

MARLIETE MARIA SOARES DA SILVA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DA
PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* AMARAL, 1926
(JARACA MALHA DE CASCAVEL)**

RECIFE, 2002

MARLIETE MARIA SOARES DA SILVA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DA
PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* AMARAL, 1926
(JARARACA MALHA DE CASCAVEL)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biologia Animal do Departamento de Zoologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos básicos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Profa. Dr. Míriam Camargo Guarnieri

Recife, 2002

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO	01
II. OBJETIVO	13
III. MATERIAIS E MÉTODOS	14
III.1. MATERIAIS	14
1.1 Serpentes	14
1.2 Peçonha	16
III.2 MÉTODOS	17
2.1 Dosagem Proteica	17
2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente redutor (SDS-PAGE)	18
2.3 Atividade coagulante sobre o plasma	20
2.4 Atividade fosfolipásica	21
2.5 Atividade proteolítica sobre azocaseína	22
2.6 Análise dos dados	23
IV. RESULTADOS	24
1. Dosagem Proteica	24
2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente redutor (SDS-PAGE)	29
3. Atividade coagulante sobre o plasma	32

4. Atividade fosfolipásica	36
5. Atividade proteolítica sobre azocaseína	39
V. DISCUSSÃO	43
VI. CONCLUSÕES	55
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

A variabilidade intraespecífica presente nas peçonhas de serpentes pode causar implicações na sintomatologia dos envenenamentos e nas pesquisas com toxinas desses animais. O presente estudo identificou a variabilidade em 52 amostras de peçonha de *B. erythromelas*, relacionando-a ao sexo, origem geográfica, desenvolvimento ontogenético e variação individual das serpentes. Para tanto, foram determinadas a dosagem proteica, a distribuição de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras, as atividades coagulante sobre o plasma, proteolítica sobre azocaseína e fosfolipásica utilizando clara de ovo como substrato. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas nas amostras de peçonha de *B. erythromelas* provenientes de machos e fêmeas (Achova). A variabilidade das atividades proteolítica ($p=0,004$) e coagulante ($p=0,02$) foi dependente do desenvolvimento ontogenético, observando em ambos os casos relação inversa ao tamanho dos animais. O conteúdo proteico ($p=0,01$) e a atividade fosfolipásica ($p=0,04$) foram significativamente maiores nas amostras de peçonha de serpentes originárias do estado da Bahia quando comparadas às de Pernambuco. A variação individual foi observada no padrão eletroforético das proteínas, conteúdo proteico e atividades fosfolipásica e coagulante. Diante do exposto, concluímos que, dentre os parâmetros testados, o principal fator de variabilidade da peçonha de *B. erythromelas* é de origem genética, porém o desenvolvimento ontogenético e a origem geográfica também são fatores de variabilidade que

devem ser levados em consideração no momento do tratamento ofídico e pesquisas com toxinas dessa espécie.

ABSTRACT

The specific variability of the snake venoms can cause implications on the snakes envenomation symptomatology and at the research with toxins of those animals. The present study determined the variability of 52 *B. erythromelas* venoms samples related to gender, geographic origin, ontogenetic development and the snakes individual variation. It was determined the proteic content, the protein distribution by reducing SDS-PAGE and the following activities: coagulant on plasma, proteolytic on azocasein and phospholipase using egg yolk as substrate. The results did not show significant differences in *B. erythromelas* venom samples from males and females (Anchova). The variability of proteolytic ($p=0,004$) and coagulant ($p=0,02$) activities dependent on the ontogenetic development, observing, in both cases, the inverse relation to the animals size. The proteic content ($p=0,01$) and phospholipase activity ($p=0,04$) were significantly higher on the snake venom samples from the States of Bahia as compared to the ones from Pernambuco. The individual variation was observed on the proteic electrophoretic pattern, protein content and phospholipase and coagulant activity. Based on the exposed above, we concluded that, among of parameters tested, the main factor of the *B. erythromelas* venom variability is the genetic origin, but the ontogenetic development and geographic origin are also variability factors that should be considered at moment of the ophidic treatment and toxin research from this specie.

I. INTRODUÇÃO

SERPENTES

As serpentes surgiram há mais de 125 milhões de anos, no Cretácio inferior, e estão distribuídas por todo o mundo habitando a zona tropical, subtropical e temperada. A classificação zoológica agrupa as serpentes na subordem Ophidia ou Serpente, e, juntamente com lagartos e anfisbênias a ordem Squamata, subclasse Lepdossauria e classe Reptilia (Habermahl, 1981; Romano-Hoge, 1990).

Atualmente são encontradas, aproximadamente, 2700 espécies de serpentes em todo o mundo, distribuídas em 18 famílias e 420 gêneros. De todas as espécies de ofídios conhecidos cerca de 10% são considerados peçonhentos (Campbel e Lamar, 1989; Romano-Hoge, 1990).

No Brasil estão catalogadas 64 espécies de serpentes peçonhentas de importância médica distribuídas em duas famílias: Viperidae e Elapidae. A família Viperidae está representada pelos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus), e Elapidae pelos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais verdadeiras) (Silva Jr *et al.*, 1991; Borges, 1999).

Cerca de 30 espécies e subespécies do gênero *Bothrops* são conhecidas no Brasil. A classificação inicial das espécies foi realizada por Amaral (1944) através das características morfológicas (tipo de cauda e escamas subcaudais) e hábitos dos animais (terrestre ou arborícola).

Atualmente são utilizadas técnicas mais avançadas para análise de parentesco entre espécies, tais como eletroforese das proteínas totais do plasma e morfologia interna do hemipênis, assim como utilização de caracteres moleculares, principalmente, do DNA mitocondrial (Janeiro-Cinquini *et al.*, 1989). De acordo com a análise de doze espécies, estudadas até o momento, foi possível classificar o gênero *Bothrops* em quatro grupos distintos:

1. **Grupo Atrox:** formado por *Bothrops atrox*, *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. pradoi*;
2. **Grupo Alternatus:** formado por *B. alternatus*, *B. cotiara* e *B. fonsecai*;
3. **Grupo Neuwiedi:** formado por *B. neuwiedi* e *B. erythromelas*;
4. **Grupo Jararaca:** formado por *B. jararaca*, *B. insulares* e *B. jararacussu*.

No estado de Pernambuco, de acordo com Vanzolini *et al.* (1980), encontram-se apenas duas espécies do gênero *Bothrops*: *B. erythromelas* em toda área de caatinga e, possivelmente, *Bothrops neuwiedi piauihyensis* restrita a caatinga do Sertão do São Francisco. Mais recentemente, Siqueira - Filho (2000) confirmou a ocorrência de *Bothriopsis bilineata* em área de floresta montana, citada anteriormente por Ramos (1944); e Soares (2001) registrou a ocorrência de *Bothrops leucurus*, restrita a mata remanescente, no município de Caruaru.

A espécie *B. erythromelas* (figura 1) é conhecida, popularmente, como jararaca malha de cascavel ou jararaca avermelhada, e se encontra amplamente distribuída na caatinga dos estados de Pernambuco, Minas Gerais, Sergipe, Alagoas, Paraíba e Ceará (Romano - Hoge, 1990), além de brejos de altitudes ou regiões de mata remanescente do estado de Pernambuco (Soares 2001). Existem poucos estudos com relação a biologia, história natural e manejo dessa espécie. Silva Filho (2000) acompanhou o nascimento de 20 filhotes de *B. erythromelas* mantidos em cativeiro, observando, a partir dos dados biométricos dos neonatos, que essa espécie pode ser incluída entre as menores espécies do gênero *Bothrops*, e não apresenta dimorfismo sexual ou ontogênico.



Figura 1. *Bothrops erythromelas* (Souto, 2000).

No Brasil, os acidentes ofídicos têm importância médica e epidemiológica, constituindo um problema de saúde pública. No país são registrados, anualmente, 20.000 acidentes ofídicos dos quais 13,8% ocorrem na região Nordeste. No triênio 1995 a 1997 foram notificados 1.389 acidentes com animais peçonhentos no estado de Pernambuco, sendo 70% causados por serpentes peçonhentas. As espécies botrópicas se encontram amplamente distribuídas em todo território nacional e são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos notificados no sudeste do Brasil (Cardoso, 1992) e 78,8% no estado de Pernambuco (Aquino, 1999). A região Nordeste é a primeira em letalidade por acidentes ofídicos (0,81%), seguindo-se do Centro - Oeste (0,63%), Norte (0,53%), Sul (0,33%) e Sudeste (0,26%) (FNS, 1998).

PEÇONHAS OFÍDICAS

A peçonha, substância tóxica produzida por animais, é utilizada para imobilização, defesa e digestão da presa. Nas serpentes, dependendo da espécie, a peçonha pode ser produzida em dois tipos de glândulas: Duvernoy e de peçonha (Vital Brazil, 1982; Stoker, 1990).

A glândula de Duvernoy é constituída por várias células serosas e não apresenta lúmen para estocagem ou músculo responsável pela liberação de peçonha, sendo a peçonha liberada através da pressão realizada pela mandíbula da serpente no ato da alimentação ou defesa (Vital

Brazil, 1982). Por outro lado, as glândulas de peçonha possuem células cujo formato é triangular e a peçonha produzida é estocada em um grande lúmen. A ejeção e o movimento das presas inoculadoras de peçonha são realizadas voluntariamente pelo controle muscular (Stoker, 1990). Yamanouye *et al.* (1997), analisando as glândulas de peçonha de *B. jararaca*, observaram que o sistema nervoso simpático está intimamente ligado às funções de produção e secreção de peçonha.

As proteínas constituem cerca de 90% do peso seco das peçonhas ofídicas. A fração não protéica compreende ânions e cátions inorgânicos, lipídeos, carboidratos, pequenos peptídeos e aminoácidos dentre outros (Stoker, 1990).

As enzimas existentes nas peçonhas tais como proteases, fosfolipases e hialuronidases contribuem para a difusão dos constituintes das peçonhas no tecido conjuntivo da presa ou predador, promovendo maior absorção da mesma, além de efeitos locais (Vital Brazil, 1982).

Em geral, os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas) são caracterizados por efeitos no local da picada como: dano tecidual local induzido por mionecrose, edema, hemorragia e infiltrado celular; choque hipovolêmico e alterações na coagulação sangüínea, ocasionando incoagulabilidade sangüínea por defibrinogenação. Em casos graves, os acidentados podem apresentar hemorragias em órgãos eqüidistantes do local da picada (coração, pulmões, rins, intestinos e cérebro), gengivorragia, hematúria, hematêmese e insuficiência renal aguda (Cardoso e Brando, 1982; Vital Brazil, 1982; Gutiérrez e Lomonte, 1989;

FNS, 1998). Em Pernambuco, as vítimas de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, no período de 1995 a 1997, apresentaram predominantemente alterações no local da picada como dor (77,7%) e edema (68,3%) e em menor proporção, sangramento local, eritema, equimose, abscesso e necrose (Aquino, 1999).

A hemorragia constitui um dos efeitos mais evidentes no acidente botrópico, a qual é causada, primariamente, por toxinas hemorrágicas ou hemorraginas e agravada por enzimas que atuam consumindo fatores da coagulação sangüínea (Kamiguti *et al.*, 1991). Valença (1997) observou que o inóculo de peçonha de *B. erythromelas* em cães induz um quadro hemorrágico agudo sistêmico, com comprometimento dos pulmões, rins e fígado, sendo evidenciadas alterações clínicas como gengivorragia, petéquias hemorrágicas cutâneas e hematúria.

As alterações no sistema de coagulação são comuns após os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, devido a ação de proteinases, trombina - símile, ativadores de fator X, ativadores de protrombina (Fator II), enzimas fibrinolíticas e fibrinogenolíticas existentes na peçonha (Gené *et al.*, 1989; Kamiguti *et al.*, 1991). Apesar do efeito da incoagulabilidade ser bastante alarmante, dois dias após o tratamento com soro antiofídico, as funções dos fatores da coagulação retomam suas atividades normais, predominando apenas os fatores locais que fazem com que o paciente permaneça mais tempo hospitalizado (Ribeiro e Jorge, 1990).

A peçonha de *Bothrops erythromelas* caracteriza-se por apresentar uma das mais potentes atividades coagulantes do gênero

Bothrops e (Furtado *et al.*, 1991; Zapellini, 1991; Sanches *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1992) pela ausência da atividade trombina símile, juntamente com *B. castelnaudi* (Nahas *et al.*, 1979; Furtado *et al.*, 1991; Maruyama *et al.*, 1992). O inóculo da peçonha de *B. erythromelas*, em cães, induz a um quadro de hipercoagulação, seguido de incoagulabilidade sangüínea em virtude do consumo dos fatores II, V e X (Vasconcelos, 1996).

A atividade proteolítica presente nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* pode ser refletida na sintomatologia do acidentado, sendo caracterizada pela presença de edema, dor, rubor, eritema, bolhas e necrose (Cardoso e Brando, 1982). As proteases podem ser classificadas, assim como as toxinas hemorrágicas, em dois grupos distintos: serinoproteinases e metaloproteinases (Sousa *et al.*, 2001). Em algumas peçonhas de serpentes as atividades hemorrágica e proteolítica se encontram associadas, intensificando ainda mais o quadro clínico do envenenamento ofídico (Soto *et al.*, 1988; Sousa *et al.*, 2001). De fato, essa associação foi observada por Soto *et al.* (1988) na peçonha de *Crotalus m. molossus*, o mesmo não pôde ser relatado por Assakura *et al.* (1992) analisando a peçonha de *Bothrops atrox*, que apesar de muito ativa no substrato caseína, apresentava baixa atividade hemorrágica.

As fosfolipases são enzimas esterolíticas capazes de hidrolisar fosfolipídeos e classificadas em A1, A2, B, C e D, dependendo do sítio de hidrólise do substrato. As fosfolipases A₂ (PLA₂) hidrolisam fosfolipídeos na posição sn² do glicerol. Essas enzimas são encontradas no meio intra e extracelular e nos mamíferos desempenham uma importante função na

manutenção dos fosfolipídeos celulares e reparo das membranas, além de participar de vários processos fisiológicos e patológicos (Kini, 1997). As (PLA₂) estão distribuídas em vários grupos dependendo de sua estrutura e mecanismo de catálise. As enzimas do grupo I são encontradas em peçonhas de serpentes das famílias Elapidae e Hydrofidae e em suco pancreático de mamíferos. As pertencentes ao grupo II estão presentes nas peçonhas de serpentes das sub-famílias Viperinae e Crotalinae, fluido sinovial humano e em plaquetas de mamíferos. Nas peçonhas de abelhas (*Apis mellifera*) e do único lagarto peçonhento (*Helomaderma sp*) se encontram as PLA₂s do grupo III. O grupo IV é o mais recente e inclui a PLA₂ isolada da peçonha do molusco *Conus magnos* (Dennis, 1994; Arni e Ward, 1996; Kini, 1997).

Vários pesquisadores têm demonstrado os efeitos patológicos decorrentes das PLA₂s presentes nas peçonhas de serpentes. Essas enzimas podem apresentar potência letal e farmacológica variável, apresentando desde baixa letalidade e nenhuma ação órgão – específica até alta toxicidade e especificidade a exemplo das neurotoxinas (Rosemberg, 1997). Em muitas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* as propriedades miotóxicas são influenciadas por PLA₂ com atividade enzimática e miotóxica. Em alguns casos, o dano muscular bem como a citólise e liberação de lisossomos ocorre onde a atividade da PLA₂ é inibida, embora a atividade enzimática aumente a ação das miotoxinas (Gutiérrez e Lomonte, 1995). Na peçonha de *Naja n. naja*, o edema induzido provocado pela formação de prostaglandinas e leucotrienos está relacionado com uma

PLA₂, enquanto em *Naja n. sputatrix* a PLA₂ desempenha forte influencia na atividade anticoagulante e letal desta peçonha (Rosenberg, 1997). Por outro lado, a fosfolipase purificada da peçonha de *B. erythromelas* não apresenta nenhuma associação com as atividades letal, hemorrágica, edematogênica, coagulante ou anticoagulante, apesar de possuir alta atividade enzimática (Modesto, 2000).

VARIABILIDADE DAS PEÇONHAS OFÍDICAS

A variabilidade nos constituintes das peçonhas pode ser encontrada em vários grupos de animais peçonhentos como serpentes, formigas, escorpiões e aranhas, dentre outros (Sanches *et al.*, 1992; Assakura *et al.*, 1992; Kalapothakis e Chávez–Olórtegui, 1997; Debont *et al.*, 1998; Binford, 2001; Orivel e Dejean, 2001)

Indivíduos de diferentes famílias, gêneros, espécies e até mesmo os da mesma espécie apresentam diferenças nos constituintes de suas peçonhas. As variações intraespecíficas estão presentes em relação a sazonalidade; *habitat*, idade dos espécimes; dimorfismo sexual e dieta alimentar (Chippaux *et al.*, 1991). Os estudos da variabilidade das peçonhas de serpentes quanto aos aspectos farmacológicos e químicos de seus constituintes têm sido amplamente realizados para o conhecimento de relações filogenéticas e identificação de espécies morfologicamente duvidosas (Tu *et al.*, 1980; Perrone *et al.*, 1989), além da própria caracterização das peçonhas de espécies do mesmo gênero (Aird e Silva

Jr., 1991; Silva Jr. *et al.*, 1991; Tan e Ponnudurai, 1991; Assakura *et al.*, 1992; Leite *et al.*, 1992; Cavinato *et al.*, 1998).

O *habitat* pode representar uma forte influência na variação dos constituintes da peçonha de serpentes. A sintomatologia dos acidentes ocasionados por *Vipera russelli*, amplamente distribuída no sudeste da Ásia, pode ser caracterizada dependendo da origem geográfica do espécime responsável pelo acidente. Por exemplo, serpentes provenientes do Sri Lanka, freqüentemente, ocasionam envenenamentos caracterizados por neurotoxicidade e hemólise intravascular, enquanto a presença de hemorragia na pituitária pode ser observada na sintomatologia dos acidentes com espécimes provenientes de Burna e sul da Índia (Jayanthi e Veerabasappa-Gowda, 1988).

Na Europa, as observações clínicas realizadas em vítimas de acidentes ocasionados em diferentes épocas do ano chamaram a atenção para variações sazonais presentes na peçonha de *Vipera aspis*. Os envenenamentos ocasionados na primavera e verão apresentavam sintomatologia mais grave que os ocorridos nos demais meses do ano (Chippaux *et al.*, 1991).

Kouyoumdjian e Polizelli (1989) analisaram acidentes com serpentes filhotes e adultas de *Bothrops moojeni* e correlacionaram com a idade dos animais, concluindo que a peçonha dos filhotes apresentava maior capacidade na alteração da coagulação sangüínea que a peçonha de serpentes adultas. Da mesma forma, Ribeiro e Jorge (1990) observaram que os acidentes ocasionados por serpentes adultas de *B. jararaca*

apresentavam, freqüentemente, efeitos locais bastante pronunciados tais como abscessos, necrose e edema, enquanto a peçonha dos filhotes causava alterações na coagulação sangüínea.

Alguns pesquisadores têm realizado estudos comparativos nos constituintes da peçonha de serpentes fêmeas e machos da mesma espécie, no entanto, os dados obtidos não apresentam consistência em virtude do número amostral dos animais. Contudo, fêmeas de *Calloselasma rhodostoma*, *Bitis nasicornis* e *Crotalus adamanteus* têm apresentado semelhança quanto a produção de um componente adicional da peçonha, o qual está ausente nas serpentes de sexo masculino da mesma espécie (Daltry *et al.* 1996).

A variabilidade na composição das peçonhas pode determinar diferenças significativas na sintomatologia durante o envenenamento humano. A disparidade na sintomatologia dos acidentes humanos com serpentes da mesma espécie tem alertado a comunidade médica para a necessidade de antivenenos mais específicos ou pelo menos a utilização de peçonhas de animais de uma forma mais heterogênea possível, ou seja, animais de diferentes idades, sexos e provenientes de várias regiões onde ocorra a produção do soro (Russel, 1997).

Pontes (2000) comparou a capacidade neutralizante dos soros antibotrópicos poliespecífico comercial e monoespecífico contra a peçonha *B. erythromelas*, uma vez que essa espécie é considerada a principal responsável pelos acidentes botrópicos que ocorrem na região Nordeste. Os resultados encontrados revelaram uma importante diferença na

neutralização das atividades enzimáticas e biológicas da peçonha de *B. erythromelas* pelos soros antibrotrópicos poliespecífico comercial e monoespecífico. Todas as atividades testadas (letal, necrosante, hemorrágica, coagulante sobre plasma e fosfolipásica) foram neutralizadas por ambos soros, porém as quantidades necessárias para neutralização foram, aproximadamente, o dobro para o soro antibrotrópico poliespecífico comercial quando comparado ao soro monoespecífico.

A existência dessas variações nas peçonhas de serpentes apresenta sérias implicações, não apenas para medicina clínica e no tratamento dos pacientes picados por serpentes, mas também para toxinologia e outras pesquisas usando as peçonhas de serpentes ou seus componentes como ferramentas biológicas (Wüster e McCarthy, 1995).

A importância da espécie *Bothrops erythromelas* para região Nordeste, a escassez de trabalhos que avaliam os fatores que causam a variabilidade nas peçonhas de serpentes brasileiras e as dificuldades de neutralização pelo soro antibrotrópico comercial nos impulsionaram a aprofundar o conhecimento acerca da peçonha dessa espécie, através da realização desse trabalho.

II. OBJETIVO

Determinar se a variabilidade presente na composição de algumas atividades enzimáticas da peçonha de *Bothrops erythromelas* está relacionada a fatores ligados ao sexo, desenvolvimento ontogenético, origem geográfica e/ou variação individual.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 MATERIAIS

1.1 Serpentes

Cinquenta e dois espécimes de *Bothrops erythromelas* foram utilizados para realização do presente trabalho. Vinte um animais foram coletados no estado de Pernambuco, sendo dezessete serpentes mantidas no Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da UFPE (LAPT_x –UFPE) e as demais em um serpentário de Petrolina (n= 4). Nove espécimes foram coletados na Bahia e mantidos no Laboratório de Animais Peçonhentos - UFBA (n= 4); serpentário de Petrolina (n= 2), Laboratório de Animais Peçonhentos da Universidade Estadual de Feira de Santana (n= 1) e Instituto Butantan – SP (n= 2). Os demais espécimes (n= 22) nasceram no laboratório da Fundação Ezequiel Dias – MG, porém foram provenientes de serpentes prenhes coletadas em Itaparica (Bahia). As serpentes foram sexadas, quando possível, e seus tamanhos foram determinados, em centímetros, a partir da medida da extremidade do focinho até o final da cauda (rostro - caudal). Na tabela 1 encontram-se as informações sobre origem, local de manutenção, sexo e tamanho das serpentes utilizadas. As serpentes com tamanho entre 35 e 50cm foram consideradas jovens e as acima de 50cm adultas.

Tabela 1. Número da serpente, origem, instituição, sexo e tamanho (cm) dos espécimes de *B. erythromelas* utilizados neste trabalho. (* Informações desconhecidas)

Amostras	Local de Origem		Cativoiro	Sexo	Tamanho (cm)
	Bioma	Cidade/Estado			
01	Caatinga	Sertânea-PE	LAPT _x - UFPE	F	35
02	Caatinga	Sertânea-PE	LAPT _x – UFPE	F	35
03	Caatinga	Ibimirim-PE	LAPT _x – UFPE	F	38
04	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	F	62
05	Caatinga	Custódia-PE	LAPT _x – UFPE	F	36
06	Caatinga	Custódia-PE	LAPT _x – UFPE	F	59
07	Caatinga	Ibimirim-PE	LAPT _x – UFPE	F	58
08	Caatinga	Ibimirim-PE	LAPT _x – UFPE	F	40
09	Caatinga	Ibimirim-PE	LAPT _x – UFPE	F	33
10	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	F	67
11	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	F	46
12	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	F	61
13	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	M	62
14	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	M	56
15	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	F	69
16	Caatinga	Afogados da Ingazeira-PE	LAPT _x – UFPE	F	57
17	Caatinga	Petrolina-PE	Petrolina	F	*
18	Caatinga	Petrolina-PE	Petrolina	F	88
19	Caatinga	Petrolina-PE	Petrolina	F	*
20	Mata	Caruaru-PE	LAPT _x – UFPE	F	43
21	Caatinga	Petrolina-PE	Petrolina-PE	*	43
22	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	57
23	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	60
24	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	68
25	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	78
26	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	61
27	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	73
28	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	82
29	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	63
30	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	68
31	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	88
32	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	82
33	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	84
34	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	89
35	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	57
36	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	57
37	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	81
38	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	64
39	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	61
40	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	72
41	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	73
42	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	F	82
43	Caatinga	Itaparica-BA	FUNED-MG	M	61
44	Caatinga	Feira de Santana-BA	LAP – UFBA	F	80
45	Caatinga	Itaparica-BA	LAP – UFBA	F	33
46	Caatinga	Itaparica-BA	LAP – UFBA	F	71
47	Caatinga	Xingó-BA	LAP – UFBA	*	*
48	Caatinga	Xingó-BA	LAP – UFBA	*	61
49	Caatinga	Juazeiro-BA	Petrolina-PE	*	33
50	Caatinga	Itaparica-BA	Butantan-SP	M	65
51	Caatinga	Maracas-BA	Butantan-SP	M	54
52	Caatinga	Juazeiro-BA	Petrolina-PE	M	55

1.2 Peçonha

As amostras de peçonha de *Bothrops erythromelas* foram obtidas a partir de extrações manuais utilizando gás carbônico (sólido ou gasoso) como anestésico. A compressão das glândulas de peçonha, com os dedos polegar e indicador, foi realizada após anestesia dos animais. A peçonha foi recolhida em tubos capilares para evitar perda das amostras, transferidas para recipientes plásticos, liofilizadas e acondicionadas a -20°C até o momento do uso.

III.2 MÉTODOS

2.1 Dosagem Protéica

A quantificação de proteínas nas amostras individuais de peçonha de *B. erythromelas* foi realizada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Miller (1959).

Quinhentos microlitros de reagente de tartarato de cobre (Na_2CO_3 10% - NaOH 0,5 M; CuSO_4 5%, tartarato de Na e K 1%; na proporção 100: 1: 9, respectivamente) foram adicionados à 100 μL das amostras individuais de peçonha (50 μg dissolvidos em 100 μL de NaCl 0,85%). Após 10 minutos à temperatura ambiente, foram acrescentados 1,5 mL do reagente de fenol de Folin Ciocalteau 0,17 N (Haloquímica) e a mistura foi mantida a 50 $^{\circ}\text{C}$, durante 10 minutos. Após o resfriamento, as densidades ópticas foram determinadas através da leitura em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech – Ultrospec[®] 200) a 650 nm.

As amostras foram analisadas em triplicata e para estimar as concentrações de proteínas de cada amostra foi construída uma curva padrão de albumina bovina nas concentrações de 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), com algumas modificações nas concentrações dos géis de empilhamento e resolução.

Para análise eletroforética das amostras de peçonhas de *B. erythromelas* foi utilizado gel de empilhamento 4% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e gel de resolução 12%, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, nas proporções descritas na tabela 2.

Dez microlitros de cada amostra e 4 µL dos padrões de massa relativa, previamente diluídos em tampão de amostra (Tris 12,4 mM; SDS 4%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,05%) foram aplicados em cada poço do gel. O tampão de corrida empregado foi Tris 0,025 M - glicina 0,192 M - SDS 0,1%, pH 8,3.

A SDS - PAGE foi processada a 72 mA e 150 V, por aproximadamente 7 horas. Os géis foram corados e fixados durante 14 horas, a 28° C, em solução de Coomassie Brilliant Blue® R-250 (Sigma) 0,4% - ácido acético 7% - metanol 50% e, posteriormente, descorados em solução de ácido acético 10% - metanol 45%. Os géis foram colocados em solução de secagem (metanol 40% - glicerina 1%) durante 6 horas e em seguida foram fotografados.

Os pesos moleculares (PM) das amostras individuais de peçonha foram determinados a partir de uma equação linear obtida na curva de calibração da SDS - PAGE com proteínas padrão (tabela 3).

Tabela 2. Reagentes utilizados na preparação dos géis de empilhamento e de resolução em SDS - PAGE.

Soluções	Gel de resolução (mL) (12%)	Gel de empilhamento (mL) (4%)
Acrilamida/bisacrilamida	12,0	13,0
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	2,5
Tris-HCl 1,5 M pH 8,75	7,5	-
SDS* 10%	0,3	0,1
Água deionizada	10,05	6,1
TEMED**	0,015	0,01
Persulfato de amônia 10%	0,15	0,05

* Dodecil sulfato de sódio; ** N,N,N',N' Tetrametil etilenodiamina

Tabela 3. Proteínas padrão de massa relativa (Sigma) utilizadas para obtenção da curva de calibração da eletroforese em gel de poliacrilamida.

PROTEÍNAS PADRÃO	MASSA RELATIVA (Dalton)
α - Lactoalbumina	14.000
Albumina Bovina	67.000
Anidrase Carbônica	30.000
Fosforilase b	94.000
Inibidor de tripsina de soja	20.000
Ovoalbumina	43.000

2.3 Atividade Coagulante sobre o plasma

A atividade coagulante da peçonha de *B. erythromelas* foi avaliada segundo o método de Theakston e Reid (1983).

Inicialmente foi obtida uma curva padrão com uma mistura de peçonha de *B. erythromelas* para obtenção da concentração intermediária, considerada ótima. A concentração ótima foi utilizada para análise das amostras individuais de peçonha. A mistura foi formada a partir da reunião de 1 mg de todas as amostras de peçonhas individuais. A mistura foi diluída em água destilada, liofilizada e mantida à -20°C até o momento do uso.

Alíquotas de 300 μL de plasma humano citratado (1 parte de citrato de sódio 3,8% para 9 partes de sangue) foram mantidas a 37°C , por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 75 μL da mistura de peçonha em diferentes concentrações (2,0; 6,0; 18,5; 55,5; 166,7; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) diluída em NaCl 0,85% e o tempo de coagulação cronometrado. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

A análise das amostras individuais de peçonha foi realizada de acordo com o método anteriormente citado, utilizando a concentração de 166,7 $\mu\text{g/mL}$. Todas as dosagens das amostras foram realizadas em triplicata.

Para determinação da atividade coagulante foi calculado o índice de coagulação (I.C.), determinado pela equação 1:

$$\text{I.C.} = 1000/\text{TC} \quad (1)$$

Onde: (TC) tempo de coagulação obtido em segundos.

2.4 Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada através do método de Marinetti (1965), com algumas modificações na concentração do tampão de diluição.

Uma solução contendo gema de ovo diluída em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, em uma proporção em que a densidade óptica a 925 nm correspondesse a aproximadamente 0,6, foi utilizada como substrato. À 2 mL do substrato foram adicionados 50 µL da mistura de peçonha em diferentes concentrações (20; 40; 60; 80; 100 µg/50 µL). A densidade óptica foi anotada a cada 15 segundos durante 2 minutos.

A análise das amostras individuais de peçonha foi realizada, em duplicata, utilizando a concentração de 40µg/50µL, de acordo com método anteriormente citado. Uma unidade de atividade foi considerada como sendo a quantidade de peçonha capaz de reduzir 1,0 miliunidade de densidade óptica por minuto.

2.5 Atividade Proteolítica sobre Azocaseína

A atividade proteolítica sobre azocazeína foi realizada segundo a metodologia descrita por Silva Jr. *et al.* (1991).

Dois microlitros (140; 120; 100; 80; 60; 40 e 20 µg/mL) da mistura de peçonha foram incubados a 37^o C por 2,5 h com 1 mL de azocazeína (1 mg/mL) diluída em PBS (tampão fosfato salino). A reação foi interrompida mediante a adição de 100 µL de ácido tricloro acético 0,5 M gelado. A mistura foi centrifugada durante 5 minutos e o sobrenadante foi avaliado em espectofotômetro no comprimento de onda de 342 nm (D.O.).

As amostras individuais foram testadas na concentração 50mg/mL, segundo metodologia citada anteriormente

A atividade azocaseínolítica específica (A.A.C.), expressa em mg de peçonha foi calculada segundo a equação 2:

$$\text{A.A.C. (U/mg)} = (\text{D.O. 342 nm/mg peçonha}) \times 100 \quad (2)$$

2.6 Análise dos Dados

A análise estatística dos resultados obtidos para determinação da presença de variação geográfica, sexual e ontogenética foi realizada pelo teste de Co-Variância (Anchova), admitindo-se nível de significância $p < 0,05$ de acordo com Zaar (1996).

A análise da variação individual foi realizada comparando-se os resultados de cada subgrupo composto pelos animais de mesmo tamanho, origem geográfica e sexo. A variação individual foi considerada presente quando os resultados excederam os desvios padrões para cada subgrupo, em cada atividade testada.

IV. RESULTADOS

1. Dosagem Protéica

A dosagem de proteínas das amostras de peçonha de *B. erythromelas* foi estimada a partir da curva padrão da figura 2. Os resultados revelaram que todas as amostras de peçonha de *B. erythromelas* apresentaram alto conteúdo de proteínas. A quantidade de proteínas nas amostras de peçonha ficou compreendida entre $662,3 \pm 24,28 \mu\text{g/mg}$ e $1591,4 \pm 18,00 \mu\text{g/mg}$ (dados não mostrados). Uma vez que o método superestima a quantidade de proteínas, todos os valores encontrados nas dosagens foram divididos por um fator de ajuste (1,5914), com o objetivo de padronizar todos os resultados a 100%. Desta forma a percentagem de proteínas nas amostras de peçonha de *B. erythromelas* variou entre 41,6 e 100% (tabela 5).

Os resultados obtidos indicaram relação significativa ($p= 0,01$) entre a quantidade de proteínas e a procedência dos animais, sendo as serpentes provenientes do estado da Bahia, as que apresentaram maiores concentrações de proteínas em suas peçonhas (figura 3). A comparação entre conteúdo de proteínas e tamanhos dos animais não apresentou relação significativa ($p= 0,92$), da mesma forma que a comparação entre o sexo das serpentes e seus conteúdos protéicos também não foi significativa ($p= 0,86$). Por outro lado, a quantidade de proteínas encontrada em

serpentes do mesmo sexo, origem geográfica e tamanhos similares foi variável.

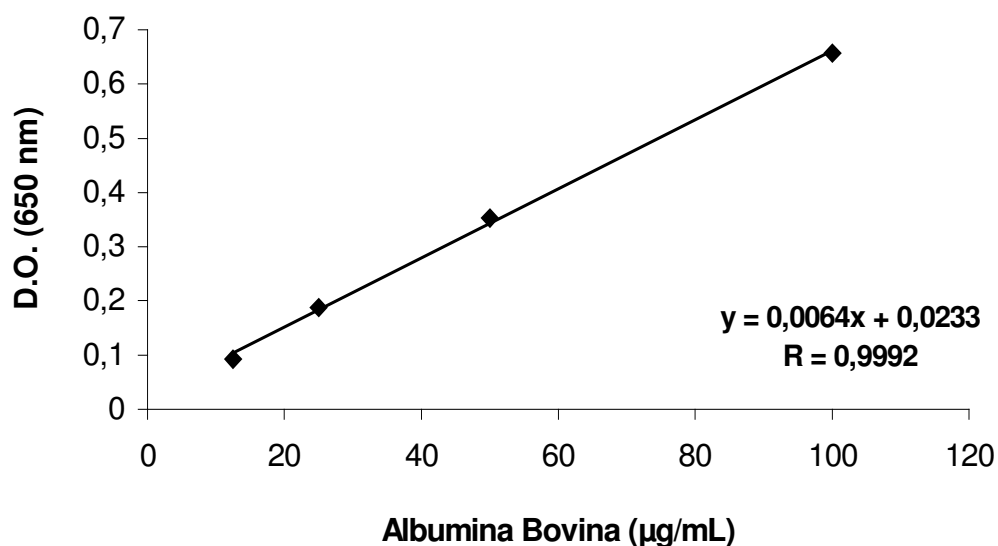


Figura 2. Curva padrão da dosagem proteica. Cem microlitros de albumina bovina (125; 250; 500 e 1000 µg/mL) foram adicionados a 500 µL de Tartarato de Na e K durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de reagente de Folin, sendo a mistura mantida a 50 °C durante 10 minutos. Após o resfriamento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 650 nm.

Tabela 5. Resultados das atividades enzimáticas e quantificação de proteínas das amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas*.

Amostras	Proteínas (%)	IC=1000/TC	Ativ. Fosfolipásica U/ mg	Ativ. Azocaseinolítica (U/mg)
01	45,7 ± 3,3	72,5 ± 2,9	1737,5 ± 530,3	61,0 ± 0,1
02	41,6 ± 2,4	95,2 ± 8,7	2800,0 ± 88,4	*
03	54,4 ± 1,1	85,0 ± 2,5	1931,2 ± 97,2	71,6 ± 0,1
04	53,3 ± 2,5	63,0 ± 1,1	2393,7 ± 291,7	68,3 ± 0,1
05	53,9 ± 4,2	77,0 ± 0,0	1801,5 ± 444,1	83,3 ± 0,1
06	48,7 ± 1,6	59,0 ± 0,0	912,5 ± 300,5	51,3 ± 0,1
07	62,0 ± 0,2	44,0 ± 5,3	1756,2 ± 44,2	46,5 ± 0,1
08	51,2 ± 0,2	57,0 ± 2,5	2150,0 ± 0,0	51,0 ± 0,1
09	64,8 ± 6,4	84,0 ± 8,7	1456,2 ± 79,5	*
10	58,1 ± 2,2	50,0 ± 1,0	1762,5 ± 53,0	55,3 ± 0,1
11	57,4 ± 6,5	90,1 ± 8,7	1750,0 ± 282,8	*
12	64,4 ± 3,2	94,3 ± 0,0	1681,2 ± 627,6	63,5 ± 0,1
13	59,3 ± 3,0	35,5 ± 0,6	693,7 ± 308,1	50,8 ± 0,1
14	57,9 ± 3,8	73,5 ± 2,0	1887,5 ± 159,1	56,0 ± 0,1
15	61,1 ± 2,4	55,2 ± 1,2	1231,2 ± 150,3	52,3 ± 0,1
16	59,0 ± 5,6	49,0 ± 1,8	1306,0 ± 114,5	59,7 ± 0,1
17	59,3 ± 5,4	36,0 ± 0,0	1650,0 ± 141,4	49,3 ± 0,1
18	65,2 ± 1,7	35,3 ± 1,2	2006,2 ± 114,9	48,5 ± 0,1
19	78,8 ± 1,2	60,0 ± 2,2	2450,0 ± 106,1	54,7 ± 0,1
20	73,5 ± 0,6	55,2 ± 9,0	200,0 ± 88,4	59,8 ± 0,1
21	53,2 ± 0,1	51,3 ± 2,2	*	*
22	72,0 ± 0,1	71,0 ± 3,3	1600,0 ± 53,0	56,7 ± 0,1
23	74,0 ± 1,4	59,2 ± 9,0	2625,0 ± 530,3	59,5 ± 0,1
24	78,7 ± 1,7	8,3 ± 0,0	2193,7 ± 79,5	56,6 ± 0,1
25	87,7 ± 12,3	23,0 ± 0,7	1762,5 ± 35,3	55,7 ± 0,1
26	76,0 ± 17,0	48,5 ± 2,0	2550,0 ± 106,1	57,9 ± 0,1
27	64,4 ± 12,9	42,2 ± 1,7	1212,5 ± 671,7	57,6 ± 0,1
28	64,5 ± 11,9	27,7 ± 0,7	1312,5 ± 194,4	55,9 ± 0,1
29	78,5 ± 9,1	53,5 ± 1,6	1500,0 ± 282,8	59,4 ± 0,1
30	75,5 ± 19,5	39,0 ± 1,2	2162,5 ± 159,1	54,0 ± 0,1
31	75,6 ± 13,6	38,0 ± 2,8	1475,0 ± 88,4	54,3 ± 0,1
32	68,0 ± 2,4	41,3 ± 2,8	2475,0 ± 212,1	53,2 ± 0,1
33	75,7 ± 9,9	62,5 ± 0,0	2062,5 ± 159,1	52,7 ± 0,1
34	64,9 ± 8,8	36,4 ± 2,8	2187,5 ± 123,7	53,2 ± 0,1
35	66,2 ± 1,3	29,3 ± 4,3	2125,0 ± 618,7	54,5 ± 0,1
36	67,4 ± 17,7	44,8 ± 1,7	3881,2 ± 203,3	51,2 ± 0,1
37	93,5 ± 10,8	16,0 ± 1,0	1400,0 ± 265,2	52,4 ± 0,1
38	62,6 ± 5,4	33,0 ± 0,5	2175,0 ± 176,8	55,1 ± 0,1
39	69,6 ± 0,5	40,0 ± 0,0	2268,7 ± 8,8	52,7 ± 0,1
40	69,1 ± 0,5	49,5 ± 0,9	2562,5 ± 17,7	60,7 ± 0,1

Continuação da tabela 5. Resultados das atividades enzimáticas e quantificação de proteínas das amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas*.

Amostras	Proteínas (%)	IC=1000/TC	Ativ. Fosfolipásica U/ mg	Ativ. Azocaseinolítica (U/mg)
41	76,0 ± 62,0	13,3 ± 0,5	1725,0 ± 35,3	58,1 ± 0,1
42	76,1 ± 9,3	23,2 ± 0,6	2350,0 ± 194,4	59,3 ± 0,1
43	76,3 ± 12,9	8,3 ± 0,0	2175,0 ± 143,0	56,7 ± 0,1
44	49,3 ± 2,0	17,0 ± 0,6	2062,5 ± 123,7	51,6 ± 0,1
45	100,0 ± 1,8	31,2 ± 1,0	1406,2 ± 79,5	63,2 ± 0,1
46	53,3 ± 7,2	30,4 ± 1,6	1187,5 ± 0,0	52,9 ± 0,1
47	77,7 ± 6,2	37,0 ± 4,3	*	55,9 ± 0,1
48	55,7 ± 7,3	18,4 ± 0,2	1731,2 ± 203,3	53,1 ± 0,1
49	73,3 ± 9,3	76,9 ± 9,1	1631,2 ± 26,5	*
50	60,9 ± 9,8	60,0 ± 9,1	*	*
51	67,9 ± 0,7	62,5 ± 1,3	*	*
52	53,3 ± 11,7	40,0 ± 1,0	*	46,2 ± 0,1

IC: índice de coagulação.

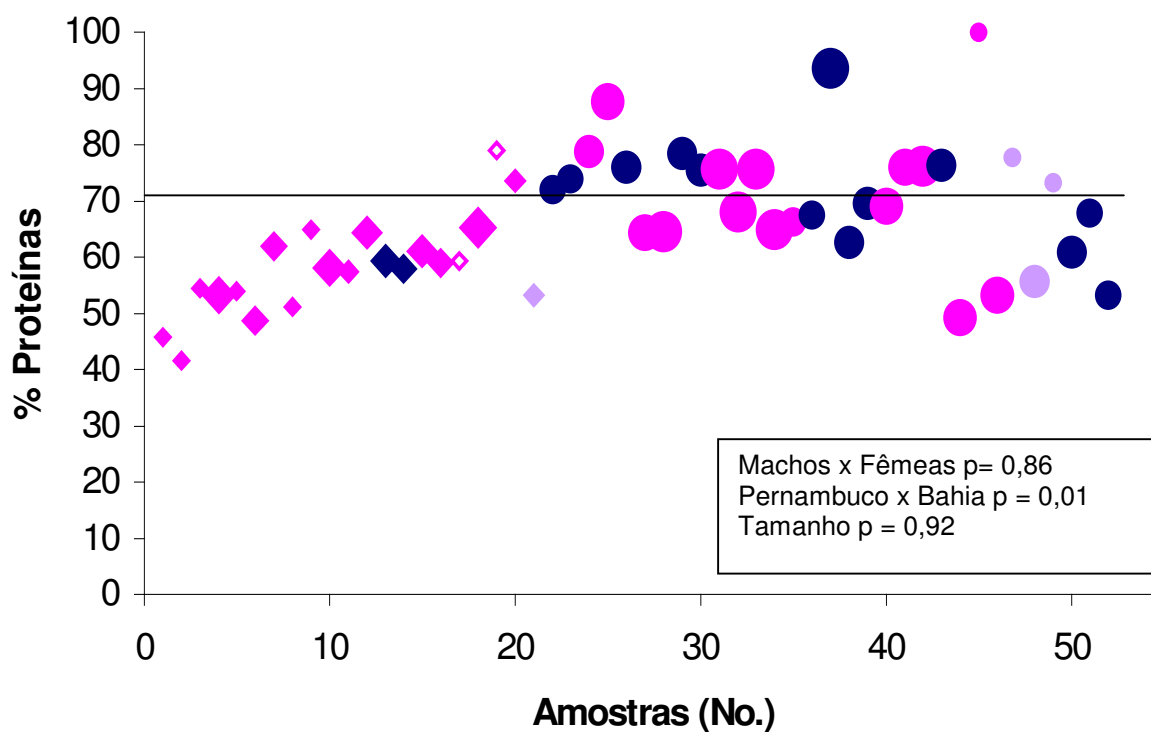


Figura 3. Porcentagem de proteínas de 52 amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas*, segundo o método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Miller (1959). Cem microlitros das amostras individuais de peçonha (50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ de NaCl 0,85%) foram adicionados a 500 μL de Tartarato de Na e K durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de reagente de Folin, sendo a mistura mantida a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Após o resfriamento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 650 nm. Os tamanhos dos losangos e círculos simbolizam os tamanhos das serpentes; ($\diamond$) Pernambuco; ($\circ$) Bahia; ($\color{magenta}\square$) fêmeas; ($\color{darkblue}\square$) machos. O quadro acima representa as relações estabelecidas entre as amostras de peçonhas analisadas e seus respectivos índices de significância.

2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE)

As amostras individuais de peçonha da serpente *B. erythromelas*, analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras, apresentaram bandas compreendidas entre 102 e 5,6 KDa, com perfil eletroforético semelhante: três grupos principais de proteínas de massas relativas em torno de 80, 38 e 20 KDa (figuras 4, 5 e 6).

Os perfis eletroforéticos das amostras individuais de peçonha de serpentes foram similares, com exceção da amostra nº 20, que apresentou padrão completamente diferente, pela ausência das bandas de pesos moleculares 82,2; 79,5; 76,7 KDa e presença das bandas de 44,4 e 37 KDa (figura 5). A amostra nº 47 apresentou redução da banda de 79,5 KDa e presença das bandas de 37, 28 e 27 KDa (figura 6).

As diferenças encontradas entre as demais amostras de peçonha de *B. erythromelas* restringiram-se a ausência ou redução da banda de 82,2 (amostras nºs 2, 8, 14) e 38,8 KDa (nºs 1, 8, 11, 14, 15, 18, 23, 33, 35, 49) e presença da banda de 37 KDa (nºs 14, 47) (figuras 4, 5 e 6).

As diferenças observadas na distribuição das bandas de baixo peso molecular (abaixo de 26 KDa) quando comparamos os perfis das amostras encontradas nas figuras 5 e 6, provavelmente, se devem a técnica e não a variações reais nas proteínas das peçonhas testadas.

A variabilidade encontrada nas amostras de peçonha de *B. erythromelas* não pode ser correlacionada com o sexo, tamanho ou procedência dos animais. A banda de 38,8 Kda foi a que apresentou maior variação, estando ausente tanto em machos quanto fêmeas, tanto em animais pequenos quanto grandes, e tanto em amostras provenientes de Pernambuco quanto da Bahia. Por outro lado, amostras de peçonhas de serpentes do mesmo tamanho, sexo e origem geográfica apresentaram variações individuais quanto a presença ou ausência de determinadas bandas proteicas.

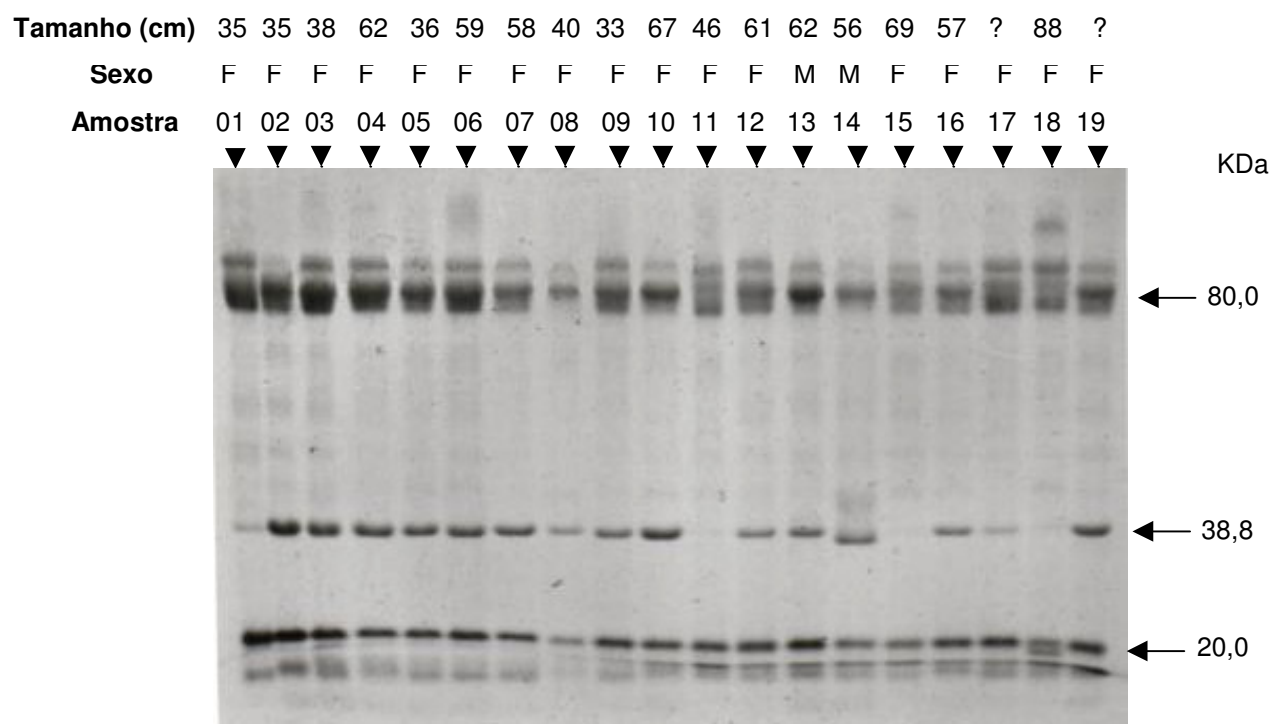


Figura 4. Perfil eletroforético das amostras individuais de peçonha de *B. erythromelas* (40 µg/poço) provenientes do estado de Pernambuco, em SDS-PAGE, gel de resolução a 12%, em sistema redutor.

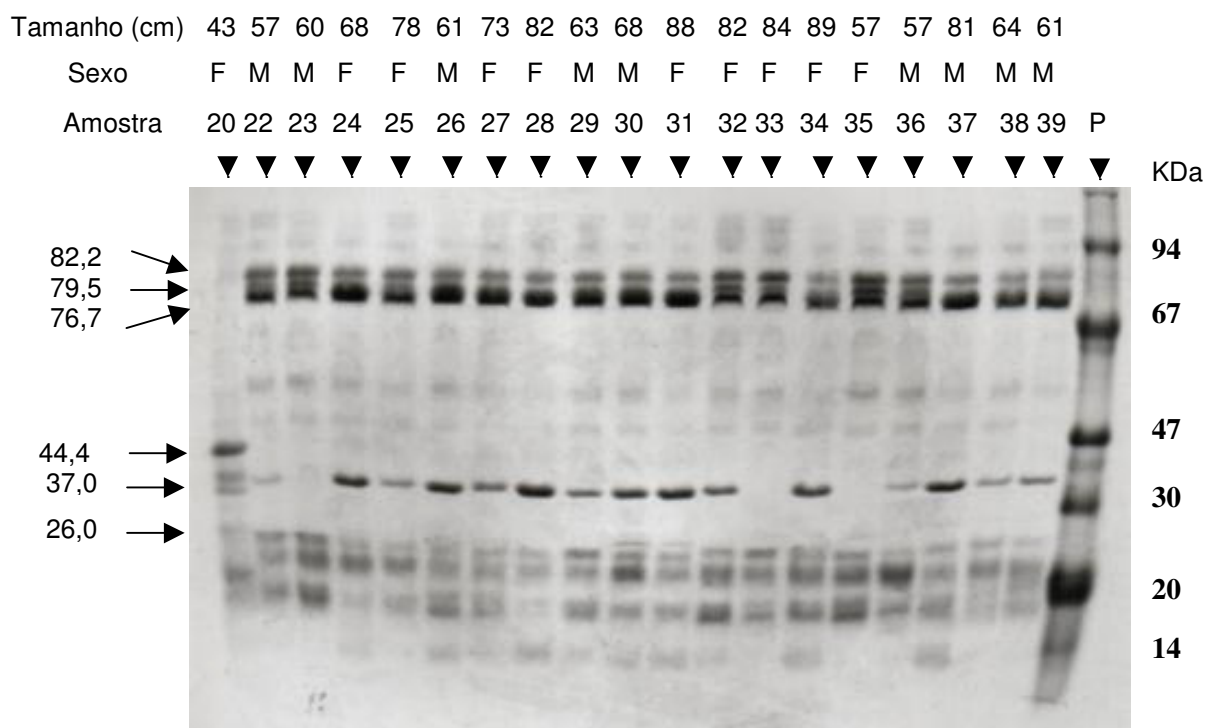


Figura 5. Perfil eletroforético das amostras individuais de peçonha de *B. erythromelas* (40 µg/poço) provenientes do estado da Bahia, exceto a amostra de registro 20 pertencente ao estado de Pernambuco, em SDS-PAGE, gel de resolução a 12%, em sistema redutor. Padrões de peso molecular: Fosforilase b (94 KDa); Albumina Bovina (67 KDa); Anidrase Carbônica (30 KDa) Inibidor de Tripsina de Soja (20 KDa) e α -Lactoalbumina (14 KDa).

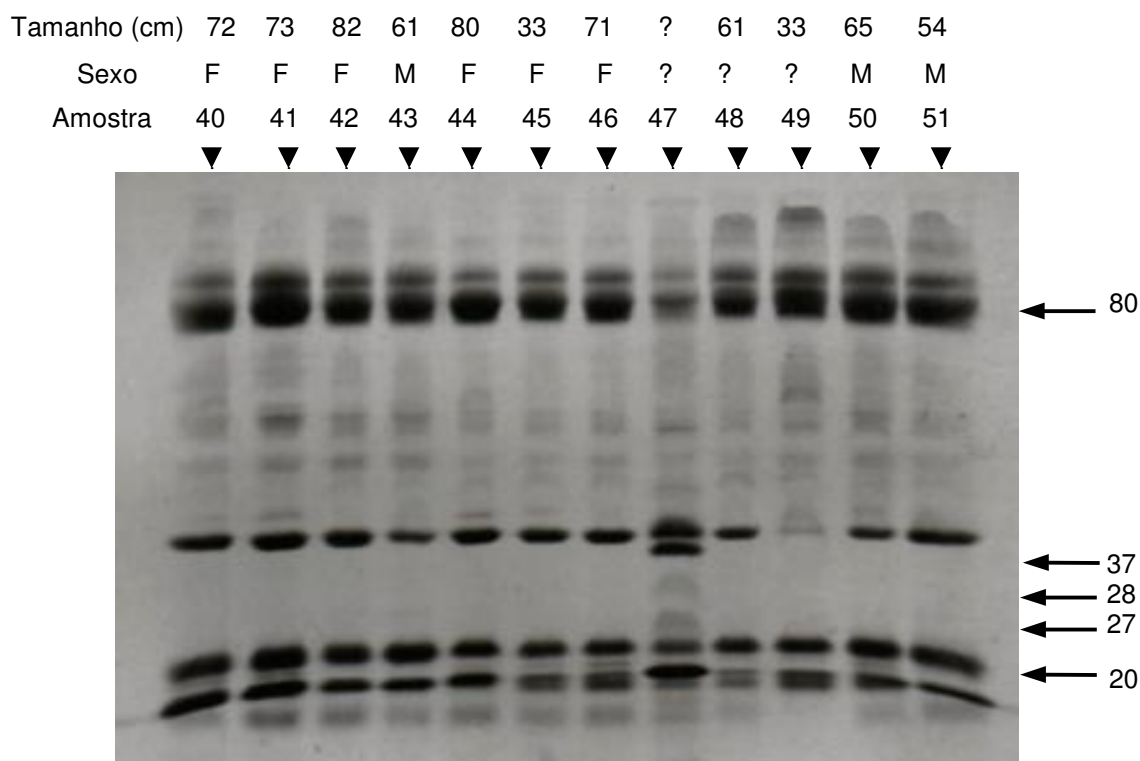


Figura 6. Perfil eletroforético das amostras individuais de peçonha de *B. erythromelas* (40 µg/poço) provenientes do estado da Bahia, em SDS-PAGE, gel de resolução a 12%, em sistema redutor.

3. Atividade Coagulante sobre plasma

A atividade coagulante das amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas* foi analisada utilizando plasma humano citratado como substrato. A concentração de 166,7 µg/mL (log = 2,22) de peçonha foi utilizada para análise de todas amostras individuais de peçonha, obtida a

partir de uma curva dose resposta, realizada com a mistura de peçonha das amostras analisadas (figura 7).

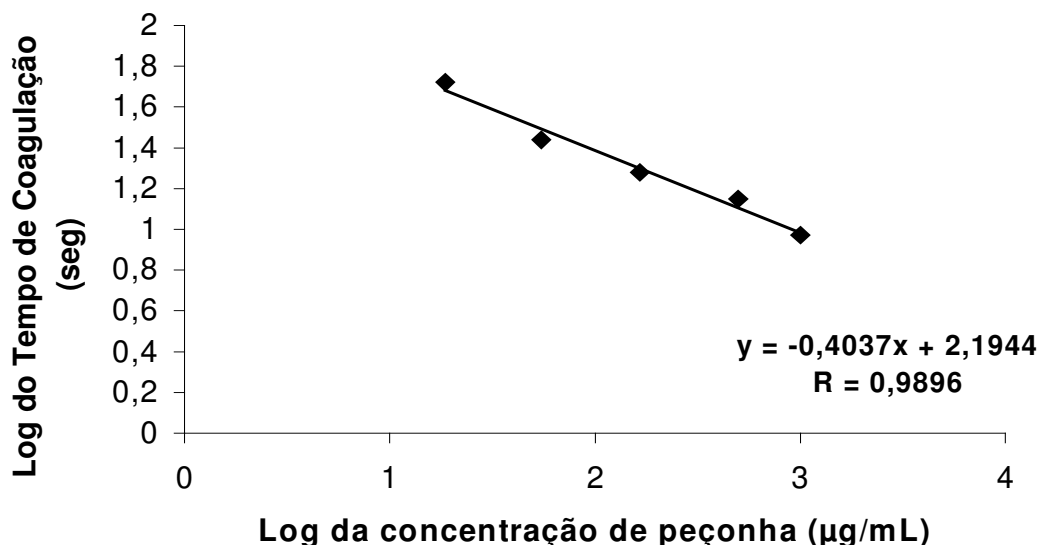


Figura 7. Curva padrão da atividade coagulante da mistura de 52 amostras individuais de peçonha de *B. erythromelas*. Setenta e cinco microlitros de cada concentração (18,5 – 100 µg) da mistura de peçonha diluída em salina (0,85%) foram incubados com 300 µL de plasma humano citratado e o tempo de coagulação cronometrado.

Os resultados da atividade coagulante das amostras individuais de peçonha apresentaram índices de coagulação compreendidos entre $8,3 \pm 0,0$ e $95,2 \pm 8,7$ (tabela 5).

A relação entre os tamanhos dos animais e a atividade coagulante foi inversamente proporcional ($p = 0,02$), ou seja, quanto maior o animal, menor a capacidade de sua peçonha coagular o plasma humano. Ao

analisar a procedência dos animais foi observada relação significativa ($p= 0,03$) entre este fator e a atividade coagulante; as serpentes provenientes do estado de Pernambuco apresentaram peçonha com capacidade de coagular o plasma humano citratado significativamente maior do que as peçonhas de serpentes provenientes da Bahia. Por outro lado, não houve relação ($p= 0,89$) entre o sexo dos animais e a atividade coagulante das amostras de peçonha (figura 8). No entanto, a variação individual esteve presente nesta atividade por algumas amostras de peçonha de serpentes do mesmo tamanho, origem geográfica e sexo diferirem entre si.

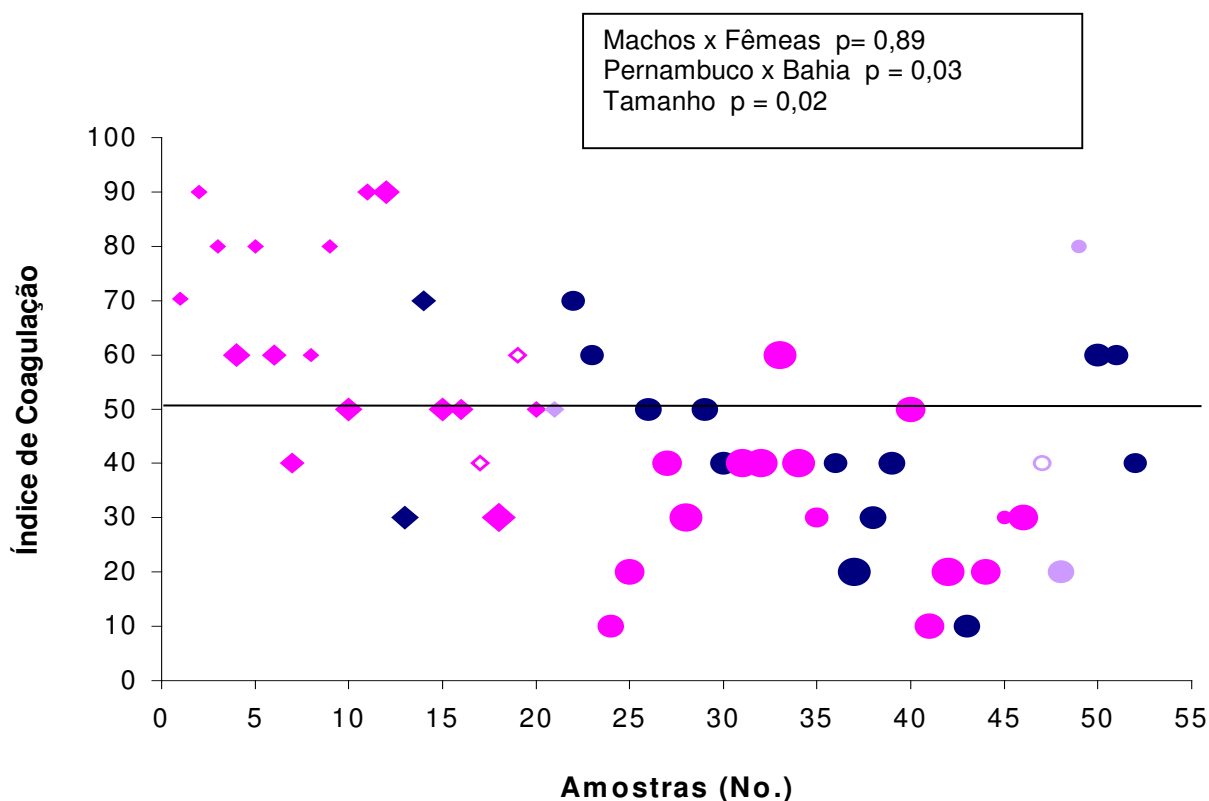


Figura 8. Índices de coagulação de 52 amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas*. Setenta e cinco microlitros de peçonha diluída em salina (166,7 $\mu\text{g/mL}$) foram incubados com 300 μL de plasma humano citratado e o tempo de coagulação cronometrado. Os tamanhos dos símbolos correspondem aos tamanhos das serpentes; ($\diamond$) Pernambuco; ($\circ$) Bahia; ($\color{pink}\blacksquare$) fêmeas; ($\color{darkblue}\blacksquare$) machos. O quadro acima representa as relações estabelecidas entre as amostras de peçonhas analisadas e seus respectivos índices de significância.

4. Atividade Fosfolipásica

A partir dos resultados da atividade fosfolipásica da mistura de peçonha de *B. erythromelas* utilizando gema de ovo como substrato foi escolhida a concentração de 40 $\mu\text{g}/50\ \mu\text{L}$ para as análises individuais das amostras de peçonha (figura 9).

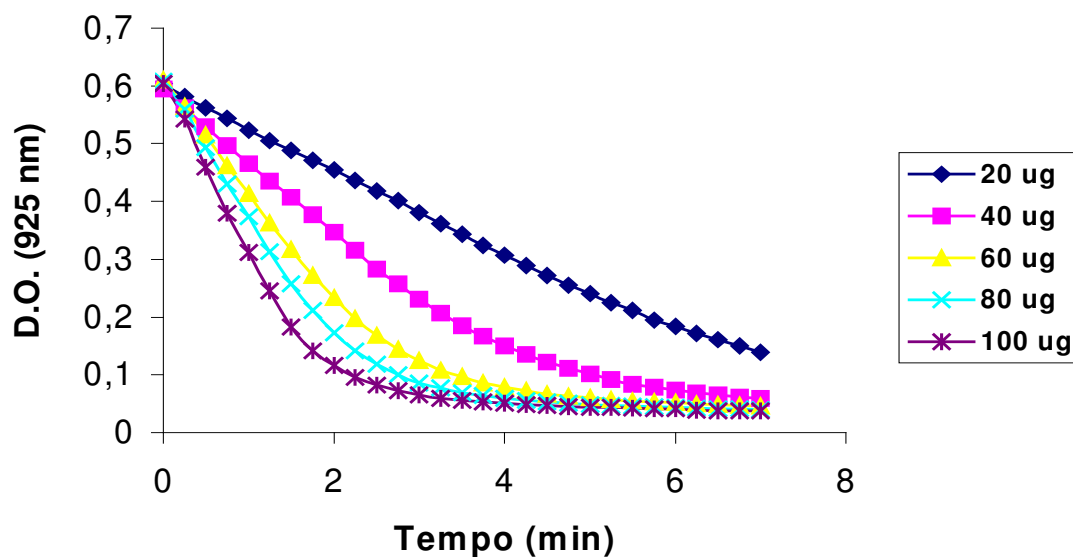


Figura 9. Atividade fosfolipásica da mistura de 52 amostras de peçonha de *B. erythromelas*. Cinquenta microlitros da mistura de peçonha (20-100 μg) foram adicionados ao substrato preparado com gema de ovo diluída em tampão Tris – HCl, pH 8,0. O decaimento da densidade óptica decorrente da atividade fosfolipásica da mistura de todas amostras de peçonha sobre o substrato foi acompanhado a cada 15 segundos, durante 2 minutos.

Os resultados obtidos na análise da atividade fosfolipásica apresentaram valores de atividade específica compreendidos entre $200 \pm 0,88$ e $2800 \pm 0,88$ U/mg (tabela 5).

A atividade fosfolipásica apresentou relação significativa ($p= 0,04$) quanto a procedência dos animais (figura 10), sendo os maiores valores presentes nas amostras de peçonha de serpentes provenientes do estado da Bahia. Não foram observadas relações significativas entre as amostras de peçonha de *B. erythromelas* de diferentes tamanhos ($p= 0,77$) ou sexo ($p= 0,93$), porém a variação individual esteve presente em algumas amostras de peçonha analisadas.

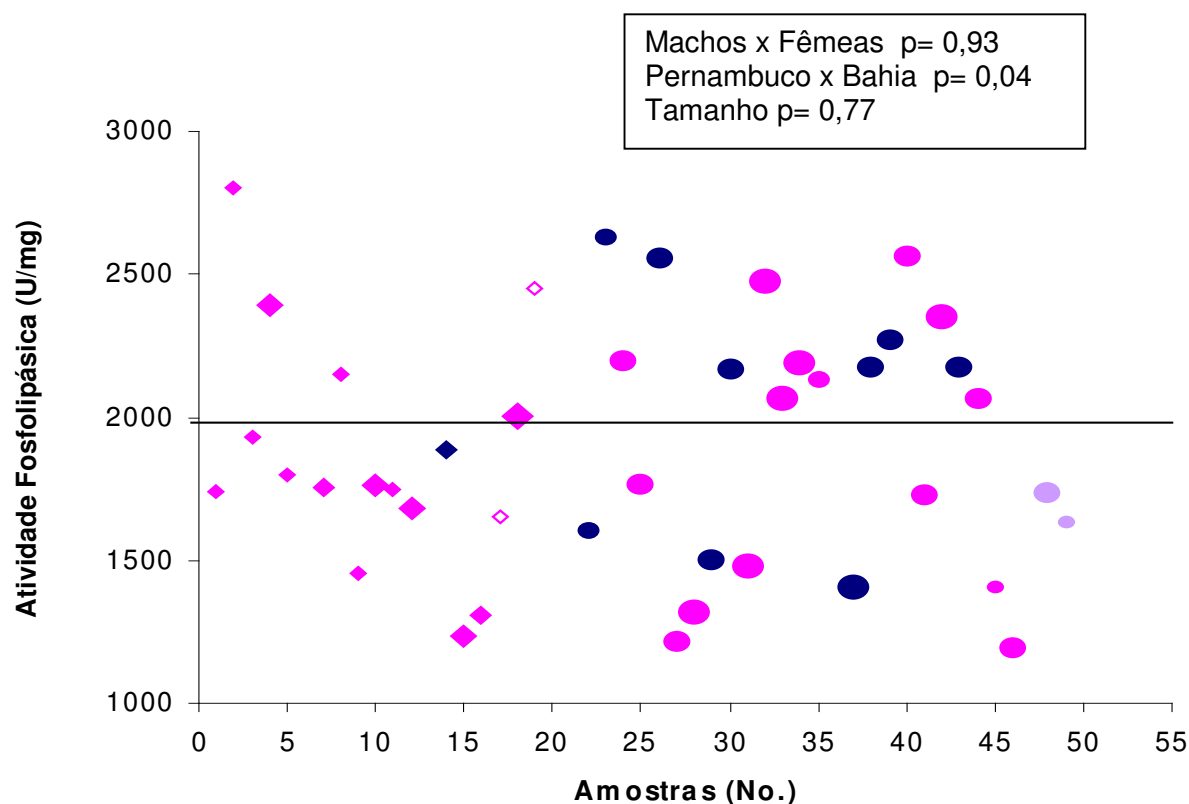


Figura 10. Atividade fosfolipásica de 47 amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas*. Quarenta microgramas de peçonha em 50 μ L foram adicionados a solução de gema de ovo diluída em tampão Tris – HCl, pH 8,0. O decaimento da densidade óptica da mistura foi acompanhado a cada 15 segundos, durante 2 minutos. Os tamanhos dos símbolos correspondem aos tamanhos das serpentes; ($\diamond$) Pernambuco; ($\circ$) Bahia; ($\color{pink}\blacksquare$) fêmeas; ($\color{darkblue}\blacksquare$) machos. O quadro acima representa as relações estabelecidas entre as amostras de peçonhas analisadas e seus respectivos índices de significância.

6. Atividade Proteolítica sobre Azocaseína

A curva dose-resposta da atividade proteolítica sobre azocaseína da mistura de peçonha de *B. erythromelas* está representada na figura 11. A partir desta curva foi determinada a concentração de 50 mg/mL, considerada ótima, para análise das amostras individuais de peçonha.

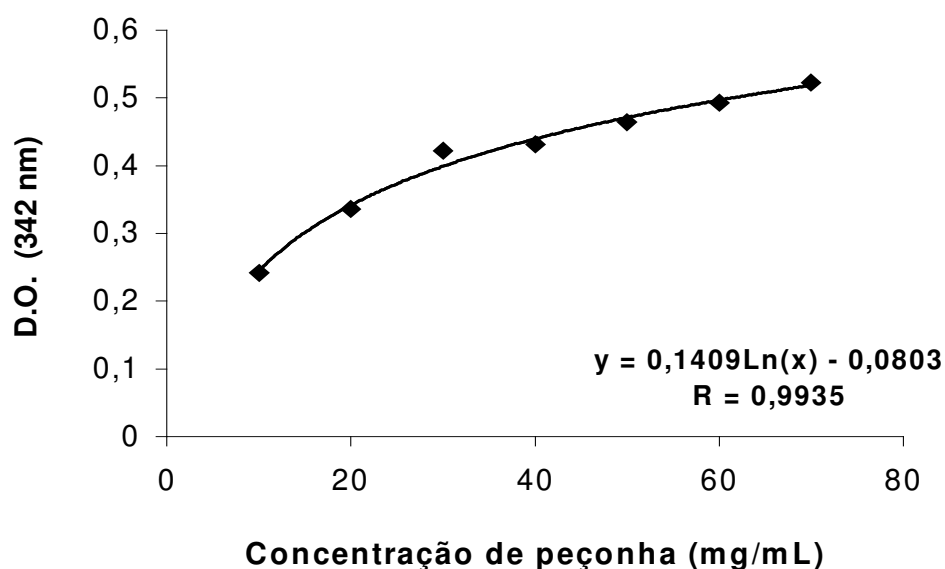


Figura 11. Atividade proteolítica da mistura de 52 amostras de peçonha de *B. erythromelas* sobre azocaseína. Dois microlitros da mistura de peçonha (10 - 70 μ g) foram adicionados ao substrato azocaseína e incubados em 37 $^{\circ}$ C por 2,5 horas. Cem microlitros de ácido tricloro acético foram utilizados para interromper a reação, em seguida as amostra foram centrifugadas e a densidade óptica (D.O.) do sobrenadante foi determinada a 342 nm.

Os resultados da atividade proteolítica variaram entre $46,2 \pm 0,1$ e $83,3 \pm 0,1$ U/mg (tabela 5).

A análise da atividade proteolítica sobre azocaseína das amostras peçonha de *B. erythromelas* revelou uma relação inversa entre o tamanho dos animais e esta atividade ($p= 0,004$), ou seja, quanto maior o tamanho dos animais menor a atividade proteolítica da peçonha (figura 12). Não foi observada relação significativa quanto a procedência das serpentes e a atividade proteolítica da peçonha ($p= 0,6$), tão pouco em relação ao sexo das mesmas e a referida atividade ($p= 0,1$). Os resultados obtidos com serpentes do mesmo sexo, origem geográfica e tamanho foram semelhantes, indicando que não existe variação individual da atividade proteolítica.

A tabela 6 apresenta as relações entre as amostras de peçonha de *B. erythromelas* quanto ao conteúdo proteico e atividades enzimáticas, e seus respectivos níveis de significância.

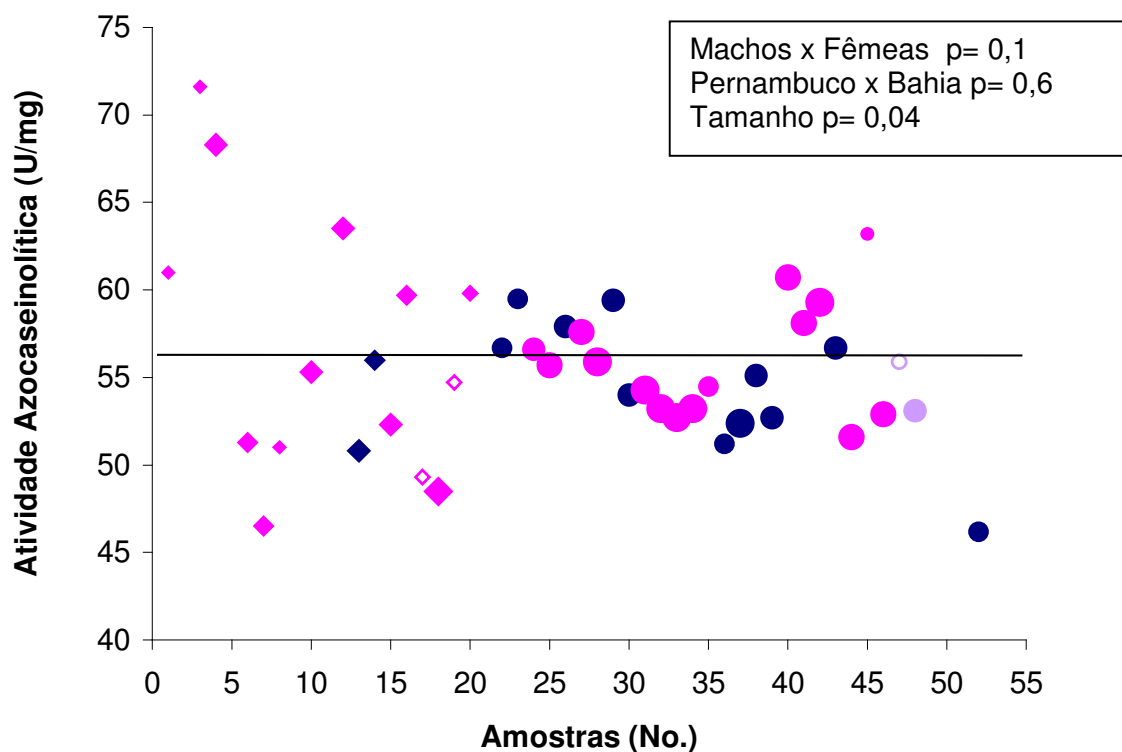


Figura 12. Atividade proteolítica sobre azocaseína (U/mg) de 45 amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas*. Dois microlitros de cada amostra individual de peçonha (50 mg/mL) foram adicionados ao substrato azocaseína e incubados em 37⁰ C por 2,5 horas. Cem microlitros de ácido tricloro acético foram utilizados para interromper a reação, em seguida as amostra foram centrifugadas e a densidade óptica (D.O.) do sobrenadante foi determinada a 342 nm. Os tamanhos dos símbolos correspondem aos tamanhos das serpentes; (◇) Pernambuco; (○) Bahia; (●) fêmeas; (●) machos. O quadro acima representa as relações estabelecidas entre as amostras de peçonhas analisadas e seus respectivos índices de significância.

Tabela 6. Sumário dos resultados obtidos na análise da quantidade de proteínas e atividades enzimáticas das amostras individuais de peçonha de *B. erythromelas*

	Quantidade de Proteínas (%)	Índice Coagulant e	Ativ. Fosfolipásica (U/mg)	Ativ. Proteolítica (U/mg)
Média	65,9 ± 11,7	48,1 ± 2,4	1849,6 ± 600,6	56,3 ± 6,4
Média – Bahia	76,1 ± 10,9	38,1 ± 1,8	1988,4 ± 564,8	55,4 ± 3,4
Média Pernambuco	58,2 ± 8,3	62,9 ± 1,9	1677,8 ± 590,3	57,8 ± 9,3
Significância- Procedência	p= 0,01	p= 0,03	p= 0,04	p= 0,6
Média – fêmeas	64,3 ± 12,3	50,0 ± 2,3	1790,2 ± 526,5	57,2 ± 7,3
Média – machos	69,6 ± 9,8	45,5 ± 1,8	2076,5 ± 753,4	54,5 ± 3,7
Significância – sexo	p= 0,86	p= 0,89	p= 0,93	p= 0,1
Significância - tamanho dos animais	p= 0,92	p= 0,02	p= 0,77	p= 0,004
Variabilidade Individual	Presente	Presente	Presente	Ausente

Os números em negrito correspondem aos resultados que indicam presença de variabilidade.

V. DISCUSSÃO

A espécie *B. erythromelas* se encontra amplamente distribuída em região de caatinga, sendo, provavelmente, a principal causadora dos acidentes ofídicos que ocorrem na região Nordeste (Aquino, 1999; Soares, 2001). Apesar de sua importância são poucos os estudos a respeito da peçonha dessa espécie (Zappellini, 1991; Sanches *et al.*, 1991; Furtado *et al.*, 1991; Maruyama *et al.*, 1992; Vasconcelos, 1996; Valença, 1997; Rocha, 1998; Modesto, 2000; Pontes, 2000; Nunes, 2000; Silva Filho, 2000; Silva, 2001), provavelmente, devido à dificuldade de manutenção dos animais em cativeiro.

Em todas as pesquisas realizadas com a peçonha de *B. erythromelas* foram utilizadas misturas de amostras de peçonhas de vários indivíduos. Esse procedimento ignora a existência de variações intraespecíficas demonstradas anteriormente em outras espécies botrópicas (Jiménez-Porras, 1964; Aragón e Gubensek, 1981; Meier, 1986), que podem influenciar os resultados obtidos (Williams e White, 1987).

O presente estudo ampliou os conhecimentos acerca da variabilidade da peçonha de *B. erythromelas*, os quais restringiram-se, até o momento, a determinação da variação na composição e nas atividades de amostras de peçonhas de apenas uma serpente fêmea e seus filhotes (Furtado *et al.*, 1992).

Os resultados, obtidos neste trabalho, mostraram que o conteúdo proteico, a distribuição das proteínas da peçonha e toda as atividades enzimáticas testadas apresentaram variabilidade. A atividade coagulante da peçonha foi o parâmetro mais variável entre as atividades testadas. As atividades enzimáticas são decorrentes da ação de uma ou mais proteínas que podem atuar isolada ou de forma sinérgica, conseqüentemente, cada atividade apresenta um nível de variação diferente das demais.

Este estudo também avaliou as causas da variabilidade observada na peçonha de *B. erythromelas*, revelando que o principal fator causador de variação foi a variabilidade individual, seguida da origem geográfica e dos tamanhos dos animais.

Por outro lado, o sexo dos animais não apresentou influência na composição e nas atividades enzimáticas testadas das amostras de peçonha de *B. erythromelas*. Embora existam muitos estudos sobre variabilidade de peçonhas ofídicas, poucos analisaram a influência do dimorfismo sexual, provavelmente, pela dificuldade de obter um número de serpentes suficiente de ambos os sexos para realizar a pesquisa. Concordando com o presente trabalho, verificou-se que a maioria dos parâmetros avaliados, em outros estudos, não é dependente do sexo como foi observado, por exemplo, em *Calloselasma rhodostoma*, *Bitis nasicornis* e *Crotalus adamanteus* (Marsh e Glatson, 1974; Mebs e Kornalik, 1984; Daltry *et al.*, 1996). Por outro lado, as serpentes fêmeas dessas espécies apresentaram uma proteína adicional na peçonha, cuja função é desconhecida (Daltry *et al.*, 1996). Embora o presente estudo tenha identificado uma variação significativa no padrão de

bandas eletroforéticas da peçonha de *B. erythromelas*, não foi possível estabelecer qualquer relação entre a presença e ausência de bandas e o sexo dos animais.

As amostras de peçonha de *B. erythromelas* analisadas neste estudo apresentaram variações de acordo com o tamanho das serpentes. Esses resultados correspondem aos encontrados em outras espécies das subfamílias Crotalinae e Viperinae, que sugerem que algumas alterações na composição da peçonha sejam idade-dependentes (Lomonte *et al.*, 1983; Meir, 1986; Furtado *et al.*, 1991; Tun-Pe, 1995).

Serpentes podem apresentar variabilidade dependente do desenvolvimento ontogenético com relação a letalidade (Meier e Freyvogel, 1980; Lomonte *et al.*, 1983; Glenn e Straight, 1985; Minton e Weinstein, 1986), atividades hemorrágica, edematogênica (Lomonte *et al.*, 1983; Minton e Weinstein, 1986), coagulante (Furtado *et al.*, 1991), proteolítica (Bonilla *et al.*, 1973; Lomonte *et al.*, 1983), fosfolipásica (Lomonte *et al.*, 1983) e conteúdo proteico (Meier e Freyvogel, 1980; Furtado *et al.*, 1991).

A letalidade e as atividades hemorrágica e proteolítica, dependendo da espécie do animal, podem ser diretamente proporcionais ao desenvolvimento ontogenético (Bonilla *et al.*, 1973; Lomonte *et al.*, 1983; Minton e Weinstein, 1986) ou apresentar comportamento inverso (Gutiérrez, 1980). A atividade edematogênica e o conteúdo protéico nas peçonhas das espécies *Bothrops alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*; *Crotalus d. durissus*, *Echis carinatus* e *Naja nigriculles* mostraram-se mais intensos com o aumento do tamanho dos animais (Lomonte *et al.*, 1983; Minton e

Weinstein, 1986; Furtado *et al.*, 1991). Por outro lado, as atividades coagulante e fosfolipásica, presentes nas peçonhas de *Crotalus horridus atricaudatus*, *C. durissus durissus*, *Bothrops alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* foram reduzidas com o crescimento das serpentes (Lomonte *et al.*, 1983; Furtado *et al.*, 1991).

A atividade fosfolipásica e a concentração de proteínas das amostras de peçonha de *B. erythromelas* não mostraram relação com desenvolvimento ontogenético. Concordando com os resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que a concentração protéica, descrita na literatura, não acompanha o desenvolvimento ontogenético de *Bothrops alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*, *B. atrox*, *B. neuwiedi urutu*, *Naja nigricollis* e *Echis carinatus* (Meier e Freyvogel, 1980; Furtado *et al.*, 1991). Por outro lado, uma serpente *B. erythromelas* adulta apresentou maior concentração de proteína em sua peçonha do que seus filhotes (Furtado *et al.* 1991).

Neste estudo, foi observado que as atividades proteolítica e coagulante estão relacionadas ao desenvolvimento ontogenético das serpentes *B. erythromelas*.

A atividade proteolítica apresentou-se mais intensa nos indivíduos menores em relação aos maiores na espécie *B. erythromelas*. No entanto, os resultados deste trabalho não se harmonizam com os obtidos por Furtado *et al.* (1991), que evidenciaram o inverso no estudo de uma serpente *B. erythromelas* adulta e seus filhotes. O uso de azocaseína para análise de amostras individuais da peçonha de *B. erythromelas* no presente estudo não

pode justificar essa variação, uma vez que ambos estudos utilizaram substratos inespecíficos. A variabilidade das enzimas proteolítica pode ser mais complexa do que se supunha. Ao que parece, a síntese dessas enzimas aumenta no início da vida dos indivíduos, chegando ao seu máximo na fase juvenil e reduzindo quando os animais tornam-se adultos. A grande heterogeneidade das enzimas proteolíticas das peçonhas ofídicas pode contribuir para este fato (Iwanaga e Suzuki, 1979).

A atividade coagulante da peçonha de serpentes pequenas de *B. erythromelas* foi mais potente do que a encontrada na peçonha de serpentes maiores. Essa atividade é decorrente de potentes ativadores de protrombina (fator II) e do fator X (Sanches *et al.*, 1992), porém a sua variabilidade foi atribuída somente a variação na atividade do fator II (Furtado *et al.*, 1991). Recentemente, o fator II da peçonha de *B. erythromelas* foi purificado e caracterizado como sendo uma metaloproteinase não hemorrágica, podendo ser utilizada como agente pró-coagulante (Silva, 2001). A variação idade-dependente da atividade coagulante da peçonha não se restringe a essa espécie; *B. alternatus*, *B. coatira*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* também apresentaram variação similar. Nessas espécies a ação pró-coagulante é devido a presença de três proteínas – fatores X e II e trombina símile – que apresentam variação intraespecífica.

Pelo menos duas hipóteses têm sido propostas para explicar o significado das variações nas peçonhas de serpentes durante o crescimento: (1) mudança na dieta (Mackessy, 1988) e (2) adaptação para captura e digestão da presa (Andrade *et al.*, 1996; Andrade e Abe, 1999). A primeira

hipótese não pode ser aplicada a variabilidade da peçonha de *B. erythromelas* observada neste trabalho, uma vez que todas as serpentes foram alimentadas com o mesmo tipo de presa (roedores). A segunda hipótese pode explicar melhor os resultados do presente estudo: a idade dos animais leva a uma mudança da peçonha tornando-a mais ativa para determinados tipos de presas que são preferenciais em cada época da vida do animal. Esse comportamento é observado em *B. jararaca* e *B. moojeni*, onde a peçonha dos jovens é mais ativa para lagartos e menos ativas para roedores, ocorrendo o inverso nos indivíduos adultos (Andrade *et al.*, 1996; Andrade e Abe, 1999). Além disso, o rendimento de peçonha produzida por espécimes jovens, geralmente, é baixo em relação aos adultos (Silva Filho, 2000), desta forma as altas atividades enzimáticas (proteolítica e coagulante) presentes na peçonha de serpentes jovens de *B. erythromelas* podem compensar esse baixo rendimento com a garantia da captura e digestão das presas preferenciais.

Além da função de captura, as peçonhas ofídicas possuem a função secundária de defesa (Vital Brasil, 1982), comportamento que leva aos acidentes em humanos. A presença de variação ontogenética nas peçonhas de serpentes, observadas em experimentos *in vitro*, são refletidas na sintomatologia dos acidentes por *B. moojeni* e *B. jararaca* causando importantes implicações médicas (Kouyoumdjian e Polizelli, 1989; Ribeiro e Jorge, 1990).

Estudos comparativos de peçonhas da mesma espécie de serpentes, porém de origens geográficas diferentes têm mostrado o quanto os

componentes presentes nas peçonhas podem ser variáveis e importantes para distinguir diferenças entre populações (Jiménez-Porras, 1964; Aragón e Gukensek, 1981; Glenn *et al.*, 1983; Aird e Kaiser, 1985; Glenn e Straight, 1985; Meier, 1985; Glenn e Straight, 1989; Kornalik e Taborska, 1988; Jayanthi e Veerabadappa, 1988; Williams *et al.*, 1987; Gené *et al.*, 1989; Sanchez *et al.*, 1992; Daltry *et al.*, 1995; Francischetti *et al.*, 2000).

No presente estudo foram avaliadas amostras de peçonha de *B. erythromelas* coletadas em Pernambuco e na Bahia, além de serpentes que nasceram no serpentário da FUNED-MG, de fêmeas prenhes que foram coletadas na Bahia. Em virtude da similaridade entre os resultados obtidos com as amostras de peçonha de *B. erythromelas* provenientes da Bahia e das crias das serpentes coletada na mesma região, a avaliação da variação geográfica foi realizada considerando essas serpentes como um só grupo ou população. Desta forma, as amostras de peçonha de *B. erythromelas* originadas da Bahia diferiram das amostras das serpentes de Pernambuco em três aspectos: (1) apresentaram menor atividade coagulante; (2) maior concentração de proteínas e (3) maior atividade fosfolipásica. A variação da atividade coagulante, provavelmente, foi resultante da diferença de tamanho dos animais, uma vez que as serpentes que compõem o grupo de Pernambuco foram significativamente menores do que as do grupo da Bahia.

Outras atividades biológicas e enzimáticas tais como letalidade (Glenn *et al.*, 1983; Glenn e Straight, 1985; Minton e Weinstein, 1986; Francischetti, 2000), atividade proteolítica (Minton e Weinstein, 1986; Glenn

e Straight, 1989), e hemorrágica (Glenn *et al.*, 1983; Glenn e Straight, 1989), encontradas nas peçonhas de *Crotalus atrox*, *C. s. scutulatus* e *C. durissus terrificus*, também apresentam variabilidade regional (Glenn *et al.*, 1983; Glenn e Straight, 1985; Minton e Weinstein, 1986; Francischetti, 2000).

A variabilidade regional pode estar presente nas peçonhas de serpentes que compartilham diferentes regiões do mesmo bioma (Glenn *et al.*, 1983; Glenn e Straight, 1985; Minton e Weinstein, 1986; Francischetti, 2000) ou naquelas que habitam biomas distintos (Jiménez-Porras 1964; Aragón e Gubensek, 1981; Jayanthi e Veerabasappa-Gowda, 1988).

Das 52 amostras de peçonhas de *B. erythromelas* analisadas neste trabalho, 51 pertenciam ao mesmo bioma: caatinga. Embora essas serpentes tenham sido provenientes da caatinga, as duas populações estão separadas por essa importante barreira topográfica – o Rio São Francisco. Estudos anteriores têm mostrado que o isolamento reprodutivo causado, principalmente, por barreiras geográficas, muito mais do que por barreiras ecológicas é, provavelmente o principal responsável pela evolução das diferenças entre as peçonhas de serpentes (Jiménez-Porras, 1964; Glenn e Straight, 1985).

Por outro lado, um único espécime coletado em região de Brejo de Altitude (área de Mata Atlântica remanescente) destacou-se por apresentar perfil eletroforético da peçonha completamente diferente das amostras de peçonha de serpentes oriundas da caatinga. Esses resultados sugerem que além do isolamento reprodutivo, diferenças significativas no *habitat* (vegetação, umidade, temperatura, pluviosidade, entre outros) podem levar a

alterações da peçonha. No entanto, essa variação necessita ser melhor estudada uma vez que a amostra avaliada foi de um exemplar. Resultados similares foram observados nas amostras de peçonhas de *B. nummifera* capturadas nas regiões do Atlântico e Pacífico da Costa Rica. As duas populações dessa espécie podem ser facilmente distinguidas devido à diferenciação no perfil eletroforético de suas peçonhas (Jiménez–Porras, 1964).

As amostras de peçonha de *B. erythromelas*, analisadas neste estudo, apresentaram variabilidade intraespecífica regional e ontogenética. Contudo, amostras de peçonhas de serpentes de mesma área geográfica, sexo e tamanhos semelhantes também apresentaram diferenças quanto aos perfis eletroforéticos, conteúdo proteico e atividades coagulante e fosfolipásica. Resultados similares foram observados nas peçonhas de *Bothrops atrox*, *Calloselasma rhodostoma* e *Notechis ater niger* (Meir, 1986; Williams e White, 1987; Daltry *et al.*, 1996). Esse fato, provavelmente, reflete a variação individual, de origem genética, na síntese proteica das peçonhas ofídicas (Meier, 1986; Daltry, 1996).

Os acidentes com serpentes ainda constituem um problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais (Warrel, 1996). O soro antiveneno é o único tratamento eficaz para picadas de serpentes, sendo gênero-específico e produzido a partir do inóculo de uma mistura de peçonha em cavalos (Borges, 1999). Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver testes para diagnóstico e monitoramento dos envenenamentos (Greenwood *et al.*, 1974; Theakston *et al.*, 1977; Viravan *et*

al., 1986; Labrousse *et al.*, 1988; Tan *et al.*, 1992). No Brasil não há nenhum serviço médico que os utilize rotineiramente, desse modo, o diagnóstico é feito através da sintomatologia apresentada pelo paciente (FNS, 1998). A presença da variabilidade intraespecífica nas peçonhas ofídicas pode confundir o quadro clínico resultando em diagnósticos errôneos (Daltry *et al.*, 1996).

Apesar de considerada variabilidade intraespecífica na peçonha de *B. erythromelas*, identificada neste estudo, ainda não existem trabalhos que comprovem que essa variação seja refletida na sintomatologia dos acidentados, porém em *B. moojeni* e *B. jararaca* esse fato já está comprovado (Kouyoumdjian e Polizelli, 1989; Ribeiro e Jorge, 1990). No entanto, sabe-se que as enzimas proteolíticas estão associadas aos efeitos locais, tais como dor, edema, calor e rubor (Cardoso, 1992), enquanto as enzimas coagulantes atuam em várias etapas da cascata da coagulação (Kamiguti e Sano-Martins, 1995), resultando em incoagulabilidade sangüínea (Kamiguti *et al.*, 1986). O envenenamento experimental em cães mostrou que a incoagulabilidade sangüínea decorrente da ação da peçonha de *B. erythromelas* está associada, principalmente, ao consumo dos Fatores II, V e X da cascata da coagulação (Vasconcelos, 1996).

Desta forma, a presença de variação nas atividades proteolítica e coagulante entre serpentes jovens e adultas de *B. erythromelas* sugere que os acidentes com serpentes jovens podem levar a alterações na coagulação sangüínea e efeitos locais mais pronunciados do que com serpentes adultas.

Até o momento, não se tem registros científicos quanto a relação entre quantidade de proteínas de peçonhas e a sintomatologia dos envenenamentos ofídicos. As fosfolipases podem apresentar uma série de atividades biológicas diferentes, como miotoxidade, letalidade ou ação anticoagulante (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Rosenberg, 1997), porém a fosfolipase purificada a partir da peçonha de *B. erythromelas* mostrou-se apenas leve indutora de permeabilidade vascular (Modesto, 2000). Por isso, as alterações entre as peçonhas de serpentes oriunda da Bahia e de Pernambuco não podem ser relacionadas com quaisquer alterações específicas no quadro clínico de envenenamento por esses animais.

Contudo, mesmo que as espécies responsáveis pelo envenenamento sejam corretamente identificadas, a eficiência terapêutica pode ser diminuída se as peçonhas utilizadas no preparo do soro não apresentarem satisfatória reação imunológica cruzada com a peçonha da serpente responsável pelo acidente (Moura-da-Silva, 1990). De fato, a capacidade neutralizante do soro antibrotrópico poliespecífico comercial contra a peçonha de *B. erythromelas* é duas vezes menor que a do soro monoespecífico para essa espécie (Pontes, 2000). Cabe ressaltar que no Brasil apenas as peçonhas de cinco espécies de serpentes (*Bothrops jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) são utilizadas na produção do soro antibrotrópico comercial pelo Ministério da Saúde (FNS, 1998). Mesmo que a peçonha de *B. erythromelas* fosse incluída na mistura para produção do soro antiveneno comercial, outros fatores como tamanho e origem geográfica teriam que ser considerados a

fim de produzir uma mistura mais homogênea possível dos locais onde ocorrem os acidentes. Na peçonha de serpentes de *Vipera russelli* do oeste da Índia, por exemplo, o soro antiveneno neutraliza fracamente as peçonhas de populações do sul da Índia e Sri Lanka (Jayanthi e Veerabasappa-Gowda, 1988), enquanto antivenenos preparados para espécimes adultos de *Crotalus durissus* na Costa Rica são menos eficientes para as peçonhas de serpentes jovens (Gutiérrez *et al.*, 1991).

Por outro lado, muitas toxinas de peçonhas ofídicas têm sido purificadas na tentativa de suas utilizações na área médica e produção de fármacos (Stoker, 1990). Na espécie *B. erythromelas*, o ativador de protrombina (Fator II) purificado apresentou grande potencial de utilização defibrinogenante como droga terapêutica em doenças vasculares oclusivas (Silva, 2001). Essa toxina é a maior responsável pela variação na atividade coagulante de adultos e filhotes de *B. erythromelas* (Furtado *et al.*, 1991). Os resultados anteriores aliados aos do presente estudo permitirão a seleção de grupos de serpentes pequenas que naturalmente sintetizam altas concentrações do ativador de Fator II para continuidade e otimização dos estudos que visem a utilização médica dessa toxina.

Por fim, a presença de variações intraespecíficas na peçonha de *B. erythromelas*, reveladas neste estudo, fornecem subsídios para médicos no que se refere ao tratamento eficaz dos acidentados com serpentes jovens e adultas e para a comunidade científica que realiza pesquisas com toxinas dessa espécie.

VI. CONCLUSÕES

- ❖ A variabilidade nas atividades coagulante e proteolítica da peçonha de *B. erythromelas* é dependente do tamanho dos animais.
- ❖ A variabilidade na concentração de proteínas e atividade fosfolipásica da peçonha de *B. erythromelas* está relacionada com a origem geográfica das serpentes.
- ❖ A variabilidade na concentração e distribuição das proteínas da peçonha de *B. erythromelas*, bem como na suas atividades coagulante e fosfolipásica apresentam grande variações entre indivíduos.
- ❖ A variabilidade nos parâmetros avaliados na peçonha de *B. erythromelas* não está relacionada ao dimorfismo sexual.
- ❖ A variabilidade na peçonha de *B. erythromelas* é decorrente da somatória das influências da variação genética individual, da origem geográfica e do desenvolvimento ontogenético das serpentes.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S. D. e SILVA, N. J. D. JR. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. Comparative Biochemistry and Physiology B. Comparative Biochemistry Vol. 99 (2), pp. 287-294. 1991.

AIRD, S. D. e KAISER, I. I. Compative studies on three rattlesnake toxins. Toxicon, Vol. 2, pp. 361-374. 1985

ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. e SANTOS, M. C. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny? J. Herpetol., Vol. 30, pp. 285-288, 1996.

ANDRADE, D. V. e ABE, A. S. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. Herpetologica, Vol. 55, pp.200-204, 1999.

AMARAL, A. Notas sobre a ofiologia neotrópica e brasílica. II. Sobre *Bothrops lansbergii lansbergii* (Schlegel, 1841); *Trimeresurus dunni* Hartweg e Oliver 1938; T. *lansbergii annectens* Schmidt 1936. Pap. Avul. Dep. Zool. São Paulo n 5, p. 7-12. 1944.

AQUINO, W. K. Levantamento clínico e epidemiológico dos acidentes ofídicos no Estado de Pernambuco. 1999, 103f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ARAGÓN, F. e GUBENSEK, F. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon*, Vol. 19 (6), pp. 797-805, 1981.

ARNI, R. K. e WARD, R. J. Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon*, Vol. 34 (8), pp. 827-841, 1996.

ASSAKURA, M. T. FURTADO, M. D. e MANDELBAUM, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comparative Biochemistry And Physiology B. Comparative Biochemistry*, Vol. 102 (4), pp. 727-732, 1992.

BINFORD, G. J. An analysis of geographic and intersexual chemical variation in venoms of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). *Toxicon* Vol. 39, pp. 955-68. 2001.

BONILA, C. A., FAITH, M. R. e MINTON, Jr. S. A. L-amino acid oxidase, phospholipase, total protein and other properties of juvenile timber rattlesnake (*C. h. horridus*) venom at different stages of growth. *Toxicon* (11), pp. 301-303. 1973

BORGES, R. C. Serpentes peçonhentas brasileiras: Manual de identificação, Prevenção e Procedimento em Caso de Acidentes. São Paulo, Ed. Atheneu, Pp. 58-72, 1999.

CAMPBELL, J. A. e LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America, New York, Ed. Comstock Publishing Associates, pp. 425. 1989.

CARDOSO, J.L.C. e BRANDO, R.B. Acidentes por animais peçonhentos, clínica e tratamento. Livraria e Editora Santos. 1^a Edição, pp. 23, 1982.

CARDOSO, J.L.C. Introdução ao estudo dos acidentes por animais peçonhentos. In: Plantas venenosas e animais peçonhentos, Schvartsman, S. 2^a Ed., pp. 139-187, 1992.

CAVINATO, R.A, REMOLD, H. e KIPNIS, T.L. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. Toxicon, Vol. 36 (2), pp. 257-265, 1998.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAM, V. e WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon, Vol. 29 (11), pp. 1279-1303, 1991.

DALTRY, J.; PONNUDURAI, G.; SHIN, C. K.; TAN, N.H.; THORPE, R. S. e WUSTER, W. Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*, Vol. 34 (1), pp. 67-79. 1996.

DEBONT, T.; SWERTS, A.; VEN DER WALT, J. J.; MULLER, G. J.; VERDONCK, F.; DAENENS, P. e TYTGAT, J. Comparison and characterization of the venoms of three *Parabuthus* scorpion species occurring in southern Africa. *Toxico*, Vol. 36 (2), pp. 341-52. 1998.

DENNIS, E. A. Diversity of groups types, regulation and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, pp. 13057-60, 1994.

FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L. e MOTA, I. Toxic activities of venom from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*, Vol. 30 (12), pp. 1603-08, 1992.

FIERO, M. K., SEIFERT, M. W., WEAVER, T. J., e BONILLA, C. A. Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus v. viridis*). *Toxicon* Vol. 10, pp. 81-82. 1972.

FNS - Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, pp. 9-20, 1998.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; GOMBAROVITS, M. E. C.; VALENZUELA, J. G.; CARLINI, C. R e GUIMARÃES, J. A. Intraspecific variation in the venoms of the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Vol. 127, pp. 23-36, 2000.

FURTADO, M^a-F. D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A S. e ANTONIO, L. C. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon, Vol. 29 (2), pp. 219-226, 1991.

GENÉ, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. e CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon V. 27 (8), pp. 841-48, 1989.

GLENN, J. L.; STRAIGHT, R. C.; WOLFE, M. C. e HARDY, D. L. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave Rattlesnake) venom properties. Toxicon, Vol. 21 (1), pp. 119-130, 1983.

GLENN, J. L. e STRAIGHT, R. Venom properties of the rattlesnakes (*Crotalus*) inhabiting the Baja California region of Mexico. Toxicon, Vol. 23 (5), pp. 769-775, 1985.

GLENN, J. L. e STRAIGHT, R. C. Intergradation of two different venom populations of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Toxicon*, Vol. 27 (4), pp. 411-418, 1989.

GREENWOOD, B. M.; WARREL, D. A.; DAVIDSON, N. McD; ORMEROD, L. D. e REID, H. A. Immunodiagnosis of snake bite. *British Medical Journal*, Vol. 4, pp 743-745, 1974.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F. e BOLÁNOS, R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Ver. Biol. Trop.* Vol. 28, pp. 341-346. 1980.

GUTIÉRREZ, J. M. e LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venom. A review. *Mem. Inst. Butantan*, Vol. 51, pp. 211-33, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; DOS SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F. e ROJAS, G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *C. d. terrificus*. *Toxicon*, Vol. 2, (11), pp. 1273-77, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M. e LOMONTE, B. Phospholipase A₂, myotoxinas from *Bothrops* snake venom. Review Article. *Toxicon*, Vol. 33, (11), pp. 1405-24. 1995.

HABERMEHL, G. G. Venoms animals and their toxins. New York, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 3^a Ed., pp. 195, 1981.

IWANAGA, S. e SUZUKY, T. Enzymes in snake venoms. In: Snake venoms, pp. 684-750. 1979.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; CARDOSO, R. P.; ABE, A. S. e SEGURA, O. P. Agrupamento de serpentes do gênero *Bothrops* pelos caracteres do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: XIII CONG. BRAS. ZOOL. CUIABÁ. 1989, p. 135.

JAYANTHI, G. P. e VEERABASAPPA GOWDA, T. Geographical variation in Índia in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon*, Vol. 26 (3), pp. 257-64. 1988.

JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nimmifera*. *Toxicon*, Vol. 2, pp. 187-195, 1964.

KALAPOTHAKIS, E. e CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon*, Vol. 35 (10), pp. 1523-29. 1997.

KAMIGUTI, A. S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTIS, I. S. e NAHAS, L. Alteration of the blood coagulation system after accidental human inoculation in Brazil. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, Vol. 19, pp. 199-204, 1986.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C. ; THEAKSTON, R. D. G. e SANO-MARTINS, I. S. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* Vol 29 (8), pp. 961-72. 1991.

KAMIGUTI, A. S. e SANO-MARTINS, I. S. South american snake venoms affecting haemostasis. *J. Toxicol-Toxin Reviews*, Vol. 14 (3), pp. 359-74, 1995.

KINI, R. M. Phospholipase A2 – A complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R. M. Ed. *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. England, Chichester. Pp. 1-28. 1997.

KORNALIK, F. e TÁBORSKÁ, E. Intraspecies variability the composition of coagulant active snake venoms. In: *Hemostasis and venom animal*, Markland, F. S. Marcel Dekker, New York, pp. 503-513, 1988.

KOUYOUMDJIAN, J. A. e POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, Vol. 31 (2), pp. 84-90. 1989.

LABROUSSE, H.; NISHIKAWA, A. K.; BON, C.; AVRAMEAS, S. Development of a rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for measuring venom antigens after an experimental snake bite. *Toxicon*, Vol. 26 (12), pp. 1157-1167. 1998.

LEITE, L. C. C.; FURTADO, M. F.; CORREA, T. C. e RAW, I. Characterization of the snake from seven Brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion – exchange chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 102B (3), pp. 515-20, 1992.

LOMONTE, B., GENÉ, J. A., GUTIÉRREZ, J. M., CERDAS, L. Estudio comparativo de serpiente cascabel (*Crotalus d. durissus*) de ejemplares adultos e recién nacidos. *Toxicon*, Vol. 21 (3), pp 379-384, 1983.

MACKESSY, S. P. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnake *Crotalus viridis helleri* e *C. v. oreganus*. *Copeia*, pp. 92-101. 1988.

MARSH, N. E GLATSTON, A. Venom of the rhinoceros horned viper, *Bitis nasicornis*. *Toxicon*, Vol. 12, pp. 621-628. 1974.

MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; TOMY, S. C.; ANTONIO, L. C.; SUGIKI, M.; MIHARA, H. Prothrombin and factor X –activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Vol. 86, pp. 549-56, 1992.

MEBS, D e KORNALIK, F. Intraspecific variation in content of a basic toxin in eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. *Toxicon*, Vol. 22 (5), pp. 831-833, 1984.

MEIER, J. e FREYVOGEL, T. A. Comparative studies on venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*), carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricollis*) snakes at different ages. *Toxicon*, Vol. (18), pp. 661-662, 1980.

MEIER, J. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon*, Vol. 24 (1), pp. 41-46, 1986.

MINTON, S. A. e WEINSTEIN, S. A. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*, Vol. 24 (1), pp. 71-80. 1986.

MODESTO, J. C. A. Purificação e caracterização parcial de uma fosfolipase A_2 da peçonha de *Bothrops erythromelas* (jararaca malha de cascavel). Recife, 2000, 67f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica) Universidade Federal de Pernambuco.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; NISHIKAWA, A. K.; BRONDSKYN, C. I.; SANTOS, M. C.; FURTADO, M.F.D.; DIAS DA SILVA,

W. e MOTA, I. Antigenic cross-reactive of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. *Toxicon*, Vol 28 (2), pp. 181-188, 1990.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and Factor X- Activator componets of *Bothrops* snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 2, pp. 314-28, 1979.

NUNES, E. S. Inibição dos efeitos da peçonha de *Bothrops erythromelas* (jararaca malha de cascavel) pelo extrato de *Jatropha molissima* (Pohl) Bail (pinhão bravo). 2000, 50f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ORIVEL, J. e DEJEAN, A. Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). *Toxicon* Vol. 39, pp. 195-201, 2001.

PERRONE, M. A. L.; VELLARROEL, M. S.; FURTADO, M. A. D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes dos estado de São Paulo e do estado do Paraná com algumas espécies morfológicamente duvidosas. *Mem. Inst. Butantan*. Vol. 51 (1), pp. 25-32. 1989.

PONTES, M. M. B., Comparação da capacidade neutralizante dos soros antibotrópicos poliespecífico comercial e monoespecífico frente à peçonha de *Bothrops erythromelas*. 2000, 64f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

RAMOS, J. H. *Bothrops bilineata* Wied, 1825, sua ocorrência em Pernambuco. Arquivo do Instituto de Pesquisas Agronômicas-IPA. Vol. 3, 1941.

RIBEIRO, L. A. e JORGE, M. T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo, Vol. 32 (6), pp. 436-42, 1990.

ROCHA, M. L. Distribuição e eliminação da peçonha de *Bothrops erythromelas* marcada com I^{131} após a injeção intravenosa em camundongos. 1998, 69f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: Soerensen, B., Animais Peçonhentos. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro pp. 1-45, 1990.

ROSENBERG, P. Pitfalls to avoid in the study of correlations between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipase A₂ enzymes. In: Kini, R. M. Ed. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism. England, Chichester. Pp. 1-28, 1997.

RUSSEL, F. E.; WALTER, F. G.; BEY, T. A.; FERNANDEZ, M. C. Snakes and snakebite in Central America – Review. Toxicon, Vol. 35 (10), pp. 1469-1522. 1997.

SANCHEZ, E. F. FREITAS, T. V., FERREIRA-ALVES, D. L., VELARDE, D. T., DINIZ, M. R., CORDEIRO, M. N., AGOSTINI-COTTA, G. e DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. Toxicon, Vol. 30 (1):95-104. 1992.

SILVA-FILHO, M. A. Manejo de serpentes da espécie *Bothrops erythromelas* (Serpentes – Crotalinae – Viperidae) coletadas em Pernambuco. Recife, 2000, 69f. (Monografia do Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, M. B. Purificação e clonagem de um ativador de protrombina presente na peçonha da serpente *Bothrops erythromelas*. 2001, 117f. (Dissertação de Doutorado em Ciências), Escola Paulista de Medicina-USP, São Paulo.

SILVA JR., N. J.; GRIFFIN, P. R.; AIRD, S. D. Comparative chromatography of brazilian coral snake (*Micrurus*) venom. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 100B (1), pp. 117-26, 1991.

SIQUEIRA-FILHO, J. A. Suplemento: *Neoregelia*: sugênero *Longipetalopsis*. In: Bromélias da Mata Atlântica – *Nidularium*. LEME, E. M. C. Sextante, Rio de Janeiro, pp. 231-237. 2000

SOARES, M. M. S. Identificação taxonômica das serpentes coletadas no estado de Pernambuco. 2001, 65f. (Monografia do Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOTO, J.G.; PEREZ, J.C. e MINTON, S.A. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snakes venoms. Toxicon, Vol. 26 (9), pp. 875-82, 1988.

SOUSA, J. R. F., MONTEIRO, R, Q., CASTRO, H. C. e ZINGALI, R.B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. Toxicon, Vol. 39, pp. 787-92, 2001.

STOCKER, K. F. Composition of snake venoms. In: Stcker, K. F., ed. Medical use of snake proteins. CRC Press., Boca Ratin, Vol. 2, p. 33-57. 1990.

TAN, N. H. e PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). Comp. Biochem. Physiol. Vol.100B (2), pp. 361-65, 1991.

TAN, N. H.; YEO, K. H. e JAAFAR, M. I. N. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom and venom antibodies. Toxicon, Vol. 30 (12), pp. 1609-1620, 1992.

THEAKSTON, R. D. G; LLOYD-JONES, M. J. e REID, H. A. Micro-Elisa for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. The Lancet, Vol (24), pp. 639-641, 1977.

TU, A. T.; STERMITZ, J. e ISHIZAKI, H. Comparative study of pit viper venoms of genera *Trimeresurus* from Asia and *Bothrops* from América: a immunological and isotachophoretic study. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 66B, pp. 249-54, 1980.

TUN-PE, NU-NU-LWIN, AYE-AYE-MYINT, KYI-MAYHTWE e KHIN-AUNG-CHO. Biochemical and biological properties of the venom from russell's viper (*Daboia russelli siamensis*) of varying ages. Toxicon, Vol. 33 (6), pp. 817-821. 1995.

VALENÇA, R. C. Estudo do processo hemorrágico induzido pela peçonha de *Bothrops erythromelas*. 1997, 61f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

VANZOLINI, P. E., COSTA, A. M. M. R., VITT, L. J. Répteis da caatinga. Rio de Janeiro, 1980.

VASCONCELOS, C. M. L. Estudo da peçonha de *Bothrops erythromelas*: caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição. 1996. 112f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

VITAL BRAZIL, O. Farmacologia das peçonhas. In: Corbett, C. E. ed Farmacodinâmica. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 1044-74, 1982.

VIRAVAN, C.; VEERAVANT, U.; WARREL, M. J., THEAKSTON, R. D. G.; e WARREL, D. A. Elisa confirmation of acute and past envenoming by the monocellate thai cobra (*Naja kaouthia*). J. Trop. Med. Vol. 35 (1), pp. 173-181, 1986.

WARRELL, D. A. Clinical features of venomings from snake bites. In: Envenoming and their treatments, Bon, C. e Goyffon, M. Editions Fondation Mérieux, Lyon, pp. 63-76. 1996.

WILLIAMS, V. e WHITE, J. Variation in venom constituents within a single isolated population of peninsula tiger snake (*Notechis ater niger*). Toxicon, Vol. 25 (1), pp. 1240-1243, 1987.

WÜSTER, W. E MCCARTHY, C.J. Venomous snake systematics: implications for snake bite treatment and toxinology. In: Envenomings and their treatments, C. Bon & M. Goyffon. Institut Pasteur. França, 1995.

YAMANOUYE, N.; BRITTO, L. R. G.; CARNEIRO, S. M.; MARKUS, R. P. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake. J. Exp. Biology. Pp. 2547-56. 1997. In: <http://www.biologists.com/jeb/200/19/jeb0823.html>

ZAR, J. H. Biological Analysis. 3^aEd, Nerw Jersey, Pratrice Hall. Pp. 718.

ZAPPELINI, A. Estudos bioquímicos e farmacológicos da peçonha de *Bothrops erythromelas*. 1991, 72f. (Dissertação de Mestrado em Farmacologia) UNICAMP, Campinas.