



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PORTO NACIONAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANTONIO ITALO DOS SANTOS NUNES

**ESTUDO COMPARATIVO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
VENENO DA *Bothrops moojeni*, DO CERRADO TOCANTINENSE E DO
SUDESTE**

Porto Nacional - TO
2021

ANTONIO ITALO DOS SANTOS NUNES

**ESTUDO COMPARATIVO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
VENENO DA *Bothrops moojeni*, DO CERRADO TOCANTINENSE E DO
SUDESTE**

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Porto Nacional, Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Simone Seibert

Porto Nacional - TO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- N972e NUNES, ANTONIO ITALO DOS SANTOS .
ESTUDO COMPARATIVO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
VENENO DA *Bothrops moojeni*, DO CERRADO TOCANTINENSE E DO
SUDESTE. / ANTONIO ITALO DOS SANTOS NUNES. – Porto Nacional, TO,
2021.
43 f.
Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Porto Nacional - Curso de Ciências Biológicas, 2021.
Orientadora : Carla Simone Seibert
1. Proteínas. 2. Toxicidade. 3. Cerrado. 4. *Bothrops*. I. Título

CDD 570

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANTONIO ITALO DOS SANTOS NUNES

ESTUDO COMPARATIVO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DA *Bothrops moojeni*, DO CERRADO TOCANTINENSE E DO SUDESTE

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Porto Nacional, Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Simone Seibert

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Carla Simone Seibert/UFT

Ms. Deize Carneiro Queirós/ UFT

Ms. Marcio Trevisan/UFT

Porto Nacional, 2021

Dedico essa monografia a você, Pai...

Sempre imaginei o dia da minha formatura, com as pessoas que mais amo celebrando comigo esse marco tão importante da minha vida. Sei que você sempre teve orgulho de mim, e que queria muito estar presente nesse dia, mas não deu tempo.

**Por isso, dedico essa monografia ao Sr. que sempre me apoiou e me amou incondicionalmente.
Sinto sua falta todos os dias...**

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato por todas as experiências que vivi saindo da minha cidade e indo para uma cidade desconhecida, porque sentir na pele a felicidade, a dor, o sofrimento, o amor, a amizade e muitas outras coisas. Aprendi que posso tudo se acreditar em mim mesmo, tudo fica mais fácil e bonito. Agradeço a todas as pessoas que passaram por minha vida, e que me ajudaram a me tornar quem eu sou hoje, sou extremamente grato.

Quero agradecer em especial a minha família por sempre estarem do meu lado, nas horas boas e ruins. Mãe, muito obrigado por me amar incondicionalmente e me proteger sempre. Pai, mesmo não estando mais aqui presente o Sr. me ajudou tanto, obrigado por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos, e as minhas irmãs Camylla, Rudmylla e Rayka por serem essas meninas incríveis e por me fazerem ri, chorar e me dar tanto amor e carinho, amo vocês. Obrigado família, por nunca me deixar faltar nada e eu vou sempre fazer de tudo para retribuir cada ato de vocês. Sou extremamente grato por ter pessoas tão queridas na minha vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Carla Simone Seibert, primeiramente por ter acreditado em mim e me dado um voto de confiança anos atrás. Obrigado também pelos ensinamentos, companheirismo, por ter paciência e confiado em mim para o desenvolvimento da pesquisa. E se nesse tempo todo de convivência você sempre estava disposta a me auxiliar e esclarecer minhas dúvidas, posso partir para as novas etapas da minha vida com a sensação de dever cumprido.

Aos colegas de Laboratório, a técnica Izabel por sempre me ajudar e auxiliar nos experimentos. De maneira especial, gostaria de agradecer a Lourrana, pela amizade que construímos dentro do laboratório, que me ensinou tudo que sabia, ótima tutora, e por ter sido também minha amiga e me apoiado sempre. Agradeço a Milena por ser a melhor pupila, e por rir das minhas desgraças e comemorar minhas vitórias junto comigo, em todos esses anos de trabalho.

Aos amigos e mentores da pós-graduação CIAMB, Marcio Trevisan, Patrícia, Deize e a Sara, vocês me ajudaram, me apoiaram e me ensinaram bastante, evolui muito por causa de vocês. Agradeço imensamente pelas contribuições no trabalho e pela força que me deram.

A minha turma 2016/2, Jonas, Livia, Debora, Leydmara, Rodrigo, Raisia, Aninha, Sabrina, Luana, Kamila, amo vocês. Em especial a Kerulaine por ser a minha pessoa, obrigado

por sempre me apoiar e acreditar em mim, te amo muito e vou carregar você comigo pro resto da vida. A Ana Thaissa e a Carolina pelo período que moramos juntos, obrigado por me aturarem e me ajudarem quando precisei.

A minha família Ohana, vocês não têm ideia do quanto foram importantes pra mim durante todos esses anos, amo demais vocês, Baby, Mariana, Rachel, Loise, Lia, Bruno e Karol. Muito obrigado pelas inúmeras horas de trabalho, diversão e carinho que dividiram comigo. Sou e serei eternamente grato por conhecer vocês, pois Ohana quer dizer família, família quer dizer nunca abandonar ou esquecer.

Não poderia esquecer da bancada evangélica, Debora, Juliana, Rizia, Victorina, Laianny e Leny que não é tão evangélica assim kkk, me ajudaram bastante em todas as disciplinas que pegamos juntos, saudades das nossas conversas na sala do estagiário. Vocês são mulheres incríveis, desejo muito sucesso nas suas carreiras. A Sheilliny uma das meninas mais talentosas que conheço, minha parceira da genética, mesmo eu trabalhando na bioquímica, por aturar minhas inúmeras mensagens sobre as buscas por pós-graduações, empregos e por ajuda nessa monografia.

Aos meus amigos da UFT Pedro, Pammela, Marley, Bia, Pablo, Carol, Geruza, Analu, José e Geo Quinn amo vocês. Obrigado por estarem sempre por perto e por terem vivido comigo as maiores aventuras. Em especial à Ester e Luana que me acompanharam em tantos momentos bons e ruins, me dando amor e suporte, com suas presenças tanto físicas quanto emocionais. Obrigado por se tornarem parte da minha família e por muitas vezes ser um porto seguro.

Aos demais amigos da UFT, que estiveram presentes e que eu não citei, pois se for para colocar o nome de todos não vai caber nesta monografia, por isso sintam-se imensamente agradecidos!

Um enorme agradecimento à Fundação Universidade Federal do Tocantins e todo seu corpo docente em especial ao colegiado do curso de Ciências Biológicas, campus de Porto Nacional que me proporcionaram experiência e um grande aprendizado durante todo o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, no projeto “Fortalecimento de programas de Pós-Graduação, na Amazônia e na Extra-Amazônia, com ênfase em envenenamentos ofídicos: uma estratégia de formação de pessoal e

interdisciplinaridade”, projeto realizado entre os programas de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente/UFT, Toxinologia/Instituto Butantan e Medicina Tropical/UEA. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Tocantins, FAPT, no projeto do Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS), “O acidente Botrópico no Tocantins: Epidemiologia, fatores ambientais, Toxicidade do veneno” pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

**“Em algum lugar, alguma coisa
incrível está esperando para ser
descoberta.”**

(Carl Sagan)

RESUMO

A família das serpentes Viperidae é responsável pelo maior número de acidentes ofídicos registrados no Brasil, sendo de maior relevância para a saúde pública. Nesta família está o gênero *Bothrops*, responsável por cerca de 90% dos acidentes no país, e também no estado do Tocantins. A espécie *Bothrops moojeni* é distribuída por todo o Cerrado tocantinense, é a espécie de maior relevância para o Estado. Estudos mostram que a composição dos venenos varia bastante de acordo com sexo, ontogenia, alimentação, distribuição geográfica, dentre outros. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição das atividades biológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops moojeni*, em um estudo comparativo, entre o veneno coletado em espécimes do cerrado tocantinense e no Sudeste do Brasil. Para esse intuito foi caracterizado o perfil proteico, por eletroforese (SDS-PAGE), e determinadas as atividades biológicas do edema, hemorragia, necrose e miotoxidade, em camundongos swiss. A análise do perfil proteico demonstrou bandas predominantes, com três bandas majoritárias (40, 18 e 10 kDa) para o *pool* do Tocantins, e para o *pool* do Sudeste (24, 18 e 10 kDa). Tanto o veneno da *B. moojeni* do Tocantins quanto o do Sudeste apresentaram as atividades biológicas testadas, sem diferenças significativas para os protocolos avaliados. Portanto, apesar do *pool* de venenos do Tocantins apresentar variação na intensidade das bandas proteicas com relação ao veneno do Sudeste, não houve alteração nas atividades biológicas. Contudo, serão necessários mais estudos tendo em vista a variabilidade observada na constituição proteica entre os venenos.

Palavras-chaves: Proteínas. Toxicidade. Veneno. Cerrado. *Bothrops*.

ABSTRACT

The family of snakes Viperidae is responsible for the largest number of snakebites recorded in Brazil, being of greater relevance to public health. In this family is the Bothrops genus, responsible for about 90% of accidents in the country, and also in the state of Tocantins. Bothrops moojeni is distributed throughout the Cerrado Tocantinense, it is the most relevant species for the State. Studies show that the composition of poisons varies greatly according to sex, ontogeny, food, geographic distribution, among others. Therefore, this study aimed to evaluate the composition of biological activities induced by Bothrops moojeni venom, in a comparative study, between the venom collected in specimens from the Cerrado Tocantins and in Southeast Brazil. For this purpose, the protein profile was characterized by electrophoresis (SDS-PAGE), and the biological activities of edema, hemorrhage, necrosis and myotoxicity were determined in Swiss mice. The analysis of the protein profile showed predominant bands, with three major bands (40, 18 and 10 kDa) for the Tocantins pool, and for the Southeast pool (24, 18 and 10 kDa). Both B. moojeni do Tocantins and Southeast venom showed the tested biological activities, with no significant differences for the evaluated protocols. Therefore, despite the poison pool in Tocantins varying in the intensity of the protein bands in relation to the poison in the Southeast, there was no change in biological activities. However, further studies will be necessary in view of this variability observed in the protein constitution between poisons.

Key-words: Proteins. Toxicity. Venom. Thick. *Bothrops*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição das serpentes venenosas. Em vermelho as áreas com registro das espécies de serpentes..... 15
- Figura 2. Foto da espécie *Bothrops moojeni*, com distribuição por município do estado do Tocantins..... 17
- Figura 3. (A). Perfil eletroforético do veneno *Bothrops moojeni*. As amostras (10 µg) foram submetidas à SDS-PAGE 10%. Pool do Tocantins (1; POOL TO), Pool do Sudeste (2, POOL SD) e padrão (3). As faixas proteicas foram coradas com azul Comassie R-250. E análise densitometria do POOL TO (B) e (C) POOL SD. Utilizando o programa GelAnalyzer 19.1. 25
- Figura 4. Atividade edematogênica dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos (n=5), de 20 a 25 g, receberam 1,8 µg de veneno/40µL solução salina estéril na pata posterior direita, e após 1h estas foram medidas. Pool do Tocantins (POOL TO) e Pool do Sudeste (POOL SD). 27
- Figura 5. A- Atividade hemorrágica dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos (n=5), de 20 a 25 g, receberam 38 µg de veneno/100µL solução salina estéril, no abdômen (i.d.), e após 2h foram sacrificados e a área hemorrágica analisada. B- Imagem da área hemorrágica da parte interna da pele dos animais. Pool do Tocantins (POOL TO) e Pool do Sudeste (POOL SD). 28
- Figura 6. Atividade necrosante dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos (n=4), de 20 a 25 g, receberam 38 µg de veneno/100µL solução salina estéril, na região do abdômen (i.d.), e após 48h foram sacrificados e a área necrosada analisada. B- Imagem da área necrosada obtida da parte interna da pele dos animais. Pool do Tocantins (POOL TO) e Pool do Sudeste (POOL SD). 29
- Figura 7. Análise macroscópica de 24 horas da atividade necrosante dos venenos de *Bothrops moojeni*, na região do abdômen (i.d.). Pool do Tocantins (POOL TO) e Pool do Sudeste (POOL SD). 30
- Figura 8. Atividade miotóxica dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos (n=5), de 20 a 25 g, receberam 50 µg de veneno/50 µL solução salina estéril no

músculo gastrocnêmio direito, e após 3h os animais foram anestesiados e o sangue coletado para dosagem de CK. Pool do Tocantins (POOL TO) e Pool do Sudeste (POOL SD).31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>B. moojeni</i>	<i>Bothrops moojeni</i>
BCA	Ácido Bicinconínico
CK	Creatino Fosfoquinase
CO ₂	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DME	Dose Mínima Edematogênica
DMH	Dose Mínima Hemorrágica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
i.d.	Via Intradérmica
i.m.	Via Intramuscular
KDa	Quilodalton
Lys	Lisina
NaCL	Cloreto de Sódio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NH ₃	Hidróxido de amônia
PLA ₂	Fosfolipase A2
<i>POOL SD</i>	<i>Pool</i> do veneno de <i>B. moojeni</i> do Sudeste
<i>POOL TO</i>	<i>Pool</i> do veneno de <i>B. moojeni</i> do Tocantins
S.F.	Solução fisiológica
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SVMP	Metaloprotease
SVSP	Serino protease
UHe	Unidade hemorrágica
Ve	Veneno
Vs	Solução salina
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	O veneno Botrópico	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Especificos.....	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	Veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	21
3.2	Camundongos Swiss	21
3.3	Determinar o Perfil Proteico	22
3.3.1	Determinação das proteínas totais	22
3.3.2	Eletroforese SDS-PAGE	22
3.4	Atividades Biológicas Do Veneno.....	22
3.4.1	Atividade edematogênica:	22
3.4.2	Atividade hemorrágica:	23
3.4.3	Atividade necrosante:	23
3.4.4	Atividade miotóxica:	24
3.5	Análises Estatísticas.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1	Eletroforese	25
4.2	Atividades Biológicas do Veneno	26
4.2.1	A Atividade Edematogênica.....	26
4.2.2	Atividade hemorrágica	28
4.2.3	Atividade necrosante	29
4.2.4	Atividade miotóxica	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	ANEXO A - Comissão de Ética do Uso de Animais da UFT.....	42

1 INTRODUÇÃO

No mundo, estão catalogadas aproximadamente 3.709 espécies de serpentes, sendo 600 espécies venenosas, destas 200 espécies são consideradas de importância médica. As serpentes venenosas estão espalhadas por toda a Terra, com exceções de algumas ilhas localizadas em grandes altitudes e em ambientes congelados (Figura 1) (WHO, 2014; UETZ *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2019).



Figura 1. Distribuição das serpentes venenosas. Em vermelho as áreas com registro das espécies de serpentes. Fonte: (WHO, 2014)

Existem cerca de 442 espécies de serpentes no Brasil e estas estão classificadas em 10 famílias, sendo duas destas consideradas peçonhentas, sendo estas a família Elapidae apresenta 27 espécies e a família Viperidae 28 espécies (MELGAREJO, 2003; COSTA; BÉRNILS, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Peçonhentas são as serpentes que possuem uma presa (dente) para inocular o veneno, como o observado para as famílias Viperidae e Elapidae. Na família Viperidae estão os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias*, incluindo recentemente *Rhinocerophis*, *Bothriopsis*, *Bothropoides* (jararaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu). Na família Elapidae o gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus* (coral verdadeira), e dentro desses gêneros contém subespécies (MELGAREJO, 2003; FENWICK *et al.*, 2009; BÉRNILS; COSTA, 2015).

Essas serpentes peçonhentas estão espalhadas por todo o território brasileiro e são responsáveis pelos acidentes ofídicos de relevância médica (FUNASA, 2001), o que é evidenciado pelos 29.000 casos de acidentes ofídicos registrados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAM, em 2019. A família Viperidae é a responsável pelo maior

número de acidentes ofídicos registrados no Brasil e também em outros países da América do Sul, sendo estes considerados de maior relevância para a saúde pública (MELGAREJO; CARDOSO; FRANÇA, 2003).

A fauna brasileira, por estar localizada num país tropical, apresenta número importante de espécies de serpentes peçonhentas. Há cerca de 55 espécies registradas, de cinco gêneros (ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL, 2003). O gênero *Bothrops* apresenta cerca de 30 espécies e é o responsável pelo maior número de registro de acidentes ofídicos no país, sendo responsáveis por cerca de 90% dos acidentes (CHIPPAUX, 2017). Segundo Queirós (2020) no Tocantins, 90% dos acidentes envolvendo serpentes são do gênero *Bothrops*.

Estas serpentes apresentam uma dentição solenóglifa, com presas móveis no maxilar superior, o que garante uma grande eficiência na inoculação da peçonha. Têm preferência em locais úmidos, como matas, áreas de cultivo e onde encontram roedores, além disso são predominantemente noturnas e agressivas quando ameaçadas. A principal característica do envenenamento por essa serpente é o efeito local, apresentando dor, hemorragia, edema, necrose e insuficiência renal (NOGUEIRA *et al.*, 2003; MAMEDE *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2018; AGUIAR *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2016).

O presente estudo foi realizado com o veneno da serpente *Bothrops moojeni*, descrita por Hoge (1966). Esta serpente está distribuída por todo o território tocantinense (SILVA *et al.*, 2019) (Figura 2), possui vários nomes populares como Caiçara, Jararação, Jacuruçu, e é a principal serpente do Cerrado do Brasil Central. Apresentam dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Possuem uma mudança ontogenética na sua dieta, os filhotes alimentando-se de presa ectotérmica e os adultos com presas endotérmicas (ANDRADE; ABE; DOS SANTOS, 1996; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003).



Figura 2. Foto da espécie *Bothrops moojeni*, com distribuição por município do estado do Tocantins.
Fonte: (SILVA *et al.*, 2019)

1.1 O veneno Botrópico

O veneno das serpentes é um dos mais complexos, contém compostos que desencadeiam várias atividades biológicas, sendo bastante utilizado para o desenvolvimento de novas drogas, por ser uma ótima fonte de biomoléculas (LOMONTE; CALVETE, 2017). A composição do veneno é influenciável por múltiplos fatores como o gênero, espécie, subespécies, fatores ambientais, ecológicos, distribuição geográfica, ontogenia, sexo e hábitos alimentares (DALTRY; WUSTER; THORPE, 1996; ZELANIS *et al.*, 2010; GIBBS *et al.*, 2011). São ricos em uma grande diversidade de proteínas e peptídeos complexos, como majoritariamente as serinoproteinases (SVSPs), metaloproteinases (SVMPs), fosfolipases A₂ (PLA2s) e L-aminoácidos oxidases (LAAOs), que desencadeiam diversos fatores fisiológicos nos organismos, deste modo utilizados para investigações biomédicas (CALVETE *et al.*, 2007; FOX; SERRANO, 2008; KANG *et al.*, 2011).

De acordo com Queiroz *et al.* (2008) a peçonha do gênero *Bothrops* contém várias substâncias diferentes, 90% do seu peso seco é de caráter proteico e os outros 10% são constituídos por lipídios, carboidratos, metais, nucleotídeos, amins biogênicas, aminoácidos livres e sais inorgânicos. O veneno de *B. moojeni* contém muitas enzimas proteolíticas que são relacionadas às atividades hemorrágicas, coagulante e anticoagulante, que participam interferindo na ativação dos fatores da cascata da coagulação sanguínea, hemorragia e necrose (RAW, 1991).

As principais proteínas que compõem esse veneno são as metaloproteinases (SVMPs), enzimas que utilizam um metal, geralmente o zinco, para influenciar a velocidade de uma

reação (MESH, 2007). Essas enzimas estão envolvidas nos efeitos locais e patológicos na indução de reação inflamatória, inibição da agregação plaquetária e ativação da coagulação (GUTIERREZ *et al.*, 1995; FOX; SERRANO, 2005; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2007).

As metaloproteinases são classificadas em três classes principais P-I, P-II, P-III e em onze subclasses P-Ia, P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IIId, D-I, P-IIe, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc, P-IIId, sendo que a classe P-I (P-Ia) são enzimas com domínio catalítico, pouco efeito hemorrágico e com muitas atividades fibrina (geno) liticas, e estão incluídas as proteínas com massas moleculares variando entre 20 a 30 kDa. A classe P-II (P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IIId e P-IIe) apresentam domínio do tipo desintegrina e catalítico, com massa molecular de 30 a 60 kDa. A classe P-III (P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId) possuem enzimas com domínio ricas em cisteínas, um domínio catalítico, um domínio do tipo desintegrina e lectina C (BJARNASON; FOX, 1995; BELLO *et al.*, 2006; FOX; SERRANO, 2008).

As serinoproteinases (SVSPs) se originaram de enzimas digestivas que evoluíram por duplicação gênica e se modificaram para desenvolver outras funções, em geral são glicoproteínas de uma única cadeia. Apresentam uma região catalítica bem conservada (His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵), que possuem diferentes formas de ação, e estão associadas a distúrbios hemostáticos envolvidos nos componentes da cascata da coagulação sanguínea e fibrinolítico. A massa molecular varia dependendo da quantidade de glicosilações presentes na molécula, entre 26 a 67 KDa, além de que que não é só o peso que mudaria, mas também o padrão de atuação e as vezes até o destino de interesse da protease, sendo que essas glicosilações podem aumentar ou diminuir sua eficiência dessa molécula (SERRANO; MAROUN, 2005; ISABEL *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

As fosfolipases do tipo A₂ (PLA_{2s}), que estão envolvidas nos efeitos locais e na miotoxicidade da picada, atuam sobre hidrólise dos fosfolípidios de membrana, destruindo a parede celular com a clivagem de fosfolípidios em ácidos graxos e lisofosfolípidios (WITTCOFF, 1951; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013), e apresentam um baixo peso molecular, por volta de 14 a 18 KDa (DENNIS *et al.*, 2011). As PLA_{2s} do veneno da serpente podem ser classificadas em grupo I e II (SIX; DENNIS, 2000), sendo que a família Viperidae está incluída no grupo II, que é subdividido em ácido aspártico na posição 49, (PLA_{2s} de Asp49), que têm como atividade catalítica a hidrólise de fosfolípidios. E a lisina 49 com Lys na posição 49 (PLA_{2s} de Lys49), que não possuem atividade catalítica (ARNI; WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004).

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavor enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de um L- aminoácido a α -cetoácido, assim produzindo um peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (NH₃) (DU; CLEMETSON, 2002). As LAAOs são normalmente glicoproteínas homodiméricas ligadas ao FAD, contendo a massa molecular entre 110 a 150 kDa (TAN; FUNG, 2008). Alguns trabalhos descrevem que estas possuem várias atividades, entre elas está a indução de apoptose (SUHR; KIM, 1999), inibição e indução de agregação plaquetária (STÁBELI *et al.*, 2004), atividade anticoagulante (SAKURAI *et al.*, 2003), atividade anti-viral, anti-parasitária e hemolítica (ALI *et al.*, 2000; TEMPONE *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003).

O perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos no Tocantins e no Sudeste do país, apresenta um padrão clássico, predominando na área rural, tendo como local do acidente membros inferiores do corpo, com predominância para o sexo masculino (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; BONAN *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2014; FEITOSA *et al.*, 2020). Trabalhos nessas duas regiões revelam que a maioria dos acidentes foram classificados como leve ou moderado considerando a classificação do Ministério da Saúde, entretanto alguns pacientes ainda foram à óbito, mesmo submetidos ao antiveneno (RIBEIRO *et al.*, 1998; BONAN *et al.*, 2010; QUEIRÓS, 2020). Portanto, é importante considerar todas as variações regionais, incluindo animais de diversas regiões para compor o *pool* de venenos para a produção do antiveneno, sendo importante considerar que a eficiência da antiveneno está vinculada ao tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento (FRY *et al.*, 2003).

É de extrema importância as pesquisas na área de toxilogia de veneno de serpentes, para o esclarecimento das variações ocorrentes na composição entre espécies, para que o antiveneno responda adequadamente às mudanças na composição dos venenos (WARRELL, 1989; WUSTER *et al.*, 1992; GILLISSEN *et al.*, 1994; WUSTER, 1996; FRY *et al.*, 2003).

Diante desse pressuposto, entende-se que o Cerrado tocantinense possui grande biodiversidade animal e vegetal, aliado ao clima tropical sazonal, e estes fatores podem influenciar na natureza química das toxinas das serpentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição e algumas atividades biológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops moojeni*, em um estudo comparativo, entre o veneno de espécimes coletadas no Cerrado tocaninense e no Sudeste do Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar e comparar o perfil proteico do veneno de *B. moojeni*, do cerrado do Tocantins e do Sudeste;

Avaliar a intensidade das respostas biológicas nas atividades de edema, hemorragia, necrose e miotoxidade, entre os venenos obtidos de espécimes de *B. moojeni*, do Cerrado do Tocantins e do Sudeste.

3 METODOLOGIA

3.1 Veneno de *Bothrops moojeni*

O veneno utilizado neste estudo foi obtido de serpentes coletadas nas áreas rurais dos municípios de Araguaína (2 fêmeas – 1 adulta e 1 jovem), Palmas (1 macho jovem e 2 fêmeas adultas) e Santa Rosa (1 fêmea adulta), no estado do Tocantins, nos anos de 2016 e 2017. A autorização para as coletas das serpentes foi liberada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO; N° 52416-1).

Os animais foram enviados para o Laboratório de Herpetologia, do Instituto Butantan/SP, onde foram mantidos em cativeiro para a finalidade de pesquisa. Nesse estudo foram utilizados os venenos dos 06 exemplares da espécie *Bothrops moojeni*, extraídos no seu primeiro ano em cativeiro. Os venenos foram liofilizados e estocados em freezer a - 20°C até o momento dos experimentos.

Os experimentos foram conduzidos comparativamente com o *Pool* de venenos de *Bothrops moojeni* coletados de espécimes do sudeste do país, disponibilizado pelo Instituto Butantan/SP.

3.2 Camundongos Swiss

Foram utilizados camundongos machos *Mus musculus* Swiss, com pesos entre 20 - 25g, mantidos em câmaras com temperatura controlada (22,2°C) em ciclos claro-escuro de 12 horas, onde receberam ração e água *ad libitum*. Os camundongos machos foram fornecidos Biotério da Anilab (Animais de Laboratório) Paulínia-SP. pela empresa ANILAB/SP.

Essa pesquisa é um fragmento do trabalho de doutorado do Márcio Trevisan, cujo projeto foi autorizado pela Comissão de Ética do Uso de Animais da UFT, com processo número 23101.005186/2018-98 (ANEXO A). E os experimentos seguiram as Normas de Bem-estar Animal do COBEA.

3.3 Determinar o Perfil Proteico

3.3.1 Determinação das proteínas totais

As proteínas totais das amostras dos venenos das serpentes foram determinadas seguindo o método Smith *et al.* (1985), também conhecido por método do ácido bicinchonínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolína). A albumina bovina (Sigma-USA) foi utilizada como proteína para estabelecer uma curva padrão e efetuar a correlação dos valores obtidos em diferentes concentrações (em µg) dos venenos utilizados nos testes. Os venenos foram diluídos em solução salina a 0,85% e a leitura das absorbâncias a 562 nm. Sendo que, a quantidade de proteínas foi expressa em µg de proteína por mg de veneno.

3.3.2 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil protéico do veneno foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Utilizou-se uma concentração de 4 % no gel de aplicação e 10 % no de corrida (200v; 40mA e 20W). As amostras de veneno (10 µg) foram aplicadas na presença de β-mercaptoetanol e paralelamente foi utilizado um padrão de massa molecular de 10 a 250 kD, Dual Color Precision Plus (Bio Rad). Os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue, lavados com a solução descorante, documentados (SILVA; WINGE, 1994) e analisados utilizando o programa GelAnalyzer 19.1.

3.4 Atividades Biológicas do Veneno

3.4.1 Atividade edematogênica:

Para avaliar o perfil edematogênico, o veneno foi diluído na concentração de 1,8 µg contido em 40 µl de solução salina estéril. Essa concentração foi injetada no coxim plantar, dos animais por via intradérmica, sendo um grupo de 5 animais para cada veneno (*POOL TO*; *POOL SD*). A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina estéril. Os volumes das patas foram medidos antes do experimento e 1 hora após a administração da peçonha (QUEIRÓS, 2020).

A mensuração do volume das patas foi realizada utilizando-se um paquímetro digital da marca Marberg (0 a 200 mm). A área do edema foi calculada pela multiplicação das medidas da largura e da altura da pata pelo valor de π (3,14159265), antes e após a aplicação dos tratamentos. O edema foi expresso em % de aumento do volume da pata injetada com veneno (Ve) em relação ao volume da pata controle injetada com solução salina (Vs), como demonstrado abaixo na equação:

$$\% \text{ de aumento do volume podal} = \frac{Ve - Vs}{Vs} \times 100$$

3.4.2 Atividade hemorrágica:

A dose mínima hemorrágica (DMH) é definida como a menor quantidade de veneno capaz de induzir um halo de hemorragia de 10 mm de diâmetro (MOURA *et al.*, 2015). A dose mínima hemorrágica do *pool* de veneno de *Bothrops moojeni*, coletadas no Tocantins, foi definida por Queirós (2020) em 7,6 μg de veneno. Para comparar o veneno do Tocantins com o do Sudeste, foi conduzida em grupos de 5 animais para cada veneno (*POOL TO*; *POOL SD*), administrado 5 vezes a concentração definida para a dose mínima hemorrágica do veneno da *B. moojeni* do Tocantins, o equivalente a 38 μg de veneno, em 100 μL de solução salina estéril, e aplicado no abdômen dos camundongos (i.d.). Após duas horas da administração do veneno, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e a pele do abdômen foi retirada para avaliar a área hemorrágica. A atividade hemorrágica foi medida considerando a média e desvio padrão dos diâmetros da área hemorrágica (mm^2). Os halos hemorrágicos (mm^2) e a intensidade da coloração (pixels - RGB) dos mesmos foram quantificados no programa Inkscape versão 0.92 e 0.93, definido como unidade hemorrágica (UHe).

3.4.3 Atividade necrosante:

Nessa atividade o diâmetro da necrose foi obtido em um protocolo semelhante ao da atividade hemorrágica, com grupos de 4 animais para cada veneno (*POOL TO*; *POOL SD*). O veneno de *Bothrops moojeni* foi injetado (i.d.) na região do abdômen dos camundongos. Após 48 horas da injeção do veneno (38 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ solução salina estéril), os animais foram eutanasiados, suas peles foram removidas e o diâmetro do lado interno da pele foi determinado para cada grupo de tratamento. Os halos de necrose formados (mm^2) e a intensidade da

coloração (pixels - RGB) dos mesmos foram quantificados no programa Inkscape versão 0.92 e 0.93, como unidade necrosante (UHe).

Os camundongos envenenados foram acompanhados por 24 e 48hs após a administração do veneno, para avaliar a ocorrência de óbitos e a condição externa do tecido.

3.4.4 Atividade miotóxica:

A atividade miotóxica foi conduzida com grupos de 5 animais para cada veneno (*POOL TO*; *POOL SD*), os quais foram injetados (i.m.) no músculo gastrocnêmio direito, com concentração do veneno de *B. moojeni* de 50 µg para um volume final de 50 µL, diluído em solução salina estéril. Como controle foi utilizado um grupo de dois camundongos não envenenados. Após 3 horas de envenenamento, o sangue foi coletado por punção cardíaca para a dosagem de Creatinofosfoquinase (CK) (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980; NAKADA *et al.*, 1984). Para as dosagens plasmática de Creatinofosfoquinase (CK), o sangue foi coletado com EDTA 10%, o plasma foi separado por centrifugação a uma temperatura de 20° C, a 3000 r.p.m. por 15 minutos. Os níveis individuais de CK foram quantificados utilizando o KIT de dosagem sérica de CK (CK-NAC Ref.: 117 – Labtest Diagnóstica®), utilizando-se 0,02 ml de amostra e 1 ml de reagente, em espectrofotômetro a 340 nm. O valor de CK foi expresso em Unidades/L, onde cada unidade foi definida como a quantidade de enzimas que catalisam a hidrólise de 1 µmol de NADH por minuto à 25°C.

3.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) das amostras analisadas. As comparações entre os grupos amostrais foram realizadas pela análise de variância (ANOVA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Quando a ANOVA foi significativa, aplicou-se o teste de médias de Tukey, para comparações múltiplas, utilizando o GraphPad Prism, versão 9.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eletroforese

A técnica de eletroforese é muito utilizada para análise de proteínas que permite uma grande elucidação dos padrões de proteínas dos venenos, no qual podem ser separados e identificados comparativamente (JIMÉNEZ-PORRAS, 1964; JONES, 1976; RAEL *et al.*, 1984; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991; MOURA-DA-SILVA, 1992; MENDOZA *et al.*, 1992; TAN; PONNUDURAI, 1992; ASSAKURA *et al.*, 1992).

O perfil proteico do veneno das serpentes de *Bothrops moojeni* (SDS PAGE 10%) está demonstrado na Figura 3. O veneno de *B. moojeni* obtido de espécimes do Tocantins (Fig.3, A1) apresentou três bandas majoritárias, nos pesos aproximados de 40, 18 e 10 kDa, com cerca de 7 bandas minoritárias entre elas. Já o *pool* veneno da *B. moojeni* do Sudeste (Fig.3, A2) obteve três bandas majoritárias, em aproximadamente 24, 18 e 10 kDa, e 7 bandas minoritárias. Portanto, tanto o *pool* do Tocantins quanto o do Sudeste apresentaram dez bandas.

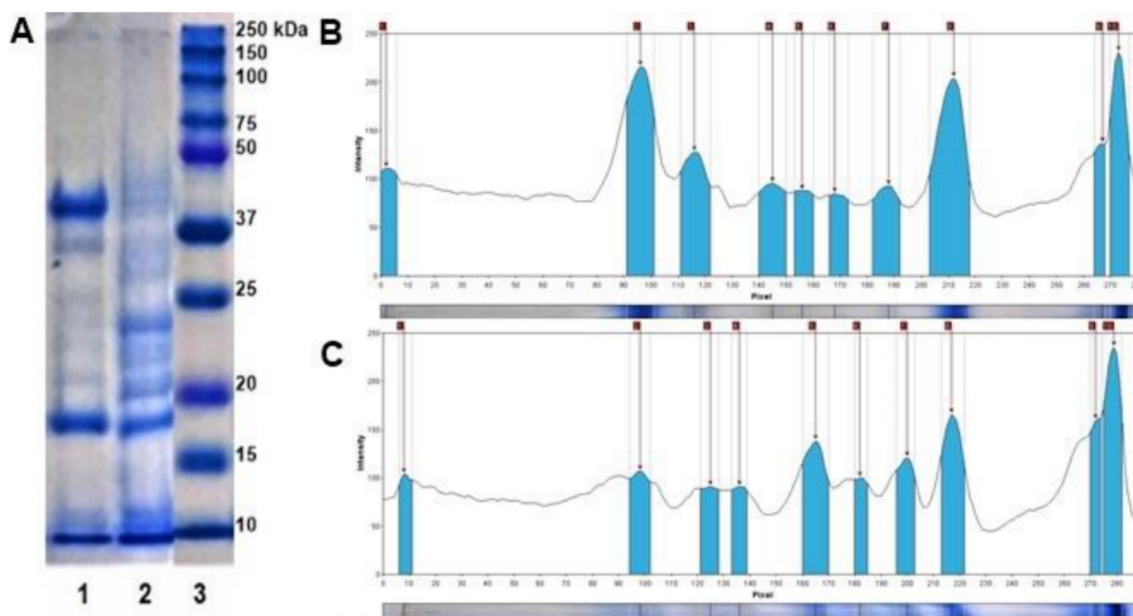


Figura 3. (A). Perfil eletroforético do veneno *Bothrops moojeni*. As amostras (10 μ g) foram submetidas à SDS-PAGE 10%. *Pool* do Tocantins (1; *POOL TO*), *Pool* do Sudeste (2, *POOL SD*) e padrão (3). As faixas proteicas foram coradas com azul Comassie R-250. E análise densitometria do *POOL TO* (B) e (C) *POOL SD*. Utilizando o programa GelAnalyzer 19.1.

Através do padrão molecular pode-se inferir que as proteínas com o peso molecular de 10 a ~18 kDa pertence à classe das fosfolipases, e tanto o *pool* do Tocantins quanto o do Sudeste tiveram duas bandas majoritárias em ~10 e ~18 kDa, e outras bandas pouco expressas,

com isso pode-se deduzir que esses venenos induzem uma necrose drástica, bem como edema, miotoxidade e efeito pró-inflamatório (LOMONTE *et al.*, 1990, MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991, SOARES *et al.*, 1998, SOARES *et al.*, 2000, CALGAROTTO *et al.*, 2008, SANTOS-FILHO *et al.*, 2008).

As bandas entre 20 a 25 kDa pertencem às metaloproteinases e foram observadas em pequenas bandas no gel e podem ser pouco expressas, podendo possuir pouco efeito hemorrágico e com muita atividade fibrina (geno) litica, sendo o *pool* do Sudeste com mais expressão que o *pool* do Tocantins (ASSAKURA *et al.*, 1985, BERNARDES *et al.*, 2008, GOMES *et al.*, 2009, QUEIROZ *et al.*, 2011, TORRES *et al.*, 2012).

As bandas de ~27 a 50 kDa estão quase indetectáveis em ambos os venenos analisados, exceto por uma grande banda no *pool* do veneno do Tocantins por volta dos ~ 40 kDa. Essa é classificada como serinoproteinase, que está ligada a distúrbios hemostáticos envolvidos nos componentes da cascata da coagulação sanguínea e fibrinolítica (SERRANO *et al.*, 1993, OLIVEIRA *et al.*, 1999, OLIVEIRA *et al.*, 2013, AMORIM *et al.*, 2018). Já a proteína em torno de 250 kDa, ainda não foi descrita para o veneno de *B. moojeni*, contudo estão presentes em outros venenos botrópico como na *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 2006; RIBEIRO JUNIOR, 2008; OLIVEIRA, 2014).

Portanto esse trabalho mostra uma divergência na composição proteica do *pool* do veneno da *B. moojeni* das duas regiões, apresentando bandas com intensidades diferentes, como por exemplo a banda com o peso molecular de ~40 kDa do Tocantins, que foi bem intensa se comparado com a do Sudeste. Essa variação intraespecífica apresentado nessa pesquisa corrobora com trabalhos que mostram a variação individual entre a mesma espécie, podendo ter ausência ou adição de proteínas na composição dos venenos (PERRONE *et al.*, 1989; ROCHA; FURTADO, 2005; RIBEIRO JUNIOR, 2008; SEGURA *et al.*, 2010; AGUIAR *et al.* 2019).

4.2 Atividades Biológicas do Veneno

4.2.1 A Atividade Edematogênica

A atividade edematogênica foi analisada 1 hora após a administração dos venenos, como é possível observar na Figura 4, a média edematogênica para o *pool* do veneno do Tocantins

foi de $99,2 \pm 23,98 \text{ mm}^2$ e o *pool* do Sudeste $104,0 \pm 14,41 \text{ mm}^2$. A análise estatística não identificou diferenças estatísticas significativas ($p = 0,7381$).

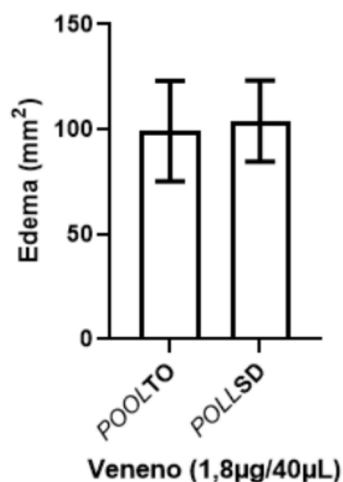


Figura 4. Atividade edematogênica dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos ($n=5$), de 20 a 25 g, receberam $1,8 \mu\text{g}$ de veneno/ $40 \mu\text{L}$ solução salina estéril na pata posterior direita, e após 1h estas foram medidas. *Pool* do Tocantins (POOL TO) e *Pool* do Sudeste (POOL SD).

A atividade edematogênica do veneno de *Bothrops* é resultado da ação conjunta entre diversas enzimas proteolíticas do veneno que induzem a liberação de mediadores químicos como as citocinas do tipo TH1 (pró inflamatórias) em especial são as Interleucinas (IL) e o TNF (Fator de Necrose Tumoral). Estas induzem resposta inflamatória, causando aumento na permeabilidade das membranas e extravasamento de líquidos para o espaço extracelular (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; FERNANDES *et al.*, 2013; MASUDA *et al.*, 2019).

Neste estudo, foi possível observar que o veneno induziu o edema na pata dos camundongos (Figura 4), corroborando com outros estudos realizados em serpentes da mesma espécie, em diferentes regiões do país (NADUR-ANDRADE *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2009; QUEIROZ, 2020). GOMES *et al.* (2009) também mostra na sua pesquisa de isolamento de proteínas do veneno da *Bothrops moojeni*, a BthMP (23,5 kDa), uma metaloproteinase de alta atividade proteolítica capaz de induzir edema, devido à liberação dos químicos que provoca a permeabilidade das membranas e extravasamento de líquidos para o espaço extracelular.

Em outras pesquisas, as fosfolipases A_2 miotóxicas da *B. moojeni* foram isoladas e caracterizadas, estas são capazes de induzir o edema quando administrado na pata dos camundongos, sendo tais proteínas as M-VI (14 kDa) (SOARES *et al.*, 1998), BmooTX-I (15

kDa) (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008), BmTX-I (14,2 kDa) (CALGAROTTO *et al.*, 2008), BmooMtx (16,5 kDa) (QUEIROZ *et al.*, 2011).

4.2.2 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi avaliada 2h após a administração dos venenos. Foi administrada 5 vezes a concentração definida para a dose mínima hemorrágica do veneno do Tocantins, o equivalente a 38 µg de veneno (100 µL) de acordo com Queirós (2020). O *pool* do veneno do Tocantins obteve uma média de halos hemorrágicos de $319,1 \pm 90,71$ UH e no *pool* do Sudeste $307,9 \pm 101,34$ UHe, sem diferenças estatísticas significativas ($p = 0,8581$; Fig. 5).

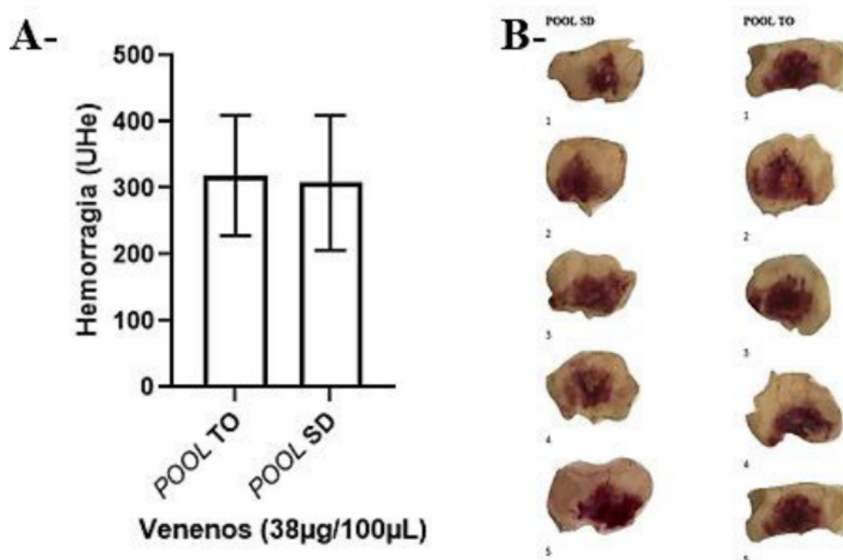


Figura 5. A- Atividade hemorrágica dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos (n=5), de 20 a 25 g, receberam 38 µg de veneno/100µL solução salina estéril, no abdômen (i.d.), e após 2h foram sacrificados e a área hemorrágica analisada. B- Imagem da área hemorrágica da parte interna da pele dos animais. *Pool* do Tocantins (POOL TO) e *Pool* do Sudeste (POOL SD).

A atividade hemorrágica para o envenenamento botrópico é a causa de maior complicação em acidentados e depende da quantidade de veneno inoculado (MELGAREJO, 2003). As SVMP estão intimamente relacionadas aos distúrbios hemostáticos e pela perda da integridade vascular, ocorrendo a alteração da permeabilidade dos vasos sanguíneos e extravasamento de sangue, além de interferir na agregação plaquetária (BJARNASSON; FOX, 1994, KAMIGUTI *et al.*, 1996, MARKLAND, 1998, GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Ocorre ainda uma hemorragia generalizada devido ao consumo de fibrinogênio e os pró-coagulantes sanguíneos, formando edema causado pelo extravasamento de líquidos (KAMIGUTI *et al.*, 1996, MANDELBAUM *et al.*, 1982). As metaloproteinases da classe P-I

não são hemorrágicas ou fracamente hemorrágicas, como as proteínas Moojeni protease A (20,4 kDa) (ASSAKURA *et al.*, 1985), BmooMP α -I (24,5 kDa) (BERNARDES *et al.*, 2008; AKAO *et al.*, 2010), BthMP (23,5 kDa) (GOMES *et al.*, 2009), Bmoo FIBMP-I (27,6kDa) (TORRES *et al.*, 2012). A variação nas propriedades de hemorragia dos venenos encontrados em *B. moojeni* foi confirmado por outros estudos (SANCHEZ *et al.*, 1992; DE ROODT; LITWIN; VITAL, 2003; MAMADE *et al.*, 2016) e essa pesquisa mostra que tanto o *pool* do veneno da *B. moojeni* do Tocantins, quanto do Sudeste apresentaram atividade hemorrágica (Figura 5), corroborando com os estudos de QUEIRÓZ (2020), AGUIAR *et al.* (2019) e NADUR-ANDRADE *et al.* (2012).

4.2.3 Atividade necrosante

A atividade necrosante foi avaliada 48 h após a administração dos venenos, via intradérmica (i.d.) no abdômen dos camundongos, na mesma concentração da atividade hemorrágica (38 μ g de veneno). A média dos halos necrosantes para o *pool* do veneno do Tocantins foi de $77,0 \pm 18,12$ UHe e no *pool* do Sudeste $128,6 \pm 58,15$ UHe. Apesar do grupo do *Pool* de veneno do Sudeste apresentar maior média, a análise estatística não identificou diferenças significativas ($p = 0,1019$; Fig. 6).

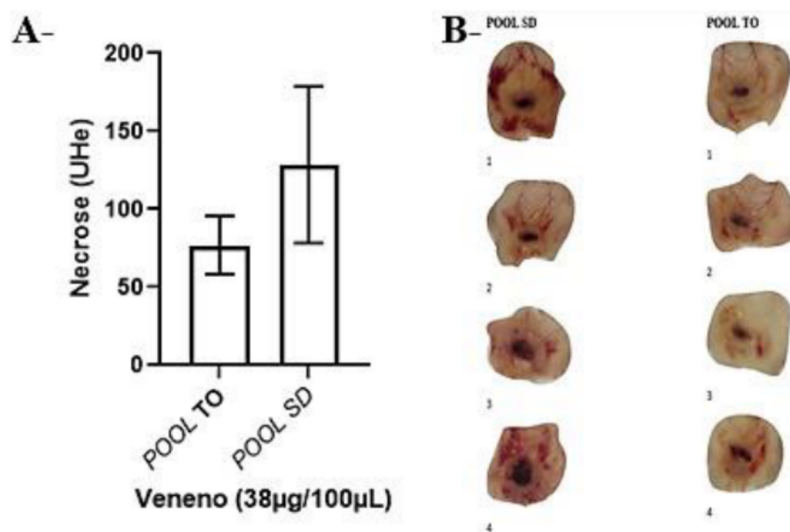


Figura 6. Atividade necrosante dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos (n=4), de 20 a 25 g, receberam 38 μ g de veneno/100 μ L solução salina estéril, na região do abdômen (i.d.), e após 48h foram sacrificados e a área necrosada analisada. B- Imagem da área necrosada obtida da parte interna da pele dos animais. *Pool* do Tocantins (POOL TO) e *Pool* do Sudeste (POOL SD).

A necrose é um processo patológico complexo e nele intervêm múltiplos fatores nos mais diversos mecanismos, que ocasiona a morte celular, provocando a perda parcial ou total do

tecido afetado (BOLAÑOS, 1984; GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003). No envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* a necrose muscular (mionecrose) é um dos efeitos mais importantes da sua patogênese. Praticamente todos os tecidos moles podem ser necrosados, como pele, músculos, vasos sanguíneos, tendões, cartilagem, entre outros (GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). A mionecrose é causada pela ação direta da fosfolipase A₂ miotóxicas ou proteínas miotóxicas. Elas atuam sobre a membrana das células musculares que promovem a hidrólise dos fosfolípidos de membrana, interferindo no controle de íons cálcio, liberando ácidos graxos livres e lisifosfolípidos, que causam mionecrose das fibras musculares. Além de também atuarem na via de liberação de fatores pró-inflamatórios, ou de forma indireta no desenvolvimento de isquemia pelas alterações vasculares ocasionadas pelas metaloproteases, resultante da drástica alteração homeostática produzida no acidente (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; HARRIS, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

Apesar de não haver diferenças estatísticas entre os *pools* dos venenos das diferentes regiões, a análise macroscópica em 24 e 48 hs demonstrou variação no tempo de ação da resposta necrosante. Nas primeiras 24 hs o halo necrosante foi mais intenso no grupo de camundongos tratado com o *pool* do veneno do Tocantins, sendo que um camundongo veio a óbito. Contudo, para o grupo de camundongos tratados com o *pool* de veneno do Sudeste esse quadro se intensificou 24 hs após o envenenamento (Figura 7). Essa variação no tempo de ação da necrose pode estar relacionado com a composição proteica desses venenos.

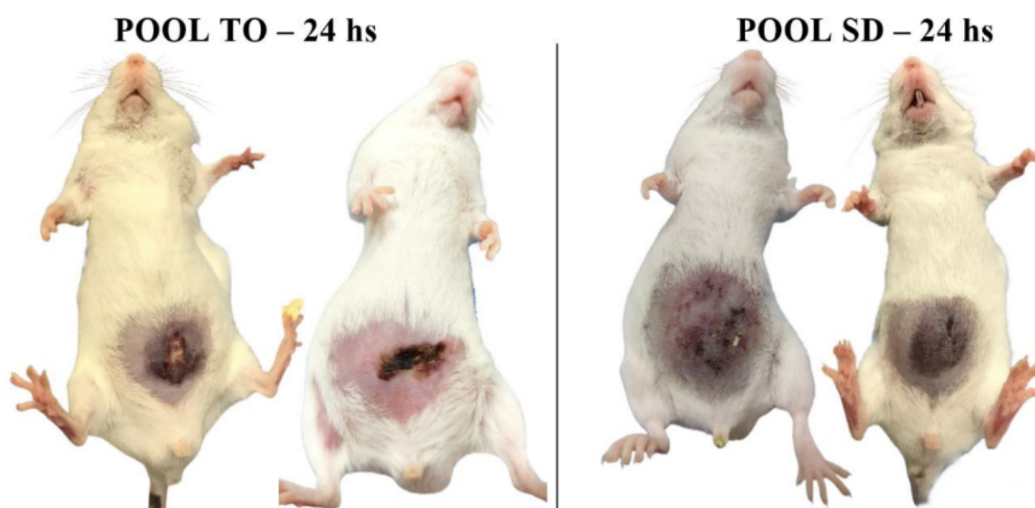


Figura 7. Análise macroscópica de 24 horas da atividade necrosante dos venenos de *Bothrops moojeni*, na região do abdômen (i.d.). *Pool* do Tocantins (*POOL TO*) e *Pool* do Sudeste (*POOL SD*).

Portanto, foi observado que o *pool* do veneno da *B. moojeni* do Tocantins e do Sudeste possuem atividade necrosante, podendo estas serem induzidas pelas proteínas fosfolipase A₂ miotóxicas, como revelam nos estudos de caracterização e isolamento dessas proteínas no veneno da *B. moojeni*, Miotóxica I e II (13,5 kDa) (LOMONTE *et al.*, 1990), M-VI (14 kDa) (SOARES *et al.*, 1998) BmTX-I (14,2 kDa) (CALGAROTTO *et al.*, 2008), BmooMtx (16,5 kDa) (QUEIROZ *et al.*, 2011). Mas também, pelas alterações vasculares causadas pelas proteínas metaloproteases BthMP (23,5 kDa) (GOMES *et al.*, 2009), Moojenin (45 kDa) (DE MORAIS *et al.*, 2012).

4.2.4 Atividade miotóxica

A atividade miotóxica foi avaliada 3 horas após a injeção (i.m.) no músculo gastrocnêmio direito, e determinada com a dosagem da enzima creatinofosfoquinase (CK) no plasma dos camundongos. Como demonstrado na figura, a média para o *pool* do veneno do Tocantins foi de $213,4 \pm 45,94$ U/L e o *pool* do Sudeste $226,3 \pm 12,7$ U/L. A análise estatística não identificou diferenças significativas dos níveis de CK plasmático ($p = 0,5986$; Fig. 8).

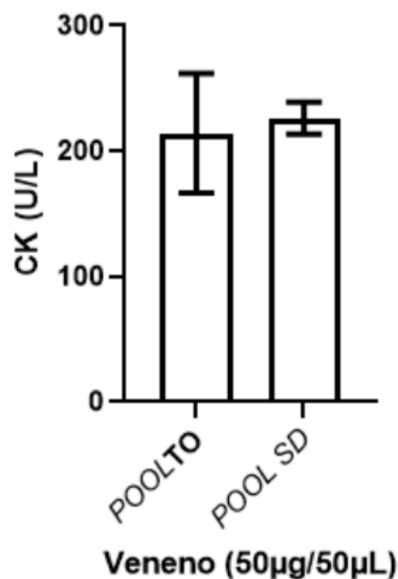


Figura 8. Atividade miotóxica dos venenos de *Bothrops moojeni*. Camundongos swiss machos ($n=5$), de 20 a 25 g, receberam 50 μ g de veneno/50 μ L solução salina estéril no músculo gastrocnêmio direito, e após 3h os animais foram anestesiados e o sangue coletado para dosagem de CK. *Pool* do Tocantins (*POOL TO*) e *Pool* do Sudeste (*POOL SD*).

As miotoxinas no veneno do gênero *Bothrops* são um grupo de proteínas que causam necrose muscular e induzem citotoxicidade das células musculares esqueléticas (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). No entanto as PLA₂ do tipo II estão presentes em maior quantidade e são os

componentes mais importantes no dano muscular dessas serpentes, induzindo a miotoxicidade, provocada pela liberação de enzimas e mioglobina no sangue, como a creatina quinase (CK) que é usado como marcador, no plasma para identificar se apresenta necrose no tecido muscular, em pacientes acidentados (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; MASUDA *et al.*, 2019).

Nesse estudo a atividade miotóxica foi induzida pelo *pool* do veneno da *B. moojeni* do Tocantins e o do Sudeste (Figura 8), corroborando com a literatura. QUEIRÓZ (2020), SALVADOR *et al.* (2018) e SEGURA *et al.* (2010), avaliaram a atividade miotóxica de diferentes espécies botrópicas, no qual resultou em diferentes quantificações. Como também em pesquisas com caracterização e isolamento de proteínas da *B. moojeni* a Miotóxica I e II (13,5 kDa) (LOMONTE *et al.*, 1990), BmooMtx (16,5 kDa) (QUEIROZ *et al.*, 2011), BmooTX-I (15 kDa) (SANTOS-FILHO *et al.* 2008), M-VI (14 kDa) (SOARES *et al.*, 1998) MjTX-I (13,4 kDa) (SOARES *et al.*, 2000) e BmTX-I (14,2 kDa) (CALGAROTTO *et al.*, 2008), as quais induziram o aumento de creatina quinase (CK) no plasma sanguíneo, por provocarem danos na membrana de células musculares.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os venenos da serpente *Bothrops moojeni*, obtidos de espécimes coletadas do cerrado tocantinense e no Sudeste, apresentaram diferenças no perfil proteico, havendo bandas com intensidades diferentes.

Contudo, quando avaliadas as atividades biológicas desses venenos, não foram detectadas diferenças significativas para as atividades edematogênica, hemorrágica, necrosante e miotóxica.

Dessa forma, são necessários mais estudos que avaliem as características do veneno do cerrado tocantinense, a fim de desvendar o que essa variação proteica pode representar para o envenenamento botrópico, bem como, para o comportamento biológico dessa espécie, no cerrado.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, W. S. *et al.* Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. **PLoS ONE** v. 14, n. 9, 2019.
- AKAO, P. K. *et al.* Structural studies of BmooMPalpha-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 55, p. 361–368, 2010.
- ALI, S.A. *et al.* Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, n. 2, p. 216–226, 2000.
- AMORIM, F. G. *et al.* New Insights on Moojase, a Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops moojeni* Snake Venom. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 12, p.500, 2018.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; DOS SANTOS, M. C. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny?. **Journal of Herpetology**, p. 285–288, 1996.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Malaque, C. M.S.; Haddad Junior, V. (Eds). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Sarvier**, São Paulo, SP. p. 6-12, 2003.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2 da structural review. **Toxicon**. v.34, p. 827–841, 1996.
- ASSAKURA, M. T. *et al.* Hemorrhagic, fibrinolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon**, v. 30, n. 4, p. 427-438, 1992.
- ASSAKURA, M. T. *et al.* Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 691-706, 1985.
- BELLO, C. A. *et al.* “Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic 8 ISRN Toxicology proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom”. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 189–200, 2006.
- BERNARDES, C. P. *et al.* Isolation and structural characterization of a new Fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. v. 51, p. 574-84, 2008.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Brazilian Reptiles: List of Species. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2015.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. “Snake venom metalloendopeptidases: reprotlysins”. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 345– 368, 1995.
- BJARNASSON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **J. Pharmacology & Therapeutics**. v. 62, p. 325–372, 1994.

BOCHNER, R; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003.

BOLAÑOS, R. Veneno de Serpientes. Estructura química y actividades biológicas y farmacológicas. In: Universidad de Costa Rica (Ed.). **Serpientes, venenos y ofidismo en Centro América**. San José, p. 45-81, 1984.

BONAN, P. R. F. *et al.* Perfil epidemiológico dos acidentes causados por serpentes venenosas no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. **Rev Med Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 503-507, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos**. Serpentes. Aspectos epidemiológicos. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13712-situacao-epidemiologica-dados>. Dados obtidos em consulta no dia 14 de setembro de 2020.

CALGAROTTO, A. K. *et al.* Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1509-19, 2008.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CARDOSO, J. L. C. *et al.* Jr. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. **REV INST MED TROP SAO PAULO**, v. 45, n. 6, p.338, 2003.

CHIPPAUX, J. P. Incidence and mortality due to snakebite in the americas. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 11, n. 6, 2017.

COSTA, H; BERNILS, R. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, p. 11-57, 2018.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537–540, 1996.

DE MORAIS, N. C. G. *et al.* Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 60, p. 1251–1258, 2012.

DE OLIVEIRA, F. *et al.* Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 111, p. 130–138, 2016.

DE ROODT, A. R.; LITWIN, S.; VIDAL, J. C. Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 949–58, 2003.

DENNIS, E. A. *et al.* Phospholipase A 2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 12 out. 2011.

DU, X. Y, CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

FEITOSA, S. B.; MISE, Y. F.; MOTA, E. L. A. Ofidismo no Tocantins: análise ecológica de determinantes e áreas de risco, 2007-2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 29, n. 4, 2020.

FENWICK, A. M. *et al.* Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FERREIRA, A. T. S. **Caracterização das Nucleotidases Presentes no Veneno da Serpente *Bothrops jararaca* – Ênfase para as Atividades Atpase e Adpase**. Tese em Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes-RJ, 2006.

FERREIRA, R. S. *et al.* Anti-Inflammatory and Antibothropic Properties of *Jatropha Elliptica*, a Plant from Brazilian Cerrado Biome. **Adv Pharm Bull**, v. 6, n. 4, p. 573-579, 2016.

FOX, J. W., SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**, v. 275, p 3016–3030, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p 969–985, 2005.

FRY, B. G. *et al.* Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 18, p. 2047–2062, 2003.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, n. 2, p. 120, 2001.

GIBBS, H. L. *et al.* Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 2169–2179, 2011.

GILLISSEN, A. *et al.* Neurotoxicity, haemostatic disturbances and haemolytic anaemia after a bite by a Tunisian saw-scaled or carpet viper (*Echis "pyramidum"*-complex): failure of antivenom treatment. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 937–944, 1994.

GOMES, M. S. *et al.* BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 24-32, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Ver. Biol. Trop.** v. 50, n. 2, p. 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 958-975, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**. v. 33, p 19–29, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en raton blanco. **Toxicon**, v. 18 p. 603-610, 1980.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F. Efectos proteolitico, hemorragico Y mionecrotico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon**, v. 18, p. 315-321, 1980.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofidico en América Latina. **In:** CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD, V.JR. (ED.). **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 310-323, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, a review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, n. 14, p. 211-233, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A(2): Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**. v. 62, p. 27–39, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, M. “Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms.” **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. “Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity.” **Toxicon**, v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipase A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, v. 42, p. 933-943, 2003.

HOGUE, A. R. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae) **Memórias do Instituto Butantan**, v. 32, p. 109 – 184, 1966.

ISABEL, T. F. *et al.* Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v.115, p. 49–54, 2016.

JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Venom proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. **Toxicon**, v. 2, p. 155-166, 1964.

JONES, J. M. Variations of venom proteins in *Agkistrodon* snakes from North America. **Copeia**, v. 3, p. 558-562, 1976.

KAMIGUTI, A. S. *et al.* Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627–642, 1996.

KANG, T. S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS Journal**, v. 278, p. 4544-4576, 2011.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.
- LOMONTE, B. *et al.* Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v.28, p.1137-1146, 1990.
- LOMONTE, B.; CALVETE, J.J. Strategies in 'snake venomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** v. 23, n. 26, 2017.
- MAMEDE, C. C. *et al.* Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: Enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**. v. 117, p. 37–45, 2016.
- MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon** v. 20, p. 955–972, 1982.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749–1800, 1998.
- MASUDA, H. *et al.* Batroxobin accelerated tissue repair via neutrophil extracellular trap regulation and defibrinogenation in a murine ischemic hindlimb model. **PLoS one**, v. 14, n. 8, 2019.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Málague C.M.S. & Haddad Jr V. (Eds), *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier Editora, p. 42-69. São Paulo, 2003.
- MENDOZA, C. E. C.; BHATTI, T.; BHATTI, A. R. Electrophoretic analysis of snake venoms. **Journal of Chromatography**, v. 580, p. 355-363, 1992.
- MOURA, V. M. *et al.* Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**., v. Artigo submetido em outubro de 2014, 2015.
- MOURA-DA-SILVA, A. M. Caracterização de Venenos de Serpentes por Eletroforese em Poliacrilamida. **Boletim de biotecnologia**, v.3, p. 3-7, 1992.
- MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: Effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2893–2905, 2007.
- MOURA-DA-SILVA, S. M. *et al.* Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p.713-723, 1991.
- NADUR-ANDRADE, N. *et al.* Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. **Lasers in Medical Science**, v. 27, p. 65–70, 2012.

- NAKADA, K. *et al.* Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera, **Toxicon**, v. 22, n. 6, p. 921-930, 1984.
- NOGUEIRA, C. C. *et al.* Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. **South American Journal of Herpetology**, v. 14, p. 1-274, 2019.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian cerrado. **Journal of Herpetology**. v. 37, p. 653–659, 2003.
- OLIVEIRA, F. *et al.* Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (CAISSACA). **Biochem Mol Biol Int**. v. 47, n. 6, p.1069-77, 1999.
- OLIVEIRA, L. M. F. *et al.* Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 282-290, 2013.
- OLIVEIRA, S. S. **Atividades biológicas do veneno de serpentes *Bothrops atrox* capturadas na Floresta Nacional do Tapajós, Oeste do Pará**. Dissertação Toxinologia do Instituto Butantan, São Paulo, 2014.
- OWNBY, C. L. *et al.* Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**. v. 37, n. 3, p.411-45, 1999.
- PERRONE, M. A. L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. F. D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfologicamente duvidosas. **Mem. Inst. Butantan**. v. 51, n. 1, p. 25-32, 1989.
- QUEIRÓS, Deize Carneiro. **O Acidente Botrópico no Tocantins**: perfil epidemiológico dos acidentados, fatores ambientais facilitadores dos acidentes, toxicidade e neutralização do veneno. Dissertação (CIAMB). UFT - Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, 2020.
- QUEIROZ, G. P. *et al.* Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-51, 2008.
- QUEIROZ, M. R. *et al.* Biological characterization of a myotoxin phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis [online]**. v.17, n.1, p.49-58, 2011.
- RAEL, E. D.; KNIGHT, R. A.; ZEPEDA, H. Electrophoretic variations of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venoms and migration differences of Mojave toxin. **Toxicon**, v. 22, n. 6, p. 980-985, 1984.
- RAW, I, GUIDOLIN, R, HIGASHI, H, KELEN, E. Antivenins in Brazil: preparation. In: Tu AT (editor). **Handbook of natural toxins**. New York: Marcel Dekker, v. 5, p.557-83, 1991.
- RIBEIRO JUNIOR, M. A. **Estudo comparativo do veneno de *Bothrops jararaca* do continente e de espécimes da Ilha de São Sebastião**. Dissertação em Ciências. Instituto de pesquisa energéticas e nucleares, São Paulo, 2008.

- RIBEIRO, L. *et al.* (1998). Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 312-8, 1998.
- ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Rev. Bras. Zool.** v. 22, n. 2, p. 383-393, 2005
- SAKURAI, Y. *et al.* Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1649, n. 1, p. 51–57, 2003.
- SALVADOR, G. *et al.* Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10317. 2018.
- SANCHEZ, E. F. *et al.* Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**. v. 30, n. 1, p. 95–103, 1992.
- SANTOS, A. L. *et al.* Estudo retrospectivo dos acidentes por serpentes atendidos no Hospital Geral de Palmas -TO, no período de 2010 e 2011. **Desafios: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins** – Palmas, v. 1, n. 1, p. 226-244, 2014.
- SANTOS-FILHO, N. A, *et al.* A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inductor phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908-17, 2008.
- SEGURA, A. *et al.* Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**. v. 56, p. 980-989, 2010.
- SERRANO, S. M. T. *et al.* Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom—I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 471-481, 1993.
- SERRANO, S.M.; MAROUN, R.C Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon** v. 45, p. 1115–1132, 2005.
- SILVA, M.; WINGE, H. Aperfeiçoamento da Técnica de “Plastificação de Géis de Poliacrilamida”. **Ver. Bras. Gen. Brazilian J. Gen.** 17(3) (Suppl.): 326, 40 Congresso Nacional de Genética, Caxambú, 1994.
- SILVA, R. C. C.; FREITAS, M. A.; SANTANNA, S. S.; SEIBERT, C. S. **Serpentes no Tocantins: guia ilustrado**. São Paulo, SP: Ekos Editora, 2019.
- SINAN/SVS/MS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Ministério da Saúde, Brasil. 2019.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem.** v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOARES, A. M. *et al.* Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys.** v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000.

SOARES, A. M. *et al.* A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503-14, 1998.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipases A2 myotoxins from Bothrops snake venoms: structure-function relationship. **Current Organic Chemistry.** v. 8, p. 1677–1690, 2004.

SOUSA, L. F. *et al.* Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. **Toxins.** v.10, n. 10, p. 411, 2018.

STÁBELI, R. G. *et al.* Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2881–2886, 2004.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Comparison of the Apoptotic Pathways Induced by L-Amino Acid Oxidase and Hydrogen Peroxide. **The Journal of Biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 305–309, 1999.

TAN, N. H.; FUNG, S. Y. Snake venom L-Amino Acid Oxidases and their potential biomedical applications. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.16, n. 1, p. 1-10, 2008.

TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. A comparative study on the electrophoretic patterns of snake venoms. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 102B, n. 1, p. 103-109, 1992.

TEMPONE, A. G. *et al.* *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. With hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 3, p. 620–624, 2001.

TORRES, F. S. *et al.* Bmoo FIBMP-I: A New Fibrinolytic Metaloproteinase from. **ISRN Toxicology**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

UETZ, P.; FREED, P.; HOŠEK, J. (orgs.), **The Reptile Database**, 2018. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>, acessado em 10 de novembro de 2020.

WARRELL, D. A. Snake venoms in science and clinical medicine. 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 732–40, 1989.

WHO - **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. List of neglected tropical diseases. 2014 Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. 2014; acessado em 17 de outubro de 2020.

WITTCOFF, H. The phosphatides. **Journal of Chemical Education**, v. 29, n. 12, p 638, 1952.

WUSTER, W. *et al.* Population systematics of Russell's viper: a multivariate study. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 47, n. 1, p. 97–113, 1992.

WUSTER, W. Venomous snake systematics: implications for snakebite treatment and toxinology. **Toxicon**, v. 2, n. 34, p. 143, 1996.

ZELANIS, A. *et al.* Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 2010.

ZHANG, Y.J. *et al.* Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, n. 3, p. 598–604, 2003.

ANEXO A - Comissão de Ética do Uso de Animais da UFT

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



Araguaína, 21 de novembro de 2018.

O projeto intitulado "*Estudo da Pétiveria alliacea e Annona crassiflora mart. frente aos efeitos do veneno da serpente Bothrops moojeni*" processo n° 23101.005186/2018-98 sob a responsabilidade de Márcio Galdino dos Santos, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Atenciosamente,

Sandro Estevan Moron

Coordenador da CEUA/UFT