

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS.
BACHARELADO EM BIOLOGIA

**Varição sexual e ontogenética do veneno de *Bothrops leucurus* (Wagler,
1824) (Serpentes: Viperidae)**

Cruz das Almas

Bahia - Brasil

2016

Diego dos Santos Pereira

[Este artigo será submetido à publicação no periódico Applied Research in Toxicology (ISSN: 2359-4721), 2016]

Variação sexual e ontogenética do veneno de *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824) (Serpentes: Viperidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte das exigências do curso de graduação de Bacharelado em Biologia, para obtenção do título de Bacharel em Biologia, sob a orientação da Professora Dra. Jacqueline Ramos Machado Braga.

Cruz das Almas

Bahia – Brasil

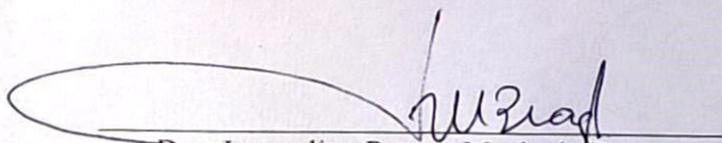
2016

Diego dos Santos Pereira

Variação sexual e ontogenética do veneno de *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824) (Serpentes: Viperidae)

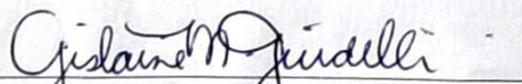
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte das exigências do Curso de Graduação de Bacharelado em Biologia, para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

APROVADO em 27 de Julho de 2016.

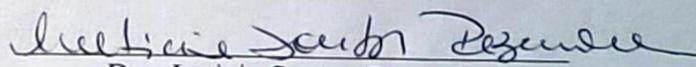


~~Dra. Jacqueline Ramos Machado Braga~~

UFRB



Dra. Gislane Marcolino Guidelli
Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia



Dra. Leticia Santos Resende
Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia

Agradecimentos

À minha família, em especial aos meus pais por todo apoio.

Ao “meu” laboratório e orientadora Jacqueline Ramos Machado Braga por ter aceitado entrar nas mais loucas empreitadas comigo.

Aos meus amigos todos, pois de forma direta e indireta contribuíram com a conclusão desse ciclo.

À toda equipe do núcleo de Herpetologia do Instituto Butantan, Dra. Ketlhen Grego, Ariel Vilarinho, Dr. Sávio Fernandes, à querida Dra. Marisa Teixeira, e sobretudo ao meu querido amigo Leonardo Oitaven.

RESUMO

DOS SANTOS PEREIRA, DIEGO, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, julho de 2016. Variação sexual e ontogenética do veneno de *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824) (Serpentes: Viperidae). Orientador: Jacqueline Ramos Machado Braga

No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops*. A espécie *Bothrops leucurus*, popularmente conhecida como jararaca-do-rabo-branco ou malha-de-sapo, é responsável por cerca de 70% dos acidentes na Bahia. Alterações na composição química de um veneno podem refletir em alterações no quadro de envenenamento. O estudo da variação sexual e ontogenética dos venenos das serpentes são de suma importância na busca pelo entendimento de sua complexidade, efeitos da intoxicação, além da busca por moléculas farmacologicamente ativas. O presente estudo objetivou analisar as variações sexual e ontogenética do veneno da serpente *Bothrops leucurus*. Foram separados *pools* de venenos brutos em grupos: machos e fêmeas; jovens, adultos e longevos. Foram avaliados perfil eletroforético, atividade proteolítica em gelatina, atividade coagulante em plasma equino, atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e soroneutralização. O veneno de *B. leucurus* apresentou variação ontogenética e sexual em todas as técnicas avaliadas. O perfil eletroforético mostrou que o veneno das fêmeas apresenta maior diversidade de proteínas em sua composição. A ação proteolítica foi observada em todos os grupos, sendo mais potente nos animais adultos e longevos. Apenas o veneno dos jovens apresentou ação coagulante, tendo as fêmeas a maior atividade. O veneno de todos os grupos avaliados demonstrou discreta atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. Apesar das diferenças verificadas nos grupos de testados, todos os venenos foram neutralizados pelo soro de referência para o gênero *Bothrops*, apesar desta espécie não compor o *pool* para a produção do mesmo.

Palavras-chaves: serpente; peçonha; jararaca.

ABSTRACT

In Brazil, most snakebites are caused by snakes of the genus *Bothrops*. The specie *Bothrops leucurus*, popularly known as white tail jararaca, is responsible for about 70% of accidents in Bahia. Changes in venom chemical composition may reflect in changes within the framework of poisoning. The study of sexual and ontogenetic variation of snake venoms are of paramount importance in the search for understanding of its complexity, effects of intoxication, as well as search for pharmacologically active molecules. The present study aimed to analyze the sexual and ontogenetic venom variations of the snake *Bothrops leucurus*. Pools of crude venoms were separated into groups: males and females; young, adults and olds snakes. Were evaluated electrophoretic profile, proteolytic activity in gelatin, equine plasma coagulant activity, antimicrobial activity on *S. aureus* and serum neutralization. The *B. leucurus* venom presented ontogenetic and sexual variation in all the techniques evaluated. The electrophoretic profile showed that the females' venom has increased diversity of proteins in their composition. The proteolytic action was observed in all groups being more potent in adult and olds animals. Only the young animals presented action coagulant, having females the highest activity. The poison of all evaluated groups showed discrete antimicrobial activity on *S. aureus*. Despite the differences in the groups of tested, all the venoms were neutralized by the reference serum for the genus *Bothrops*, although this species does not compose the pool for production.

Keywords: snake; venom; jararaca.

Sumário

Resumo.....	1
Introdução.....	1
Material e métodos.....	3
Resultados e discussão.....	4
Conclusão.....	9
Referências bibliográficas.....	9

Variação sexual e ontogenética do veneno de *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824)

(Serpentes: Viperidae).

Diego dos Santos Pereira

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Laboratório de Imunobiologia.

Jacqueline Ramos Machado Braga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Laboratório de Imunobiologia.

Cruz das Almas- Bahia, Brasil. 55 (75) 991806963 jacquebraga@globo.com

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse no presente artigo.

No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops*. A espécie *Bothrops leucurus*, popularmente conhecida como jararaca-do-rabo-branco ou malha-de-sapo, é responsável por cerca de 70% dos acidentes na Bahia. Alterações na composição química de um veneno podem refletir em alterações no quadro de envenenamento. O estudo da variação sexual e ontogenética dos venenos das serpentes são de suma importância na busca pelo entendimento de sua complexidade, efeitos da intoxicação, além da busca por moléculas farmacologicamente ativas. O presente estudo objetivou analisar as variações sexual e ontogenética do veneno da serpente *Bothrops leucurus*. Foram separados *pools* de

venenos brutos em grupos: machos e fêmeas; jovens, adultos e longevos. Foram avaliados perfil eletroforético, atividade proteolítica em gelatina, atividade coagulante em plasma equino, atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e soroneutralização. O veneno de *B. leucurus* apresentou variação ontogenética e sexual em todas as técnicas avaliadas. O perfil eletroforético mostrou que o veneno das fêmeas apresenta maior diversidade de proteínas em sua composição. A ação proteolítica foi observada em todos os grupos, sendo mais potente nos animais adultos e longevos. Apenas o veneno dos jovens apresentou ação coagulante, tendo as fêmeas a maior atividade. O veneno de todos os grupos avaliados demonstrou discreta atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. Apesar das diferenças verificadas nos grupos de testados, todos os venenos foram neutralizados pelo soro de referência para o gênero *Bothrops*, apesar desta espécie não compor o *pool* para a produção do mesmo.

Palavras-chaves: serpente; peçonha; jararaca-do-rabo-branco.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos, envolvendo humanos e animais, são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, aonde 12 das 28 espécies distribuídas no país ocorrem no Nordeste, sendo a Bahia um dos principais Estados que propiciam habitat adequado às espécies tropicais (LIRA-DA-SILVA et al, 2009). O gênero *Bothrops* pertence à família Viperidae e tem como características a presença de escamas subcaudais em pares, sem modificações na cauda, cabeça triangular, além da presença de fosseta loreal e presas do tipo solenóglifas (BRAZIL, 2010).

Os acidentes por animais peçonhentos foram incluídos pela Organização Mundial da Saúde no rol das Doenças Tropicais Negligenciadas, visto que têm se mostrado de grande importância na saúde pública de vários países, sobretudo no Brasil aonde o número de acidentes chega a 20 mil por ano (WHO, 2009). Serpentes do gênero *Bothrops* são as de maior importância médica no Brasil. A espécie *Bothrops leucurus*, popularmente conhecida como jararaca-do-rabo branco quando juvenil, e malha-de-sapo quando adulta, é responsável por cerca de 70% dos acidentes na Bahia, sendo endêmica do bioma Mata Atlântica. Seu veneno pode causar, além de dor local e mionecrose, atividade fibrinolítica, coagulante, proteolítica, hemorrágica, distúrbios como cefaleia, vômitos, náuseas, oligúria, hemorragia, hipotensão, visão turva, tremores e, em casos mais graves, insuficiência renal aguda e hemorragia sistêmica, podendo evoluir para um quadro de choque cardiovascular (BRAZIL, 2010).

A espécie *Bothrops leucurus* se distingue das demais do gênero pela presença de faixa pós-ocular escura que se estende do olho ao canto da boca. Os adultos apresentam faixa vertebral marrom avermelhada e 23 fileiras de escamas dorsais no meio do corpo, entretanto no que se refere ao seu padrão de coloração, a espécie é bastante variável, podendo ser essa diferenciação sazonal, ontogenética ou sexual (BRAZIL, 2010).

Os venenos animais são *cocktails* complexos de compostos biologicamente ativos, que são secretados por glândulas especializadas e entregues ativamente para o animal alvo, através da imposição de um ferimento (STÁBELI et al, 2006). As moléculas injetadas induzem a ruptura dos processos fisiológicos e bioquímicos normais da vítima, tipicamente com o objetivo de facilitar a alimentação ou defesa do animal peçonhento (SUNAGAR et al, 2014). Essas substâncias apresentam ações neurotóxicas, miotóxicas, proteolíticas e hemorrágicas, porém muitos desses componentes têm funções essenciais na coagulação sanguínea, pressão arterial, agregação plaquetária, transmissão do impulso nervoso, funções analgésicas e anticancerígenas (QUEIRÓZ et al, 2008).

As toxinas animais possuem grande importância na descoberta e desenvolvimento de compostos terapêuticos (LAMEU et al., 2010). Em função de apresentarem composição complexa, o que induz os diversos efeitos biológicos, as toxinas ofídicas apresentam excelente potencial na prospecção de novas moléculas biologicamente ativas. Os diversos estudos da literatura têm demonstrado o grande potencial biotecnológico das toxinas ofídicas, através de

ensaios que envolvem o veneno total ou suas frações (LUNA et al, 2010).

O veneno botrópico é composto principalmente por metaloproteinases, hidrolases que dependem da ligação com um metal para manifestar suas atividades, sendo elas responsáveis pela mionecrose, hemorragia e reações inflamatórias no local da picada. As serinoproteases são caracterizadas como enzimas que têm atividade do tipo trombina, desencadeando importante papel sobre a cascata de coagulação. As fosfolipases do tipo A2 são responsáveis por hidrolisar inclusive fosfolípidios de membrana. As fosfolipases A2 dos venenos de serpentes podem apresentar diversas ações tóxicas como neurotoxicidade, miotoxicidade, hipotensão, hemorragia interna, atividade antiplaquetária, anticoagulante e inflamatória (CUNHA; MARTINS, 2012).

A variação ontogenética na composição dos venenos das serpentes pode ocorrer por esses animais possuírem uma alimentação diferenciada entre adultos e filhotes. Além disso, ainda podem ocorrer variações entre machos e fêmeas, e relativas à distribuição geográfica e tempo decorrido entre as extrações (LOURENÇO Jr., 2011). Esta variabilidade tem diversas implicações na terapêutica dos acidentes, como mostra estudo acerca das diferenças nos quadros clínicos de pacientes picados por serpentes de uma mesma espécie (WARREL,1997) .

A variação do veneno de serpentes de uma mesma espécie vem sendo amplamente estudada, na busca pela compreensão da complexidade dos

venenos e sua ação tóxica. Os autores sugerem que a evolução molecular do veneno pode ter sido influenciada por inúmeros fatores ecológicos e evolutivos, como dieta, distribuição das presas, pressão dos predadores, mudanças ontogenéticas e o sexo do animal (SUNAGAR et al, 2014).

Quando juvenis, algumas espécies de serpentes possuem uma quantidade maior de neurotoxinas, e seu veneno demonstra uma ação mais sistêmica. No adulto, entretanto, a quantidade de enzimas digestivas são as mais significativas, e seu veneno então teria ação mais local, salvaguardando as características do envenenamento das diferentes famílias da subordem Ophidia. Essas espécies com esse padrão de composição proteica na sua peçonha, foram classificadas como de espécies tipo I. Tais mudanças nos padrões proteicos do veneno têm início ainda nos recém-nascidos, e sofrem constantes modificações ao longo da vida. Deste modo, as variações ontogenéticas do veneno seriam as de maior relevância para a produção de soros e prospecção de moléculas de interesse farmacológico (WRAY et al, 2015) .

O estudo da variação sexual e ontogenética dos venenos das serpentes é de suma importância na busca pelo entendimento de sua complexidade, dos efeitos desencadeados pela intoxicação, além da bioprospecção de moléculas de interesse farmacológico. O presente estudo tem como objetivo analisar as variações sexual e ontogenética do veneno da serpente *Bothrops leucurus*. Devido à importância médica das proteínas do veneno, uma compreensão abrangente dos efeitos biológicos e das forças evolutivas que moldam a sua

biodiversidade se mostra essencial para desvendar o potencial biotecnológico do *cocktail* mais complexo da natureza.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos

Os pools dos venenos liofilizados, de espécimes de *B. leucurus*, foram gentilmente doados pelo Núcleo de Herpetologia do Instituto Butantan- SP, e foram divididos em grupos considerando o sexo (machos e fêmeas) e a idade (jovens entre 2 e 3 anos, adultos entre 5 e 7 anos, e longevos entre 10 e 22 anos). Todos os venenos dos grupos foram armazenados sob refrigeração (-20 °C) até o início dos ensaios.

Perfil eletroforético

O veneno (1mg/ml PBS pH 7,4) de *B. leucurus* foi submetido à eletroforese em gel (SDS-PAGE), de acordo com a técnica de Laemmli (1970), sendo que as amostras foram submetidas a condições não redutoras em gel 15%.

Western blotting

O gel foi transferido para membrana de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979). Após a transferência, a membrana foi bloqueada overnight com leite desnatado 5% em PBST 0,05% . A membrana foi lavada 3 vezes durante 10 min com PBST 0,05% e incubada com 1mg veneno/ml em PBS/ BSA a 1%, durante 1 h à temperatura ambiente. Após lavar 3 vezes, durante 10 min com PBST 0,05%, os blots foram

corados com o cromógeno (4-cloro-1-naftol) sob agitação, até o fim da reação, quando a membrana foi lavada em água corrente.

Zimografia em SDS-PAGE

A zimografia em SDS-PAGE no substrato gelatina é uma técnica usada para detectar a presença de metaloproteinases presentes no veneno, através da degradação da gelatina no gel. Para detecção das enzimas proteolíticas presentes nos venenos, foi utilizado o método descrito por Heusen e Dowdle (1980), com modificações. Foram preparados mini-géis (10x 7cm x 0,75 mm) na concentração de 10% para o gel de separação, incorporando-se gelatina (Sigma-USA) (na concentração final de 1mg/ml no gel), e 4% para o gel de concentração. A corrida eletroforética foi realizada em cuba BIORAD (100V/ 80 mA/ 4°C), sob condições não redutoras. Após a corrida, os géis foram lavados em tampão de lavagem II (30 minutos), tampão de lavagem I (10 minutos), imergidos em tampão de ativação e incubados por 3 horas a 37°C. Os géis foram corados em Comassie Brilliant Blue R-250.

Dose mínima coagulante em plasma de equino (DMC-P) com soroneutralização

A DMC é definida como a concentração mínima de veneno necessária para que seja coagulada uma solução de plasma ou fibrinogênio, no tempo de 60 segundos a 37 °C. Foram utilizadas concentrações de 2,0 a 0,015 mg/ml dos *pools* de venenos de *B. leucurus*, sendo os mesmos testados em plasma de equinos comercial. Posteriormente foram encubados veneno e soro antibotrópico (25µl de

cada), e adicionados 50µl de plasma esquino para verificar a soroneutralização, utilizando coagulômetro para medir o tempo de coagulação.

Ensaio antimicrobiano

O inóculo de *Staphylococcus aureus* cultivado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi então descartado restando a massa bacteriana ao fundo do tubo de ensaio. A suspensão foi preparada com o auxílio uma alça de platina foi coletado a massa bacteriana através do método de suspensão direto em 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) (HIMEDIA®). A suspensão foi homogeneizada em mixer (LABNET®) por 60s, e ajustada até alcançar a turvação correspondente ao padrão de $1,2 \times 10^8$ UFC/ml (CLSI, 2012). Foram realizados três controles: o branco, onde foi adicionado apenas o meio BHI; o controle positivo (C+), que continha meio BHI e *S. aureus*; e o controle negativo (C-), que continha meio BHI, *S. aureus* e antimicrobiano Sulfonamida/Trimetoprim. 50µl da suspensão bacteriana foram distribuídos em microplaca de 96 poços com fundo em "U" nas diluições 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. As placas foram incubadas a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 18 horas em incubadora BOD (Cientec®). As placas foram então submetidas à leitura em espectrofotômetro (492nm).

RESULTADOS

A eletroforese em gel de acrilamida revelou perfis de veneno bastante semelhantes de uma forma geral, bandas de aproximadamente 20KDa foram as mais intensamente marcadas nos diferentes grupos avaliados. Entretanto, foi possível observar a presença de proteínas de baixo peso molecular, de aproximadamente 25 KDa e 50 KDa, que aparecem de forma mais significativa nos filhotes de ambos os sexos, estando quase indetectáveis em animais adultos e longevos (Fig. 1).

A zimografia revelou forte atividade proteolítica principalmente nos adultos, porém reduzida nos filhotes, como mostra a área mais clara do gel, local aonde houve degradação do substrato gelatina (Fig. 2). Com relação à diferença sexual, a Figura 2 demonstra ainda que o veneno das fêmeas é mais proteolítico quando o animal é adulto, e em machos, quando longevos.

Na DMC-P, o *pool* de venenos de indivíduos longevos de ambos os sexos não demonstrou atividade coagulante. Entretanto, verificou-se diferença nos resultados encontrados entre filhotes e adultos, aonde o valor da DMC-P chegou a variar quase quatro vezes de um grupo pra outro (Tab. 1).

A Tabela 1 revela ainda que, com relação ao ensaio de soroneutralização, os venenos testados apresentaram a atividade coagulante totalmente neutralizada com o uso do soro referência nacional produzido pelo IB, apesar do veneno de *B.*

leucurus não fazer parte do *pool* de venenos referência para a produção de soro antitoxinogênico no Brasil.

O teste de *Western blotting* foi realizado visando ratificar a neutralização, das enzimas presentes nos diferentes *pools* do veneno de *B. leucurus*, pelos anticorpos presentes no soro antitoxinogênico do IB (Fig. 3) demonstra que o soro antitoxinogênico reagiu nas diferentes bandas dos distintos grupos.

O teste para determinar o potencial antimicrobiano do veneno dos diferentes grupos demonstrou que a bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou discreta sensibilidade ao veneno da serpente *B. leucurus*. O veneno dos jovens, sobretudo das fêmeas, mostrou maior atividade sobre as bactérias, quando comparado aos venenos de adultos e longevos (Gráfico 1).

DISCUSSÃO

Os resultados do perfil eletroforético corroboram estudos anteriores em espécies de viperídeos, que evidenciaram diferenças no perfil proteico dos venenos. Estudo analisando dosagem proteica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, demonstrou 15% a menos de proteínas no veneno dos filhotes quando comparado ao dos adultos, além da presença de isoformas de fosfolipases A2, resultantes de modificações pós-traducionais que poderiam induzir diferentes intensidades na ação desse veneno (LOURENÇO Jr., 2011). Uma outra análise do veneno de *C. durissus terrificus*, avaliando influência ontogenética mostrou que a crotamina só está presente no veneno na fase adulta do animal, e que em neonatos, o veneno é

composto por cerca de 40% de metaloproteinases, enquanto que, no adulto esse valor se refere à composição da fosfolipase crotoxina (CALVETE et al, 2010).

Em estudo avaliando o rendimento de veneno em *B. leucurus*, encontrou-se um alto teor proteico nos filhotes, correspondente ao dobro dos animais longevos, o que mostra que a quantidade de proteínas por ml de veneno se reduz ao longo da vida do animal (OITAVEN, 2016). Quanto à variação sexual, pode-se observar na Figura 1 que os animais machos apresentam uma menor diversidade proteica na composição do seu veneno.

As metaloproteinases, presentes no veneno botrópico, são capazes dentre outras coisas de clivar componentes da matriz extracelular, e de causar mionecrose, sendo por isso, sua ação sentida no local da picada (MONTENEGRO, 2011. CUNHA E MARTINS, 2012). A Figura 2 revela que a atividade proteolítica do veneno de *B. leucurus* seria um característica que pode estar relacionada com a maturidade desses animais nos diferentes sexos. Os resultados demonstram que o veneno dos espécimes adultos pode possuir um efeito mais local que o dos filhotes (Fig. 2). Em serpentes do gênero *Micrurus*, as enzimas com atividade proteolítica mostram-se também mais significativamente presentes no veneno dos animais adultos (WRAY et al, 2015).

Os resultados do ensaio de coagulação (Tab. 1) revelaram que, ao menos enquanto filhotes, o veneno de *B. leucurus* apresenta efeitos mais sistêmicos. Todavia esse potencial vai sendo perdido durante o desenvolvimento do animal, e

enzimas digestivas passam a compor o veneno, como podemos verificar ao analisar que, em ambos os sexos, os longevos tendem a perder essa atividade coagulante em seu veneno, mas passam a ter um atividade proteolítica maior. A atividade coagulante pode estar relacionada à ação das serinoproteases, grupo de enzimas presentes no veneno botrópico, que têm ação do tipo trombina, afetando a coagulação sanguínea por ativação dos diferentes componentes nela envolvidos (CUNHA; MARTINS, 2012).

Espécies de serpentes que, quando juvenis possuem toxinas com ações mais sistêmicas, e quando adultas apresentam mais enzimas digestivas em sua composição, possuem venenos do Tipo 1. Nas serpentes adultas, o veneno revela uma ação mais local, salvaguardando as características individuais do envenenamento presentes nas diferentes famílias da subordem Ophidia. Tais mudanças nos padrões proteicos do veneno têm início ainda nos recém-nascidos, sofrendo constantes modificações ao longo da vida (WRAY et al, 2015).

Muitos estudos têm sido feitos com intuito de buscar novos fármacos com potencial antimicrobiano, as substantivas naturais como toxinas de plantas e animais vem sendo amplamente testadas devido sua alta complexidade e ampla ação enzimática (CALVETE, 2009). O Gráfico 1, que mostra os resultados referentes ao ensaio antimicrobiano sobre *S. aureus*, revela que, apesar de demonstrar atividade antimicrobiana, ainda são necessários mais estudos para identificar qual componente molecular do veneno de *B. leucurus* poderia induzir tal atividade. Estudo anterior mostrou que a fração L-aminoácido oxidase do veneno

de *B. leucurus* não apresentou atividade antimicrobiana, sugerindo que a mesma seja consequência da ação de um outro grupo enzimático presente no veneno (TORRES, 2009). Entretanto, Nunes et al (2011) encontrou atividade antimicrobiana numa lectina presente no veneno de *B. leucurus*, e Koduri (2002) encontrou esse tipo de ação na fosfolipase A2, mostrando que esse tipo de atividade pode estar relacionada a diferentes compostos enzimáticos presentes no veneno desta serpente.

CONCLUSÃO

O veneno de *Bothrops leucurus* apresentou variação ontogenética mais marcante em todas as técnicas avaliadas. Com relação ao sexo, os dados revelaram discreta diferença da atividade dos venenos avaliados. O veneno dos espécimes jovens demonstrou maior atividade coagulante e antimicrobiana, além de maior diversidade proteica na composição dos venenos, sobretudo nas fêmeas. Com relação aos venenos dos espécimes longevos, verificou-se uma maior atividade proteolítica, menor atividade antimicrobiana, sem efeito na coagulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brazil, T. K.; **Catálogo da fauna terrestre de importância médica da Bahia.**

Edufba, Salvador, 202p, 2010.

Calvete, J. J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M. Venoms,

venomics, antivenomics. **FEBS Letters.**, v.583, p.1736–1743, 2009.

Calvete, J, J; Sanz, L; Cid, P; De-La-Torre, P; Flores-Diaz, M; Santos, M, C, D;

Borges, A; Brems, A; Ângulo, Y; Lomonte, B; Alape-Giron, A; Gutierrez, J, M;

Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the

South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive

Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. **Journal of**

Proteome Research. v.9, p.528–544, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance**

standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard—11th

. **CLSI document M02-A11.** Wayne, PA. 2012.

Cunha, E, M; Martins, O, A. Principais compostos químicos presente nos venenos de

cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de**

Educação e Ciência (REEC). v.02 p.21-26, 2012.

Heussen, C; Dowdle, E, B. Electrophoretic anlysis of plasminogen activators in

polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized

substrates. **Analytical Biochemistry.** v.102 p.196-202, 1980.

Koduri, R. S. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. **J. Biol. Chem.** v. 277, p.5849-5857, 2002.

Laemmli, U, K; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v.227 p.680-685, 1970.

Lameu, C; Hayashi, M, A, F; Guerreiro, J, R; Oliveira, E, F; Lebrun, I; Pontieri, V; Morais, K, L, P; Camargo, C, M; Ulrich, H. **The central nervous system as target for antihypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom.** **Citrometry**, v.77 p.220–230, 2010.

Lira-Da-Silva, M. R; Mise, Y. F; Casais-E-Silva, L. L; Ulloa. J; Breno Hamdan, B; Brazil T. K. Morbimortalidade por ofidismo no nordeste do Brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia.** v.79 p.21-25, 2009.

Lourenço Jr, A. **Variação sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Crotalus durissus terrificus* da região de Botucatu–São Paulo: caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica.** Botucatu. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2011.

Luna, K, P, O. **Avaliação da resposta imune relacionada à ação dos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella*.** Salvador, Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia, 2010.

Montenegro, C, F. **Efeito de uma desintegrina RGD recombinante de *Rhinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*) na migração de células normais e tumorais.** São Carlos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2011.

Nunes, D. C. O. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom, **Comp. Biochem. Physiol**, v.154, p. 226-233, 2011.

Oitaven, L, C, P. **Fatores de interferência no rendimento e estudo bioquímico do veneno de *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes: Viperidae) em cativeiro.** São Paulo, Monografia do Programa de Aperfeiçoamento Profissional, Instituto Butantan, 2016.

Queiroz, G, P; Pessoa, L, A; Portaro, F, C, V; Furtado, M, F, D; Tambourgi, D, V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v.52, p.842-851, 2008.

Stábeli, R. G.; Amui, S. F.; Sant'ana, C. D.; Pires, M. G.; Nomizo, A.; Monteiro, M. C.; Romão, P. R.; Guerra-Sá, R.; Viera, C. A.; Giglio, J.R.; Fontes, M. R.; Soares, A. M.

Bothrops moojeni miotoxin-II, a Lys49 phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.142 p.371-381, 2006.

Sunagar, K; Undheim, E, A; Scheib, H; Gren, E, C; Cochran, C; Person, C, E; Koludarov, I; Kelln, W; Hayes, W, K; King, G, F. Intraspecific venom variation in the medically significant southern pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): biodiscovery, clinical and evolutionary implications. **Journal Proteomics**. v.99 p.68–83, 2014.

Torres, A. F. C.; **Ação antibacteriana, antifúngica, e antiparasitária dos venenos de serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações fosfolipases A2 e L-aminoácido oxidase**, Fortaleza. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2009.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the U. S. A.**, v.76, p.4350-4354, 1979.

Warrel, D, A. Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. **Symp Zool Soc Lond** .v.70, p189-203, 1997.

Who–World Health Organization. **Neglected Tropical Diseases**. 2009. Disponível

em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/ Acesso em:
04 de maio de 2015.

Wray, K; Margres, M, J; Seavy, M; Rokyta, D, R. Early significant ontogenetic changes in snake venoms. **Toxicon.**, v.96, p.74-81, 2015.

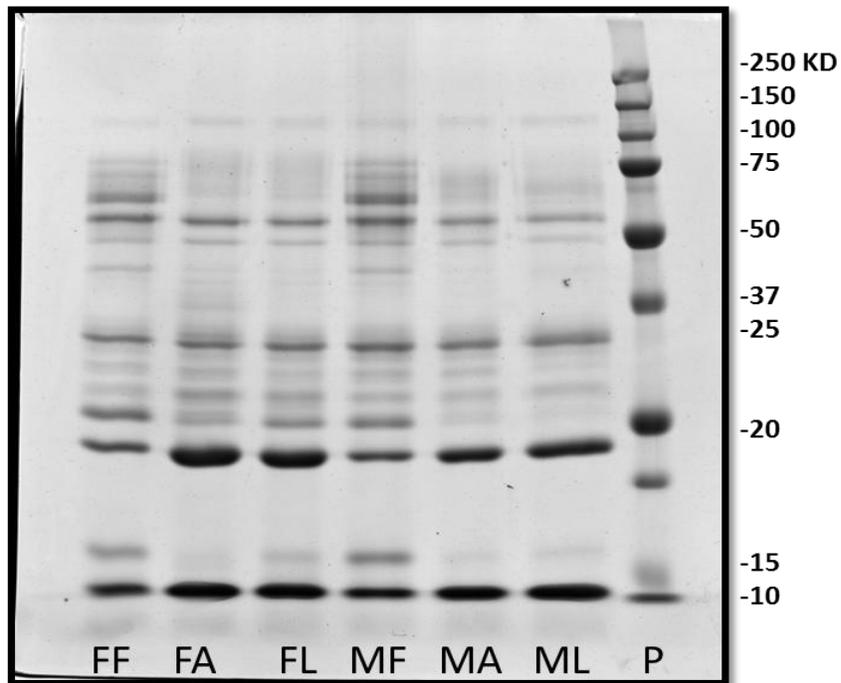


Figura 1. SDS-PAGE mostrando variação entre os venenos de *Bothrops leucurus*. Fêmea Filhote (FF), Fêmea Adulta (FA), Fêmea Longeva (FL), Macho Filhote (MF), Macho Adulto (MA), Macho Longevo (ML) e Padrão molecular(P).

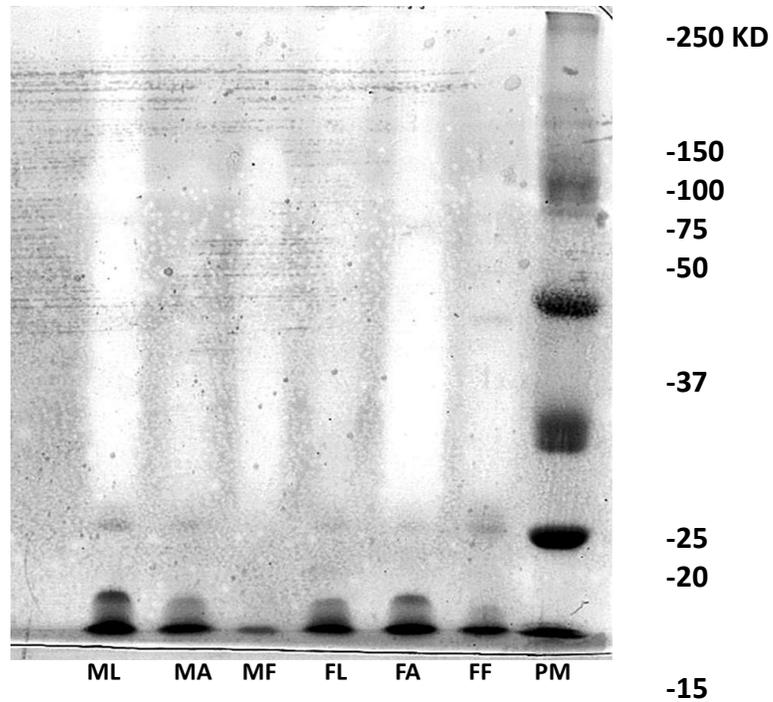


Figura 2. Zimografia em SDS-PAGE no substrato gelatina, evidenciando ação proteolítica (áreas claras do gel) dos diferentes *pools* de venenos de *B. leucurus*. Macho Longevo (ML), Macho Adulto (MA), Macho Filhote (MF), Fêmea Longeva (FL), Fêmea Adulta (FA), Fêmea Filhote (FF) e Padrão Molecular (PM).

Table 1. Relação da Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma (DMC-P) ($\mu\text{g/mL}$) dos exemplares de *Bothrops leucurus* e com o soro antiofídico do Instituto Butantan, nos diferentes grupos testados.

Grupos	DMC-P ($\mu\text{g/mL}$)	C/Soro Antiofídico
Jovens fêmeas	20,0	*s.c.
Jovens machos	30,0	*s.c.
Adultos fêmeas	76,0	*s.c.
Adultos machos	109,0	*s.c.
Longevos fêmeas	*s.c.	*s.c.
Longevos machos	*s.c.	*s.c.

* s.c. (sem coagulação no tempo testado)

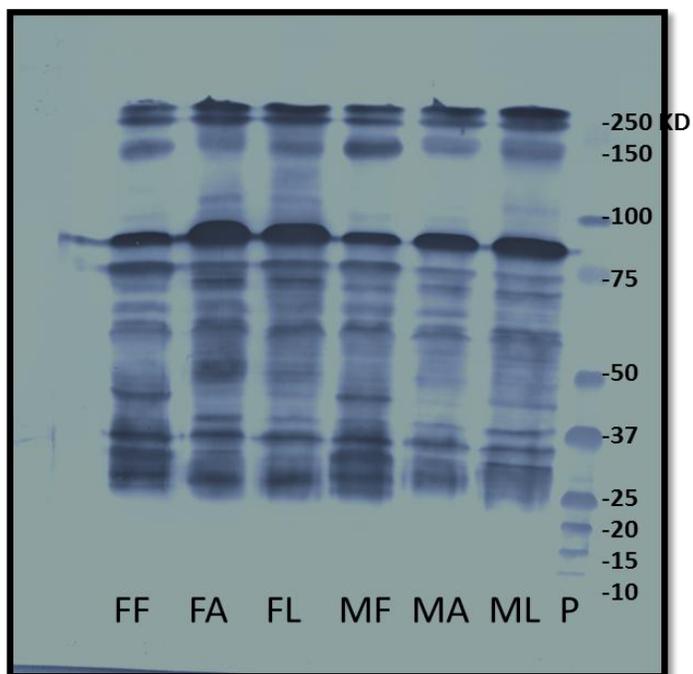


Figura 3. *Western blotting* mostrando reação do veneno dos diferentes grupos frente ao soro antibotrópico referência nacional do IB. Fêmea Filhote (FF), Fêmea Adulta (FA), Fêmea Longeva (FL), Macho Filhote (MF), Macho Adulto (MA), Macho Longevo (ML) e Padrão molecular(P).

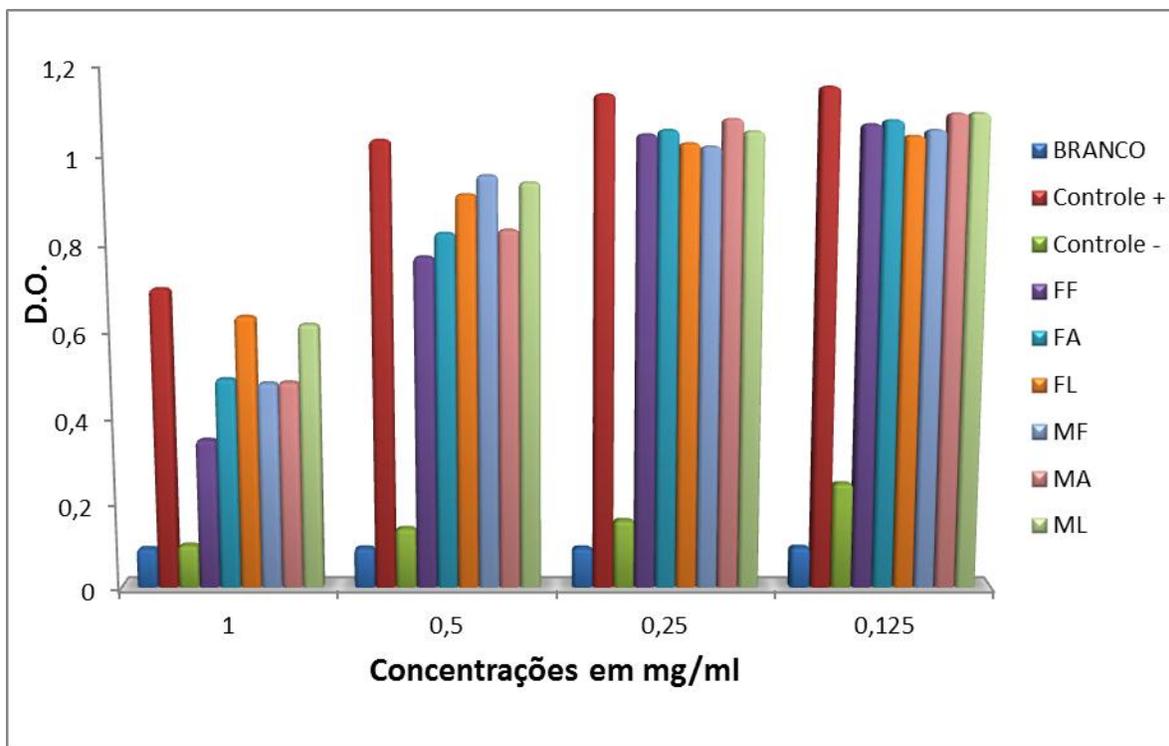


Gráfico 1. Atividade antimicrobiana do veneno dos grupos de *B. leucurus* analisados, sobre cepa de *S. aureus*. Macho Longevo (ML), Macho Adulto (MA), Macho Filhote (MF), Fêmea Longeva (FL), Fêmea Adulta (FA), Fêmea Filhote (FF), BRANCO (Meio BHI), Controle+ (BHI e *S. aureus*) e Controle- (BHI, *S. aureus* e a Sulfonamida/Trimetoprim).