INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESTUDO COMPARATIVO DO VENENO DE *Bothrops jararaca* DO
CONTINENTE E DE ESPÉCIMES DA ILHA DE SÃO SEBASTIÃO.

MARCOS ANTONIO RIBEIRO JÚNIOR

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.

Orientador:

Patrick Jack Spencer

SÃO PAULO

2008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

ESTUDO COMPARATIVO DO VENENO DE *Bothrops jararaca* DO
CONTINENTE E DE ESPÉCIMES DA ILHA DE SÃO SEBASTIÃO.

MARCOS ANTONIO RIBEIRO JÚNIOR

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.

Orientador:

Patrick Jack Spencer

SÃO PAULO

2008

Ao meu avô, exemplo de vida e à minha mãe,
sempre presente.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Patrick Jack Spencer pelo voto de confiança, amizade, incentivo e pela sua paciência em ensinar-me, sendo fundamental sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pelo fornecimento dos venenos.

À Dra. Myrian Callefo do Museu de Herpetologia do Instituto Butantan pela ajuda na obtenção dos dados dos venenos.

À Dra. Solange Serrano do Centro de Toxinologia Aplicada e à Laura P. Narvaes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan pelo fornecimento do substrato sintético para a realização de alguns experimentos.

Ao Dr. Rui Seabra do CEVAP de Botucatu pelo fornecimento do soro antibotrópico comercial.

Ao amigo Alisson T. Bucchi, do CEVAP de Botucatu pelo auxílio na análise dos géis.

Ao amigo Sandro Detoni, que me ajudou a escrever a geomorfologia da Ilha de São Sebastião.

Aos amigos “Johnny” e “Zé Maria” pelos ensinamentos, conversas, amizade e pela ampla ajuda e colaboração, auxiliando enormemente na execução deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Renata, Susana e Taís que muitas vezes pararam seus experimentos para auxiliar-me nos meus.

À Lucélia que me ensinou a montar o aparato da eletroforese corretamente.

Ao Dr. Jean Queiroz, que sempre me incentivou e ajudou, tornando-se um grande amigo.

À minha irmã Raíssa, Rodrigo e Natália pela estadia em sua residência.

À minha irmã Wanessa e ao Sérgio que muitas vezes me forneceram carona.

À Claudinha que sangra os camundongos como ninguém.

À Dra. Olga que sempre organizou festas surpresas em meu aniversário, pelo seu carinho.

Aos amigos Paulo, Naldo, Luciano, Alexandre e Rogério que tiveram o “árduo trabalho” de me aturar como hóspede no CRUSP.

Àqueles que considero irmãos pela cumplicidade, críticas sinceras, amizade e grandioso ensinamento obtido através de suas experiências na vida e na bancada, que deram-me as mãos e muitas vezes se “descabelaram” com minhas atitudes, pessoas especiais e muito importantes na realização deste trabalho e na minha vida: Alberto, Eduardo, Murilo e Janaína.

À Rosa pela sua amizade, bom humor, pelos muitos ensinamentos e por corrigir meu “portunhol”.

À “Dna. Gê” pelo café nosso de cada dia.

Ao “Seu Zé Longino” pela amizade e brincadeiras.

À Dra. Rute, pela amizade e respeito.

Às minhas “irmãs científicas” Karina e Érika pela amizade e carinho, auxílio na bancada e por agüentar meus desabafos.

Ao amigo Dr. Franco, pela amizade, companheirismo e incentivo.

À “Neidinha” pelo auxílio e por todos os cuidados com os animais do biotério no IPEN.

Ao amigo Mosca, que sempre me deu carona e pelos seus e-mails engraçados.

Ao amigo Walker pela amizade e bom humor.

A todos os orientadores do Centro de Biotecnologia do IPEN que de alguma maneira contribuíram neste trabalho.

Aos animais que contribuem para o avanço dos conhecimentos.

Aos demais amigos e companheiros de trabalho: Andrés, Perez, Geyza, Bia, Bruno, Cris, Flavinha, Felipe, Freddy, Marcos, Juliana, Simone, Caio, Paulo, Priscila, Tiago, Solange, Kelly, às Vanessas (loira e morena), Larissa, Camila, Bete, Sandra, “Zefinha”, Junqueira, “Carlão”, “Terê”, Arlete, Edna, Néia, André, Marcos, “Seu Antonio”, Calixto, “Seu Cícero”, Paolo, Nélío, Rô, André, Miriam, Danielle...e todos os demais, simplesmente por serem amigos e por fazerem das horas, agradáveis momentos no laboratório e fora deste.

Aos amigos, presentes e distantes, que de alguma maneira contribuíram na finalização de mais uma etapa da minha vida.

Ao amigo “Edão”, meu compadre, por sua amizade e auxílio.

Ao meu avô “Zezé” pela sua imensurável sabedoria e por ser um exemplo de ser humano. À minha mãe e minha avó, por serem mãe e avó e por estarem sempre presentes.

À toda minha família.

Aos meus amigos queridos “Chico” e Ane, que fizeram parte da minha vida e hoje estão junto ao Pai.

À minha namorada Viviane, pela companhia, carinho e compreensão.

Aos amigos e exemplos profissionais Gerson e Ricardo pelo incentivo e amizade.

Ao programa de Pós-Graduação da USP e do Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares e seus professores.

Ao Centro de Biotecnologia pelo espaço e por fornecer todos os subsídios necessários para a execução deste trabalho.

ESTUDO COMPARATIVO DO VENENO DE *Bothrops jararaca* DO CONTINENTE E DE ESPÉCIMES DA ILHA DE SÃO SEBASTIÃO.

Marcos Antonio Ribeiro Júnior.

RESUMO

A variabilidade na composição e nas atividades biológicas dos venenos de serpentes vem sendo documentada por diversos autores e pode ser observada em diversos níveis. As diferenças na composição dos venenos apresentam relevância na terapêutica dos envenenamentos ofídicos, tornando o estudo da variação dos venenos de extrema importância para a confecção de antivenenos mais específicos e de maior eficácia nos tratamentos de envenenamentos ofídicos em humanos. Os estudos das variações do veneno de serpentes em populações isoladas são raros, sendo no Brasil os casos mais conhecidos os da *Bothrops insularis* e *Bothrops alcatraz*. Diversos estudos sugerem que as oscilações do nível marinho, ocorridas há 11.000 anos, teriam isolado populações de serpentes nas ilhas recentemente formadas, resultando em duas diferentes rotas evolutivas que deram origem a estas espécies. Tendo em vista que a formação da Ilha de São Sebastião-SP ocorreu no mesmo período, isolando populações de animais ali existentes, nos propusemos a avaliar a variação nas atividades do veneno de 80 exemplares de serpentes *Bothrops jararaca* provenientes da ilha e da sua área de distribuição continental, comparando-as com o Veneno Referência Nacional, para as atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica indireta, hemorrágica e amidolítica, assim como de seus perfis eletroforéticos (SDS-PAGE) e seu reconhecimento pelo soro antibotrópico comercial através da técnica de Western Blot. A análise eletroforética (SDS-PAGE 12,5%) através de densitometria óptica evidenciou, em sua maioria bandas protéicas de baixo peso molecular e a presença de duas áreas majoritárias com grande variação no número, disposição e intensidade das bandas nas faixas de pesos moleculares de 45 kDa e 25 kDa. A variação da disposição das bandas apresentadas nos géis correlacionou-se com a variação nas atividades. Amostras que apresentaram baixa atividade fosfolipásica foram exatamente aquelas que apresentaram poucas e tênues bandas com aproximadamente 14 kDa. A análise das atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica e esterásica apresentou um padrão de similaridade que nos permitiu estabelecer duas grandes subpopulações de venenos; uma ao norte da distribuição geográfica amostrada, apresentando altas atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica e amidolítica e outra ao sul apresentando menores valores para tais variedades. Não foi possível estabelecer uma relação direta entre o padrão de distribuição geográfica com a variação nas atividades hemorrágicas dos venenos amostrados. A técnica de Western Blot permitiu concluir que o soro antibotrópico comercial não apresenta um bom reconhecimento para proteínas de baixo peso molecular. A análise das atividades dos venenos dos exemplares insulares apresentou similaridade com as atividades das amostras de veneno de serpentes coletadas próximas à ilha, sugerindo que o intercâmbio gênico não tenha sido de todo interrompido, provavelmente devido à sua proximidade para com o continente.

COMPARATIVE STUDY OF *Bothrops jararaca* VENOM FROM MAINLAND AND SPECIMENS OF THE ISLAND OF SÃO SEBASTIÃO.

Marcos Antonio Ribeiro Júnior.

ABSTRACT

The variability in composition and biological activities of snake venoms has been documented by several authors and can be observed in different levels. The study of the differences in venom composition is relevant for the therapeutic of snake envenoming, enabling the confection of more specific sera for the treatment of humans. The studies of snake venom variations in isolated population are scarce, and in Brazil, such studies concern mostly *Bothrops Alcatraz* and *Bothrops insularis*. Several studies suggest that the oscillations of the sea level which occurred 11,000 years ago might have isolated snake populations on the recently formed islands, resulting in two different evolutive routes which originated these species. Considering that the formation of Island of São Sebastião occurred within the same period, we decided to investigate the variability of 80 individual venom samples collected from specimens from the island and the continent, comparing these samples with the National Reference Venom for their caseinolytic, phospholipase, hemorrhagic and amidolytic activities, as well as electrophoretic profiles and immunoreactivity against the commercial anti-bothropic serum. Optical densitometry of the polyacrylamide gels indicated the presence of low molecular weight components and a molecular weight range with a high degree of variation of band number, migration pattern and intensity between 45 and 25 kDa. The variations in the electrophoretic profiles correlated with the differences observed in the enzymatic activities. Samples that presented low phospholipase activity also showed faint bands in the 14 kDa region. Taken together, the activities profiles enabled us to distinguish two distinct populations, one more to the north with higher activities, and another to the south with lower activities. There was no detectable correlation between geographic origin of the venom and hemorrhagic activity. By western blot we were able to observe the commercial anti-serum fails in recognizing the low molecular weight components. These analyses showed that the insular venoms were very similar to the venoms obtained from continental areas close to the island, suggesting that the genic flow might not have been interrupted, probably due to the close vicinity of the island and the continent.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	11
1.1- Venenos ofídicos	14
1.2- Variabilidade do veneno de serpentes	16
1.3 -O isolamento geográfico.....	18
1.4 -Algumas Considerações Sobre a Formação da Ilha de São Sebastião	19
2. OBJETIVO	22
2.1- Objetivo Geral:	22
2.2- Objetivos Específicos:	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1_Materiais e Reagentes	23
3.1.1- Animais:	23
3.1.2 – Venenos ofídicos:	23
3.1.3- Reagentes e preparos das soluções:.....	26
3.1.4- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
3.1.5- Atividade Proteolítica sobre Caseína:	28
3.1.6- Atividade Fosfolipásica:	28
3.1.7- Atividade amidolítica:	28
3.1.8- Western Blot.....	29

3.2. MÉTODOS	30
3.2.1- Plotagem da distribuição das amostras.....	30
3.2.2- Eletroforese.....	30
3.2.3- Caracterização da atividade proteolítica sobre caseína.	31
3.2.4 - Determinação da atividade fosfolipásica.....	32
3.2.5- Determinação da atividade hemorrágica.	33
3.2.6- Determinação da atividade amidolítica.	33
3.2.7- Western Blot.....	34
4. RESULTADOS	36
4.1- Eletroforese (SDS_PAGE):	36
4.2- Atividade proteolítica sobre a caseína.....	43
4.3- Atividade Hemorrágica	47
4.4- Atividade Fosfolipásica.....	53
4.5- Atividade amidolítica	57
4.6- Western Blot.....	62
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

Existem atualmente cerca de 2900 espécies de serpentes (Greene, 1997) que são incluídas em dois clados: Aletynophidia e Scolecophidia (Macdowell, 1987; Cadle, 1988; Heise *et al.*, 1995). A Infraordem Scolecophidia compreende as famílias Anomalepididae, Leptotyphlopidae e Typhlopidae, representadas por espécies de hábito fossorial, alimentando-se de pequenos invertebrados como cupins e formigas e cujo limitado ângulo de abertura bucal constitui uma característica distintiva deste grupo (Pough *et al.*, 1998). Aletynophidia compreende todos os demais representantes da subordem Serpentes, as serpentes “típicas”, que se diferenciam das anteriores pela presença de olhos bem desenvolvidos não recobertos por placas, pela capacidade de movimentação independente das mandíbulas, pela ausência da sínfise mandibular e pela ingestão de presas de tamanho superior ao seu diâmetro cefálico (Rage, 1994). Dentro desta Infraordem estão alocados os Henophidia representados pelas famílias Anilidae, Anomochilidae, Boidae, Bolyeriidae, Cyliophiidae, Erycidae, Loxocemidae, Pythonidae, Tropidophiidae, Ungaliophiidae, Uropeltidae e Xenopeltidae e os Caenophidia que compreendem as superfamílias Acrocordoidea e Colubroidea (Rieppel, 1988; Wuster *et al.*, 1997; McDiarmid *et al.*, 2001; Vidal, 2002).

A superfamília Acrocordoidea compreende apenas a família Acrochordidae enquanto Colubroidea apresenta a maior diversidade em número de espécies onde estão classificadas as famílias Atractaspididae, Colubridae, Elapidae e Viperidae, que possuem representantes capazes de inocular peçonha (Greene, 1997), dentro das quais são descritos mais de 400 gêneros e cerca de 2400 espécies (Rieppel, 1988; Vidal 2002).

De acordo com Gans (1978) e Méier & White (1995) são reconhecidas quatro séries de dentição em Colubroidea, associadas ou não a glândulas secretoras de substâncias nocivas.

As famílias Boidae e Colubridae possuem representantes cuja dentição caracteriza-se por uma série de dentes maciços e pouco diferenciados, com a função de segurar e projetar a presa para o interior do tubo digestivo. Este tipo de dentição denomina-se áglifa (*a*: ausente-*glifo*: ranhura) e não apresenta ligação com glândulas orais modificadas (FIG.1).

FIGURA 1 - Crânio de serpente áglifa, demonstrando a ausência de presas especializadas na inoculação de peçonha (MODIFICADO DE BORGES, 1999).

Atractaspididae e alguns Colubridae apresentam dentição do tipo opistóglifa (*opisto*: posterior- *glifo*: ranhura), com presas sulcadas na porção posterior do maxilar ligadas à glândulas orais modificadas conhecidas como Glândula de Duvernoy, cujas funções são a imobilização e lubrificação da presa a ser ingerida (FIG.2).

FIGURA 2 - Crânio de serpente opistóglifa, demonstrando a presença de presas especializadas na inoculação de peçonha, localizadas na porção posterior da boca (MODIFICADO DE BORGES, 1999).

A família Elapidae caracteriza-se pela presença de presas sulcadas anteriores, fixas, ligadas à glândulas de veneno com a finalidade de imobilizar e matar as presas (FIG.3).

FIGURA 3 - Crânio de serpente proteróglifa, evidenciando a presença de presas especializadas na inoculação de peçonha, localizadas na porção anterior da boca (MODIFICADO DE BORGES, 1999).

A família Viperidae apresenta dentição do tipo solenóglifa, móvel e altamente especializada, ligada à glândulas de veneno altamente desenvolvidas (FIG.4).

FIGURA 4 - Crânio de serpente solenóglifa, demonstrando a presença de presas móveis, altamente especializadas na inoculação de peçonha, implantadas na porção anterior da boca. Notar o maxilar móvel extremamente reduzido (MODIFICADO DE BORGES, 1999).

Acredita-se que durante o processo evolutivo as modificações osteológicas cranianas em Colubroidea permitiram o desenvolvimento de um complexo mecanismo de inoculação de substâncias biologicamente ativas através do desenvolvimento de glândulas secretoras orais modificadas e da especialização de presas inoculadoras (Kochva, 1978; Thomas & Pough, 1979; Russel, 1980; Kardong, 1982).

Sugere-se que, inicialmente, as secreções produzidas pelas serpentes ancestrais eram enzimas similares às secretadas pelo pâncreas, de forma a auxiliar a digestão de presas, que acabaram evoluindo, culminando no desenvolvimento de um aparato venenífero (Kochva, 1987).

A função biológica dessas secreções permitiria uma maior eficácia para a captura, subjugação e morte de presas e detenção de eventuais predadores, contribuindo decididamente para o sucesso reprodutivo da espécie (Chippaux *et al.*, 1991; Mebbs, 1999; Kardong, 2002).

A família Viperidae, dentre as famílias de serpentes atualmente conhecidas, apresenta o mais alto grau de especialização no aparelho venenífero, portando um complexo sistema de produção e estocagem de veneno, associado a modificações morfológicas importantes como uma musculatura especializada ao redor das glândulas de veneno, perda dos dentes do palato, além de presas móveis caniculadas na parte anterior do maxilar, que se elevam no momento do bote (Gans, 1968; Thomas & Pough, 1979; Kochva, 1987).

1.1 Venenos ofídicos

Segundo a definição de Russel (1980): “Venenos são substâncias tóxicas produzidas por plantas ou animais em um órgão secretor bem desenvolvido, ou mesmo, num grupo de células, as quais são liberadas durante o ato da picada ou mordida”.

Os venenos ofídicos são provavelmente os fluidos secretórios mais concentrados que se têm notícias (Stocker, 1990). Apresentam composição complexa, extremamente variável, contendo componentes orgânicos e inorgânicos.

Alguns componentes inorgânicos exercem a função de mantenedores da estabilidade estrutural de algumas proteínas presentes no veneno como, por exemplo, as metaloproteases, atuando também como catalisadores em algumas reações enzimáticas (Friederich & Tu, 1971; Bjarnason & Fox, 1988).

Dentre os componentes orgânicos destacam-se as proteínas e peptídeos, que representam acima de 90% de seu peso seco, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos (Deutsch & Diniz, 1955; Iwanaga & Suzuki, 1979; Bjarnason & Fox, 1988).

Os principais componentes tóxicos são enzimas e outras proteínas que podem levar a diversos efeitos bioquímicos, imunológicos, farmacológicos e patológicos, podendo induzir lesões no tecido local, efeito sistêmico e morbidade ou morte relacionada com a toxicidade do veneno (Rosenfeld, 1971).

Os componentes protéicos ativos presentes nos venenos de serpentes, em geral, podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os componentes

enzimáticos podemos citar as fosfolipases A₂ (PLA₂), as fosfodiesterases, metaloproteases, serinoproteases, arginina éster hidrolases, acetilcolinesterases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, dentre outras (Tan & Saifuddin, 1991; Barbosa *et al.*, 2005).

As fosfolipases A₂ são uma classe de enzimas cálcio-dependentes que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil-éster do 3-sn-fosfolipídeo, podendo ser constituídas por uma cadeia simples, com massa molecular em torno de 14 kDa (Cho *et al.*, 1988), podendo estar associada a outras moléculas que modulam a sua atividade e especificidade. Desempenham importante papel em vários processos fisiológicos como na síntese de leucotrienos e prostaglandinas, auxílio na digestão e reparo de membranas celulares. Podem ser isoladas de venenos de serpentes; secreções de mamíferos e, mais recentemente, de extratos de plantas medicinais (Lizano *et al.*, 2003).

As metaloproteases são abundantemente encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae e caracterizam-se pela presença de um íon metálico associado a um motivo estrutural altamente conservado. São divididas em quatro classes: Classe P-I com massa molecular entre 20 e 30 kDa; Classe P-II com massa molecular entre 30 e 50 kDa; Classe P-III com massa molecular entre 50 e 80 kDa e Classe P-IV, com massa molecular entre 80 e 100 kDa (Hite *et al.*, 1994; Bjarnason & Fox, 1995; Serrano & Fox, 2005). Estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento ofídico promovendo degradação de fatores da cascata da coagulação sangüínea, inibição da agregação plaquetária, necrose tecidual, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005; Serrano & Fox, 2005).

As serinoproteases encontradas nos venenos de serpentes são freqüentemente associadas a distúrbios hemostáticos devido à sua atuação nos componentes da cascata da coagulação sangüínea e do sistema fibrino(geno)lítico. Apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa, dependendo do número de glicosilações (Serrano & Maroun, 2005).

As disintegrinas são proteínas não enzimáticas presentes em venenos de viperídeos, apresentam massa molecular baixa e um motivo estrutural geralmente formado pela sequência Arginina, Glicina e Ácido aspártico que mimetiza a sequência presente em outras moléculas que interagem com integrinas plaquetárias como o fibrinogênio, assim inibindo a agregação plaquetária (Calvete *et al.*, 2005).

As lectinas do tipo C encontradas em venenos de serpentes são moléculas diméricas, com massa molecular aproximada de 30 kDa que estão envolvidas com alterações de processos hemostáticos decorrentes do envenenamento ofídico, interagindo com receptores plaquetários ou fatores da cascata da coagulação sanguínea (Zingali *et al.*, 2001).

1.2 Variabilidade do veneno de serpentes

Atualmente, estudos realizados envolvendo venenos de serpentes têm servido à sistemática, até mesmo em nível filogenético permitindo determinar novas linhas de segregações por meio do estudo do veneno de diferentes populações (Barrio & Miranda, 1966; Glenn & Straight, 1979; Rael *et al.*, 1984; Brazil, 1984).

A variabilidade na composição e nas atividades biológicas dos venenos de serpentes vem sendo documentada por diversos autores e pode ser observada em diversos níveis tais como variações interfamiliares, variações intergenéricas, variações interespecíficas, variações intraespecíficas, variações ontogenéticas, variações geográficas, variações sazonais e variações sexuais (Chippaux *et al.*, 1991; Mendoza *et al.*, 1992; Moura da Silva, 1992; Sanchez *et al.*, 1992; Tan & Ponnudurai, 1992).

A composição do veneno está relacionada ao tipo de dieta de uma determinada espécie, uma vez que uma de suas principais funções é a captura e morte das presas (Gans & Eliot, 1968; Thomas & Pough, 1979; Kochva *et al.*, 1987; Aird & Jorge da Silva, 1991, Jorge da Silva *et al.*, 1991; Cogo *et al.*, 1993; Mackessy, 1993; Daltry *et al.*, 1996).

A eficácia do veneno varia em função da suscetibilidade da presa. *Bothrops insularis*, um viperídeo de hábitos arborícolas, endêmico da Ilha da Queimada Grande, litoral sul de São Paulo, apresenta veneno mais ativo em pássaros do que em mamíferos (Cogo *et al.*, 1993), enquanto algumas espécies de serpentes marinhas apresentam toxinas pós-sinápticas, importantes para a subjugação de presas rápidas em ambiente aquático (Li *et al.*, 2005).

Daltry *et al.* (1996) sugerem que as variações geográficas na composição dos venenos de serpentes refletem uma especialização apropriada às presas locais. Em um estudo comparando os venenos de *Calloselasma rhodostoma* nascidas em cativeiro e de seus congêneres selvagens de mesma origem geográfica de seus genitores, observou-se uma similaridade entre os perfis de migração eletroforética apesar das diferenças da alimentação não natural em cativeiro e da alimentação natural, evidenciando que a relação entre o tipo de

presa e composição do veneno é herdada e não induzida, estando sob possível controle genético.

Tan *et al.* (1993) observaram diferenças entre os perfis de migração eletroforética entre os venenos de exemplares jovens e adultos de *Notechis scutatus*, entretanto observaram similaridades nas atividades bioquímicas dos venenos, atribuindo-as à dieta generalista desta espécie tanto em exemplares jovens quanto em exemplares adultos.

Gutiérrez *et al.* (1990) observaram variações ontogenéticas em algumas atividades do veneno de *Lachesis muta stenophrys*: o veneno de animais adultos apresentou-se mais proteolítico e mais letal que o veneno de animais juvenis.

Lomonte & Carmona (1992) relatam que somente os indivíduos adultos de *Bothrops asper* apresentam miotoxinas, corroborado por Chaves *et al.* (1992) que relatam atividade miotóxica apenas para exemplares adultos dessa espécie.

As variações sazonais na composição do veneno de serpentes são pouco relatadas. Gubensek *et al.* (1974) observaram diferenças entre os perfis de mobilidade eletroforética das proteínas do veneno de *Vipera ammodytes* coletado entre diferentes estações do ano, notando a ausência de duas bandas protéicas nos períodos mais frios; Detrait & Duguy (1966) relatam que o veneno de *Vipera aspis* é menos ativo no outono do que na primavera e verão.

Tan & Ponnudurai (1991) estudando o veneno de 13 diferentes espécies determinaram que, à exceção de *Bothrops alternatus* e *Bothriopsis biliniatus*, estes venenos apresentaram alta atividade proteolítica e baixa atividade fosfolipásica, sugerindo que tais diferenças nas atividades biológicas dos venenos poderiam ser utilizadas como ferramenta de distinção dentre algumas espécies.

Furtado *et al.* (1991) determinaram as atividades necrosante, edematogênica, hemorrágica, coagulante e proteolítica dos venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* demonstrando a variabilidade existente entre estas espécies.

As diferenças na composição dos venenos apresentam relevância na terapêutica dos envenenamentos ofídicos. Ribeiro & Jorge (1990) e Kamiguti *et al.* (1986), observaram diferenças no tempo de coagulação sanguínea em pacientes acidentados por indivíduos adultos e filhotes de *Bothrops jararaca*.

Warrel (1997) correlaciona a variabilidade observada nos venenos com a terapêutica dos envenenamentos e descreve diferenças nos quadros clínicos de pacientes picados por serpentes de diferentes idades.

O conhecimento da variação dos venenos é de extrema importância na confecção de antivenenos mais específicos e de maior eficácia nos tratamentos de envenenamentos ofídicos em humanos (Chippaux *et al.*, 1991).

1.3 O isolamento geográfico

Os ambientes insulares constituem um dos ecossistemas mais desafiantes para a sobrevivência das comunidades de plantas e animais.

Muitos estudos geraram novos conhecimentos a respeito da dinâmica insular, tais como o papel da área reduzida na diversidade de espécies, a função do isolamento geográfico e da origem das ilhas na composição da biota. Neste sentido, cada ilha pode ser considerada como um ecossistema individualizado.

Características como a composição da fauna e da flora insular, assim como dos aspectos geomorfológicos presentes nas ilhas fornecem subsídios importantes para os estudos da ecologia e evolução decorrentes de eventos climáticos e geológicos ocorridos.

O litoral brasileiro possui um grande número de ilhas, ilhotas e lajes, em sua maioria de tamanho reduzido e origem diversificada (Silveira, 1964).

O litoral do Estado de São Paulo enquadra-se no chamado Litoral de Sudeste, que abrange do sul do sul do Estado do Espírito Santo ao cabo de Santa Marta em Santa Catarina, cuja costa forma um arco que tem sua origem associada à gênese da Serra do Mar, à formação de bacias oceânicas e às flutuações do nível do mar ocorridas há cerca de 11.000 anos, no período subsequente ao da última glaciação (Suguio *et al.*, 1985; Benett & Glasser, 1996).

As oscilações do nível do mar foram decorrentes do derretimento das calotas de gelo continentais, fazendo com que porções de massas continentais fossem submersas, isolando partes da extensão continental e formando as ilhas presentes no litoral brasileiro (Suguio *et al.*, 1985; Suguio & Sallun, 2004).

Populações endêmicas de ilhas formam um bom modelo de estudo de evolução, principalmente através de sua comparação com espécimes similares continentais (Marques *et al.*, 2002).

Devido ao número de espécies, estudos das variações intraespecíficas dos componentes dos venenos de serpentes ainda são relativamente escassos (Chippaux *et al.*, 1991), e estudos de variação em populações isoladas são raros, sendo no Brasil os casos mais conhecidos os da *Bothrops insularis* e *Bothrops alcatraz*. Estas espécies são restritas às Ilhas da Queimada Grande e de Alcatrazes, respectivamente, localizadas no litoral paulista, e as características de seu veneno já foram objeto de investigação em vários trabalhos (Junqueira de Azevedo, 2001, Narvaes, 2007). Grazziotin *et al.* (2006) sugerem que as oscilações do nível marinho, ocorridas no Pleistoceno há 11.000 anos, isolaram populações de serpentes nas ilhas recentemente formadas, resultando em duas diferentes rotas evolutivas que deram origem a estas espécies.

1.4 Algumas Considerações Sobre a Formação da Ilha de São Sebastião

Com uma área de 336 km², ilha de São Sebastião é a principal ilha do arquipélago da Ilhabela. Esse arquipélago localiza-se no Litoral Norte do Estado de São Paulo, entre as seguintes coordenadas geográficas: 23° 40'S a 24° S e 45°W a 45° 30'W (FIG.5).

A origem da estrutura geológica da Ilha de São Sebastião correlaciona-se aos processos de formação do Planalto Atlântico. Esse Planalto ocorre numa faixa de orogênese antiga, denominada Cinturão Orogênico do Atlântico, onde predominam relevos residuais compostos por estruturas litológicas diversificadas. Essas estruturas compõem-se, sobretudo, de rochas metamórficas associadas às rochas intrusivas. Nesse contexto, as Serras encontradas no Planalto Atlântico são, na maioria das vezes, resíduos de estruturas dobradas intensamente que foram atacadas por processos erosivos.

FIGURA 5 - Localização do Município de Ilhabela, Estado de São Paulo.

A gênese do Cinturão Orogênico do Atlântico decorre de vários ciclos de dobramentos que foram acompanhados de metamorfismos regionais, falhamentos e extensas intrusões. A fase orogenética ocorreu no Pré-Cambriano e foi sucedida por diversos ciclos de erosão. Os granitos, gnaisses e granito-gnaisses existentes na Ilha de São Sebastião correspondem a essa fase.

No Jurássico Superior, ocorreu uma reativação de falhas antigas e diversos eventos magmáticos que foram denominados de Reativação Wealdeniana, a fase de tectonismo perdurou até o Cretáceo Médio. Assim, entre o Pós-cretáceo e até, aproximadamente, o Terciário Médio, a região passou por uma fase epirogenética que soergueu a plataforma sul-americana e reativou os falhamentos antigos, seguidos por eventos de vulcanismo. Tal reativação produziu as escarpas da Serra do Mar e da Mantiqueira e a fossa tectônica do Vale do Paraíba do Sul.

Uma vez que as Ilhas de São Sebastião, Alcatrazes e Queimada Grande tem a mesma origem geológica e foram separadas do continente no mesmo período, e tendo-se

observado que as espécies *Bothrops insularis* e *Bothrops alcatraz* sofreram especiação no período compreendido entre a última elevação do nível do mar e os dias de hoje (cerca de 11.000 anos), seria perfeitamente plausível que populações de serpentes de outras ilhas da região também estivessem sofrendo processos de diferenciação em relação a espécie continental. Uma vez que caracteres morfológicos têm se mostrado pouco eficazes para este tipo de avaliação (*Bothrops alcatraz* é morfológicamente similar a um exemplar juvenil de *Bothrops jararaca*), uma análise do veneno, principal ferramenta de predação das serpentes peçonhentas permitiria detectar possíveis diferenças que por sua vez evidenciariam alterações na dieta, resultantes da escassez de presas abundantes no ambiente continental. Assim, no presente trabalho, nos propusemos a analisar comparativamente venenos de serpentes da ilha e de várias regiões continentais, comparando os com o veneno referencia nacional.

2- OBJETIVO

2.1- *Objetivo Geral:*

Caracterizar as variações nas atividades enzimáticas e bioquímicas do veneno de *Bothrops jararaca* individualmente coletadas ao longo de sua distribuição continental e de uma população isolada na Ilha de São Sebastião-SP, utilizando-se o Veneno Referência Nacional como parâmetro de comparação.

2.2- *Objetivos Específicos:*

- Analisar qualitativamente os venenos individuais através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) avaliados por densitometria óptica.
- Caracterizar a atividade hemorrágica dos venenos individuais.
- Avaliar os venenos individuais quanto às suas atividades enzimáticas proteolítica sobre caseína, fosfolipásica e amidolítica.
- Avaliar a reatividade dos venenos individuais frente ao soro antibotrópico comercial através da técnica de Western Blot.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Materiais e Reagentes

3.1.1- Animais:

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, pesando entre 18 e 22 g, provenientes do Biotério do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN/SP, mantidos em caixas plásticas com meio absorvente, recebendo água e ração *ad libitum* e período de luz de 12 horas. A manipulação destes animais, antes e durante os ensaios, esteve de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratório (NIH publ. N° 86-23, revisado em 1985) e com os princípios de ética de experimentação animal (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.1.2 – Venenos ofídicos:

Os venenos individuais de *Bothrops jararaca* coletadas ao longo de sua distribuição geográfica continental e de exemplares provenientes da Ilha de São Sebastião – SP, assim como o Veneno Referência Nacional, preparado a partir das extrações individuais de 2.000 espécimes, procedentes de toda a área de distribuição geográfica da espécie, aqui utilizado como parâmetro de comparação para as atividades testadas, foram fornecidos pela Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

Os venenos foram obtidos na forma liofilizada e foram mantidos em freezer (-20 °C) até o momento do uso. Destes, 40 amostras são oriundas das extrações de 40 exemplares de *Bohtrops jararaca* provenientes da Ilha de São Sebastião-SP e 40 amostras das extrações de 40 exemplares oriundos do continente em função de sua distribuição geográfica, conforme TAB.1 e 2.

TABELA 1 –Localidades, comprimentos rostro-anal/ cauda, pesos e sexos dos exemplares de *Bothrops jararaca* amostrados.

Protocolo	Procedência	Estado	Comprimento	Peso (g)	Sexo
			rostro-anal/calda (mm)		
BJ IB 9471-1	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9504 -	Ilha de São Sebastião	SP	370+55	20	Mac.
BJ IB 9515 - 3	Ilha de São Sebastião	SP	800+150	175	Fem.
BJ IB 9521 - 3	Ilha de São Sebastião	SP	560+ 90	45	Mac.
BJ IB 9522 -	Ilha de São Sebastião	SP	720+130	75	Mac.
BJ IB 9524 -	Ilha de São Sebastião	SP	480 + 90	30	Mac.
BJ IB 9526 - 4	Ilha de São Sebastião	SP	700+120	120	Fem.
BJ IB 9532 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9538 - 2	Ilha de São Sebastião	SP	632+85	70	Fem.
BJ IB 9546 - 5	Ilha de São Sebastião	SP	580+90	42	Mac.
BJ IB 9547 - 2	Ilha de São Sebastião	SP	680+120	172	Mac.
BJ IB 9548 - 2	Ilha de São Sebastião	SP	560+100	34	Fem.
BJ IB 9556 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9602 -	Ilha de São Sebastião	SP	580 + 110	45	Mac.
BJ IB 9610 -2	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 96104 -	Ilha de São Sebastião	SP	730-120	68	Fem.
BJ IB 96126 -	Ilha de São Sebastião	SP	430 + 70	23	Fem.
BJ IB 96127 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9616 - 3	Ilha de São Sebastião	SP	710+120	105	Mac.
BJ IB 9618 -2	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9619 - 1	Ilha de São Sebastião	SP	860-150	120	Mac.
BJ IB 9656 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9661 - 1	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9666 - 2	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9670 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9671 - 1	Ilha de São Sebastião	SP	370+60	20	Fem*.
BJ IB 9672 - 5	Ilha de São Sebastião	SP	759-120	146	Mac.
BJ IB 9673 - 1	Ilha de São Sebastião	SP	970+110	325	Fem.
BJ IB 9708 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9709 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9710 -	Ilha de São Sebastião	SP	800 + 110	110	Fem.
BJ IB 9711 -	Ilha de São Sebastião	SP	700 + 110	65	Mac.
BJ IB 9725 -	Ilha de São Sebastião	SP	625+105	55	Mac.
BJ IB 9730 -	Ilha de São Sebastião	SP	780 + 110	60	Fem.
BJ IB 9731 -	Ilha de São Sebastião	SP	747+110	81	Fem.
BJ IB 9753 - 4	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9754 - 2	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *
BJ IB 9804 -	Ilha de São Sebastião	SP	710+110	80	Mac.
BJ IB 9815 -	Ilha de São Sebastião	SP	790+110	130	Fem.
BJ IB 9858 -	Ilha de São Sebastião	SP	d.n.n. *	d.n.n. *	d.n.n. *

* d.n.n. – Dado não notificado.

Fem.- Fêmea.

Mac. – Macho.

TABELA 2 – Localidades, comprimentos rostro-anal/ cauda, pesos e sexos dos exemplares de *Bothrops jararaca* amostrados.

Protocolo	Procedência	Estado	Comprimento	Peso (g)	Sexo
			rostro-anal/calda (mm)		
BJ 20/10/00 A	Joanópolis	SP	630-90	75	Fem.
BJ 20/10/00 B	Colônia Paulista	SP	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 20/10/00 C	Piedade	SP	950-160	280	Fem.
BJ 20/10/00 D	Ibiúna	SP	1140-160	605	Fem.
BJ 20/10/00 E	Cotia	SP	1060-150	395	Fem.
BJ 990625 - 7	Atibaia	SP	760-90	30	Fem.
BJ 990629 - 7	Pedro Toledo	SP	1070-130	170	Mac.
BJ 990702 - 2	Pindamonhangaba	SP	890-120	110	Mac.
BJ 990914-1	Iguape	SP	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 990917 - 23	Ubatuba	SP	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 9912 -	Pedro Toledo	SP	760-90	66	Fem.
BJ 9617-2	São Sebastião	SP	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 9654-2	Boiçucanga	SP	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 890629-5	Pedro Toledo	SP	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 990702-4	São João Mor	SP	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 981215 - 1	Estiva	MG	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 990625 - 1	Extrema	MG	1200-140	506	Fem.
BJ 990810 - 1	Bocaina de Minas	MG	1103-140	450	Fem.
BJ 9914	Papanduva	SC	870-150	207	Mac.
BJ 990702 - 6	São Bento do Sul	SC	840-140	295	Mac.
BJ 990706 - 3	São Bento do Sul	SC	760-100	85	Mac.
BJ 990706 - 6	São Bento do Sul	SC	980-140	175	Mac.
BJ 990917 - 10	Papanduva	SC	830-110	100	Mac.
BJ 990917 - 5	Caçador	SC	850-100	95	Mac.
BJ 9916 -	Papanduva	SC	340-50	10	Mac.
BJ 9917-10	Papanduva	SC	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 9916 -	Papanduva	SC	970-110	170	Fem.
BJ 9918	Papanduva	SC	970-110	170	Fem.
BJ 000120-1	São Miguel Iguaçu	PR	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 990625 - 5	Apucarana	PR	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 990625 - 6	Apucarana	PR	980-110	165	Fem.
BJ 990629 - 2	União da Vitória	PR	1090-130	290	Fem.
BJ 990629 - 4	União da Vitória	PR	910-120	130	Mac.
BJ 990914 - 5	Machado Cruz	PR	960-110	155	Fem.
BJ 990914 - 6	Machado Cruz	PR	1055-125	250	Fem.
BJ 990917 - 6	Machado Cruz	PR	950-120	150	Fem.
BJ 990917 - 7	Machado Cruz	PR	1070-120	340	Fem.
BJ 990917 - 8	Machado Cruz	PR	870-100	120	Mac.
BJ 990628-3	União da Vitória	PR	1160-130	340	Fem.
BJ 990917-9	Machado Cruz	PR	d.n.n.*	d.n.n.*	d.n.n.*
BJ 9911 -	Campo Mourão	PR	640-70	65	Mac.

* d.n.n. – Dado não notificado.

Fem.- Fêmea.

Mac. – Macho.

O soro antibotrópico comercial, lote 0609168/B, foi fornecido pelo Dr. Rui Seabra do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos- CEVAP/UNESP- Botucatu.

3. 2- Reagentes e preparos das soluções:

3.2.1- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Tampão de Concentração 0,25 M Tris/HCl- pH 6,8:

Tris (hidroximetil) amino metano (Nuclear - Brasil).....	7,575 g
SDS (dodecil-sulfato de sódio).....	0,5 g
Água destilada q.s.p.....	250 mL

* Ácido clorídrico (Nuclear - Brasil) para o ajuste do pH.

Tampão de Separação 0,75 M Tris/HCl - pH 8,8:

Tris (hidroximetil) amino metano (Nuclear - Brasil).....	22,725 g
SDS	0,5 g
Água destilada q.s.p.....	250 mL

* Ácido clorídrico para o ajuste do pH.

Acrilamida - Bis - Acrilamida:

Acrilamida (Sigma - USA).....	29,2 g
Bis-Acrilamida (Sigma - USA).....	0,8 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Tampão de Corrida - pH 8,3:

Tris (hidroximetil) amino metano (0,025 M).....	18,2 g
Glicina (0,192 M) (Nuclear- Brasil).....	86,4 g
SDS (0,1%).....	6,0 g
Água destilada q.s.p.....	6.000 mL

Tampão de Amostra – 0,0625 M- Tris-HCl- pH 6,8:

Tampão de concentração 0,25 M - pH 6,8	5,0 mL
SDS 10%.....	4,0 mL
Glicerol 20 %.....	2,0 mL
Azul de bromofenol 0,02% (Inlab- Brasil).....	2,0 mg
Água destilada q.s.p.....	10 mL

Outros Reagentes:

Persulfato de amônio 10% (LKB Bromma- Suécia).

N, N, N',N' - tetrametil 1,2 diamino metano (TEMED) (Sigma- USA).

Preparação dos Géis**Gel de Resolução (12,5%):**

Solução de resolução.....	3,75 mL
Acrilamida-Bis-Acrilamida.....	6,25 mL
Água destilada	4,75 mL
S.D.S 20%	75 µL
Persulfato de amônio 10%	70 µL
TEMED	35 µL

Gel de Empilhamento (4%):

Solução de empilhamento.....	3,75 mL
Acrilamida-Bis-Acrilamida.....	2,0 mL
Água destilada	9,5 mL
S.D.S 20%	75 µL
Persulfato de amônio 10%	70 µL
TEMED	35 µL

Coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250

Solução Corante:

Etanol (Merck- Brasil)	450 mL
Ácido acético (Synth- Brasil).....	100 mL
Água destilada q.s.p.....	1.000 mL
Corante Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck - Brasil).....	5,0 g

Solução Descorante:

Etanol (Merck- Brasil).....	300 mL
Ácido acético	100 mL
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

3.2.2- Atividade Proteolítica sobre Caseína:

Substrato Caseína (Merck-Brasil) solução 1% em PBS.....	500 mL
Ácido Tricloroacético (Reagen-Brasil) 5%.....	500 mL

3.2.3- Atividade Fosfolipásica:

Cloreto de Cálcio 10 mM (CaCl₂ 10 mM):

Cloreto de cálcio di-hidratado (Reagen-Brasil).....	147mg
Água destilada q.s.p.	100 mL

3.2.4- Atividade amidolítica:

Tris-HCl 0,1M pH 8,0:

Tris hidroxiaminometano (Sigma-Brasil).....	12,1 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

* Ácido clorídrico para o ajuste do pH.

3.2.5- *Western Blot*

Solução Tampão Fosfato de Sódio (PBS) (estoque-concentração 10X):

Cloreto de Sódio (Nuclear- Brasil)	82,0 g
Cloreto de Potássio (Nuclear- Brasil).....	2,0 g
Fosfato de Sódio di-básico (Nuclear- Brasil).....	10,5g
Fosfato de Potássio bi-hidratado (Nuclear-Brasil).....	2,0g
Água destilada q.s.p.....	1.000 mL

Solução de Bloqueio (PBS 1% / BSA 5%):

Leite em pó desnatado	5,0 g
Tampão PBS	100 mL

Tampão de Lavagem

Tampão PBS	1.000 mL
------------------	----------

Solução do 3,3' Diaminobenzidina (DAB):

DAB (3,3' Diaminobenzidina) (Sigma-USA)	50,0 mg
Tampão PBS	30 mL
Água oxigenada 30% (Nuclear-Brasil).....	20 µL

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Plotagem da distribuição das amostras.

Para a plotagem da distribuição das amostras na área de distribuição amostrada foi utilizado o software ArcMap[®].

3.2.2- Eletroforese.

A eletroforese é uma técnica laboratorial que possibilita a separação ou fracionamento de materiais de origem orgânica tal como proteínas, enzimas, DNA e RNA, com cargas elétricas definidas por pHs específicos através de sua migração através dos poros de um gel, em resposta a um campo elétrico.

Para análise dos padrões eletroforéticos das amostras individuais de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional foi utilizado o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguindo o método descrito por Laemli (1970). Os géis foram preparados nas concentrações de 12,5 % para o gel de separação e 4% para o gel de concentração (conforme o item 3.3.1 de Material e Métodos). Foi utilizado equipamento MightySlim SX250 da Hoefer[®]. Utilizou-se géis de 8x 10 cm e a separação foi realizada com voltagem constante de 90 V. Foram aplicados 40 µg em 25 µL de solução de veneno diluído em tampão de amostra na ausência de β-Mercaptoetanol após fervura a 70 °C durante 5 minutos.

Em todos os géis foram aplicadas uma amostra do Veneno Referência Nacional, utilizado como parâmetro de comparação geral, uma amostra do marcador de peso molecular comercial Precision Plus, Biorad[®] sendo seus valores de referência 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa, respectivamente, mais as amostras individuais do veneno de *Bothrops jararaca*.

Após o término das corridas, os géis foram imediatamente corados com solução corante de Coomassie Brilliant Blue (conforme Materiais, item 3.3.1 de Material e Métodos) durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida os géis foram lavados com solução descorante etanol/ ácido acético (30/10%). Posteriormente os géis foram submetidos à densitometria óptica utilizando-se o aparelho de captura de imagens VDS[®] e software IMAGE MASTER VDS 32[®] da Amersham-Pharmacia[®].

3.2.3 – Caracterização da atividade proteolítica sobre caseína.

As proteases, contidas no veneno de serpentes, podem atuar em uma série de substratos e estão envolvidas nos mecanismos de digestão e degradação protéica, coagulação sangüínea, fibrinólise e ativação do sistema complemento, sendo responsáveis pelos quadros de hemorragia, dor e necrose tecidual observados nos envenenamentos ofídicos.

O ensaio de atividade proteolítica sobre caseína evidencia a clivagem da caseína pelas enzimas proteolíticas presentes no veneno, fazendo com que os peptídeos resultantes da clivagem permaneçam em suspensão após precipitação com ácido tricloroacético, de modo que o sobrenadante obtido após centrifugação das amostras incubadas com uma solução de caseína possa ser medido com relação à sua absorbância a 280 nm. As proteínas não clivadas precipitam, tornam-se insolúveis e são separadas do sobrenadante por centrifugação. Os peptídeos clivados pela ação das proteases contidas nas amostras permanecem no sobrenadante após a centrifugação.

Para a determinação da atividade proteolítica dos venenos individuais de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional foi utilizado o método de Kunitz (1947) modificado por Lomonte & Gutierrez (1983). Para tal, brevemente 1mL das amostras individuais e do Veneno Referência Nacional na concentração de 1mg/mL foram incubadas com 1 mL de caseína 1% em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, durante 30 minutos a 37 °C.

A fração não hidrolisada foi então precipitada pela adição de 3 mL de ácido tricloroacético 5% , os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente submetidos à centrifugação a 14.000 rpm em centrífuga simples de bancada Eppendorf® 5810R a 4°C durante 15 minutos sendo a densidade óptica dos sobrenadantes determinada em um espectrofotômetro Ultrospec III, Pharmacia- Biotech® a 280 nm.

As amostras foram avaliadas em duplicata e como controle negativo foi substituída a amostra pela adição de solução salina 0,9%.

A unidade caseinolítica foi expressa em unidades por mg de veneno, obtida pela fórmula:

$$U/mg = A_{280\text{ nm}} \times 100 / \text{mg veneno}.$$

Uma vez determinada a atividade proteolítica do Veneno Referência Nacional foram realizados cálculos percentuais de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

3.2.4 – Determinação da atividade fosfolipásica.

As fosfolipases são enzimas que catalisam a hidrólise dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares, liberando quantidades equimolares de ácidos graxos e lisofosfolipídios que por sua vez promovem a lise celular. Neste trabalho utilizou-se o método da hemólise indireta (Mancuso *et al.*, 1984) para a determinação da atividade fosfolipásica dos venenos individuais de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional. Esse método utiliza uma solução aquosa de gema de ovo contendo eritrócitos murinos. As fosfolipases na presença dos fosfolipídios contidos na solução de gema de ovo liberam lisofosfolipídios, que, por sua vez, induzem o rompimento das membranas dos eritrócitos, desta forma a atividade hemolítica indireta corresponde à atividade fosfolipásica estudada.

Para a preparação da suspensão de eritrócitos foram utilizados 2 mL de sangue murino coletado com EDTA 250 mM. submetido à centrifugação a 1.000 rpm em centrífuga de bancada Eppendorf® 5810R a 14 °C durante 10 minutos, foi separado o plasma e as hemáceas foram lavadas 3 vezes (1 volume de hemáceas para 2 volumes de solução de lavagem) com tampão fosfato de sódio 0,001 M pH 7,2. Após a lavagem dos eritrócitos preparou-se uma suspensão a 2,5% em tampão PBS pH 7,4.

Para a emulsão aquosa de gema de ovo utilizou-se uma gema de ovo dissolvida em 100 mL de água destilada.

Para a realização deste ensaio foram utilizados 10 µL das amostras, 50 µL de CaCl₂ 10 mM, 0,6 mL da suspensão de eritrócitos, 25 µL da emulsão de gema de ovo, elevando-se o volume para 3,0 mL com tampão PBS.

Os tubos foram mantidos a 37°C durante 30 minutos e posteriormente submetidos à centrifugação em centrífuga simples de bancada Eppendorf® 5810R a 2.500 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi retirado e submetido à leitura em um leitor de placas Dynatech® MR 4.000 a 540 nm.

A unidade hemolítica corresponde a um aumento de 0,001 de absorbância em 540 nm por minuto de reação.

Uma vez determinada a atividade fosfolipásica do Veneno Referência Nacional foram realizados cálculos percentuais de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

3.2.5 - Determinação da atividade hemorrágica.

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* podem causar hemorragias, locais ou sistêmicas. A hemorragia, nesse caso, é provocada pela ação de toxinas denominadas hemorraginas, que agem sobre os vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando, posteriormente, sua ruptura.

Para a determinação da atividade hemorrágica das amostras individuais do veneno de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional foi utilizado o método de Kondo *et al.* (1960), modificado por Gutiérrez *et al.* (1985). Para tanto, foram aplicados intradermicamente 10 µg de veneno em 100 µL de solução salina 0,9% na região dorsal de camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 18 e 22 g.

Como controle negativo foram aplicados 100 µL de solução salina 0,9%

Após 2 horas os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, tendo sua pele rebatida e o diâmetro dos halos hemorrágicos medidos pela face interna, em mm², conforme ilustra a FIG.6.

Uma vez determinada a atividade hemorrágica do Veneno Referência Nacional, foram realizados cálculos percentuais de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

FIGURA 6 - Pele rebatida do dorso de camundongo Swiss macho sacrificado em câmara de CO₂, após a aplicação intradérmica de 10 µg do veneno de *Bothrops jararaca* evidenciando halo hemorrágico.

3.2.6- Determinação da atividade amidolítica.

Para a determinação da atividade amidolítica das amostras individuais do veneno de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional foi utilizado o princípio geral descrito

por Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o composto peptídico cromogênico sintético L-BAPA[®]. (N-Benzoil-L-Arg-pNA).

Os ensaios foram realizados em um sistema contendo 150 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo 10 µL da solução de veneno na concentração de 2mg/mL e 40 µL do substrato diluído para uma concentração de 1,0 mM em Tris-HCl-DMSO 10%.

Após incubação a 37°C, a reação foi submetida à leitura fotométrica em espectrofotômetro Spectra Max 190 da Molecular Devices Brasil[®] a 405 nm, em intervalos de 15 minutos.

A unidade de atividade foi determinada como a quantidade de veneno, em mg, que libera 1mmol de p-nitroanilina/minuto.

Uma vez determinada a atividade amidolítica do Veneno Referência Nacional, foram realizados cálculos percentuais de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

3.2.7- Western Blot.

O Western blot é uma técnica laboratorial que permite detectar a presença de determinadas proteínas em uma solução contendo material biológico. Essa técnica utiliza a eletroforese em gel para separar as proteínas por massa que são posteriormente transferidas para uma membrana, tipicamente de nitrocelulose, sendo então esta incubada com anticorpos primários específicos para proteínas da amostra e posteriormente o complexo antígeno-anticorpo é detectado por meio de um segundo anticorpo acoplado a uma enzima que reage com um substrato específico, promovendo precipitação de um cromóforo adicionado ao meio reacional nas bandas imunoreativas. Amostras das diversas subpopulações de veneno previamente identificadas (caracterizadas) por eletroforese amostra foram aplicadas (40 µg) em um gel a 12,5%. Uma vez terminada a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas em sistema “semi-dry” para uma membrana de nitrocelulose (0,22µ). A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em tampão PBS por uma hora. A membrana foi então incubada com soro antibotrópico comercial (lote 0609168/B) diluído 1:1000 em PBS por uma hora. Após 04 lavagens com PBS, a membrana foi incubada por 90 minutos com IgG de carneiro anti-IgG de cavalo (1:5000 em PBS) conjugada com peroxidase. Depois de 4 lavagens, a reação foi revelada pela adição de substrato/cromógeno (H₂O₂ 0,2% / 3,3-

diaminobenzidina 0,03% em PBS). Após aparecimento das bandas, a reação foi interrompida por lavagem exaustiva da membrana em água destilada.

4- RESULTADOS

4.1 - Eletroforese (SDS_PAGE):

A análise do perfil de migração eletroforética das amostras individuais do veneno de *Bothrops jararaca* apontou para perfis em geral, semelhantes (FIG.7 a 12).

Todas as amostras apresentaram predominantemente, componentes de baixo peso molecular, a maioria abaixo de 65 kDa. Nos padrões para as 80 amostras dos espécimes continentais e insulares foi possível identificar a presença de até 26 diferentes bandas protéicas.

Duas regiões foram conservativas em todas as amostras com pesos moleculares de aproximadamente 45 kDa e 25 kDa respectivamente, com variações no número e disposição de bandas entre essa faixa de peso .

Bandas protéicas apresentando peso molecular entre 65 kDa e 100 kDa também apresentaram-se de forma variável, sendo observadas variações em seu número e sua disposição.

As bandas protéicas de alto peso molecular observadas em todas as amostras testadas abrangeram os pesos moleculares entre 75 kDa a 250 kDa. Dentre estas, as bandas protéicas mais observadas abrangeram os pesos moleculares aproximados a 75 kDa, 100 kDa, 120 kDa, 150 kDa e 250 kDa ocorrendo em 35%, 62,5%, 8,75%, 41,25% e 13,75% do total de amostras, respectivamente.

As bandas protéicas de peso molecular baixo a médio mais observadas compreenderam os pesos moleculares aproximados a 10 kDa, 12 kDa, 15 kDa , 20 kDa, 25 kDa, 37 kDa , 50 kDa e 65 kDa ocorrendo em 43,75%, 22,5%, 18,75%, 25%, 31,25%, 47,5%, 31,25% e 10 % do total de amostras, respectivamente.

Nos padrões das 40 amostras individuais dos exemplares oriundos da Ilha de São Sebastião-SP, foi observada uma variação entre 07 e 16 bandas protéicas.

As amostras oriundas do Estado de São Paulo apresentaram uma variação entre 05 e 15 bandas, enquanto o Estado de Minas Gerais apresentou entre 08 e 12 bandas e os estados do Paraná e de Santa Catarina apresentaram uma variação entre 06 e 13 bandas protéicas.

FIGURA 7 - Análise densitométrica de SDS-PAGE 12,5%, sob condições de não redução. Amostras oriundas do Estado de São Paulo. (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência Nacional, (C) BJ 890629-5, (D) BJ 990629-7, (E) BJ 9912, (F) BJ 990702-2, (G) 990702-4, (H) BJ 20/10/00-D, (I) BJ 20/10/00-E, (J) BJ 20/10/00-A, (K) BJ 990625-7, (L) BJ 20/10/00-C, (M) BJ 990914-1, (N) BJ 9617-2, (O) BJ 990917-23, (P) BJ 9654-2.

FIGURA 8 - Análise densitométrica de SDS-PAGE 12,5%, sob condições de não redução. Amostras oriundas do Estado do Paraná. (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência Nacional, (C) BJ 990914-5, (D) BJ 990914-6, (E) BJ 990917-6, (F) BJ 990917-7, (G) BJ 990917-8, (H) BJ 990917-9, (I) BJ 990628-3, (J) BJ 990629-2, (K) BJ 990629-4, (L) BJ 990625-5, (M) BJ 990629-6, (N) BJ 9911, (O) BJ 000120-1.

FIGURA 9 - Análise densitométrica de SDS-PAGE 12,5%, sob condições de não redução. Amostras oriundas dos estados de Minas Gerais (C a E) e de Santa Catarina (F a L). (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência Nacional, (C) BJ 990810-1, (D) BJ 981215-1, (E) BJ 990625-1, (F) BJ 9914, (G) BJ 9916, (H) BJ 9917, (I) BJ 990917-10, (J) BJ 990702-6, (K) BJ 990706-3, (L) BJ 990706-6.

FIGURA 10 - Análise densitométrica de SDS-PAGE 12,5%, sob condições de não redução. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência Nacional, (C) BJ IB 9532, (D) BJ IB 96126, (E) BJ IB 9619-1, (F) BJ IB 9661-1, (G) BJ IB 9711, (H) BJ IB 9546-5, (I) BJ IB 9858, (J) BJ IB 9521-3, (K) BJ IB 9804, (L) BJ IB 9504, (M) BJ IB 9515-3, (N) BJ IB 9618-2, (O) BJ IB 9556.

FIGURA 11 - Análise densitométrica de SDS-PAGE 12,5%, sob condições de não redução. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência Nacional, (C) BJ IB 9524, (D) BJ IB 9526-4, (E) BJ IB 9610-2, (F) BJ IB 9616-3, (G) BJ IB 9656, (H) BJ IB 9671-1, (I) BJ IB 9673-1, (J) BJ IB 9708, (K) BJ IB 9709, (L) BJ IB 9710, (M) BJ IB 9730, (N) BJ IB 9731, (O) BJ IB 9753-4, (P) BJ IB 9815.

FIGURA 12 - Análise densitométrica de SDS-PAGE 12,5%, sob condições de não redução. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência Nacional, (C) BJ IB 9471, (D) BJ IB 9522, (E) BJ IB 9526-4, (F) BJ IB 9538-2, (G) BJ IB 9547-2, (H) BJ IB 9548-2, (I) BJ IB 9754-2, (J) BJ IB 9602, (K) BJ IB 9670, (L) BJ IB 9672-5, (M) BJ IB 96104, (N) BJ IB 96127, (O) BJ IB 9666-1, (P) BJ IB 9725.

4.2 - Atividade proteolítica sobre a caseína

Para a determinação da atividade proteolítica dos venenos individuais de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional foi utilizado o método descrito no item 3.2.3 de Material e Métodos.

Tendo sido determinada a atividade proteolítica do Veneno Referência Nacional, esta foi convertida em valores percentuais, considerada como sendo 100 % de atividade, valor a partir do qual foram realizados cálculos percentuais para os valores de atividade obtidos nas demais amostras, de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

Das 40 amostras individuais analisadas dos exemplares continentais de *Bothrops jararaca*, 22 amostras (55%) apresentaram atividade proteolítica percentual sobre caseína entre 50 e 80% quando comparadas aos valores de atividade do Veneno Referência Nacional. A atividade proteolítica percentual sobre caseína mostrou-se similar ao Veneno Referência (entre 90 a 110% de atividade percentual) em 09 amostras (22,5%). Apenas 06 amostras (15%) apresentaram atividade superior àquela do veneno referência.

O Estado de São Paulo (FIG.13) apresentou o maior número de amostras com atividade proteolítica percentual sobre a caseína similar ou superior ao Veneno Referência (22,5%) enquanto Paraná (FIG.15) e Santa Catarina (FIG.16) apresentaram 02 (5%) e 03 (7,5%) amostras com atividade proteolítica percentual sobre caseína superior ou similar ao Veneno Referência.

Observou-se um maior número de amostras com atividade proteolítica percentual sobre caseína inferior ao Veneno Referência nos Estados do Paraná, 11 amostras (27,5%) e Santa Catarina, 07 amostras (17,5%).

O Estado de Minas Gerais apresentou amostras com atividade proteolítica percentual sobre caseína, em geral próximas ao Veneno Referência (FIG.14).

Dentre as 40 amostras individuais analisadas dos exemplares insulares de *Bothrops jararaca*, 15 amostras (37,5%) apresentaram atividade proteolítica percentual sobre caseína entre 50 a 80 % de atividade quando comparadas ao Veneno Referência (FIG.17 e 18).

A atividade proteolítica percentual sobre caseína mostrou-se similar ao Veneno Referência (entre 90 a 110% de atividade percentual) em 19 amostras (47,5%). Amostras com atividade proteolítica percentual sobre caseína superior ao Veneno Referência foram observadas em 10% das amostras.

A distribuição geográfica das amostras testadas encontra-se na FIG.19.

FIGURA 13 - Atividade proteolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de São Paulo. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 20/10/00-A, (C) BJ 20/10/00-B, (D) BJ 20/10/00-C, (E) BJ 20/10/00-D, (F) BJ 20/10/00-E, (G) BJ 890629-5, (H) BJ 9617-2, (I) BJ 9654-2, (J) BJ 990625-7, (K) BJ 990629-7, (L) BJ 990702-2, (M) BJ 990702-4, (N) BJ 990914-1, (O) BJ 990917-23, (P) BJ 9912, (Q) Atividade média das amostras.

FIGURA 14 - Atividade proteolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Minas Gerais. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 981215-1, (C) BJ 990625-1, (D) BJ 990810-1, (E) Atividade média das amostras.

FIGURA 15 - Atividade proteolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado do Paraná. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 000120-1, (C) BJ 990625-5, (D) BJ 990625-6, (E) BJ 990628-3, (F) BJ 990629-2, (G) BJ 990629-4, (H) BJ 990914-5, (I) BJ 990914-6, (J) BJ 990917-6, (K) BJ 990917-7, (L) BJ 990917-8, (M) BJ 990917-9, (N) BJ 9911, (O) Atividade média das amostras.

FIGURA 16 - Atividade proteolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Santa Catarina. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 990702-6, (C) BJ 990706-3, (D) BJ 990706-6, (E) BJ 990917-10, (F) BJ 990917-5, (G) BJ 9914, (H) BJ 9916, (I) BJ 9917-10, (J) BJ 9918, (K) Atividade média das amostras.

FIGURA 17 - Atividade proteolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9471-1, (C) BJ IB 9504, (D) BJ IB 9515-3, (E) BJ IB 9521-3, (F) BJ IB 9522, (G) BJ IB 9524, (H) BJ IB 9526-4, (I) BJ IB 9532, (J) BJ IB 9538-2, (K) BJ IB 9546-5, (L) BJ IB 9547-2, (M) BJ IB 9548-2, (N) BJ IB 9556, (O) BJ IB 9602, (P) BJ IB 9610-2, (Q) BJ IB 96104, (R) BJ IB 96126, (S) BJ IB 96127, (T) BJ IB 9616-3, (U) BJ IB 9618-2, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 18 - Atividade proteolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9619-1, (C) BJ IB 9656, (D) BJ IB 9661-1, (E) BJ IB 9666-2, (F) BJ IB 9670, (G) BJ IB 9671-1, (H) BJ IB 9672-5, (I) BJ IB 9673-1, (J) BJ IB 9708, (K) BJ IB 9709, (L) BJ IB 9710, (M) BJ IB 9711, (N) BJ IB 9725, (O) BJ IB 9730, (P) BJ IB 9731, (Q) BJ IB 9753-4, (R) BJ IB 9754-2, (S) BJ IB 9804, (T) BJ IB 9815, (U) BJ IB 9858, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 19 – Distribuição geográfica das amostras individuais do veneno das serpentes continentais para a atividade proteolítica percentual.

4.3 - Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica das amostras individuais do veneno de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência foi determinada em função da dose aplicada.

Os camundongos foram inoculados pela via intradérmica na região dorsal com uma dose de veneno fixa para cada amostra.

Após 02 horas os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram suas peles rebatidas e o halo hemorrágico formado foi medido em seu comprimento e largura médios. Solução salina 0,9% foi utilizada como controle negativo para cada lote de experimentação.

Uma vez determinada a atividade hemorrágica do Veneno Referência Nacional, esta foi convertida em valores percentuais, considerada como sendo 100 % de atividade, valor a partir do qual foram realizados cálculos percentuais para os valores de atividade obtidos nas demais amostras, de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

Das 40 amostras individuais analisadas dos exemplares continentais de *Bothrops jararaca*, 10 (25%) apresentaram valores de atividade hemorrágica percentuais inferiores ao Veneno Referência Nacional. Os Estados do Paraná e Santa Catarina apresentaram juntos o maior número de amostras com valores de atividade hemorrágica percentuais inferiores ou similares ao Veneno Referência, 20%, seguidos de São Paulo, 7,5% e Minas Gerais, 5%.

Na grande maioria das amostras os valores de atividade hemorrágica percentuais obtidos foram superiores a 150% quando comparados aos valores de atividade do Veneno Referência.

As atividades hemorrágicas percentuais mais altas foram observadas nos estados de São Paulo, 22,5%; Paraná, 22,5% e Santa Catarina, 10%.

As amostras com atividade hemorrágica percentual mais acentuadas foram oriundas dos estados do Paraná (340%), Santa Catarina (300%) e São Paulo (270%).

Dentre as amostras insulares, observou-se uma tendência a alta atividade hemorrágica; 70 % das amostras apresentaram valores de atividade hemorrágica percentuais acima do valor de atividade observado para o Veneno Referência, enquanto 22,5% das amostras apresentam valores percentuais inferiores ao Veneno Referência. Os mais altos valores de atividade percentuais foram observados entre amostras de exemplares provenientes da Ilha de São Sebastião-SP.

A distribuição geográfica das amostras testadas encontra-se na FIG.26.

FIGURA 20 - Atividade hemorrágica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de São Paulo. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 20/10/00-A, (C) BJ 20/10/00-B, (D) BJ 20/10/00-C, (E) BJ 20/10/00-D, (F) BJ 20/10/00-E, (G) BJ 890629-5, (H) BJ 9617-2, (I) BJ 9654-2, (J) BJ 990625-7, (K) BJ 990629-7, (L) BJ 990702-2, (M) BJ 990702-4, (N) BJ 990914-1, (O) BJ 990917-23, (P) BJ 9912, (Q) Atividade média das amostras.

FIGURA 21 - Atividade hemorrágica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Minas Gerais. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 981215-1, (C) BJ 990625-1, (D) BJ 990810-1, (E) Atividade média das amostras.

FIGURA 22 - Atividade hemorrágica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado do Paraná. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 000120-1, (C) BJ 990625-5, (D) BJ 990625-6, (E) BJ 990628-3, (F) BJ 990629-2, (G) BJ 990629-4, (H) BJ 990914-5, (I) BJ 990914-6, (J) BJ 990917-6, (K) BJ 990917-7, (L) BJ 990917-8, (M) BJ 990917-9, (N) BJ 9911, (O) Atividade média das amostras.

FIGURA 23 - Atividade hemorrágica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Santa Catarina. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 990702-6, (C) BJ 990706-3, (D) BJ 990706-6, (E) BJ 990917-10, (F) BJ 990917-5, (G) BJ 9914, (H) BJ 9916, (I) BJ 9917-10, (J) BJ 9918, (K) Atividade média das amostras.

FIGURA 24 - Atividade hemorrágica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9471-1, (C) BJ IB 9504, (D) BJ IB 9515-3, (E) BJ IB 9521-3, (F) BJ IB 9522, (G) BJ IB 9524, (H) BJ IB 9526-4, (I) BJ IB 9532, (J) BJ IB 9538-2, (K) BJ IB 9546-5, (L) BJ IB 9547-2, (M) BJ IB 9548-2, (N) BJ IB 9556, (O) BJ IB 9602, (P) BJ IB 9610-2, (Q) BJ IB 96104, (R) BJ IB 96126, (S) BJ IB 96127, (T) BJ IB 9616-3, (U) BJ IB 9618-2, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 25 - Atividade hemorrágica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9619-1, (C) BJ IB 9656, (D) BJ IB 9661-1, (E) BJ IB 9666-2, (F) BJ IB 9670, (G) BJ IB 9671-1, (H) BJ IB 9672-5, (I) BJ IB 9673-1, (J) BJ IB 9708, (K) BJ IB 9709, (L) BJ IB 9710, (M) BJ IB 9711, (N) BJ IB 9725, (O) BJ IB 9730, (P) BJ IB 9731, (Q) BJ IB 9753-4, (R) BJ IB 9754-2, (S) BJ IB 9804, (T) BJ IB 9815, (U) BJ IB 9858, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 26 – Distribuição geográfica das amostras individuais do veneno das serpentes continentais para a atividade hemorrágica percentual.

4.4 - Atividade Fosfolipásica

As fosfolipases A₂ são enzimas proteolíticas de baixo peso molecular que destroem membranas fosfolipídicas e estão diretamente associadas à digestão de presas em serpentes.

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada através do método de hemólise indireta, que apesar de ser semiquantitativo, é muito sensível e ideal quando o número de amostras for elevado.

Uma vez determinada a atividade fosfolipásica do Veneno Referência Nacional, esta foi convertida em valores percentuais, considerada como sendo 100 % de atividade, valor a partir do qual foram realizados cálculos percentuais para os valores de atividade obtidos nas demais amostras, de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

Das 40 amostras individuais analisadas dos exemplares continentais de *Bothrops jararaca*, 28 amostras (70%) apresentaram valores de atividade percentuais nitidamente inferiores ao valor de atividade do Veneno Referência Nacional.

As amostras oriundas do Estado de Minas Gerais apresentaram um padrão de atividade fosfolipásica percentual inferior a 20% quando comparado ao Veneno Referência (FIG.28). Padrão este que se repetiu nas amostras provenientes dos estados do Paraná e Santa Catarina (FIG.29 e 30). Do total de amostras dos exemplares continentais de *Bothrops jararaca* 47,5% apresentaram atividades percentuais similares ou inferiores a 20% comparadas ao Veneno Referência.

O Estado de São Paulo apresentou o maior número de amostras com atividade fosfolipásica percentuais similares ou mais acentuadas quando comparadas aos valores de atividade do Veneno Referência, 22,5% (FIG.27). Um padrão de atividade muito próximo ao observado nas amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP, onde 72,5% dos valores obtidos apresentaram atividade fosfolipásica percentual similar ou superior ao Veneno Referência (FIG.31 e 32).

Comparativamente, apenas 7,5% das amostras provenientes da Ilha de São Sebastião, apresentaram valores de atividade fosfolipásica percentuais inferiores a 20%.

A distribuição geográfica das amostras testadas encontra-se na FIG.33.

FIGURA 27 - Atividade fosfolipásica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de São Paulo. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 20/10/00-A, (C) BJ 20/10/00-B, (D) BJ 20/10/00-C, (E) BJ 20/10/00-D, (F) BJ 20/10/00-E, (G) BJ 890629-5, (H) BJ 9617-2, (I) BJ 9654-2, (J) BJ 990625-7, (K) BJ 990629-7, (L) BJ 990702-2, (M) BJ 990702-4, (N) BJ 990914-1, (O) BJ 990917-23, (P) BJ 9912, (Q) Atividade média das amostras.

FIGURA 28 - Atividade fosfolipásica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Minas Gerais. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 981215-1, (C) BJ 990625-1, (D) BJ 990810-1, (E) Atividade média das amostras.

FIGURA 29 - Atividade fosfolipásica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado do Paraná. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 000120-1, (C) BJ 990625-5, (D) BJ 990625-6, (E) BJ 990628-3, (F) BJ 990629-2, (G) BJ 990629-4, (H) BJ 990914-5, (I) BJ 990914-6, (J) BJ 990917-6, (K) BJ 990917-7, (L) BJ 990917-8, (M) BJ 990917-9, (N) BJ 9911, (O) Atividade média das amostras.

FIGURA 30 - Atividade fosfolipásica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Santa Catarina. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 990702-6, (C) BJ 990706-3, (D) BJ 990706-6, (E) BJ 990917-10, (F) BJ 990917-5, (G) BJ 9914, (H) BJ 9916, (I) BJ 9917-10, (J) BJ 9918, (K) Atividade média das amostras.

FIGURA 31 - Atividade fosfolipásica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9471-1, (C) BJ IB 9504, (D) BJ IB 9515-3, (E) BJ IB 9521-3, (F) BJ IB 9522, (G) BJ IB 9524, (H) BJ IB 9526-4, (I) BJ IB 9532, (J) BJ IB 9538-2, (K) BJ IB 9546-5, (L) BJ IB 9547-2, (M) BJ IB 9548-2, (N) BJ IB 9556, (O) BJ IB 9602, (P) BJ IB 9610-2, (Q) BJ IB 96104, (R) BJ IB 96126, (S) BJ IB 96127, (T) BJ IB 9616-3, (U) BJ IB 9618-2, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 32 - Atividade fosfolipásica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9619-1, (C) BJ IB 9656, (D) BJ IB 9661-1, (E) BJ IB 9666-2, (F) BJ IB 9670, (G) BJ IB 9671-1, (H) BJ IB 9672-5, (I) BJ IB 9673-1, (J) BJ IB 9708, (K) BJ IB 9709, (L) BJ IB 9710, (M) BJ IB 9711, (N) BJ IB 9725, (O) BJ IB 9730, (P) BJ IB 9731, (Q) BJ IB 9753-4, (R) BJ IB 9754-2, (S) BJ IB 9804, (T) BJ IB 9815, (U) BJ IB 9858, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 33 – Distribuição geográfica das amostras individuais do veneno das serpentes continentais para a atividade fosfolipásica percentual.

4.5 - Atividade amidolítica

Uma vez determinada a atividade amidolítica do Veneno Referência Nacional, esta foi convertida em valores percentuais, considerada como sendo 100 % de atividade, valor a partir do qual foram realizados cálculos percentuais para os valores de atividade obtidos nas demais amostras, de forma a estabelecer-se um parâmetro de comparação.

Das 40 amostras individuais analisadas dos exemplares continentais de *Bothrops jararaca*, 18 amostras (45%) apresentaram valores de atividade percentuais nitidamente inferiores ao valor de atividade do Veneno Referência Nacional, destas 15 amostras (37%) apresentaram valores de atividade inferiores a 50%, comparados ao Veneno Referência.

Similarmente ao observado para as atividades fosfolipásica e proteolítica, observou-se uma tendência à baixa atividade percentual na área de distribuição geográfica mais ao sul do continente.

Os estados do Paraná e Santa Catarina apresentaram o maior número de amostras com atividade amidolítica percentual claramente inferior ao valor de atividade do Veneno Referência, com 22,5% e 15% respectivamente (FIG.36 e 37).

Comparativamente às atividades proteolítica e fosfolipásica, o Estado de São Paulo apresentou o maior número de amostras com atividade amidolítica percentual similar (22,5%) ou superior (17,5%) ao Veneno Referência Nacional (FIG.34).

Dentre as amostras dos exemplares de *Bothrops jararaca* oriundos da Ilha de São Sebastião-SP, 35% apresentaram valores de atividade amidolítica percentuais inferiores aos do Veneno Referência, 15% apresentaram padrão de atividade similar e 57,5% apresentaram valores de alta atividade amidolítica (FIG.38 e 39).

A distribuição geográfica das amostras testadas encontra-se na FIG.40.

FIGURA 34 - Atividade amidolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de São Paulo. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 20/10/00-A, (C) BJ 20/10/00-B, (D) BJ 20/10/00-C, (E) BJ 20/10/00-D, (F) BJ 20/10/00-E, (G) BJ 890629-5, (H) BJ 9617-2, (I) BJ 9654-2, (J) BJ 990625-7, (K) BJ 990629-7, (L) BJ 990702-2, (M) BJ 990702-4, (N) BJ 990914-1, (O) BJ 990917-23, (P) BJ 9912, (Q) Atividade média das amostras.

FIGURA 35 - Atividade amidolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Minas Gerais. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 981215-1, (C) BJ 990625-1, (D) BJ 990810-1, (E) Atividade média das amostras.

FIGURA 36 - Atividade amidolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado do Paraná. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 000120-1, (C) BJ 990625-5, (D) BJ 990625-6, (E) BJ 990628-3, (F) BJ 990629-2, (G) BJ 990629-4, (H) BJ 990914-5, (I) BJ 990914-6, (J) BJ 990917-6, (K) BJ 990917-7, (L) BJ 990917-8, (M) BJ 990917-9, (N) BJ 9911, (O) Atividade média das amostras.

FIGURA 37 - Atividade amidolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas do Estado de Santa Catarina. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ 990702-6, (C) BJ 990706-3, (D) BJ 990706-6, (E) BJ 990917-10, (F) BJ 990917-5, (G) BJ 9914, (H) BJ 9916, (I) BJ 9917-10, (J) BJ 9918, (K) Atividade média das amostras.

FIGURA 38 - Atividade amidolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9471-1, (C) BJ IB 9504, (D) BJ IB 9515-3, (E) BJ IB 9521-3, (F) BJ IB 9522, (G) BJ IB 9524, (H) BJ IB 9526-4, (I) BJ IB 9532, (J) BJ IB 9538-2, (K) BJ IB 9546-5, (L) BJ IB 9547-2, (M) BJ IB 9548-2, (N) BJ IB 9556, (O) BJ IB 9602, (P) BJ IB 9610-2, (Q) BJ IB 96104, (R) BJ IB 96126, (S) BJ IB 96127, (T) BJ IB 9616-3, (U) BJ IB 9618-2, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 39 - Atividade amidolítica percentual frente ao Veneno Referência Nacional. Amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP. (A) Veneno Referência Nacional, (B) BJ IB 9619-1, (C) BJ IB 9656, (D) BJ IB 9661-1, (E) BJ IB 9666-2, (F) BJ IB 9670, (G) BJ IB 9671-1, (H) BJ IB 9672-5, (I) BJ IB 9673-1, (J) BJ IB 9708, (K) BJ IB 9709, (L) BJ IB 9710, (M) BJ IB 9711, (N) BJ IB 9725, (O) BJ IB 9730, (P) BJ IB 9731, (Q) BJ IB 9753-4, (R) BJ IB 9754-2, (S) BJ IB 9804, (T) BJ IB 9815, (U) BJ IB 9858, (V) Atividade média das amostras.

FIGURA 40 – Distribuição geográfica das amostras individuais do veneno das serpentes continentais para a atividade amidolítica percentual.

4.6 - Western Blot

A análise dos ensaios de imunorreatividade do soro Antibotrópico comercial, avaliada através do método de Western Blot apresentou boa reatividade no reconhecimento das amostras.

As bandas protéicas localizadas nas regiões compreendidas entre os pesos moleculares aproximados de 150 kDa, 120 kDa, 100 a 75 kDa e 50 a 20 kDa foram prontamente reconhecidas com forte intensidade em todas as amostras; ao passo que as bandas protéicas com pesos moleculares inferiores a 20 kDa não foram reconhecidas (FIG.41 e 42).

FIGURA 41 - Ensaio de imunorreatividade através do método de Western Blot. (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência, (C) BJ 9912, (D) BJ 20/10/00 - E, (E) BJ 9617-2, (F) BJ IB 9711, (G) BJ IB 9526-4.

FIGURA 42 – Ensaio de imunorreatividade através do método de Western Blot. (A) Marcador molecular, (B) Veneno Referência, (C) BJ 990810-1, (D) BJ 990625-1, (E) BJ 9911, (F) BJ 990625-5, (G) BJ 990706-3.

5 - DISCUSSÃO

As serpentes no decorrer do seu processo evolutivo desenvolveram diversos sistemas de captura e subjugação de presas, que encontraram seu auge no desenvolvimento de um complexo sistema de inoculação de substâncias biologicamente ativas, associado ao desenvolvimento de glândulas secretoras especializadas ligadas a presas sulcadas altamente desenvolvidas (Thomas & Pough, 1979; Russel, 1980; Minton & Minton, 1980).

Os venenos das serpentes são misturas complexas contendo mais de 20 diferentes componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que 90% de seu peso seco é constituído de proteínas, que podem apresentar atividade tóxica e ou enzimática, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (Deutsch & Diniz, 1955; Iwanaga & Suzuki, 1979; Bjarnason & Fox, 1988). Enquanto os componentes inorgânicos mais comuns são os íons Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn, sendo que alguns atuam como mantenedores da estabilidade estrutural de certas proteínas, como por exemplo as metaloproteases, que são fatores hemorrágicos, outros atuam como catalisadores em reações enzimáticas específicas (Friederich & Tu, 1971; Bjarnason & Fox, 1988).

Diversos autores têm ressaltado a existência de variações na composição do veneno de serpentes e atribuem tais variações a fatores tais como a origem geográfica, idade, sexo, espécie, tipo de dieta dentre outros (Willemse, 1978; Rael *et al.*, 1984; Chippaux *et al.*, 1991; Moura Da Silva *et al.*, 1990; Furtado *et al.*, 1991). Tais variações têm sido utilizadas como ferramentas de estudos sistemáticos, assim como enriquecido a compreensão de estudos dos relacionamentos filogenéticos nos diversos níveis taxonômicos (Glenn & Straight, 1978; Brazil, 1984; Tan & Ponnudurai, 1991).

Tendo em vista estudos recentes demonstrando consistentes variações na composição e nas atividades do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, decorrentes do isolamento geográfico ao qual foram submetidas nas Ilhas de Alcatrazes e Queimada Grande tivemos como proposta de trabalho a análise da variação geográfica das atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica, amidolítica e hemorrágica, assim como dos padrões de migração eletroforética em gel de poliacrilamida com adição de SDS de 80 amostras do veneno oriundas de subpopulações continentais de *Bothrops jararaca* assim como de uma população isolada na

Ilha de São Sebastião – SP, utilizando como parâmetro de comparação o Veneno Referência Nacional, um “pool” preparado a partir das extrações individuais de 2.000 espécimes procedentes de toda a área de distribuição geográfica da espécie.

A serpente *Bothrops jararaca* (Wagler, 1824) ocorre no sudoeste do Brasil, do sudeste do Estado da Bahia ao Estado do Rio Grande do Sul, e extremo oeste do Estado de Mato grosso do Sul (Campbell & Lamar, 1989), sendo ainda conhecidas populações disjuntivas em 11 ilhas da costa do Estado de São Paulo (Campbell & Lamar, 1989; Cicchi *et al.*, 2007).

Trata-se de uma espécie predominantemente terrestre, semi-arborícola, morfologicamente muito heterogênea, com notável variação no padrão de coloração e escamação (Vanzolini, 1946; Hoge *et al.*, 1976).

Estudos realizados utilizando seqüências de DNA mitocondrial sugerem que a ampla distribuição de *Bothrops jararaca* seja formada por um complexo de diferentes espécies (Salomão *et al.*, 1997).

Esta espécie é um habitante típico de áreas florestadas, embora possa ocorrer em diferentes habitats; pode ser encontrada em áreas de vegetação umbrófila, matas sazonais semi-decíduas, áreas altamente degradadas e campos de cultivo (Sazima, 1992). É a espécie de serpente mais abundante na região sudeste do Brasil, sendo de grande importância do ponto de vista médico-sanitário, visto que ocasiona a maioria (90%) dos acidentes ofídicos notificados nesta região (Ribeiro & Jorge, 1990; Fan & Cardoso, 1995).

Seu veneno tem sido objeto de uma série de investigações que revelaram um grande espectro de atuações tais como ativação plaquetária e da cascata da coagulação sanguínea (Nahas *et al.*, 1979; Zingali *et al.*, 1990; Kamiguti & Sano-Martins, 1995), indução de hemorragia local e sistêmica (Mandelbaum *et al.*, 1976; Assakura *et al.*, 1986; Kamiguti *et al.*, 1991) e indução de edema e inflamação (Cury *et al.*, 1994; Farsky *et al.*, 1997).

Houve fatores limitantes para a realização deste estudo, uma vez que dispúnhamos de pouca quantidade de veneno, por tratar-se de amostras de serpentes individuais, fato este que nos impediu um adequado tratamento estatístico.

De acordo com estudos clássicos, a técnica de eletroforese permite uma grande resolução dos padrões de proteínas dos venenos, permitindo a separação e identificação de

seus componentes (Rael, 1984; Aird & Kaiser, 1985, Moura-Da-Silva *et al.*, 1992; Assakura *et al.*, 1992; Mendoza *et al.*, 1992; Tan & Ponnudurai, 1992).

A análise dos perfis de migração eletroforética sob condições de não redução das amostras do veneno das subpopulações continentais e da população insular de *Bothrops jararaca* resultou em perfis em geral semelhantes, embora estes tenham apresentado pequenas variações no número, disposição e intensidade das bandas.

Bandas protéicas com peso molecular de aproximadamente 65 kDa apresentaram-se de forma variável, não estando presentes em todas as amostras.

Todas as amostras apresentaram componentes em sua maioria de baixo peso molecular, a maioria abaixo de 60 kDa.

Duas regiões, localizadas entre os pesos moleculares de 48 a 60 kDa e 20 a 35 kDa aproximadamente, apresentaram bandas protéicas que foram conservativas para quase todas as amostras.

Dados de literatura descrevem proteínas com atividade proteolíticas tais como a Bothropasina, com aproximadamente 48 kDa, e algumas proteínas que também possuem atividade hemorrágica tais como HF1 e HF2, localizadas entre 62 a 46 kDa (Gutierrez & Lomonte, 1989) embora Brazil (1984) e Mandelbaum & Assakura (1988) ressaltem que a toxina HF2 apresenta baixa atividade proteolítica.

Mandelbaum *et al.* (1988) descrevem os pesos moleculares de NHFa e NHFb, proteínas com atividades proteolítica e hemorrágica, do veneno de *Bothrops neuwiedi*, com 50 kDa e 49 kDa respectivamente.

Maruyama *et al.* (1992) isolaram uma metaloprotease com atividade fibrinolítica do veneno de *Bothrops jararaca* com peso aproximado de 47 kDa denominada Jararafibrase I.

Paine *et al.* (1992) purificaram a Jararagina, uma metaloprotease com atividade hemorrágica de 52 kDa, do veneno de *Bothrops jararaca*; esta toxina promove lesão endotelial sistêmica e trombocitopenia.

As hemorraginas (metaloproteases com atividade hemorrágica) têm a capacidade de alterar a permeabilidade dos vasos sangüíneos, causando degradação das células do vaso endotelial e extravasamento de sangue, além de interferirem na agregação plaquetária. No envenenamento botrópico a hemorragia é potencializada pela incoagulabilidade sangüínea e pela formação de edema, causado pelo extravasamento de líquidos (Kamiguti *et al.*, 1994).

Tendo em vista os dados acima citados, podemos concluir que as bandas majoritárias, com peso molecular de aproximadamente 48 kDa, ocorrentes em quase todas as amostras de veneno, possivelmente correspondam com alguma proteína com atividade proteolítica conjuntamente com atividade hemorrágica.

Serrano *et al.* (1993) descreveram uma toxina do veneno de *Bothrops moojeni*, a MSP₂, com peso de 38 kDa, com atividade proteolítica e sobre a coagulação.

Brazil (1984) descreveu para todo o gênero *Bothrops* uma enzima “trombin-like” com peso molecular entre 30 e 40 kDa. Corroborando tal observação, Mandelbaum *et al.* (1984) descreveram uma toxina “trombin-like” com aproximadamente 30 kDa do veneno de *Bothrops atrox*. Por sua vez, a Bothrombin, uma toxina do veneno de *Bothrops jararaca*, que promove a coagulação do fibrinogênio, apresenta 35 kDa (Nishida *et al.*, 1994).

Em nossas análises foram observadas, tanto no gel de eletroforese sob condições não redutoras, quanto na análise por densitometria óptica, para quase todas as amostras, grandes variações no número, na disposição e na intensidade de bandas protéicas nas faixas de peso molecular de 15 kDa a 28 kDa aproximadamente.

Nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, de uma forma geral, essa faixa de peso molecular compreende muitas serinoproteases e principalmente metaloproteases da classe P-I, responsáveis pela atividade proteolítica (Serrano *et al.*, 1991).

Venenos de serpentes da família Viperidae são característicos pela sua alta atividade proteolítica, devido à presença, além das proteases, de fosfolipases e hialuronidases dentre outras enzimas, que levam à lesão local, edema, equimose, podendo evoluir para necrose (Tu, 1977).

O efeito proteolítico dos venenos de serpentes sobre substratos como a caseína, a gelatina e albumina dentre outros, é conhecido desde o início do século (Bolaños, 1984).

Furtado *et al.* (1991) verificaram a existência de variações ontogenéticas nas atividades proteolíticas dos venenos de algumas serpentes do gênero *Bothrops*, aumentando com o crescimento dos animais.

Mackessey (1993) estudando as atividades do veneno de *Crotalus viridis* descreve um aumento na atividade proteolítica nos animais adultos ao qual relaciona com a dieta diferenciada nesta fase. Semelhantemente, Zelanis (2006) observou um aumento na expressão

de uma proteína proteolítica de 24 kDa, do veneno de *Bothrops insularis* conforme o desenvolvimento ontogenético dos animais.

As proteases têm um importante papel nas composições e atividades dos venenos de serpentes, estando relacionadas a diversos processos fisiológicos, cujo propósito principal é auxiliar a digestão das presas (Thomas & Pough, 1979; Mackessey, 2003).

Os efeitos observados nos envenenamentos ofídicos são decorrentes da ação sinérgica de diferentes toxinas (Kochva *et al.*, 1993, Mebs, 1999). A atividade hialuronidásica tem um importante papel no envenenamento “*in vivo*”, promovendo a dispersão do veneno por entre os tecidos da presa através da degradação do ácido hialurônico (Pukritayakamee *et al.*, 1988).

Os ensaios de atividade proteolítica sobre a caseína mostraram que esta é mais intensa nos venenos dos exemplares oriundos do Estado de São Paulo e naqueles provenientes da Ilha de São Sebastião-SP. A análise da distribuição geográfica da atividade proteolítica sobre caseína das amostras de veneno de *Bothrops jararaca*, permitiu a visualização de um aparente padrão de distribuição, sendo observadas amostras com menores atividades proteolíticas percentuais naqueles exemplares localizados mais ao sul da distribuição amostrada (FIG.19).

Cabe ressaltar que apesar da análise dos géis de eletroforese em gel de poliacrilamida, através de densitometria óptica revelar um grande número de bandas referentes à proteases, a ausência do íon cálcio no ensaio de atividade proteolítica sobre a caseína, um importante co-fator para a atividade enzimática de muitas destas enzimas, poderia estar relacionada com a ligeira diferença observada entre os dois resultados.

Da mesma forma, a análise dos géis permite correlacionar as bandas protéicas presentes com suas respectivas atividades.

A grande variação observada nas atividades hemorrágicas dos venenos amostrados pode ser relacionada à grande presença de diferentes bandas protéicas na região com peso molecular aproximado de 45 kDa observada nos géis, uma vez que as metaloproteases estão frequentemente associadas a processos hemorrágicos (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Serrano & Fox, 2005).

Não foi possível estabelecer uma relação direta do padrão de dispersão das amostras com a atividade hemorrágica percentual. Observou-se uma grande variabilidade nas

atividades percentuais hemorrágicas de toda a área amostrada; de uma forma geral as atividades mais acentuadas foram observadas nas amostras do veneno de exemplares juvenis de *Bothrops jararaca*, enquanto as menores atividades foram observadas nos venenos provenientes de exemplares mais velhos, embora o contrário também tenha sido observado.

As amostras oriundas dos estados de Minas Gerais apresentaram em sua maioria baixa atividade hemorrágica frente ao Veneno Referência Nacional, enquanto os estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, assim como as amostras oriundas dos exemplares insulares aparentemente possuem uma tendência a altas atividades hemorrágicas (FIG.26).

A análise densitométrica dos géis permitiu a visualização de diversas proteínas de baixo peso molecular, a maioria entre 12 kDa e 15 kDa. Diversos autores relacionam proteínas com essa faixa de peso molecular com enzimas denominadas fosfolipases (Mandelbaum & Assakura, 1988).

As fosfolipases são proteínas de baixo peso molecular, entre 13 kDa e 16 kDa, existentes em tecidos de mamíferos, venenos de abelhas e de serpentes, que agem sobre o fosfatidilinositol, liberando ácido araquidônico, que por sua vez é precursor de prostaglandinas, e possuem ações neurotóxicas, miotóxicas, cardiotoxícas, hemorrágicas, anticoagulantes, hemolíticas, inibidoras de agregação plaquetária, dentre outras (Evans, 1989; Kini, 1997).

Neste trabalho avaliamos a variabilidade dos venenos em suas atividades fosfolipásicas através do método de hemólise indireta. Esse método utiliza uma solução aquosa de gema de ovo contendo eritrócitos murinos. As fosfolipases na presença dos fosfolipídios contidos na solução de gema de ovo liberam lisofosfolipídios, que, por sua vez, induzem o rompimento das membranas dos eritrócitos, desta forma a hemoglobina liberada corresponde à atividade fosfolipásica estudada. Trata-se de um método muito sensível, rápido e barato, através do qual muitas amostras podem ser testadas de uma só vez, constituindo uma alternativa ao uso de substratos sintéticos.

Machado *et al.*,(2005) relatam a existência de diversas isoformas de fosfolipases no veneno de serpentes, relacionando-as com adaptações evolucionárias visando maximizar o sucesso na captura e subjugação de presas.

Conforme o acima citado pode-se concluir que as diferentes bandas protéicas com pesos moleculares variando entre 13 kDa e 16 kDa observadas nos géis correspondam à fosfolipases A₂.

Corroborando tal postulação, os venenos que apresentaram baixa intensidade de bandas por volta de 14 kDa foram aqueles que apresentaram menor atividade fosfolipásica percentual frente ao Veneno Referência Nacional.

A análise da distribuição geográfica da atividade fosfolipásica das amostras de veneno de *Bothrops jararaca*, permitiu a visualização de um padrão de distribuição similar ao observado para as atividades proteolíticas sobre caseína, sendo observadas amostras com menores atividades proteolíticas percentuais naqueles exemplares localizados mais ao sul da distribuição amostrada (FIG.33).

A análise do padrão de dispersão geográfica da atividade amidolítica das amostras de veneno de *Bothrops jararaca*, apresentou similaridade aos observados anteriormente, sugerindo um padrão comum de dispersão para as atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica e amidolítica, uma vez que dentre as amostras testadas, as menores atividades percentuais observadas para tais atividades foram aquelas de origem mais ao sul da distribuição geográfica amostrada (FIG.19, 33 e 40).

Uma vez que o soro antibotrópico comercial, utilizado para tratamento do envenenamento ofídico em humanos, é confeccionado a partir do Veneno Referência Nacional, sendo que o mesmo é utilizado pelo Ministério da Saúde para os ensaios de titulação do soro envasado, e que a análise dos géis permitiu a visualização de bandas protéicas que não constaram no Veneno Referência, procedemos a ensaios visando caracterizar, através da técnica de Western Blot, estas amostras frente ao soro antibotrópico comercial, sua eficácia no reconhecimento de tais bandas.

A análise através de Western Blot permitiu concluir que as bandas de peso molecular médio e/ou alto são prontamente reconhecidas pelo soro antibotrópico comercial, diferentemente do observado para as bandas de baixo peso molecular, em torno de 14 kDa. Este fato já havia sido relatado na literatura por Gutierrez *et al.*,(1989) que observaram que o soro comercial era capaz de neutralizar os efeitos sistêmicos do veneno, não sendo porém eficaz para combater efeitos locais que podem, em parte, ser atribuídos à ação das fosfolipases e seus produtos de catálise.

Por outro lado, o processo de fervura das amostras no procedimento da eletroforese poderia levar à desnaturação de tais proteínas, fazendo com que estas não sejam devidamente reconhecidas pelo soro antibotrópico comercial, uma vez que anticorpos contra epítomos conformacionais não mais reagiriam.

A grande quantidade de proteínas observadas nos géis de eletroforese pode ser creditada ao fato de *Bothrops jararaca* ser uma espécie que apresenta variações ontogenéticas na dieta (Sazima, 1992). A dieta apresenta um importante papel na composição dos venenos de serpentes, agindo como um selecionador de características (Fry *et al.*, 2003).

Tanto a disponibilidade quanto a suscetibilidade das presas ao veneno relacionam-se diretamente com os hábitos alimentares e consequentemente com a composição do veneno de serpentes (Daltry *et al.*, 1996).

Ohno *et al.* (2003) e Li *et al.* (2005) declaram que a evolução acelerada, através da duplicação e divergência de genes, principais causas da substituição de nucleotídeos que levam ao surgimento de isoformas, são responsáveis pela diversificação do potencial e do espectro de ação das toxinas frente aos diferentes tipos de presas.

Serpentes cuja alimentação é composta por uma variedade de tipos de presas necessitam de uma multiplicidade de diferentes toxinas para burlar os diferentes sistemas de defesa das presas afetando seus alvos fisiológicos (Fry *et al.*, 2003).

Entretanto Sasa (1999) afirma que a diversidade observada nos venenos pode ser decorrente dos diferentes alelos que podem codificar para uma mesma classe de enzimas.

As menores variações observadas nos perfis de migração eletroforética dos exemplares insulares quando comparadas ao observado para os perfis de migração das amostras dos exemplares continentais de *Bothrops jararaca* poderiam ser explicadas pelo fato de que em populações grandes a variação individual do veneno é maior, possivelmente devido ao maior intercâmbio gênico, disponibilidade de habitats e tipo de presas, quando comparadas à populações pequenas e isoladas.

Os nossos resultados, quando analisados em conjunto sugerem que existem de fato sub-populações de *B. jararaca*, com variações quantitativas e qualitativas nas toxinas de seu veneno, mas que a população da ilha em estudo apresenta perfil de atividade homogêneo e similar ao dos espécimes coletados na região continental próxima à ilha. É possível que por estar bem mais próxima do continente do que as ilhas de Alcatrazes e de Queimada Grande, o

fluxo gênico não tenha sido interrompido, podendo ocorrer intercâmbio de espécimes entre as duas áreas.

6- Conclusões

- 1- A análise dos perfis de migração eletroforética permite a separação dos venenos em diferentes “famílias”.
- 2- Os venenos apresentaram, em sua maioria, bandas protéicas de baixo peso molecular.
- 3- As proteínas majoritárias observadas encontram-se entre as faixas de peso moleculares aproximados de 45 kDa e 25 kDa.
- 4- As variações na intensidade, número e disposição das bandas observadas nos géis de eletroforese em poliacrilamida refletem-se nas variações observadas nas suas atividades.
- 5- As atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica e amidolítica das amostras oriundas do Estado de São Paulo e das amostras oriundas da Ilha de São Sebastião-SP apresentaram uma tendência a valores similares ou superiores aos observados no Veneno Referência Nacional.
- 6- As amostras oriundas de exemplares de serpentes dos estados do Paraná, Minas Gerais e de Santa Catarina apresentaram uma tendência a valores inferiores aos observados no Veneno Referência Nacional para as atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica e amidolítica.
- 7- Não foi possível estabelecer uma relação direta entre a atividade hemorrágica e sua distribuição geográfica.
- 8- Tais observações permitem a distinção de duas grandes populações nas áreas de distribuição geográfica amostradas. Uma ao norte, apresentando atividades similares ou superiores ao Veneno Referência Nacional para as atividades proteolítica sobre caseína, fosfolipásica e amidolítica, e uma ao sul, apresentando valores nitidamente inferiores aos observados no Veneno Referência Nacional.

- 9- O soro Antibotrópico comercial reconheceu prontamente as proteínas de alto peso molecular.
- 10- As proteínas de baixo peso molecular não são reconhecidas pelo soro antibotrópico comercial.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIRD, S.D. & JORGE DA SILVA, N. Comparative studies enzymatic of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** **99B (2)**: 287-294, 1991.
2. AIRD, S.D. & KAISER, I. Comparative studies on three rattlesnake toxins. **Toxicon** **23(3)**: 361-374, 1985.
3. ASSAKURA, M.T.; RECHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Comparasion of immunological, biochemical and biophysical proprieties of three haemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon** **24**: 943-946, 1986.
4. ASSAKKURA, M.T.; FURTADO, M.F.D. & MANDELBAUM, F.R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the Lancehead Vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bohtrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comp. Biochem. Physiol.** **102B (4)**: 727-732, 1992.
5. BARRIO, A. & MIRANDA, M.E. Las diferentes poblaciones de *Bothrops alternata* Dumérily y Bibron (Ophidia, Crotalidae) de la Argentina, considerados desde el punto de vista morfológico y antigênico. **Mem. Inst. Butantan Simp. Internac.** **33(3)**: 887-892, 1966.
6. BENNETT, M.R.; GLASSER, N.F. The history of ice on Earth. **In**: BENNETT, M.R.; GLASSER, N.F. (Ed.). **Glacial geology-Icesheets and Landforms**. England: John Wiley & Sons: 7-28, 1996.
7. BJARNASON, J. & FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacological Therapeutic** **62**: 325-372, 1994.
8. BJARNASON, J. & FOX, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotlysins. **Meth. Enzy. Mol.** 248 pp, 1995.
9. BJARNASON, J. & FOX, J.W. Hemorrhagic Toxins Snake Venoms. **J. Toxicol. Toxin. Reviews** **7**: 121-209, 1988.
10. BOLAÑOS, R. Veneno de serpientes. Estrutura química y actividades biológicas y farmacológicas. **In**: Universidad de Costa Rica (Ed.). **Serpientes, Venenos y Ofidismo em Centro América**. San José, p.45-81, 1984.
11. BORGES, C.C.; SADAHIRO, M.; DOS SANTOS, M.C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.** **32**: 637-646, 1999.
12. BRAZIL, O.V. Peçonhas. **In**: COBERT, C.E. (Ed.). **Farmacodinâmica**. 6ed, São Paulo, Guanabara Koogan, 1044-1074, 1984.

13. CADLE, J.E. Phylogenetics Relationships among Advanced Snakes: A molecular perspective. University California, Berkeley, **Publ. Zool.** **199**: 1-77, 1988.
14. CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICKZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake Venom disintegrins: evolution of struture and function. **Toxicon** **45**: 1063-1074, 2005.
15. CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Cornell University , Ithaca, N.Y.,USA, 1989.
16. CHAVEZ, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; 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.
17. CHIPPAUX, J.P.; WILLIAM, V. & WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** **29**: 1279-1303, 1991.
18. CHO, W.; KEZDY, F.J. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂ . **Meth. Enzymol.** **197**: 75-79, 1991.
19. CICCHI, J.P.; SENA, M.A.; PECCININI-SEALE, D.M.; DUARTE, M.R. Snakes from islands of State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Biota Neotrop.** Vol **7** (2): 14 pp, 2007.
20. COGO, J.C.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P. & RODRIGO-SIMIONI, L. Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon** **31**: 1237-1247, 1993.
21. CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F.P.; SUDO, L. Edematogenic responses induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of lymphocytes. **Toxicon** **32**: 1425-1431, 1994.
22. DALTRY, J.C.; WUSTER, W. & THORPE, R.S. Diet and venom evolution. **Nature** **379**: 537-540, 1996.
23. DETRAIT, J. & DUGUY, R. Variations de toxicité du venin au cours du cycle annuel chez *Vipera aspis*. **L. Ann. Inst. Pasteur** **111**: 93-99, 1966.
24. DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. Proteolytic activities of snake venoms. **J. Biol. Chem.** **216**: 283-288, 1955.
25. FAN, H.W.; CARDOSO, J.L. Clinical toxicology of snake bites in south America. In: MEIER, J; WHITE, J, **Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. C.R.C., Boca Raton, 668-688, 1995.

26. FARSKY, S.H.P.; COSTA-CRUZ, J.W.M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F.P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon** **35**: 185-193, 1997.
27. FRIEDERICH, C. & TU, A.T. Role of metal in snake venoms for hemorrhage esterase and proteolytic activities. **Biochemistry** **18**(4): 678-684, 1971.
28. FRY, B.G.; WUSTER, W.; KINI, R.M.; BRUSIC, V.; KHAN, A.; VENKATARAMAN, D. & ROONEY, A.P. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **J. Mol. Evol.** **57**: 110-129, 2003.
29. FURTADO, M.F.D. *Contribuição ao estudo do veneno de Bothrops moojeni (Hoge, 1965) (Serpentes, Viperidae) em função da idade das serpentes*. 1987. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
30. FURTADO, M.F.D., MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S. & ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon** **29**: 219-226, 1991.
31. GANS, C.; ELLIOT, W.B. Snake venoms: production, injection, action. **Adv. Oral Biol.** **3**: 45-81, 1968.
32. GANS, C. Reptilian Venoms: some evolutionary considerations. **In**: GANS, C. (Ed.). **Biology of the Reptilia**. **V.8**. Academic Press, London, N. York, 782 pp, 1978.
33. GLENN, J.L. & STRAIGHT, R.C. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. **Toxicon** **16**: 81-84, 1978.
34. GLENN, J.L. & STRAIGHT, R.C. Intergradation of two different venoms populations of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. **Toxicon** **27**(4): 411-418, 1989.
35. GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARA, Y.S. & BONATTO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes, Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Mol. Ecol.** **15** (13): 3969-3982, 2006.
36. GREENE, H.W. **Snakes: The Evolution on Mystery in Nature**. Berkeley: University California Press: 351 p, 1997.
37. GUBENSEK, F.; SKET, D.; TURK, V. & LEBEZ, D. Fractionation of *Vipera ammoytes* venom and seasonal variation of its composition. **Toxicon** **12**: 167-171, 1974.
38. GUTIÉRREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G. & CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon** **23**: 887-893, 1985.

39. GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Mem. Inst. Butantan** **51(4)**: 211-223, 1989.
40. GUTIÉRREZ, J.M.; ÁVILA, C.; CAMACHO, Z.; LOMONTE, B. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (Bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon** **28 (40)**: 419-426, 1990.
41. GUTIÉRREZ, J.M. & RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**. **82**, 841-850, 2000.
42. GUTIÉRREZ, J.M. & RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon** **45 (8)**: 997-1011, 2005.
43. HARVEY, A.L. **Snake Toxins**. Int.Encycl.Pharmac.Ther.Sed. 134; Oxford; Pergamon, 1991.
44. HEISE, F.J.; MAXSON, L.R., DOWLING, H.G. & HEDGES, S.B. Higher level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S RNA genes. **Mol. Biol. Evol.** **12(2)**: 259-265, 1995.
45. HITE, L.A.; JIA, G.; BJARNASON, J.; FOX, J.W. Sequences for four snake venom metalloproteinases: Structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** **308 (1)**: 182-191, 1994.
46. HOGE, A.R.; BELLUOMINI, H.E.; FERNANDES, W. Variação do número de placas ventrais de *Bothrops jararaca* em função dos climas (Viperidae, Crotalinae)., **Memo. Inst. Butantan.** **40/41**: 11-17, 1976.
47. IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. **In**: LEE, C.Y. (Ed.). **Snake venoms**. Berlim, Springer-Verlag, 1979.
48. JORGE DA SILVA, N.; GRIFFIN, P.R.; AIRD, S.D. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** **100 B**: 117-126, 1991.
49. JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; FARSKY, S.H.; OLIVEIRA, M.L.; HO, P.L., Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **J. Biol. Chem.** **276 (43)**: 39836-39842, 2001.
50. KAMIGUTI, A.S.; SILVA, M.V. & CARDOSO, J.L.C. Desfibrinação no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.** **19 (28)**: 383-390, 1986.

51. KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; DESMOND, H.; HUTTON, R.A. Systematic haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** **9**: 1097-1105, 1991.
52. KAMIGUTI, A.S.; SLUPSKY, J.R.; ZUZEL, M. & HAY, C.R. Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb. Haemost.** **72** (2): 244-249, 1994.
53. KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I.S. South American snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol.** **14**: 359-374, 1995.
54. KARDONG, K.V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrid & elapids. **Mem. Inst. Butantan** **46**: 105-118, 1982.
55. KARDONG, K.V. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. **J. Toxicol. Toxin. Reviews.** **V.21**, 1-19, 2002.
56. KINI, R.M. Chapter 1: Phospholipase A₂- A complex multifunctional protein puzzle. **In**: KINI, R.M. (Ed.). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. England, Wiley, p. 1-28, 1997.
57. KOCHVA, E. The development of the venom gland in the opisthoglyph snake *Telescopus fallax* with remarks on *Thamnophis sirtalis* (Colubridae, Reptilia). **Copeia** **1965** (4): 147-154, 1963.
58. KOCHVA, E. Oral glands of the reptilian. **In**: GANS, C. (Ed.). **Biology of Reptilia**. **V.8**. Academic Press, London, N. York, 782 pp, 1978.
59. KOCHVA, E.; NAKAR, O.; OVADIA, M. Venoms Toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **Amer. Zool.** **23**: 427-430, 1983.
60. KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** **25**: 65-106, 1987.
61. KONDO, H.; KONDO, S.; KEZAWA, H.; MURATA, R. & OHSAKA, A. Studies on quantitative method for determination of haemorrhagic activity of Habu venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.** **13**: 43-51, 1960.
62. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiology**, **30**: 291-310, 1947.
63. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685, 1970.
64. LI, M. FRY, B.G. & KINI, R.M. 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, 2005.

65. LIZANO, S. DOMONT, G. & PERALES, J. Natural phospholipases A2 myotoxins inhibitor proteins from snakes, mammal and plants. ***Toxicon* 42(8):** 963-977, 2003.
66. LOMONTE, B. & GUTIERREZ, J.M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes da Costa Rica sobre la caseína. ***Rev.Biol.Trop.* 31 (1):** 37-40, 1983.
67. LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual expresión patterns of myotoxin in the venom of the snake *Bothrops asper*. ***Comp. Biochem. Physiol.* 102B(2):** 325-329, 1992.
68. MACHADO, L.F.; LAUGENSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.O.; FONTES, W.; BARBARO, K.C., ROEPSTORFF, P. & SOUZA, M.V. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogyn isoformas in *Loxosceles gaucho* venom. ***Proteomics* 5(8):** 2167-2176, 2005.
69. MACKASSEY, S.P. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). ***Comp. Biochem. Physiol.* 106B (1):** 181-189, 1993.
70. MACKASSEY, S.P. Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. ***J. Toxicol.-Toxin Reviews.* V.21:** 43-83, 2002.
71. MACKASSEY, S.P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K.G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*. A case of venom Paedomorphosis ? ***Copeia* 4:** 769-782, 2003.
72. MANCUSO, L. C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; DE ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. ***Toxicon* 33 (5):** 615-626, 1995.
73. MANDELBAUM, F.R.; REICK, A.P.; ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the haemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. **In:** OHSAKA, A; HAYASHI, K; SAWAI, ***Animal, Plant and Microbial Toxins***. Plenum, London, 111-121, 1976.
74. MANDELBAUM, F.R. & ASSAKURA, M.T. & REICHEL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors and isolated from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). ***Toxicon* 20(6):** 955-972, 1984.
75. MANDELDAUM, F.R.; REICHEL, A. P.; ASSAKKURA, M.T. Hemorrhagic factors from the venom of two species of *Bothrops* snakes. **In: XII Simpósio Anual da ACIESP sobre toxinas Protéicas. Campinas. Anais;** Publicação ACIESP: 9-24, 1988.

76. MANDELBAUM, F.R. & ASSAKURA, M.T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. ***Toxicon* 26 (4):** 379-385, 1988.
77. MARQUES, O.A.V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pit vipers of the genus *Bothrops*. **In:** SCHUETT, G.; HOGGREN, M. & GREENE, H.W. (Ed), ***Biology of the vipers*** .Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, Utah, USA, 2001.
78. MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A jararaca da Ilha da Queimada Grande. ***Ciência Hoje* 31 (186):** 56, 2002.
79. MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A new insular species of pit viper from Brazil, with comments on evolutionary Biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). ***Herpetologica* 58 (3):** p.303-312, 2002.
80. MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. ***Toxicon* 30:** 853-864, 1992.
81. McDIARMID, R. W.; CAMPBELL, J. A.; TOURÉ, T. A. Snakes species of the world. A taxonomic and geographical reference, volume 1. Washington: The Herpetologists' League: ***Zoological Society of London***. 1880 pp, 2001.
82. McDOWELL, S. Systematics . **In:** SEIGEL, R.A.; COLLINS, J.T.; NOVAK, S.S. (Ed.). ***Snakes: Ecology and Evolutionary Biology***. New York: Macmillan Publishing Co., p.3-50, 1978.
83. MEBS, D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. ***Kapua-Darmstadter-zur Naturgeschichte* 8:** p.145-148, 1999.
84. MÉIER, J. & WHITE, J. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. **In:** MÉIER, J. & WHITE, J. (Eds.). ***Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons***. CRC. Press: Boca Raton: Florida, p.367-412, 1995.
85. MENDOZA, C.E.C.; BHATTI, A.R. Eletrophoretic analysis of snake venoms. ***J. Chromatography* 580:** p.355-363, 1992.
86. MINTON, S.A. & MINTON, M.R. **Venomous Reptiles**. New York: Scribners, 1980.
87. MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F. & TANNIZAKI, M.M. Differences in distribution on myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. ***Toxicon* 28 (11):** p.1293-1301, 1990.

88. MOURA DA SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.. & THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparasion of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** **29** (6): p.713-723, 1991.
89. MOURA DA SILVA, A.M. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. **Bol. Biotechnol.** **3**: 3-7, 1992.
90. NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A.R. Thrombin-like factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost.** **41**: 314-328, 1979.
91. NARVAES, L. V. P. *Isolamento e caracterização de toxinas do veneno de Bothrops alcatraz (Marques, Martins e Sazima, 2002.) e aspectos coevolutivos com a dieta.* 2007. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
92. NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K., YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIKA, A. & FUKUI, H. Purification and Characterization of Bothrombin, a Fibrinogen-clotting Serine Protease from Venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry** **33**: 1843-1849, 1994.
93. OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon** **42**: 841-854, 2003.
94. PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.** **267**: 22869-22876, 1992.
95. POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H. & WELLS, K.D. **Herpetology**. Prentice Hall, Upper Saddle River: New Jersey. 337p, 1998.
96. PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARREL, D.A.; DESAKORN, V.; McMICAHEL, A.J.; WHITE, N.J. & BUNNAG, D. The hialuronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon** **26**(7): 629-637, 1988.
97. RAEL, E.D.; KNIGHT, R.A. & ZEPEDA, H. Eletrophoretic variations of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venoms and migration differences of Mojave toxin. **Toxicon** **22**(6): 980-985, 1984.
98. RAFAEL, A. *Variação intraespecífica do veneno de Bothrops jararacussu: análises eletroforéticas, imunológicas e biológicas.* 2005. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
99. RAGE, J.C. La diversité des serpents. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Les serpents**. Bordas. Paris., p. 34-45, 1994.

- 100.RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Epidemiologia e quadros clínicos dos acidentados por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **32**: 436-442 1990.
- 101.RIEPPEL, O. A review of the origin of snakes. **In**: HECHT, M.K.; WALLACE, B.; PRANCE, G.T. (Eds.). **Evolutionary Biology**. Plenum: New York. V.22, p.37-130, 1988
- 102.ROCHA, M.M.T. **Estudo da variação intraespecífica do veneno de *Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron et Duméril, 1854) em função da distribuição geográfica (Serpentes, Viperidae)**. 1995. Dissertação (Mestrado) –Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul.
- 103.ROSENFELD, G. Symptomatology , pathology, and treatment of snakebites in South America. **In**: BUCHREL, W.; BUCKELEY, E.E.; DEULKOFEU, V. (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms. Vol.II.**, New York, Academic Press: 345-384, 1971.
- 104.RUSSEL, F.E. **Snake Venom Poisoning**. J.B. Lippincott: Philadelphia, 526 pp, v
- 105.SALOMÃO, M.G.; WUSTER, W.; THORPE, R.S. DNA evolution of South American pit vipers of the genus *Bothrops*. **In**: THORPE, R.S.; WUSTER, W.; MALHOTRA, A. **Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite**. Claredon, Oxford, UK, 89-98, 1997.
- 106.SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COSTA, G. & DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from south american snakes. **Toxicon** **30** (1): 95-103, 1992.
- 107.SANO-MARTINS, I.S. & SANTORO, M.L. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos do Brasil. **In**: CARDOSO, J.C.L. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Sarvier, 289-309, 2003.
- 108.SASA, M. Diet and snake venom: evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation? **Toxicon** **37**: 249-252, 1999.
- 109.SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pit viper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. **In**: CAMPBELL, JA; BRODIE, ED, **Biology of the Pit vipers**. Selva, Tyler, TX, 199-216, 1992.
- 110.SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; DE SOUZA, G.E.P. & GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca Ilhoa) snake venom. **Toxicon** **28** (3): 261-273, 1990.

- 111.SERRANO, S.M.T.; MATOS, M.F.C.; MANDEULBAUM, F.R. & SAMPAIO, C.A.M. Basic proteinases from *Bothrops mooojeni* (Caissaca) venom-I. Isolation and Activity of two Serine proteinases, MSP1 and MSP2, on syntetic substrates and platelet aggregation. **Toxicon** **31(4)**: 471-481, 1993.
- 112.SERRANO, S.M.T. & FOX, J.W. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotysin family of metalloproteinases. **Toxicon** **45 (8)**: 969-985, 2005.
- 113.SERRANO, S.M.T.; MAURON, R.C. Snake venom serine proteinases; sequence homology vs. Substrate specifity, a paradox to be solved. **Toxicon** **45 (8)**: 1115-1132, 2005.
- 114.SILVEIRA, J. D. Morfologia do litoral. **In**: AROLDO DE AZEVEDO. (Ed.). **Brasil: a terra e o homem. Vol.2**. São Paulo, Companhia Editora Nacional: 253-305, 1964.
- 115.STOCKER, K.F. **Medical of snake venom proteins**. CRC press, 34-50, 1990.
- 116 TAN, N.H. & SAIFUDDIN, M.N. Isolation and characterization of hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). **Toxicon** **28(2)**: 385-392, 1990.
- 117.SUGUIO, K.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P.; DOMINGUEZ, J.M.L.; FLEXOR, I.M.; AZEVEDO, A.E.G. Flutuações do nível relativo do mar durante o quaternário superior do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. **Rev. Brás. Geocien.** **15 (4)**: 273-286, 1985.
- 118.SUGUIO, K.; SALLUN, A.E.M. Geologia do Quaternário e geologia ambiental. **In**: NETO, V.M.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C.D.R.; NEVES, B.B.B. (Ed.). São Paulo: Beca: 461-465, 2004.
- 119.TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological proprieties of some venoms of snake of the genus *Bothrops* (American Lance-Headed Viper). **Comp. Biochem. Physiol.** **100B (2)**: 361-365, 1991.
- 120.TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. A comparative study on the eletrophoretic patterns of snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** **102B (1)**: 103-109, 1992.
- 121.TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. & MIRTSCHEIN, P.J. A comparative study of the biological proprieties of venoms from juvenile and adult islands Taipan (*Oxyuranus microlepidotus*) snake venoms. **Toxicon** **31(3)**: 363-557, 1993.
- 122.THOMAS, R.G. & POUGH, F.H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon** **17**: 221-228, 1979.
- 123.TU, A.T. Snake venoms: Proprieties and Actions. **In**: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. New York, A Wiley. Interscience Publication, p 151-456, 1977.

- 124.VANZOLINI, P.E. Regressão do peso sobre o comprimento em *Bothrops jararaca* e sua variação sexual e estacional. *Pap. Avulsos. Zool. São Paulo Brás.* **VII (25):** 271-292, 1946.
- 125.VANZOLINI, P.E. Distribution and differentiation of animals along the coast and in continental islands of the state of São Paulo, Brazil. 1, introduction to the area and problems. *Papéis Avulsos Zool.* **26 (24):** 281-294, 1973.
- 126.VIDAL, N. Colubrid systematics: evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. *J. Toxicol.-Toxins Reviews.* **V. 21-** 21-41, 2002.
- 127.WARREL, D.A. Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. *Symp. Zool. Soc. Lond.* **70:** 189-203, 1997.
- 128.WEINSTEIN, S.A. & KARDONG, K.V. Proprieties of Duvernoy's secretions from opistoglyphous and aglyphous colubrid snakes. *Toxicon* **32:** 1161-1185, 1994.
- 129.WILLEMSE, G.T. Individual variation in snake venom. Comp. *Biochem. Physiol.* **61B (4):** 553-557, 1978.
- 130.WOLLBERG, Z.; SHABO-SHINA, R.; INTRATOR, N.; BDOLAH, A.; KOCHVA , E., SHAVIT, B.; OON, Y.; VIDNE, B.A. & GITTER, S. A novel cardiotoxin polypeptide from the venom of *Atractaspis engerddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice an isolated rat and human heart preparations. *Toxicon* **26:** 525-534, 1988.
- 131.WUSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. *Toxicon* **35 (3):** 319-340, 1997.
- 132.ZELANIS, A.P.P.; *Análise da variabilidade ontogenética do veneno de Bothrops insularis (Amaral, 1921): implicações adaptativas aos itens alimentares.* 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 133.ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; FRANCISCHETTI, I.M.; GUIMARAES, J.A. *Bothrops jararaca* snake venom effects on platelet aggregation. *Thromb. Res.* **58:** 303-316, 1990.
- 134.ZINGALI, R.B.; BIANCONI, M.L.; MONTEIRO, R.Q. Interaction of Bothrojaracin with prothrombin. *Haemostasis* **31:** 273-278, 2004.