



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

Caracterização da variabilidade genética em populações da serpente *Bothrops moojeni*
Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae): importância para a conservação e utilização na
saúde.

Nicole Cristina Lopes Dutra

Goiânia – Goiás
Setembro de 2006



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

Caracterização da variabilidade genética em populações da serpente *Bothrops moojeni*
Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae): importância para a conservação e utilização na
saúde.

Nicole Cristina Lopes Dutra

Orientadora: Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-
Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
da Universidade Católica de Goiás,
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Ambientais e Saúde.

Goiânia – Goiás
Setembro de 2006

*Ainda que eu conheça todos
os mistérios e toda ciência;
sem Amor, nada serei.*

I Coríntios 13:2

AGRADECIMENTOS

São muitos agradecimentos a fazer... Graças à Deus por isso, afinal, significa que eu tive o privilégio de contar com ajuda de muitos que contribuíram para o sucesso deste trabalho.

À minha família (Meu pai Valneide, Minha mãe Neuza, minhas irmãs, Danielle, Denise, Ana Paula, meu cunhado Rafael e minha amada sobrinha Isabella) pelo apoio, ajuda, compreensão, amor, carinho, paciência. Por terem acreditado que valeria a pena fazer um investimento tão caro e que só Deus sabe o que nos custou. Em especial ao meu pai e a minha mãe que sempre colocaram como prioridade o meu mestrado, dispensando do seu tempo, energia 24 horas em tudo o que fosse necessário para a realização deste trabalho. Vocês são pra mim o significado do verdadeiro Amor.

Agradeço à minha orientadora Mariana Pires de Campos Telles pela oportunidade de crescimento, pelo apoio, auxílio, orientação. Por ter me ensinado Muito sobre genética e por ter paciência ao fazer isso, desde a graduação e durante o mestrado. Agradeço pela oportunidade de trabalhar em genética com excelentes condições. Quanto mais eu conheço outros lugares, mais eu sei o quanto foi valoroso (e privilegiado) o meu aprendizado. Agradeço também por corrigir, organizar, reescrever, escrever, sugerir, ajudar, aconselhar, enfim, orientar... Foi você que me fez sentir orgulho desse trabalho, sem o seu esforço pra ir atrás de editais nada disso poderia ser possível. Graças a Deus eu tive o privilégio de te conhecer e poder concretizar um sonho de realizar pesquisa na área de genética. Não foi uma caminhada fácil pra mim, imagino pra você... Sendo mãe, esposa, filha, irmã, professora, pesquisadora, orientadora (eu canso só de escrever!). Algum dia espero conseguir fazer pelo menos 10% do que você faz. Você é um exemplo de mulher, um exemplo de profissional, um exemplo de pessoa. Eu escrevo isso de coração, pois chegando até aqui eu me percebo uma pessoa mais madura, mais firme, mais organizada e, com certeza, eu devo muito disso a você. Conhecer você foi essencial pra que eu me tornasse quem eu sou hoje. Valeu mesmo.

A todos os professores do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde pelos ensinamentos que contribuíram muito para a formação dessa profissional multidisciplinar... Em especial à Professora Kátia pelas discussões em sala de aula que foram extremamente produtivas para trazer à tona minhas dúvidas e firmar meu conhecimento em genética. E também pelas correções tão minuciosas que ajudaram a fazer desse trabalho o que ele é hoje. Ao professor Nelson por ter disponibilizado gentilmente as espécies para coleta.

À professora Maria Silvia Monteiro que foi quem confiou em mim e primeiro me deu a oportunidade de trabalhar num laboratório de genética e pelos ensinamentos que vão ficar para sempre comigo.

À Flávia Mello Rodrigues, que me orientou na graduação e que me ensinou muito sobre genética e sobre como escrever, contribuindo muito para minha formação. Pela enorme contribuição neste trabalho ao ler e corrigir com carinho e atenção cada linha. Suas sugestões foram essenciais para este trabalho. Fica o meu muito obrigada pela boa vontade e auxílio.

Agradeço a todos os colegas de Laboratório de Genética e Melhoramento da UCG, em especial a Lucileide, Thannya, Tariana, Lôide e Luciana pelo auxílio e apoio. À Elisângela que também me deu dicas sobre como escrever melhor. Em especial ao pessoal do NUROG, Marta e João, que auxiliaram nas coletas. Ao Breno pelos momentos de descontração no laboratório.

À Universidade Católica de Goiás, CNPq, Capes, Instituto do Trópico Subúmido e Fundação Aroeira pelo apoio financeiro e logístico.

Também ao meu pai por nunca poupar esforços pra me ajudar e participou até das coletas. Minha irmã, Denise, que participou de todo este trabalho (coleta, extração e codificação dos géis) ajudando nos momentos mais cansativos deste trabalho.

Aos colegas do mestrado, pelo apoio mútuo nessa caminhada, pela alegria, a característica de uma turma que sempre vou lembrar com muito carinho. À todos os funcionários do mestrado pelo auxílio durante essa caminhada.

E o mais especial de todos... Ao Autor da Vida, Companheiro Fiel, sempre comigo em todos os momentos, me ajudando, confortando, capacitando ao longo de todos os momentos difíceis. Quando eu achei que não iria conseguir, que iria desistir... Em todos esses momentos me mostrando o lado bom das coisas e tendo paciência em me ensinar a ter maturidade. Mil palavras não seriam suficientes para demonstrar a gratidão.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho: OBRIGADA!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	Pág. vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Principais aspectos do bioma Cerrado.....	5
3.2. Genética de Populações e Conservação da biodiversidade.....	8
3.3. Caracterização da espécie <i>Bothrops moojeni</i>	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Descrição das populações.....	24
4.2. Obtenção dos dados moleculares.....	25
4.3. Análise dos dados.....	28
4.3.1. Estimativa de Frequências Alélicas e Parâmetros Genéticos Básicos.....	28
4.3.2. Estrutura Genética Populacional.....	29
4.3.3. Divergência genética e padrão espacial da variabilidade genética.....	31
4.3.4. Programas utilizados para as análises estatísticas.....	33
4.4. Levantamento cienciométrico e bibliográfico.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Seleção de <i>primers RAPD</i>	34
5.2. Caracterização da variabilidade dentro e entre as populações.....	37
5.3. Divergência e padrão espacial da variabilidade genética.....	46
5.4. Levantamento cienciométrico e bibliográfico do nível de conhecimento e da importância da espécie <i>B. moojeni</i> para a área da saúde.....	49
5.5. Implicações e sugestões para a conservação da espécie <i>Bothrops moojeni</i>	60
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXO.....	80
9. APÊNDICE.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

página

Tabela 1. Serpentes na lista Oficial de Espécies ameaçadas de extinção (IBAMA 2003) que são criticamente ameaçadas (CR) ou ameaçadas (EN) de acordo com as categorias e critérios da <i>World Conservation Union</i> (IUCN) (Adaptado de Rodrigues, 2005).....	19
Tabela 2. Municípios, número de indivíduos (N), Latitude e longitude dos locais de coleta das populações de <i>Bothrops moojeni</i> do Centro-Oeste.....	25
Tabela 3. Esperanças matemáticas dos quadrados médios [E(QM)] para populações (P), indivíduos dentro populações (I/P), conforme Excoffier et al. (1992).....	30
Tabela 4. Relação dos 35 <i>primers</i> codificados e a classificação quanto às intensidades fraca, forte e variável em cada loco; número de locos, número de locos polimórficos por <i>primer</i> . As linhas em negrito indicam os <i>primers</i> selecionados.....	46
Tabela 5. Relação dos <i>primers</i> , suas seqüências de bases e o número de locos (NL), obtidos nas cinco populações de <i>Bothrops moojeni</i>	37
Tabela 6. Variabilidade genética para 59 locos RAPD em 5 populações de <i>Bothrops moojeni</i> no Centro-Oeste; heterozigosidade esperada (He), tamanho populacional (N), número de locos polimórficos (NLP) e porcentagem de locos polimórficos (%LP).....	39
Tabela 7. Relação das referências dos 10 estudos de genética com serpentes, utilizando diferentes marcadores moleculares, medida de diversidade genética (h) e valor da estruturação da variabilidade genética (Estatística-F).....	41

Tabela 8. Quadro de Análise de Variância Molecular para cinco populações de *Bothrops moojeni*, com base em 59 locos RAPD.....42

Tabela 9. Valores de Φ_{ST} par a par entre as cinco populações de *Bothrops moojeni*, com base em locos RAPD.....44

Tabela 10. Distância geográfica (km) entre as cinco populações de *Bothrops moojeni*.....44

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Mapa de degradação do Cerrado. A) Área de distribuição original do Cerrado e B) Principais remanescentes de vegetação do Cerrado (Adaptado de Machado <i>et al.</i> , 2004).....	6
Figura 2. Exemplar da espécie <i>Bothrops moojeni</i> (Melgarejo, 2003).....	20
Figura 3. Indivíduo se alimentando de um pequeno mamífero (UEB, 2006).....	21
Figura 4. Distribuição geográfica da espécie <i>Bothrops moojeni</i> (Campbell & Lamar, 2004).....	23
Figura 5. Pontos de coleta (municípios) das populações de <i>B. moojeni</i> na região Centro-Oeste.....	26
Figura 6. Padrão eletroforético dos <i>primers</i> OPA-01, OPA-03, OPB-04, OPB-06, OPB-18, OPM-01, OPP-04, OPP-06 com três indivíduos da espécie <i>Bothrops moojeni</i> . As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 <i>base pair ladder</i>).....	35
Figura 7. Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados utilizando o <i>primer</i> OPP-04 com indivíduos de <i>Bothrops moojeni</i> . As colunas M 100bp, indicam o marcador de peso molecular (100 <i>base pair ladder</i> , Pharmacia).....	38
Figura 8. Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados utilizando o <i>primer</i> OPP-15 com indivíduos de <i>Bothrops moojeni</i> . As colunas M 100bp, indicam o marcador de peso molecular (100 <i>base pair ladder</i> , Pharmacia).....	38
Figura 9. Distribuição dos valores de (He) dos 59 locos analisados nas populações de <i>Bothrops moojeni</i>	40

Figura 10. Padrão de divergência genética entre as 5 populações de <i>Bothrops moojeni</i> , definido pelo agrupamento por UPGMA, com base nas distâncias genéticas (Φ_{ST}). Correlação cofenética igual a 0,59.....	47
Figura 11. Relação entre as distâncias genéticas obtidas na AMOVA e as distâncias geográficas ($r = 0,294$; $P = 0,2234$ com 1000 permutações do teste de Mantel), para as cinco populações de Caiçaca.....	48
Figura 12. Porcentagem de artigos utilizando a palavra-chave “serpente” no sítio “ <i>Institute for Scientific Information</i> ” (ISI).....	49
Figura 13. Porcentagem de artigos utilizando a palavra-chave “Bothrops” no sítio “ <i>Institute for Scientific Information</i> ” (ISI).....	50
Figura 14. Porcentagem de artigos utilizando a palavra-chave “ <i>Bothrops moojeni</i> ” no sítio “ <i>Institute for Scientific Information</i> ” (ISI).....	51
Figura 15. Lesão causada por picada de <i>Bothrops moojeni</i> (Lanzenotter, 2006).....	52
Figura 16. Planta de Fracionamento de soro antiofídico da produção de soro pelo Instituto Butantan (Cardoso <i>et al.</i> , 2003).....	55
Figura 17. Estrutura terciária da Miotoxina II isolada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (Watanabe <i>et al.</i> 2005).....	57
Figura 18. Mapa mostrando o nível de antropização na região Centro-Oeste (IBGE, 2006).....	63

RESUMO

Estudos sobre a fauna do Cerrado são importantes considerando a alta taxa de destruição das suas paisagens naturais durante as últimas décadas. Estudos com marcadores moleculares se fazem importantes, pois auxiliam nas pesquisas que pretendem acessar a variabilidade genética para fins de conservação. Entre as espécies do Cerrado, *Bothrops moojeni* é uma serpente que vem demonstrando grande aplicabilidade na saúde. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de cinco populações de Caiçaca (*Bothrops moojeni* Hoge, 1966) a partir de marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphyc DNA*), bem como realizar um levantamento cienciométrico da importância da espécie para a área da saúde no sítio “*Institute for Scientific Information*” (ISI), utilizando o método “*GeneralSearch*” com as palavras chaves: serpentes, *Bothrops* e *Bothrops moojeni*. Os dados gerados com marcadores RAPD foram utilizados para avaliar a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA). A fim de se avaliar os padrões de variação espacial, foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a matriz de distâncias genéticas e geográficas entre as populações. Com base nos cinco *primers* foram obtidos 59 locos, dos quais 81% (48) foram polimórficos, variando entre 35% e 69% nas populações. O valor do ϕ_{ST} obtido pela AMOVA foi igual a 0,13 ($P < 0,0001$ - 10000 permutações). Foi possível observar que as populações de Caiçaca estudadas apresentam baixos níveis de variabilidade genética ($H_e = 0,19$) para os locos RAPD estudados, sendo que a maior parte da variação encontra-se “dentro” das populações, o que poderia indicar que já está ocorrendo uma redução na taxa de fluxo gênico entre as populações. Considerando a escala geográfica em estudo (maior distância igual a 851,83 km), populações que estão próximas geograficamente apresentam uma considerável divergência genética e a variabilidade genética não se encontra estruturada espacialmente. No que diz respeito a ciencimetria, nas palavras-chave “serpente”, “*Bothrops*” e “*Bothrops moojeni*” a maioria dos estudos foi sobre zoologia (51%), Farmacologia & Farmácia (32%) e Bioquímica e Biologia Molecular (23%), não existindo nenhum trabalho publicado, até a presente data, que avalie a variabilidade genética desta espécie. Deve-se proceder com uma análise mais sistemática e de maior magnitude para avaliar a variabilidade genética desta espécie que além de sua importância para a conservação é uma espécie de muito interesse para a área de saúde.

Palavras-chave: RAPD, Serpentes, Variabilidade genética, Genética da Conservação, *Bothrops moojeni*.

ABSTRACT

Studies that concern Cerrado (Brazilian's Savannah) fauna are important as we consider the elevated rate of destruction of its landscapes in the last decades. *Bothrops moojeni* is one of the species of vipers that occur on the Cerrado area and its venom has shown great applicability in health. In the last years, molecular markers have helped in researches that aim to assess the genetic variability. In the present work, we perform the characterization of 5 populations of Caiçaca (*Bothrops moojeni*) using RAPD (Random Amplified Polimorphyc DNA) markers and also used a sciencimetric approach to highlight the importance of this species in health in the site "Institute for Scientific Information" (ISI), using the method "General Search" with the key words: "serpente", "Bothrops" and "Bothrops moojeni". The obtained Data were used to estimate the magnitude and distribution of variability within and among the groups using AMOVA. Aiming to analyze the patterns of spatial variation patterns, Pearson relation coefficient (r) was estimated between the matrixes of genetic distances and geographic among the populations. With the 5 primers were obtained 59 loci, from which 81% (48) were polymorphic, ranging between 35% and 69% in the groups. The value of f_{ST} obtained with AMOVA was equal to 0,13 ($P < 0,0001$ - 10000 permutations). Thus, it was possible to observe that Caiçaca populations studied presented a low level of genetic variability ($He = 0,19$) and most of the genetic variation is "within" the populations, what might indicate that is already occurring a reduction of the rate of gene flow between the populations. Considering the geographic area studied (larger distance was equal to 851,83 km), populations that are geographically near presented a high level of genetic diversity and the genetic variability is not spatially structured. The populations of *Bothrops moojeni* studied presented low levels of Genetic diversity for the RAPD loci evaluated. Genetic variability is not spatially structured. Concerning sciencimetry analyses, the following key-words: "serpente", "Bothrops" and "Bothrops moojeni" most of the studies concerning zoology (51%), Pharmacology and Pharmacy (32%) and Biochemistry and Molecular Biology (23%), there was no paper published till the present date, that aimed to evaluate genetic variability in this species, as well as in the genus *Bothrops*. We recommend a wide-ranging study to evaluate genetic variability in this species due to its importance to conservation of the ecosystem from which it belong as well due to the great interest in health.

Key-words: RAPD, Vipers, Genetic Variability, Conservation Genetics, *Bothrops moojeni*.

1. INTRODUÇÃO

Fenômenos como a industrialização, urbanização, crescimento da área de plantio de monoculturas tem acelerado o processo de extinção de várias espécies do Cerrado. Esses fenômenos têm levado à pronunciadas alterações e empobrecimento da paisagem do Cerrado nas últimas décadas (Galinkin, 2003). Como consequência, muitos tipos de habitats tem sido destruídos e fragmentados e muitas espécies têm desaparecido antes mesmo que se tenha a chance de estudá-las (Klink & Machado, 2005). Entretanto, apesar de todos esses fatos, não existem serpentes que ocorrem na região Centro-Oeste ou no Cerrado na Lista Brasileira Oficial de Répteis Ameaçados de Extinção (IBAMA, 2003). Provavelmente este fato está acontecendo não necessariamente porque não existem espécies de serpentes em risco ou vulneráveis à extinção, mas sim pela escassez de estudos realizados com as espécies nativas dos Cerrados.

A Caiçaca (*Bothrops moojeni*) é uma espécie de serpente que sofre com alteração e fragmentação de habitat, assim como outros dos componentes da Herpetofauna do Cerrado (Rodrigues, 2005). Essa é uma espécie do gênero *Bothrops* amplamente distribuída na região centro-oeste do Brasil e em regiões vizinhas da Argentina e Paraguai (Nogueira *et al.*, 2003). Ela é bastante comum no Brasil e uma das maiores responsáveis por acidentes ofídicos em algumas regiões como Brasília e Triângulo Mineiro (Sebben *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003). Apesar de ser uma espécie com grande importância na área da saúde, não existem estudos que caracterizem variabilidade genética e divergência genética nesta espécie, bem como em nenhuma das 38 espécies do gênero *Bothrops*.

Tendo em vista os crescentes problemas ambientais que incidem sobre o Cerrado, estudos voltados para a identificação da variabilidade genética de populações e os processos históricos que as afetaram ao longo do tempo são necessários a fim de que se conheça tamanho, estrutura e status genético de populações naturais. A estrutura

genética de uma população se refere ao grau de endogamia dentro e entre as populações e à heterogeneidade na distribuição dos genótipos. Já o status genético se refere às tendências em abundância e distribuição ao longo do tempo, como por exemplo, identificação na população da ocorrência de gargalos, depressão por endogamia, perda da variabilidade genética. Esse tipo de informação, que pode ser fornecida a partir de dados provenientes de marcadores moleculares, é útil para que se estabeleçam eficientes programas de conservação (Petit *et al.*, 1998; Frankham *et al.*, 2004).

Do mesmo modo em que auxiliam o manejo das populações, estudos sobre o grau de variação genética presente em populações naturais nos permitem compreender mais a fundo os processos evolutivos em nível intra-específico, pois tornam possível a identificação das variações que podem estar ocorrendo dentro de uma espécie (Sunnucks, 2000).

Uma das questões importantes com respeito à efetividade ou relevância do manejo de populações é o grau no qual a espécie está subdividida geneticamente (Petit *et al.*, 1998). Por isso, a análise de populações usando técnicas de genética molecular é necessária para se conhecer relações genéticas entre indivíduos de locais conhecidos. O conhecimento de padrões de relações genéticas pode então ser associado a características ambientais para determinar se uma espécie com distribuição contínua exibe heterogeneidade genética (Frankham *et al.*, 2004). A habilidade de discernimento desses padrões geográficos permite que se façam inferências sobre fluxo gênico, processos demográficos e persistência da população ou espécie (Frankham *et al.*, 2000).

Marcadores moleculares são eficientes e amplamente utilizados para a caracterização da estrutura e variabilidade genética de populações naturais (Sunnucks, 2000). No caso de serpentes venenosas, esses dados podem ser de grande importância médica por causa da composição, atividade biológica e propriedades antigênicas de

venenos que podem variar muito de acordo com a espécie de serpente. Como a variação no veneno é muitas vezes relacionada como um produto da evolução neutra, a utilização de dados provenientes de marcadores moleculares pode ser igualmente útil tanto para fins de conservação de espécies, quanto para caracterização de veneno. Inclusive, alguns estudos se referem à variação genética como uma das principais origens da variação bioquímica de venenos (Nkinin *et al.*, 1997; Creer *et al.* 2003).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral realizar a caracterização genética de populações de *Bothrops moojeni* (Caiçaca) que ocorrem na região Centro-Oeste, com o intuito de subsidiar o estabelecimento de estratégias de manejo e conservação desta espécie de viperídeo que apresenta amplo interesse na área da saúde. Para tanto procurou-se atingir os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar *primers* do marcador RAPD (*Random Amplified Polimorphyc DNA*) que apresentem um número satisfatório de locos e um bom padrão de amplificação para *Bothrops moojeni*;
- Avaliar a magnitude da variabilidade genética dentro e entre as populações de *Bothrops moojeni*;
- Analisar a divergência genética entre as populações;
- Verificar se há estruturação espacial da variabilidade genética existente;
- Realizar um levantamento cienciométrico dos estudos realizados com serpentes do gênero *Bothrops*, especialmente da espécie *Bothrops moojeni*;
- Descrever, a partir de dados da literatura, a importância da espécie *Bothrops moojeni* na área da saúde.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Principais aspectos do bioma Cerrado

É cada vez mais evidente a importância econômica e ecológica do Cerrado, tanto para a conservação da paisagem natural do Brasil, quanto para a população que dela sobrevive. Este Bioma é composto por savanas, matas, campos e matas de galeria, um conjunto de ecossistemas que ocupa uma área correspondente a 21% do Brasil, fazendo divisa com importantes formações vegetais (Pantanal, Amazônia, Floresta Atlântica e Caatinga) e ocorrendo nos seguintes estados: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Piauí, Maranhão, São Paulo, Minas Gerais e Bahia (Klink & Machado, 2005).

O Cerrado é uma região cujo clima tropical sub-úmido é estacional, com um período chuvoso, que vai de outubro a março, e um período seco, de abril a setembro. Mesmo sendo considerada uma região quente, a média anual de temperatura (20,1°C) é a segunda menor entre todos os Biomas brasileiros. Seus solos são ácidos, com altas concentrações de alumínio, mas é pobre em outros nutrientes (Ribeiro, 2002).

Apesar disso, esse Bioma não foi poupado de ser explorado na agricultura, com uma área de pastagens e monoculturas ocupando 600.000 Km². A fragmentação do Cerrado Brasileiro (Figura 1) vem ocorrendo de forma maciça e extensa, em 2002 só restavam 45% da área original de 2 milhões de Km² (Klink & Machado, 2005). Entende-se por fragmentação a modificação de uma grande extensão contínua de habitats, que passa a ser substituída por várias manchas menores, isoladas uma das outras por uma matriz circundante (Chiarello, 1999).

O Cerrado é muitas vezes designado como a “Savana Brasileira”, isso acontece devido às similaridades de seus galhos tortos e árvores baixas com outros tipos de vegetação características de regiões como a África Central, o litoral da Índia e o Norte

de Austrália e América do Sul. Ele possui alta disponibilidade de água e baixa de nutrientes, possuindo uma grande importância na dispersão hídrica no continente. Fazendo uma comparação com outras savanas, verifica-se um quadro diferente na Austrália, onde observamos uma relação oposta entre disponibilidade de água e nutrientes. Já na África essa mesma relação é intermediária (Ribeiro, 2002).

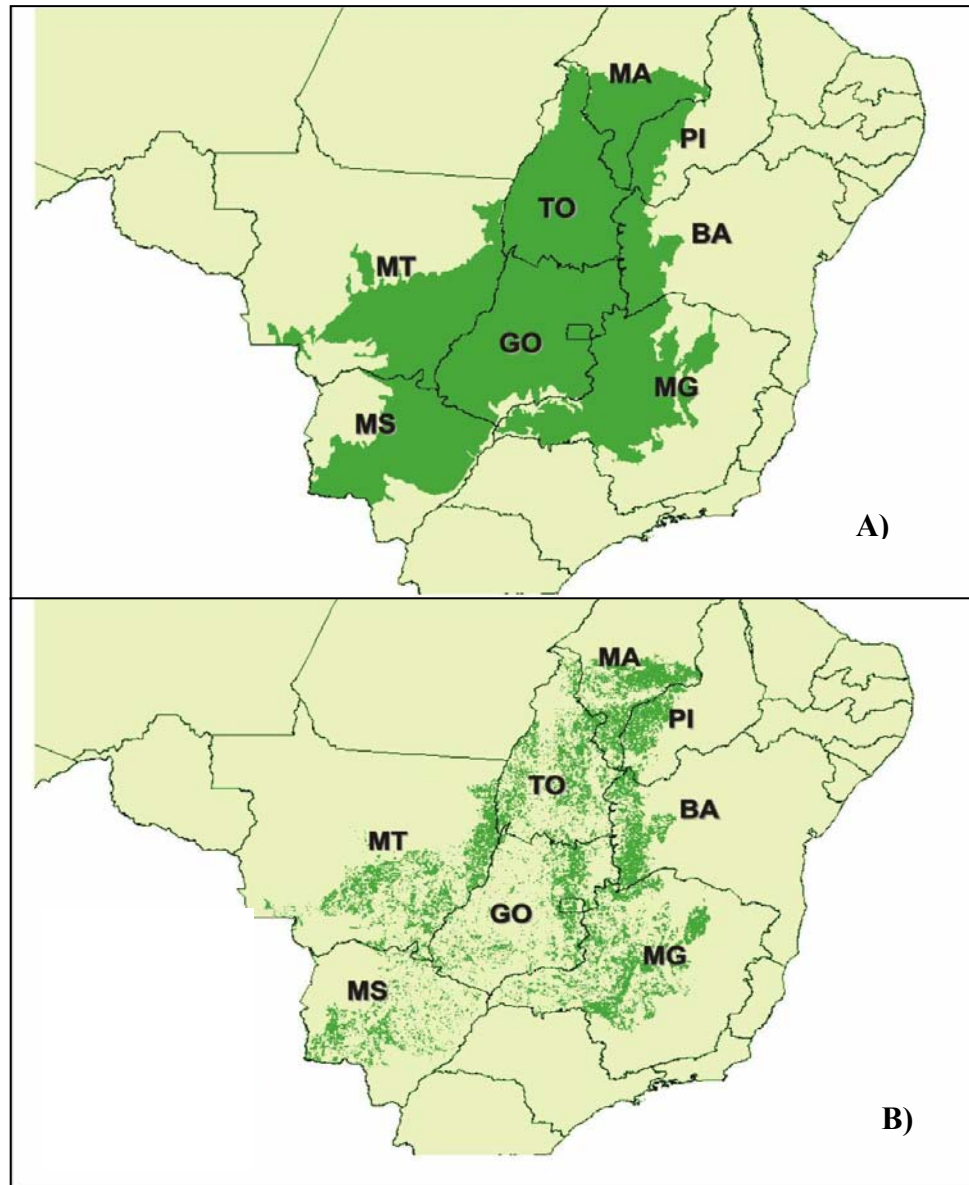


Figura 1. Mapa da degradação do Cerrado. **A)** Área de distribuição original do Cerrado e **B)** Principais remanescentes de vegetação do Cerrado (Adaptado de Machado *et al.*, 2004).

A manutenção do Cerrado vem sendo constantemente ameaçada por altas taxas de desmatamento que são superiores a de outros Biomas do Brasil, pela erosão dos solos e a degradação dos diversos tipos de vegetação, causada pela introdução de espécies exóticas e poluição, têm contribuído para sua degradação. E também outra grande

ameaça, o fogo, normalmente iniciado em áreas vizinhas de pastagens, colaborando para a situação atual de fragmentação, apesar deste ser um Bioma bem adaptado ao fogo (Klink & Machado, 2005).

Devido a relevante diversidade biológica e endemismo de espécies encontrada no Cerrado, ele foi elevado à categoria de um dos 25 hotspots para a conservação da biodiversidade no mundo (Myers, *et al.*, 2000). Sendo o Cerrado Brasileiro considerado a mais rica Savana do mundo em termos de flora e fauna com mais de 7.000 espécies e havendo alto nível de endemismo (Marris, 2005).

A atividade humana no Cerrado data de cerca de 11 mil anos, verificados no registro geológico nas ossadas de populações que, provavelmente, viviam da caça e coleta de espécies nativas. Atividades de exploração de minérios ocorrem desde os séculos XVII e XVIII, sendo que a pecuária tem no Cerrado uma tradição de mais de 3 séculos. Mas foi a partir dos anos 70 que ele assumiu um papel de grande importância no cenário agrícola nacional, onde uma agricultura mecanizada, de larga escala e alta produtividade foi introduzida (Ribeiro, 2002). Do ponto de vista da conservação, o Cerrado tem sido menosprezado ao longo das últimas décadas (Marris, 2005). Este Bioma foi excluído quando, na Constituição de 1988, foram definidas as áreas brasileiras prioritárias para a conservação, dando margem para sua exploração extensiva e indiscriminada (Felfili *et al.*, 2002). Entretanto, a conservação do que resta deste Bioma é importante até mesmo para obter ganho de produtividade nas monoculturas existentes, pois ao manter a diversidade da fauna e da flora do Cerrado, mantêm-se também os predadores das pragas que acometem a agricultura (Marques & Sazima, 2003).

As diversas espécies que compõem a fauna e a flora do Cerrado ainda são pouco estudadas. Os viperídeos continuam pouco conhecidos, carente de estudos para fornecer informações que cooperem para a melhor compreensão de sua biologia (Marques &

Sazima, 2003). Essas serpentes essenciais para a manutenção do equilíbrio de seus habitats e com uma crescente importância na área da saúde têm sofrido com a destruição do Cerrado, gerada pela antropização com formação de pastagens e lavouras, causando uma importante diminuição das áreas de ocorrência destas espécies levando algumas ao risco de extinção (Rodrigues, 2005).

Assim, estudos que visem a caracterização genética de espécies tão pouco conhecidas como as serpentes do Cerrado, têm papel de destaque, uma vez que, fornecem informações úteis no entendimento da biologia destas espécies de crescente interesse tanto para o equilíbrio ecológico, quanto para a área da saúde.

3.2. Genética de Populações e Conservação da biodiversidade

A genética de populações se propõe a descrever a maneira pela qual a frequência de alelos muda ao longo do tempo. Para estudar as mudanças nas frequências, analisam-se populações ao invés de indivíduos. Como as alterações nas frequências gênicas são o ponto de partida para evolução e especiação, genética de populações e evolução são frequentemente estudadas em conjunto (Futuyma, 1998).

A Genética da conservação é a aplicação das teorias da genética para a preservação das espécies como entidades dinâmicas capazes de interagir com as mudanças ambientais (Beebee & Rowe, 2004). A genética da conservação se baseia em muitos pressupostos teóricos da genética de populações, ecologia e genética quantitativa. Ela engloba manejo genético de populações pequenas, solução de problemas taxonômicos, definição de unidades de manejo de espécies ameaçadas, o uso de análises de genética molecular em área forense e a compreensão da biologia das espécies (Avice, 1996; Primack & Rodrigues, 2001; Reed & Frankham, 2003), demonstrando, assim, a íntima ligação entre Genética da Conservação e de populações.

Até meados da década de 80 acreditava-se que fatores genéticos não tinham uma grande influência no destino das populações ameaçadas. Pensava-se que flutuações demográficas, ambientais, bem como a antropização, causariam a extinção muito antes da deteriorização genética se tornar uma grande ameaça às populações (Wayne, 2004). Hoje, a noção da importância da conservação da diversidade genética já está bem estabelecida. Percebemos isso ao observarmos que a *World Conservation Union* (IUCN) considera a diversidade genética com uma das três formas de biodiversidade que necessitam e merecem serem preservadas (Beebee & Rowe, 2004).

Atualmente, já existem provas tanto teóricas como experimentais que sustentam a íntima ligação entre mudanças genéticas em pequenas populações e sua possível extinção. Um exemplo disso é a observação de que a perda de diversidade genética aumenta a suscetibilidade das populações à extinção. Também o fato de que populações cativas que foram deliberadamente manipuladas de forma a se tornarem endogâmicas, entraram em processo de extinção. Isso torna claro a evidência de que a perda da variabilidade genética aumenta a suscetibilidade das populações à extinção (Avice & Hamrick, 1996; Fähring, 2003; Spielman *et al.*, 2004; Ewers, 2005).

Uma maneira de expressar a variabilidade é analisar dados genéticos e expressar os dados em termos de frequências gênicas (ou alélicas). O conjunto de todas as frequências alélicas, para todos os locos que são analisados numa população específica pode ser considerado uma caracterização daquela população. Qualquer população pode ter uma ampla gama de frequências alélicas para cada um dos locos que estão sendo considerados. Além disso, duas populações não têm necessariamente o mesmo conjunto de frequências, ainda que eles sejam da mesma espécie (Gillespie, 1998).

Desta forma, o teorema de Hardy-Weinberg propõe: “Em uma população infinitamente grande, em que os cruzamentos ocorrem ao acaso e sobre o qual não há atuação de fatores evolutivos, as frequências gênicas e genotípicas permanecem

constantes ao longo das gerações” (Beiguelman, 2006). A distribuição de genótipos é expressa pela equação $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, que representa o desdobramento do seguinte binômio $(p + q)^2$ onde, **p** representa frequência do alelo dominante e **q** representa a frequência do alelo recessivo. Portanto, p^2 representa a frequência do genótipo homocigoto dominante, $2pq$ representa a frequência do genótipo heterocigoto e q^2 representa a frequência do genótipo homocigoto recessivo (Beiguelman, 2006). Este teorema, então, só é válido para populações que sejam infinitamente grandes, com cruzamentos ao acaso, isentas de fatores evolutivos, tais como, mutação, seleção natural e fluxo gênico. Quando encontramos uma população que está de acordo com essas premissas, dizemos que ela se encontra em equilíbrio genético (Frankham *et al.*, 2003).

Dentre os fatores evolutivos podemos considerar as mutações, onde diferentes locos podem surgir por mutações ao acaso, um gene mutante que determine maior viabilidade dos indivíduos vai aumentar a sua frequência no conjunto gênico da população; 1) seleção natural: nas populações os diferentes genótipos não têm a mesma viabilidade, a eliminação ou redução dos genótipos menos viáveis provoca alteração nas frequências gênicas de uma geração à outra; 2) fluxo gênico: movimentos migratórios introduzem ou retiram alelos das populações, provocando mudanças nas frequências gênicas e genotípicas e 3) deriva genética: a estabilidade das frequências gênicas varia conforme o tamanho das populações. Nas grandes populações, a estabilidade pode manter-se constante, mas, nas pequenas, as frequências sofrem desvios, ou seja, alguns genes podem ser fixados na população enquanto outros podem ser eliminados (Spielman *et al.*, 2004).

Existem pelo menos duas bases teóricas da genética de populações, a de Fisher (1930) que trata da probabilidade de extinção de um único mutante neutro (alteração no material genético que não é percebido pela seleção natural, uma vez que o fenótipo se mantém inalterado). Essa teoria mostra que em populações de tamanho constante,

$P(\text{extinção}) = e^{-1}$ (aproximadamente 37%) para 1 geração. Como esse efeito é cumulativo, espera-se que, uma vez que apareça um mutante neutro em uma população, é mais provável que ele se perca do que se mantenha na população. Esse efeito independe do tamanho da população (Beebe & Rowe, 2004).

A segunda é a teoria de Kimura (1983) que se baseia na pressão de mutação e deriva genética. Com base nos princípios de mutação recorrente e em deriva genética, ele propôs que esses dois fenômenos seriam responsáveis pelos polimorfismos moleculares, que seriam fases transitórias do processo de substituição de nucleotídeos (Hartl, 2000).

Portanto, através do estudo de genética de populações é possível estabelecer a variação no tempo da frequência de um alelo surgido na população, por mutação ou recombinação. Também é possível estimar se, num período de tempo maior, uma característica ancestral será totalmente substituída por uma nova característica e, quanto tempo, esse processo de sucessão pode levar. Neste contexto, marcadores moleculares se tornam úteis no estudo de populações e os processos evolutivos que as afetam (Hilde, 2004). Em genética de populações assume-se que os locos utilizados para a investigação da estrutura populacional são neutros com relação à seleção natural. Quando isso é verdadeiro a diferença entre populações vai aparecer com o resultado da mutação ou deriva genética não viesada pelos efeitos complexos das forças evolutivas (Hartl & Clark, 1997).

A interpretação de dados genéticos é relativamente mais fácil se o neutralismo pode ser assumido do que quando a seleção tem que ser incluída nos cálculos. É de comum acordo que grandes partes do genoma evoluem de forma neutra. Isso se aplica a uma grande proporção do DNA nuclear não codificante e provavelmente à partes de genes funcionais. Mutações na terceira posição de um códon, por exemplo,

freqüentemente não alteram a seqüência de aminoácidos de uma proteína devido à redundância no código genético (Hedrick, 2001).

Outra pressuposição que é comumente feita, dentro da Genética de Populações, é que a quantidade de variação adaptativa deve correlacionar com a variação neutra. Isso é importante porque infere que estimativa da variação neutra deveria fornecer um útil indicador da saúde genética de uma população. Este tipo de correlação é comumente encontrado, apesar de que sua força aparentemente variar em diferentes situações (Hartl, 2000).

A teoria do neutralismo faz previsões sobre o comportamento dos genes nas populações. Talvez o mais simples seja que a diversidade genética em locos neutros deveria ser positivamente correlacionada com o tamanho efetivo populacional (N_e) que se refere ao número de indivíduos que efetivamente participam na reprodução em cada geração. N_e é mais importante como uma medida de viabilidade populacional do que o censo total da população, que inclui indivíduos que não possuem prole e é normalmente muito maior do que N_e (Frankham *et al.*, 2004). Um dos maiores interesses da genética da conservação é o tamanho efetivo populacional (N_e). N_e é um parâmetro crítico para a manutenção da diversidade genética. Muito da genética da conservação envolve a estimativa do N_e e do fluxo gênico entre populações, com a intenção de potencializar ambos nas populações (DeSale & Amato, 2004). Obviamente mais mutações vão ocorrer no total por unidade de tempo numa população maior comparada com uma menor. Mas, no equilíbrio entre mutação e deriva genética, a taxa de mutação é sempre igual à taxa na qual os alelos são perdidos pela deriva genética, o que independente do tamanho populacional (Beebee & Rowe, 2004).

Entretanto, o tempo médio entre mutação e fixação de novos alelos é proporcional ao tamanho populacional. Então dada a mesma taxa de mutação por indivíduo em pequenas ou grandes populações, cada novo alelo persistirá por mais

tempo e, assim, terá um número cumulativo menor de alelos a qualquer momento na população maior. Uma consequência desta conclusão é que raros alelos serão perdidos mais rapidamente numa pequena população do que numa grande população (Beebee & Rowe, 2004). Denotando, desta forma, a importância do tamanho populacional para a conservação da fauna e da flora.

Esse nível de conhecimento genético (estimativa de N_e e fluxo gênico) também pode ser aplicado para auxiliar em programas de reprodução em cativeiro. Onde análises são feitas a partir de informações com *pedigree* com o objetivo de aperfeiçoar esquemas de cruzamento para a manutenção da saúde genética por muitas gerações das populações em cativeiro (Fraser & Bernatchez, 2001).

O estreitamento de habitats tem levado a diminuição do número de indivíduos causando endogamia e perda da variabilidade genética, pois uma população de indivíduos que são fortemente aparentados exibe baixa variabilidade. Isso é perigosamente crítico se as condições ambientais sofrerem uma forte alteração e a população não tiver variabilidade suficiente para contrabalancear a mudança. Uma população com essas características pode rapidamente ser extinta (Beebee & Rowe, 2004). Problemas genéticos podem se tornar significantes, se as populações se tornarem muito pequenas e permanecem muito isoladas (ausência de migração) por muitas gerações. Neste caso a endogamia pode levar a perda de heterozigosidade e à acumulação de alelos deletérios (Wayne & Morin, 2004).

Endogamia e perda da diversidade genética são inevitáveis em pequenas populações ameaçadas. Esses dois eventos diminuem a reprodução e a sobrevivência *a priori* e diminuem a capacidade das populações de evoluírem em resposta às mudanças ambientais *a posteriori* (DeSale & Amato, 2004).

A probabilidade de a endogamia ocorrer em pequenas populações é maior, entretanto, a ação da seleção sobre os alelos deletérios os terá tornado raros ou

inexistentes. Essa remoção dos alelos nas populações é feita com eficiência quando se apresentam sob a forma de homozigotos (Neel & Cummings, 2003). Deste modo, podemos perceber que, apesar da endogamia possuir elevada taxa em pequenas populações, os efeitos da depressão na prole dos indivíduos será relativamente pequeno. Alelos deletérios podem ser gradualmente fixados pelo acaso (deriva genética) como se eles fossem neutros em pequenas populações. Novas mutações permitem alelos deste tipo acabem se acumulando e progressivamente aumentem a carga genética (declínio adaptativo de um determinado genótipo) quando populações permanecem pequenas por um longo período. Mutações deletérias infligem uma carga genética que age através da redução das taxas de sobrevivência e reprodução dos indivíduos (Crandall & Bininda-Emonds, 2000).

Quando falamos de conservação das espécies (tais como *Bothrops moojeni*) dados genéticos obtidos através de estudos com marcadores podem ser extremamente úteis, pois fornecem informações importantes para programas de manejo e conservação – como nível de endogamia – que nos permitem recomendar estratégias de amostragem para manutenção da variabilidade genética das espécies (Beebee & Rowe, 2004).

Neste sentido, os marcadores genéticos se tornam ferramentas úteis na identificação de populações nas quais se espera que questões genéticas afetem suas expectativas de sobrevivência continuada e permitem estudos a respeito da estrutura genética de indivíduos e populações para sua caracterização e preservação de recursos genéticos (Telles *et al.*, 2001; Telles *et al.*, 2003; Telles, 2005).

Antes de 1960, o uso de marcadores estava limitado a alguns organismos que se adequavam às metodologias existentes até então indisponíveis. Inicialmente os marcadores utilizados para estudos em genética de populações eram baseados em características morfológicas por serem facilmente caracterizáveis visualmente (Alfenas *et al.*, 1998).

Com o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase, novas classes de marcadores têm surgido (como AFLP, RAPD, Microsatélites), e têm sido cada vez mais utilizados em estudos de biologia molecular uma vez que, nos permitem conhecer o padrão de distribuição da variabilidade genética de populações e fazer inferências sobre os possíveis eventos históricos que as afetaram (Rousset, 2004).

A partir da estimativa desta variabilidade, é possível aplicar modelos de genética de populações e, desta forma, melhorar o conhecimento disponível á respeito de espécies ameaçadas de extinção; as afinidades e os limites entre as espécies, modos de reprodução e estrutura familiar; níveis de dispersão e migração entre as populações; o nível de endogamia dentro de uma população; inclusive pode auxiliar na identificação de restos animais; como no conteúdo estomacal e produtos industrializados de espécies em extinção (Perez-Sweeney *et al.*, 2004).

O marcador ideal seria aquele que tem um baixo custo financeiro, fácil de desenvolver e utilizar, altamente polimórfico e neutro com relação à seleção natural. No entanto, nenhum marcador preenche todos esses requisitos simultaneamente. Desta forma, uma escolha criteriosa desses marcadores, é essencial quando se pretende estudar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas ou até mesmo formular hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (Solferini & Scheepmaker, 2001).

Quando se pretende fazer uma caracterização de uma espécie é importante levar em conta diversos fatores, entre eles a escolha do marcador apropriado deve considerar, por exemplo: o tipo de estudo que se quer realizar, adequação do grau de variabilidade do marcador molecular escolhido e ao nível de divergência que se deseja estudar. O tipo e quantidade de material biológico disponível, se a espécie em estudo é rara ou não, alguns marcadores como as RFLP requerem grandes quantidades de DNA (Petit, 1998).

Se a intenção é fazer estudos de identificação de indivíduos, marcadores que evoluem lentamente podem ser inadequados por causa do excesso de plesiomorfias (ou seja, todas as semelhanças observadas serão devidas à ancestralidade dos alelos, e não haverá eventos novos capazes de discriminar os grupos estudados). Se a espécie em estudo está correndo risco de extinção, utilizar RFLP pode ser um inconveniente por causa da quantidade de DNA necessário. Se o marcador tem baixa especificidade, como o RAPD, ele se torna pouco eficaz para estudos filogenéticos. O mesmo acontecendo com marcadores que evoluem rapidamente como os microssatélites, pois ocorrerá um excesso de variabilidade e uma grande quantidade de homoplasias nos dados. Os marcadores disponíveis atualmente podem ser classificados de acordo com vários critérios, padrões de dominância, possibilidade de viés sexual (DNA mitocondrial, transmitido apenas pela fêmea), entre outros (Solé-Cava, 2001; Li, 2002). Nesse contexto, é importante ressaltar que o fundamental é a pré-definição do problema a ser estudado e, portanto, o marcador escolhido deve ser adequado ao tipo de divergência evolutiva considerada e que os pressupostos da análise dos dados estejam bem explicitados, minimizando assim as chances de se perder de vista o problema original do estudo (Sunnucks, 2000).

Assim, é possível perceber como a Genética Molecular tem trazido grandes contribuições para a genética de populações, bem como para a Genética da conservação. Pois, através da genética molecular obtêm-se informações importantes sobre espécies ameaçadas, tais como, tamanho efetivo populacional, fluxo gênico e gargalos populacionais (Cotrim & Pais, 1998). Hoje a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) permite estudos genéticos em espécies raras, de amostragem difícil, de forma não destrutiva e não invasiva. Isso é uma grande conquista visto que antes do desenvolvimento desta técnica, a amostragem destrutiva de indivíduos era frequentemente necessária para obtenção de material para estudos com DNA

mitocondrial, por exemplo, métodos moleculares permitem abordagens sobre a saúde genética das populações ameaçadas e dão suporte para novas maneiras de conservar a biodiversidade (Jäggi, 2000; Hedrick, 2001; Perez-Sweeney, 2004).

Neste contexto, torna-se claro, então como a perda da diversidade genética em populações de animais e plantas é extremamente perigosa podendo levar as espécies à extinção. É necessário que as populações naturais se mantenham num tamanho populacional suficientemente grande para reter diversidade genética e minimizar o seu risco de extinção. É necessário que se compreenda como a diversidade genética é mantida através dos processos naturais se quisermos que programas de conservação sejam desenvolvidos para a manutenção e manejo de populações de espécies ameaçadas (Myers *et al.*, 2000).

3.3. Caracterização da espécie *Bothrops moojeni*

Entre as serpentes que ocorrem nas Américas, o gênero *Bothrops* concentra algumas das principais espécies responsáveis por acidentes ofídicos, sendo o Brasil, o país que possui maior número de representantes deste gênero. No entanto, apesar do grande número de espécies de *Bothrops* na América Latina, do seu interesse na saúde pública e pelo enorme potencial no desenvolvimento de fármacos, pouco se conhece sobre elas e ainda hoje se carece de estudos para compreender melhor sua biologia (Colli *et al.* 2002; Nogueira *et al.*, 2003).

Por muito tempo houve grande contradição sobre quais espécies realmente faziam parte do gênero. Muitas espécies que claramente não faziam parte de nenhum outro gênero eram simplesmente acrescentadas no gênero *Bothrops* (Wüster, 1997). Um exemplo disso é o fato de várias das espécies arbóreas e de pequeno porte terem sido separadas em gêneros diferentes e estudos ainda são feitos para resolver problemas semelhantes na tentativa de definir melhor as espécies verdadeiramente pertencentes ao

gênero (Salomão *et al.*, 1999; Theakston & Warrel, 2002; Grazziotin & Echeverrigaray, 2005).

Segundo a classificação tradicional existem 38 espécies no gênero *Bothrops* e cerca de 20 delas se distribuem pelo Brasil. As espécies do gênero *Bothrops* ocorrem por toda a América Latina, exceto na parte sudoeste nas áreas da Patagônia e dos Andes. Esse gênero mostra uma grande variedade no tamanho, forma e preferências de habitat e as espécies brasileiras ilustram a grande variedade da morfologia e da história natural dentro deste gênero (Wüster, 2002; Melgarejo, 2003). Apesar de alguns de seus representantes estarem incluídos na lista brasileira oficial de répteis em extinção (Tabela 1), a espécie *B. moojeni* não se encontra entre eles (IBAMA, 2003).

Tabela 1. Serpentes na lista Oficial de Espécies ameaçadas de extinção (IBAMA 2003) que são criticamente ameaçadas (CR) ou ameaçadas (EN) de acordo com as categorias e critérios da *World Conservation Union* (IUCN) (Adaptado de Rodrigues, 2005).

Taxon	Estados	Categoria IUCN
<i>Bothrops alcatraz</i>	SP	CR
<i>Bothrops insularis</i>	SP	CR
<i>Corallus cropanii</i>	SP	CR
<i>Dipsas albifrons cavalleiroi</i>	SP	CR
<i>Bothrops pirajai</i>	BA	EN
<i>Bothrops cotiara</i>	PR, SC, RS	EN

A Caiçaca, *Bothrops moojeni* (Figura 2), faz parte da herpetofauna do Cerrado sendo classificada dentro da Ordem Squamata; Subordem Serpentes; Infraordem Alethinophidia; Superfamília Colubroidea; Série Ophistoglypha; Família Viperidae; Subfamília Crotalinae. É conhecida popularmente como jararacão, Caiçaca, jararacão do Cerrado (Colli *et al.* 2002). Normalmente apresenta cor mais clara que outras jararacas. O traçado do dorso pode formar triângulos ou arcos escuros negros, com margens brancas e vértice alcançando o fio das costas. Esta espécie possui ampla variedade na tonalidade numa mesma ninhada e apresenta fosseta loreal, sendo que a fêmea possui a

cauda mais curta que a do macho (Figura 2). Pode atingir um tamanho de até 1,50 m de comprimento (Borges & Araújo, 1998; Nogueira *et al.*, 2003). Observa-se que o ciclo reprodutivo da espécie é majoritariamente sazonal, e o nascimento de filhotes ocorre durante a estação chuvosa, durante o mês de dezembro. A vitelogênese inicia-se por volta de abril sendo comum encontrar ovos no oviduto de fêmeas no mês de julho. O ciclo reprodutivo está condicionado pela alta sazonalidade climática dos Cerrados do Brasil Central (Leloup 1984; Nogueira *et al.*, 2003).

Esta é uma espécie terrestre, utilizando comumente tocas no solo e cupinzeiros, mas também usa eventualmente a água e pode escalar a vegetação (Leloup, 1984; Nogueira *et al.*, 2003). Nogueira *et al.* (2003) observou que *B. moojeni* normalmente fica inativa e abrigada durante o dia, iniciando a atividade no fim do dia ou no início da noite e possui hábitos generalistas se alimentando principalmente de pequenos mamíferos (Figura 3), anfíbios, lagartos, serpentes e aves. Seus predadores naturais, bem como de outras serpentes, incluem gaviões, garças, ema, siriema, gambás, cachorro-do-mato, gato-do mato, cangambá e furão.



Figura 2. Exemplar da espécie *Bothrops moojeni* (Melgarejo, 2003)



Figura 3. Indivíduo se alimentando de um pequeno mamífero (UEB, 2006).

O padrão colorido de desenhos no dorso do corpo serve a esta espécie como mecanismo defensivo proporcionando a camuflagem. É uma serpente com o comportamento extremamente agressivo, podendo esconder a cabeça enrodilhada sob o corpo para protegê-la de uma mordida ou bicada. A imobilidade é outra estratégia que *B. moojeni* utiliza para se defender de predadores visualmente orientados. Quando o confronto com o predador é inevitável, mordida e bote são utilizados (Marques & Sazima, 2003).

Esta é uma espécie vivípara com um ciclo reprodutivo longo e sazonal (Melgarejo, 2003). Nogueira *et al.* (2003), num estudo sobre ecologia desta espécie, observaram que apenas metade das fêmeas numa população se reproduz a cada ano. Sendo o período de vitelogênese começa por volta de maio e no início da estação seca, com a ovulação ocorrendo por volta de julho. E os nascimentos ocorrem, em sua maioria, durante a estação chuvosa nos meses de dezembro e janeiro.

Esses mesmos autores, utilizaram dados de marcação e recaptura, observaram que essa espécie usa uma pequena área por um longo período de tempo. Também concluíram que esta espécie apresenta uma baixa mobilidade ao observar que poucos indivíduos eram capturados nas armadilhas (*pitfall*). Entretanto, Nogueira *et al.* (2003) alertam que seus dados eram limitados para fazer uma inferência consistente. Sendo que a atividade desta serpente normalmente é noturna e consideravelmente maior em meses quentes e úmidos (Oliveira e Martins, 2002; Nogueira, 2003; Campbell e Lamar, 2004).

Existe uma discrepância na literatura no que se refere à área de distribuição desta espécie. A maioria concorda que ela possui ampla distribuição nos cerrados do Brasil Central, ocorrendo desde o Paraná até o Maranhão (Figura 4) (Campbell & Lamar, 1989; Melgarejo, 2003; Nogueira *et al.*, 2003). Entretanto, alguns autores afirmam que esta espécie também ocorre em regiões da Argentina e Paraguai adjacentes aos Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná (Nogueira *et al.*, 2003; Campbell & Lamar, 2004). *Bothrops moojeni* demonstra preferência por áreas úmidas, ocorrendo em densidades altas, matas ciliares, campos úmidos e veredas no Brasil Central, usando áreas antrópicas vizinhas, o que demonstra grande versatilidade em se adaptar à áreas urbanizadas (Nogueira *et al.*, 2003).

Por serem predadores secundários indivíduos da espécie *B. moojeni* possuem papel de grande importância nas cadeias tróficas de diversos ambientes naturais e perturbados; (Martins *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2003; Sazima & Marques, 2003). Sua conservação é vital não só para a manutenção das serpentes em si, mas também do equilíbrio dos ecossistemas brasileiros de que fazem parte. Além de sua importância ecológica, existe registrado que o gênero *Bothrops* é responsável por cerca de 90% dos acidentes no Brasil (Araújo *et al.*, 2003). E observa-se que a maioria dos casos de envenenamento registrados nas regiões Sudeste e Centro-Oeste é causada pela espécie *B. moojeni*, por ser uma das mais abundantes (França & Málaque, 2003).

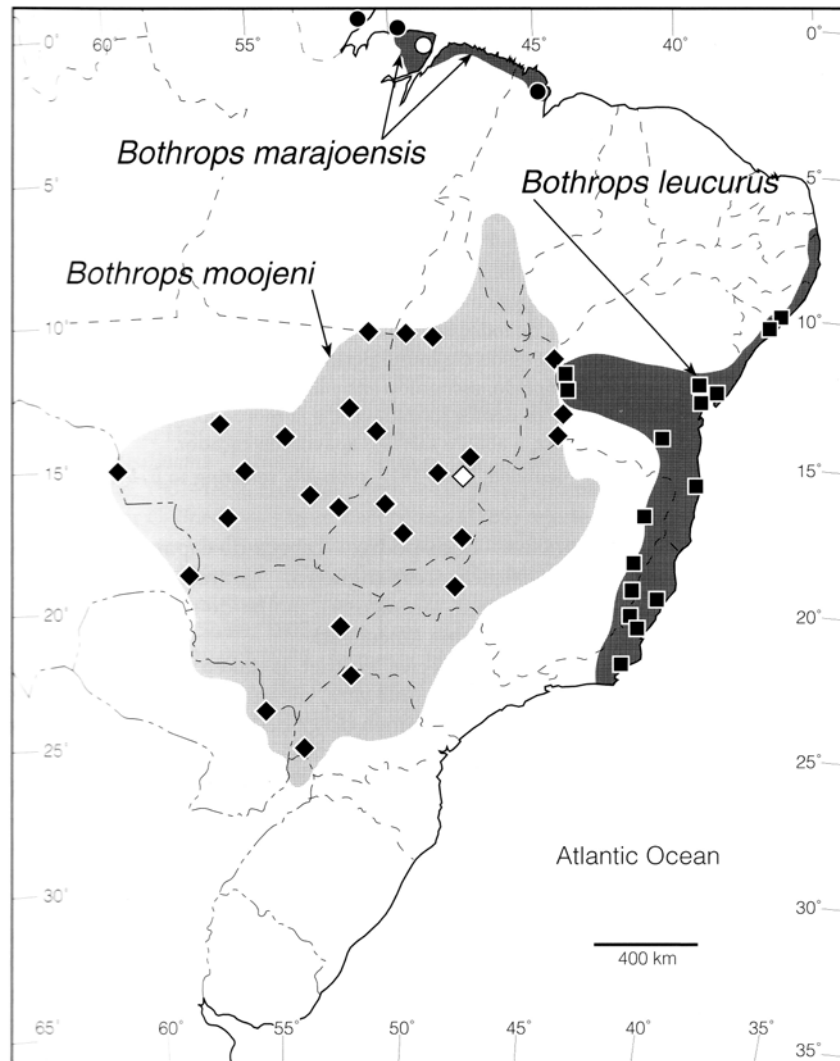


Figura 4. Distribuição geográfica da espécie *Bothrops moojeni* (Campbell & Lamar, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Descrição das populações

As cinco populações de *B. moojeni* coletadas apresentam um desequilíbrio amostral (Tabela 2) que variou de 7 (Goiânia -GO e Jataí- GO) à 33 (Sonora- MS). Vale a pena ressaltar que essas populações foram coletadas segundo a sua disponibilidade no NUROG (Núcleo de Ofiologia da UCG), portanto, um número maior de populações, bem como uma quantidade homogênea de indivíduos por população, não foi utilizado pela inviabilidade de se obter amostras.

As populações 3, 4 e 5 (Goiânia-GO, Jataí-GO e Minaçu-GO) foram amostradas a partir de indivíduos que eram encaminhados ao NUROG por pessoas da própria região que os capturavam. Em alguns casos eram trabalhadores rurais que haviam encontrado os espécimes e, em outros, indivíduos de *B. moojeni* haviam sido capturados dentro de moradias ou próximos a áreas urbanizadas.

Já as populações 1 e 2 (Sonora-MS e Canabrava-MT) possuem indivíduos provenientes de resgates de fauna, devido a construção de Hidroelétricas nos dois locais. Destruição de habitat é a principal ameaça à herpetofauna brasileira e a construção de hidroelétricas é uma ameaça a essas populações, uma vez que o habitat na área do reservatório é totalmente perdido. As conseqüências em longo prazo deste tipo de drástica transformação no ambiente, como alteração do ciclo de inundação natural e do fluxo a jusante, modificando a deposição de sedimento, disposição de nutrientes, ainda não são claramente conhecidos (Pavan, 2002; Rodrigues, 2005).

Dos indivíduos coletados em resgates de fauna, muitos são trazidos para fazer parte de coleções. Entretanto, devido ao custo e falta de espaço, a maioria que chega é fixada em formol. Grande parte dos animais capturados durante os resgates de fauna são soltos em florestas próximas, sendo que o impacto disso na ecologia e biologia das

populações das áreas adjacente pode ser negativo (Pavan, 2002). Portanto, as populações 1 e 2 representam amostras de populações que sofreram a destruição de seu habitat.

4.2.Obtenção dos dados moleculares

Foram obtidas amostras de sangue de 75 indivíduos coletados em cinco locais de ocorrência da espécie nos Estados de Mato Grosso do Sul (Sonora), Mato Grosso (Canabrava) e Goiás (Goiânia, Jataí e Minaçu) (Tabela 2, Figura 5) de acordo com a disponibilidade de exemplares no Núcleo de Ofiologia da Universidade Católica de Goiás (NUROG). O sangue desses indivíduos foi coletado da extremidade da cauda fazendo-se uma secção horizontal, em seguida cerca de 10 a 50 µl. O sangue era então colocado em um tubo *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA e transportado em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Genética e Melhoramento do Departamento de Zootecnia/ITS/UCG, onde eram conservadas a 4°C até ao momento da extração para evitar a coagulação do sangue e a degradação do DNA. As extrações de DNA eram realizadas no mesmo dia da coleta do sangue dos animais.

Tabela 2. Municípios, número de indivíduos (N), Latitude e longitude dos locais de coleta das populações de *Bothrops moojeni* do Centro-Oeste.

Cidade	N	Latitude	Longitude
1. Sonora (MS)	33	17°34'37''	54°45'28''
2. Canabrava (MT)	16	11°03'16''	51°49'53''
3. Goiânia (GO)	7	16°40'43''	49°15'14''
4. Jataí (GO)	7	17°52'53''	51°42'52''
5. Minaçu (GO)	12	13°31'59''	48°13'12''

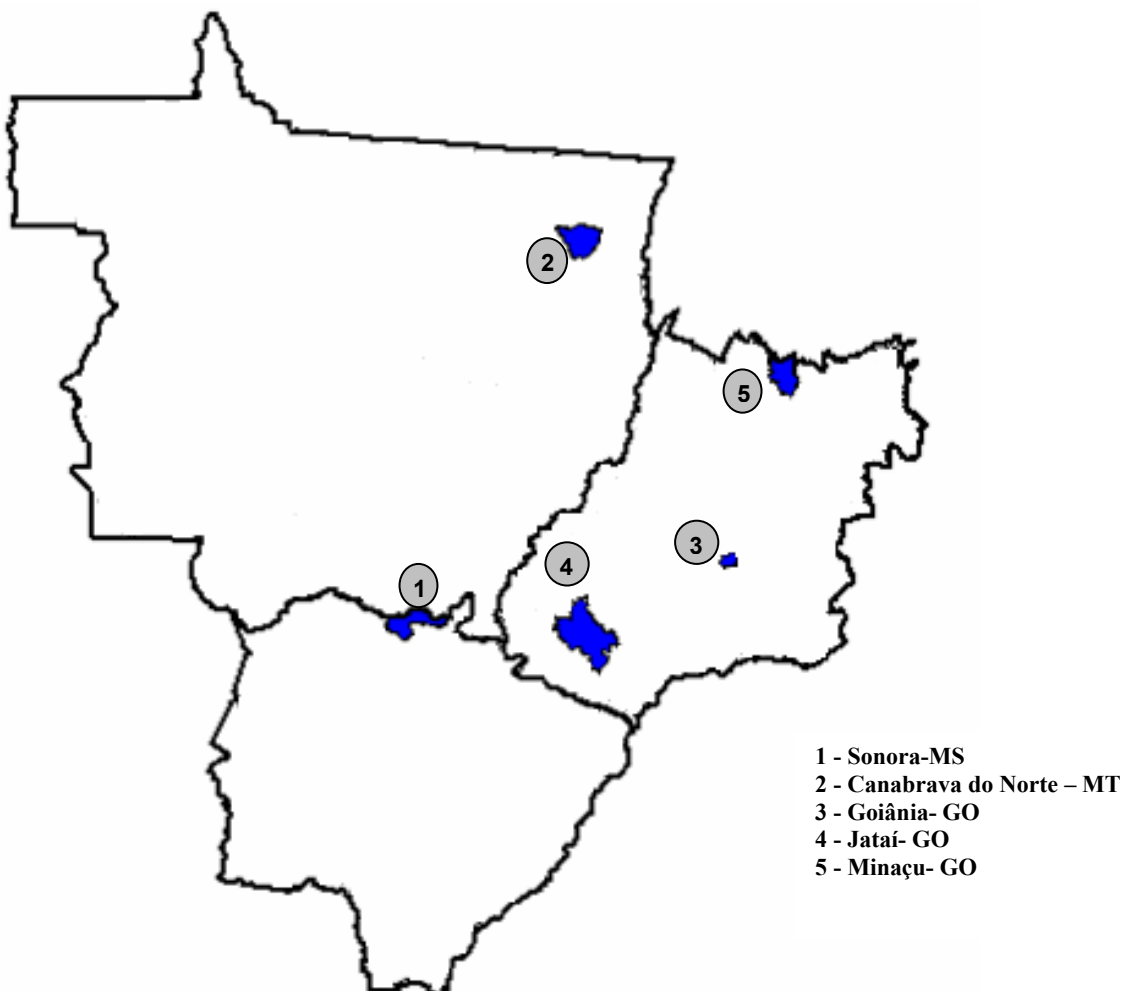


Figura 5. Pontos de coleta (municípios) das populações de *B. moojeni* na região Centro-Oeste.

O DNA foi extraído do sangue seguindo o protocolo do kit de purificação de DNA de sangue, fornecido pela *Amersham Pharmacia BiotechTM* (ANEXO). Esses 75 indivíduos pertenciam a cinco populações (número de indivíduos variando de 7 a 33 nas populações) do Cerrado distribuídas nos Estado de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Tabela 2). Após a extração, o DNA de cada indivíduo foi quantificado com o auxílio do fotodocumentador KODAK EDAS 120, utilizando o marcador *Low-DNA Mass*, fornecido pela Invitrogen.

Antes de iniciar a seleção dos *primers* RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) foi realizado um teste de amplificação utilizando apenas 9 *primers* das séries OPA (1, 2 e 3), OPB (1, 2 e 3), OPC (1, 2 e 3) para verificar a qualidade do DNA

extraído. A seleção dos *primers* RAPD foi, então, feita utilizando amostras de três indivíduos para a amplificação, via Reação em Cadeia da Polimerase, de 78 *primers* das séries OPA (1 a 16), OPB (1 a 20), OPM (1 a 20) e OPP (1 a 20) da marca *Operon*[®]. Cada gel da seleção de *primers* foi codificado considerando presença (1) ou ausência (0) da banda nas amostras e sua intensidade. As bandas eram classificadas quanto à intensidade, sendo elas, fraca (1), média (2) e forte (3). Em seguida foi feita uma média de intensidade por loco, para que fosse feita a escolha dos melhores *primers*.

As reações de PCR para um sistema com o volume final de 12 μ l foram montadas com as seguintes concentrações: 2 μ l de DNA (~3ng/ μ l); 1,18 μ l de *primer* (~10ng/ μ l); 1,52 μ l tampão da enzima (10X); 0,46 μ l de MgCl₂ (50mM); 1,22 μ l de d’NTP (2,5mM); 0,12 μ l da enzima Taq-Polimerase (cinco unidades/ μ l - fornecida pela *Amersham Pharmacia Biotech*[™]) e completando o volume com 5,5 μ l de H₂O *Milli-Q*.

A amplificação dos fragmentos de DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR), no termociclador PCT100 da MJ, foi feita utilizando um programa com os seguintes passos: (1^o) desnaturação do DNA a 96°C por 3 minutos e (2^o) a 92°C por 1 minuto; (3^o) anelamento do *primer* a 37°C por 1 minuto; extensão da molécula pela enzima *Taq polimerase* a 72°C por 1 minutos; (5^o) 40 ciclos seguindo do 2^o ao 4^o passo; (6^o) passo final de extensão de 3 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados.

Os fragmentos de DNA obtidos (bandas), para os 78 *primers* nos 3 indivíduos, foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5% submersos no tampão TBE (Tris Borato EDTA – 1X) e, em seguida, corados com brometo de etídio, visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados para as análises posteriores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os *primers* selecionados foram utilizados para a amplificação do DNA dos 75 indivíduos das cinco populações. Os fragmentos de DNA obtidos destes indivíduos (bandas) também foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5%

submersos em tampão TBE (Tris Borato EDTA – 1X) e, em seguida, corados com brometo de etídio, visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados para a codificação dos locos que foi feita segundo a presença (1) ou ausência (0) de bandas nos géis, gerando uma matriz de dados binários (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O marcador de peso molecular “100 *base pair ladder* – *Pharmacia*” (M 100bp) foi utilizado para a definição da posição dos locos e consequentemente dos tamanhos dos fragmentos de cada loco.

4.3. Análise dos dados

4.3.1. Estimativa de Frequências Alélicas e Parâmetros Genéticos Básicos

A partir da metodologia apresentada por Lynch & Milligan (1994) os dados binários gerados pelo marcador RAPD foram então usados para estimar as frequências alélicas. Lynch & Milligan (1994) desenvolveram uma metodologia que torna possível calcular parâmetros populacionais tendo como ponto de partida dados binários e tem dois pressupostos básicos. O primeiro exige que as bandas sejam identificadas no gel sem erros e cada banda pode ser relacionada a um loco com dois alelos, sendo que o carácter “dominante” (presença de bandas) do marcador impede a distinção entre os genótipos heterozigoto e homozigoto “dominante”. O segundo pressuposto é que as populações devem estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir desses pressupostos, a frequência do alelo “nulo” (ausência de bandas) \hat{q} , pode ser estimada por:

$$\hat{q} = \hat{x}^{1/2} \left(1 - \frac{Var(\hat{x})}{8\hat{x}^2} \right)^{-1},$$

onde \hat{x} é a proporção dos N indivíduos analisados na população que não apresentam banda para o locos, sendo $Var(\hat{x}) = \frac{\hat{x}(1-\hat{x})}{N}$.

Essa correção minimiza o viés na estimativa de “ q ” devido a tamanhos amostrais pequenos, mas pode ser grande se o alelo for raro ($x < 0,1$). Assim, Lynch & Milligan (1994) sugerem que o valor de \hat{q} seja obtido apenas para $x > 1-(3/N)$. As frequências alélicas foram, então, utilizadas para o cálculo das medidas de variabilidade para cada população, conforme sugerido por Alfenas *et al.* (1998) e Weir (1996).

4.3.2. Estrutura Genética Populacional

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) foi utilizada a fim de acessar o padrão da estruturação da variabilidade genética. Neste metodologia a distância entre e dentro de populações locais é desdobrada, a partir de uma estratégia semelhante à realizada na ANOVA convencional, mas parte de uma matriz de distância euclidiana calculada entre indivíduos com base no padrão de bandas visualizados no gel (presença e ausência das bandas) gerados pelo RAPD. O modelo matemático, apropriado para análise é dado por

$$X_{ij} = x + \alpha_i + \beta_{j(i)}$$

onde,

x = constante do modelo

α = é o efeito da população com variância σ_α^2 ,

β = é o efeito do indivíduo com variância σ_β^2 ,

Note-se que os efeitos são hierarquizados. A análise de variância obedece ao esquema da Tabela 3.

Tabela 3. Esperanças matemáticas dos quadrados médios [E(QM)] para populações (P), indivíduos dentro populações (I/P), conforme Excoffier *et al.* (1992).

Fonte de Variação	Grau de liberdade	SQ1	QM1	E(QM)
Populações (P)	P - 1	Sa	Qa	$\sigma_b^2 + 2\sigma_a^2$
Indivíduo (I)/P	N - P	Sb	Qb	σ_b^2
Total	N - 1	ST		

SQ = Soma dos Quadrados

QM = Quadrado Médio

E(QM) = Esperança dos Quadrados Médios

O componente de variância inter-populacional é extraído por equações das esperanças de quadrado médio (QMD), conforme a análise de variância convencional das frequências alélicas, utilizadas para estimar o F_{ST} (Cockerham 1969, 1973). O mesmo procedimento pode ser usado com base no desdobramento da soma de quadrado entre as distâncias, utilizando as chamadas estatísticas- Φ . Neste caso, $\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2$; Φ_{ST} é interpretado como a correlação de haplótipos aleatórios dentro de populações, relativo a cada par aleatório de haplótipos puxado do total da espécie. Como na ANOVA convencional, pode-se reescrever essas equações em termos das estatísticas Φ entre as populações locais, de modo que:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2},$$

Para obter uma distribuição nula dessas estatísticas, foram utilizados procedimentos de aleatorização, por permutações aleatórias das fileiras (e colunas correspondentes) da matriz de distâncias quadráticas (Mantel, 1967). Os componentes de variância foram estimados para cada uma das matrizes permutadas utilizando 1000 permutações.

4.3.3. Divergência genética e padrão espacial da variabilidade genética

A divergência genética entre as populações foi avaliada com base na matriz de distância genética obtida pela AMOVA, uma metodologia de análise desenvolvida para marcadores dominantes como o RAPD, que é a que apresenta um menor número de pressupostos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, tamanho amostral e padrão de herança do marcador. A matriz de distâncias genéticas foi utilizada em uma análise de agrupamento tipo UPGMA (*unweighted pair-group method by arithmetic averages*), que produz um arranjo hierárquico de classificação das populações, representado por um dendrograma. A representatividade deste dendrograma foi testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as populações no dendrograma (correlação cofenética) (Manly, 1997).

A fim de se analisar os padrões de variação espacial em um contexto multivariado, foi feita a estimativa do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as matrizes de distâncias genéticas e as distâncias geográficas entre as populações. O estimador do coeficiente de correlação simples (Epperson, 2003), no caso entre duas matrizes X e Y , é dado por:

$$r = \frac{\sum_{i,j=1}^n x_{ij}y_{ij}}{\sqrt{\sum_{i,j=1}^n x_{ij}^2 \sum_{i,j=1}^n y_{ij}^2}}$$

onde $x_{ij} = X_{ij} - \bar{X}$ e $y_{ij} = Y_{ij} - \bar{Y}$. A significância dessa correlação matricial não pode ser testada pelos testes estatísticos usuais, por apresentar problemas de independência entre os elementos nas matrizes. Nesse sentido, a estatística Z de Mantel (1967) tem sido frequentemente utilizada, a fim de se testar a significância da

associação entre matrizes contendo diferentes tipos de distâncias entre pares de observações (Smouse *et al.*, 1986; Manly 1997). O valor Z de Mantel é dado por:

$$Z = \sum_{i,j=1}^n X_{ij} Y_{ij}$$

onde X_{ij} e Y_{ij} são elementos das matrizes X e Y a serem comparadas (no caso, as matrizes de distância geográfica e genética, respectivamente). A significância do Z pode ser obtida comparando-se esse valor observado com valores de uma distribuição nula, construída recalculando-se os valores de Z diversas vezes, aleatorizando, em cada uma delas, a ordem dos elementos de uma das matrizes (Manly, 1997). A estatística Z possui uma relação monotônica com o r de Pearson calculado entre matrizes (correlação matricial), de modo que ela pode ser utilizada para testar a significância de r (Manly, 1986). Neste trabalho, 5000 permutações aleatórias foram utilizadas para se testar a significância das correlações matriciais.

4.3.4. Programas utilizados para as análises estatísticas

As estatísticas descritivas foram feitas no programa TFPGA 1.3 (*Tools For Population Genetic Analyses*) (Miller, 1997). As análises de divergência genética multivariadas (UPGMA) e o teste de Mantel foram realizados utilizando o pacote NTSYS 1.5 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989). Enquanto que, a Análise de Variância Molecular foi feita no programa ARLEQUIN (versão 2.000) (Schneider *et al.*, 2006).

4.4. Levantamento cienciométrico e bibliográfico

A fim de avaliar, utilizando uma abordagem cienciométrica, o número de trabalhos e a representatividade dos mesmos nas principais áreas das ciências, foi realizada uma busca dos estudos com espécies de serpentes e especificamente do gênero *Bothrops* e da espécie *Bothrops moojeni* no sítio “*Institute for Scientific Information*”

(ISI), utilizando o método “*General Search*” com as palavras-chaves: serpentes, *Bothrops* e *Bothrops moojeni*.

A importância da espécie para a área da saúde foi levantada a partir de uma revisão sistemática da literatura que disponibiliza trabalhos em livros-textos, sites na internet e periódicos científicos especializados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos *primers* RAPD

Do total de *primers* testados, 17 não amplificaram, 26 apresentaram um padrão de amplificação insatisfatório e 35 um padrão que permitiu sua codificação (Tabela 4). Para cada *primer* que apresentou um bom padrão de amplificação foi realizada a codificação do seus locos segundo a presença (1) ou ausência (0) da banda e quanto as suas intensidades, o que pode determinar diferentes níveis de dificuldade para sua codificação. A análise por *primer* forneceu um número de locos que variou de 1 a 17 e um número de locos polimórficos que variou de 0 a 10 (Tabela 4).

As bandas de cada loco dos 35 *primers* foram classificadas quanto às intensidades fraca, forte e variável em cada loco. Neste sentido, o número de bandas variou entre 0 e 11, 0 e 8, 0 e 13, respectivamente (Tabela 4). Também foram classificados quanto à visualização das bandas no gel, no que diz respeito à distância relativa entre uma banda em cada loco: grande (1), média (2) e pequena (3). Os *primers* foram escolhidos de acordo com o bom padrão de amplificação, a facilidade de codificação no gel e o número de locos que apresentassem consistência nas intensidades de bandas. Na figura 6 observa-se o padrão eletroforético de alguns *primers* utilizados na seleção.

Observou-se que o melhor *primer* é aquele que apresenta um número intermediário de locos com maior número de bandas fortes e que não apresentem uma pequena distância relativa entre as bandas. Levando em conta estes critérios, os *primers* considerados melhores foram: OPA-01, OPA-03, OPB-04, OPB-06, OPB-18, OPM-01, OPP-04, OPP-06, OPP-07, OPP-08, OPP-13, OPP-14, OPP-15, OPP-16 que estão destacados em negrito na Tabela 4.

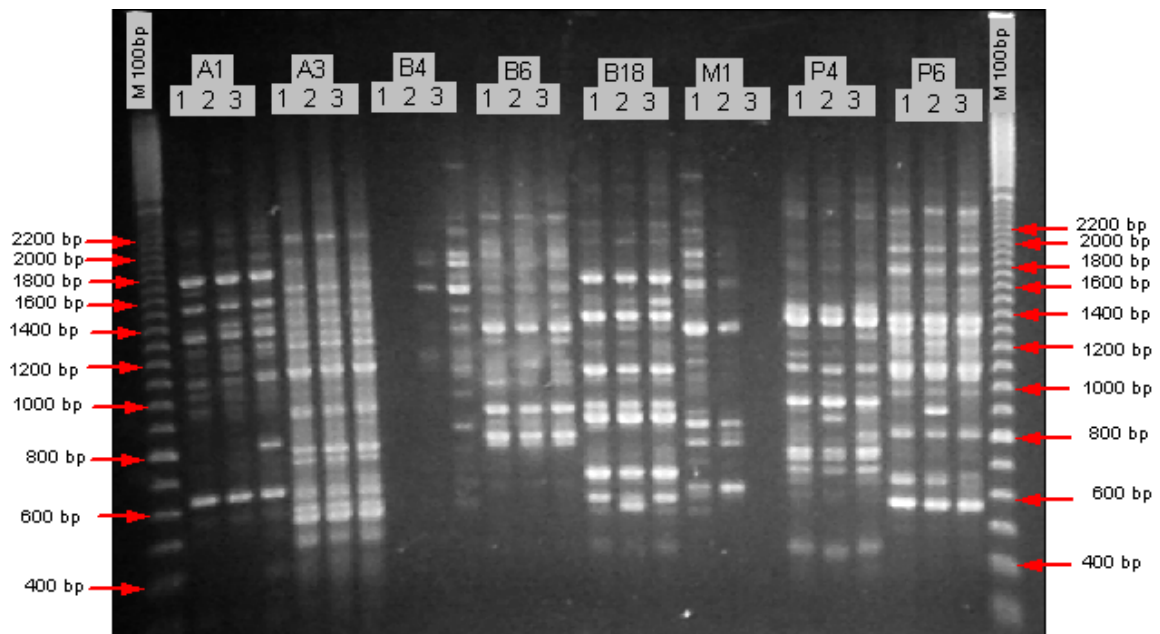


Figura 6. Padrão eletroforético dos *primers* OPA-01, OPA-03, OPB-04, OPB-06, OPB-18, OPM-01, OPP-04, OPP-06 com três indivíduos da espécie *Bothrops moojeni*. As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 *base pair ladder*).

Tabela 4. Relação dos 35 *primers* codificados e a classificação quanto às intensidades fraca, forte e variável em cada loco; número de locos, número de locos polimórficos por *primer*. As linhas em negrito indicam os *primers* selecionados.

N°	Primer	N° de locos	N° de locos polimórficos	Intensidade das bandas (%)		
				Fraco	Variável	Forte
1	OPA-01	9	6	0	0	100
2	OPA-03	11	3	0	0	100
3	OPM-01	5	0	100	0	0
4	OPM-03	4	3	0	0	100
5	OPC-01	13	7	0	0	100
6	OPC-02	12	0	0	0	100
7	OPB-01	3	2	33	0	67
8	OPB-04	13	7	85	15	0
9	OPB-05	4	0	100	0	0
10	OPB-06	9	1	44	0	56
11	OPB-07	7	0	71	29	0
12	OPB-08	1	0	100	0	0
13	OPB-10	7	0	100	0	0
14	OPB-12	2	0	0	0	100
15	OPB-13	1	0	100	0	0
16	OPB-15	4	0	100	0	0
17	OPB-17	5	0	80	0	20
18	OPB-18	8	1	0	0	100
19	OPP-01	9	8	89	0	11
20	OPP-02	9	5	78	0	22
21	OPP-04	7	1	14	86	0
22	OPP-05	1	0	100	0	0
23	OPP-06	11	5	27	18	55
24	OPP-07	12	9	58	33	8
25	OPP-08	9	5	0	67	33
26	OPP-09	6	1	50	0	50
27	OPP-10	3	0	100	0	0
28	OPP-12	3	0	0	100	0
29	OPP-13	6	0	33	0	67
30	OPP-14	14	10	21	57	21
31	OPP-15	17	4	41	18	41
32	OPP-16	14	1	79	14	7
33	OPP-17	4	2	50	0	50
34	OPP-18	4	2	50	50	0
35	OPP-19	6	2	50	50	0
Total		253	85	110	43	100

5.2. Caracterização da variabilidade dentro e entre populações

As cinco populações de *Bothrops moojeni* apresentaram uma baixa variabilidade genética, observada para os 5 *primers* de RAPD utilizados (ver APÊNDICE) nos 75 indivíduos analisados. Considerando cada *primer*, o número de locos variou entre 9 e 18, com um total de 59 locos nas cinco populações (Tabela 5). Nas figuras 7 e 8 observa-se o perfil de amplificação das amostras de DNA dos indivíduos das populações de Caiçaca (*Bothrops moojeni*), utilizando-se os *primers* OPP-04 e OPB-15, respectivamente.

Tabela 5. Relação dos *primers*, suas seqüências de bases e o número de locos (NL), obtidos nas cinco populações de *Bothrops moojeni*.

Primer	Seqüência	NL
OPB-18	C C A C A G C A G T	18
OPP-15	G G A A G C C A A C	9
OPP-16	C C A A G C T G C C	9
OPP-04	G T G T C T C A G G	11
OPP-06	G T G G G C T G A C	12
Total		59

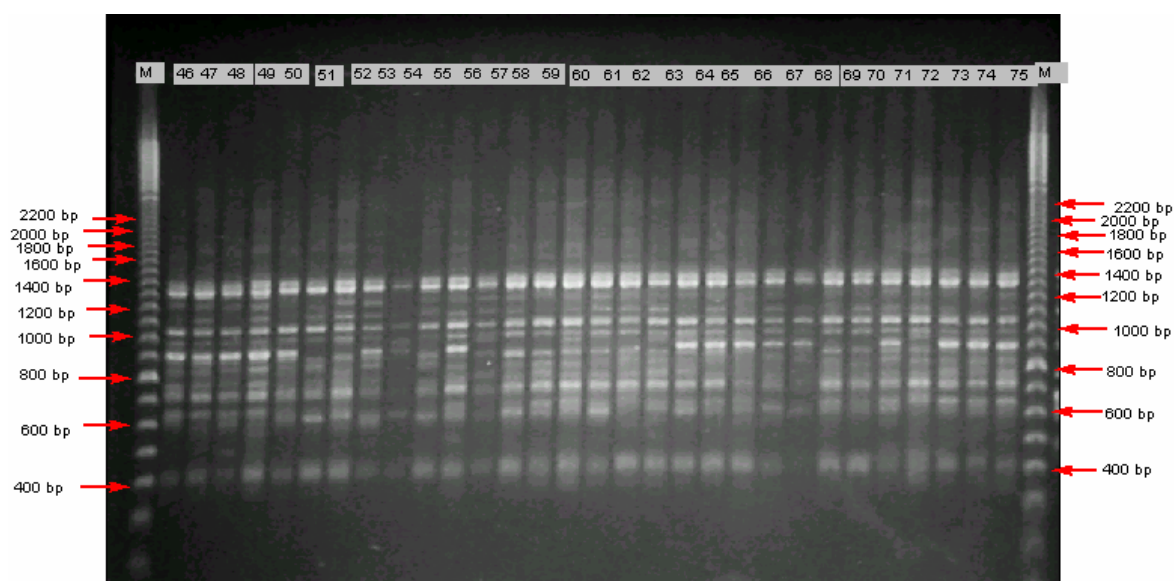


Figura 7. Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados utilizando o *primer* OPP-04 com indivíduos de *Bothrops moojeni*. As colunas M 100bp, indicam o marcador de peso molecular (100 *base pair ladder*, Pharmacia).

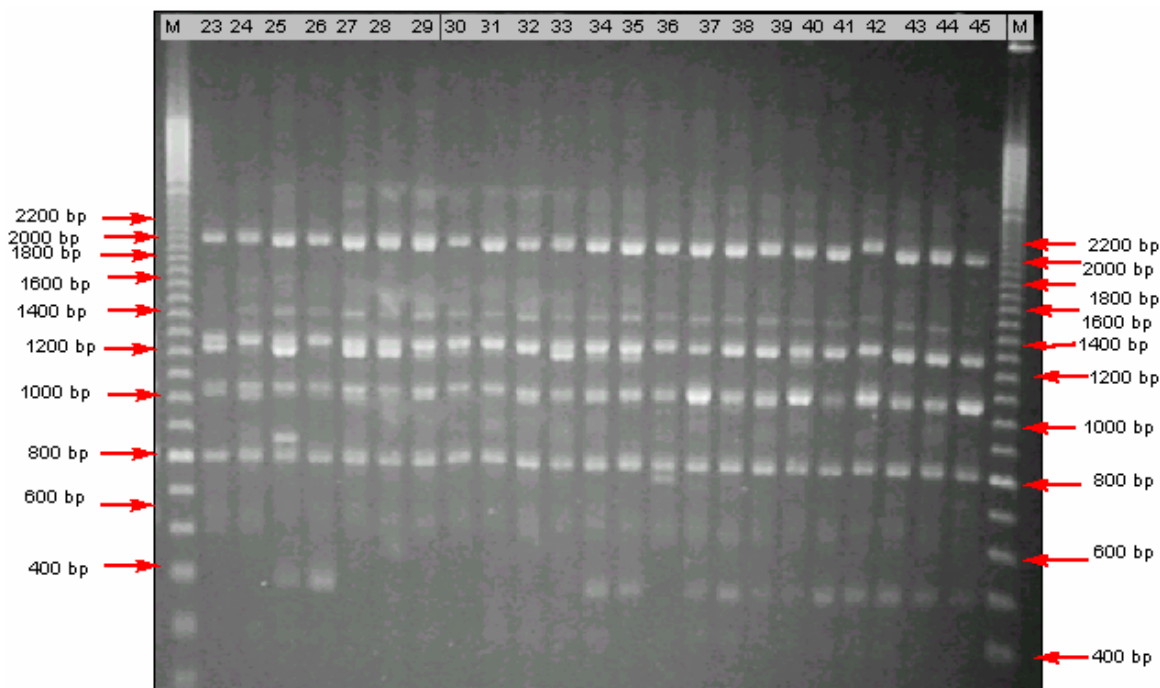


Figura 8. Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados utilizando o *primer* OPP-15 com indivíduos de *Bothrops moojeni*. As colunas M 100bp, indicam o marcador de peso molecular (100 *base pair ladder*, Pharmacia).

A proporção de locos polimórficos variou entre 35% e 69% nas populações, com um valor global de 81% (Tabela 6). A diversidade genética ou heterozigose esperada (Nei, 1973), quando se considera todos os locos simultaneamente nos 75 indivíduos variou entre 0 e 0,5 (Figura 9), mostrando que existem locos com muita diversidade e locos que já não a possuem, indicando haver um processo de perda de diversidade genética. Quando esta diversidade genética é analisada por população observou-se uma variação entre 0,11 e 0,17, com um valor global de 0,199 (Tabela 6). Como o valor máximo esperado da diversidade genética quando se analisa um loco com dois alelos (pressuposto do RAPD) é 0,5, pode-se concluir que de maneira global a diversidade em *B. moojeni* está baixa, pois 0,199 não equivale nem à metade do valor esperado.

Tabela 6. Variabilidade genética para 59 locos RAPD em 5 populações de *Bothrops moojeni* no Centro-Oeste; heterozigosidade esperada (He), tamanho populacional (N), número de locos polimórficos (NLP) e porcentagem de locos polimórficos (%LP).

População	He (Nei)	N	NLP	%LP
1. Sonora (MS)	0,1782	33	41	69,4915
2. Canabrava (MT)	0,1753	16	38	64,4068
3. Goiânia (GO)	0,1196	7	25	42,3729
4. Jataí (GO)	0,1028	7	21	35,5932
5. Minaçu (GO)	0,1612	12	33	55,9322
Geral	0,1997	15	48	81,3559

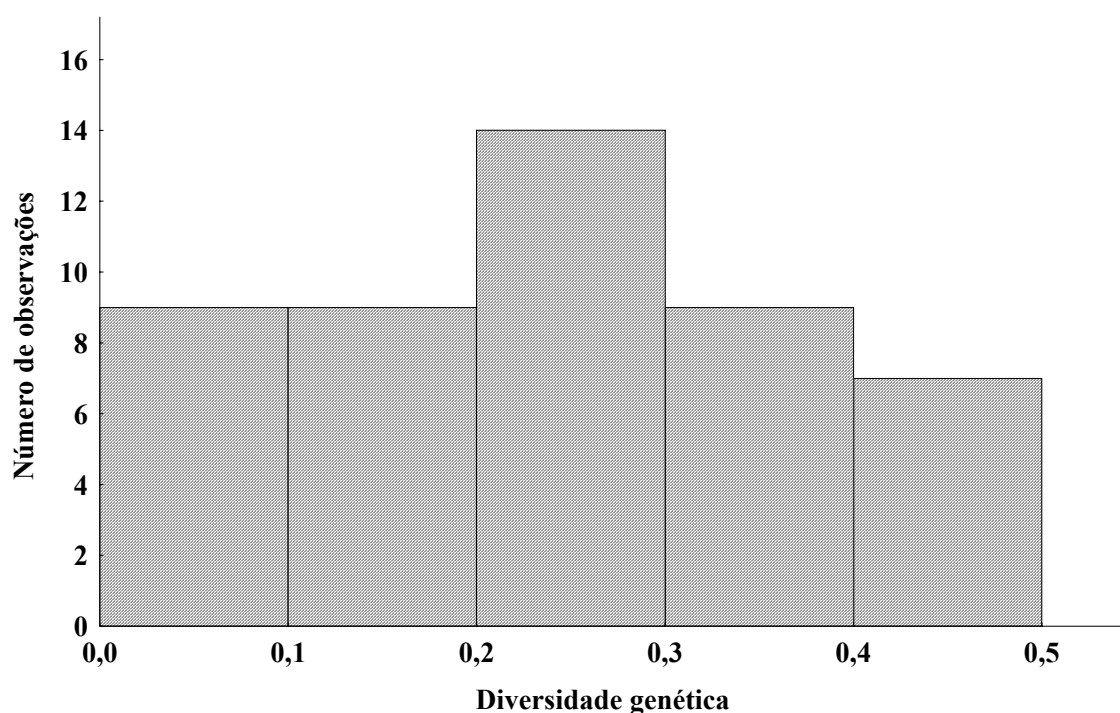


Figura 9. Distribuição dos valores de (He) dos 59 locos analisados nas populações de *Bothrops moojeni*.

O valor de diversidade encontrado em *B. moojeni* é 4 vezes maior do que o valor médio encontrado em outros 33 estudos que avaliaram a variabilidade de proteínas em serpentes (Prior *et al.*, 1997). Apenas dois estudos utilizando RAPD foram encontrados com outras serpentes (Tabela 7). Destes apenas um apresentou o valor de diversidade genética (He = 0,155) que também se mostrou baixo para a espécie *Elaphe obsoleta*

(Prior *et al.*, 1997). No entanto, este valor encontrado para *Elaphe obsoleta* é bastante semelhante ao encontrado neste estudo com *B. moojeni* (He = 0,199). Entretanto, quando se compara estes resultados com outros estudos utilizando outros marcadores moleculares percebe-se que o valor está bem abaixo da média que foi igual a 0,540 (Tabela 7). Embora este tipo de comparação deva ser realizado com muita cautela, pois a comparação está sendo feita entre diferentes estudos com diferentes espécies e marcadores, é o único parâmetro disponível na literatura, já que este é o primeiro trabalho que caracteriza a variabilidade genética em populações naturais de *B. moojeni*.

Tabela 7. Relação das referências dos 10 estudos de genética com serpentes, utilizando diferentes marcadores moleculares, medida de diversidade genética (He) e valor da estruturação da variabilidade genética (Estatística-F).

artigo	marcador	He	Estatística-F	Espécie	Referência
1	STR	0,538	0,024	<i>Thamnophis elegans</i>	Manier & Arnold, 2005
		0,588	0,035	<i>Thamnophis sirtalis</i>	
2	STR	0,75	-	<i>Natrix natrix</i>	Hille <i>et al.</i> , 2002
3	RAPD	-	0,13	<i>Vipera aspis</i>	Jaggi <i>et al.</i> , 2000
4	RAPD	0,155	0,26	<i>Elaphe obsoleta</i>	Prior <i>et al.</i> , 1997
5	isoenzimas	0,299	-	<i>Vipera berus</i>	Madsen <i>et al.</i> , 1996
6	isoenzimas	-	0,0543	<i>Thamnophis sirtalis</i>	Bittner & King, 2003
	STR	-	0,0367		
7	STR	0,714	0,006	<i>Nerodia sipedon sipedon</i>	Prosser <i>et al.</i> , 1999
8	STR	0,53	-	<i>Thamnophis sirtalis</i>	McCracken <i>et al.</i> , 1999
9	STR	0,705	-	<i>Sistrurus c. catenatus</i>	Gibbs <i>et al.</i> , 1997
10	isoenzimas	0,581	0,031	<i>Thamnophis sirtalis</i>	Lawson & King, 1996
média		0,54	0,072		

STR = *Short Tandem Repeats*

RAPD = *Random amplified Polimorphic DNA*

A análise de variância molecular (AMOVA) quando realizada considerando todos os locos mostrou que, de fato, existe uma estruturação na variabilidade genética destas populações, com um Φ_{ST} igual a 0,1369, significativo ao nível de 1% através de 10000 permutações aleatórias. Da diversidade genética total, cerca de 13% da variabilidade genética está “entre” as populações, enquanto que 86% da variação

encontra-se “dentro” das populações (Tabela 8), o que poderia indicar que já está ocorrendo uma redução na taxa de fluxo gênico entre as populações.

Tabela 8. Quadro de Análise de Variância Molecular para cinco populações de *Bothrops moojeni*, com base em 59 locos RAPD.

Fonte da Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componente da Variação	% da Variação
Entre populações	4	14	0,17335 Va	13,7
Dentro das populações	70	76	1,09207	86,3
Total	74	90	13	

Prior *et al.* (1997), trabalhando com quatro populações de *Elaphe obsoleta* e 15 locos RAPD, encontrou um valor de Φ_{ST} igual a 0,266, que comparado ao encontrado neste estudo com *B. moojeni* está alto. No entanto, quando se compara o valor encontrado para *B. moojeni* aos outros estudos com serpentes que apresentou uma média igual a 0,072 (Tabela 7), pode-se considerar que se trata de um considerável nível de estruturação, o que determina estratégias específicas para a conservação da variabilidade genética nesta espécie. Para fins de conservação *in situ*, na presença de elevados níveis de estruturação recomenda-se amostrar o maior número possível de populações, na tentativa de maximizar a variabilidade genética a ser preservada. Quando se pretende realizar coletas para a conservação *ex situ*, o mesmo raciocínio deve ser seguido amostrando indivíduos para a montagem do banco de germoplasma no maior número possível de populações.

O valor do Φ_{ST} , para os pares de população, variou entre 0,08 e 0,33, isso mostra uma heterogeneidade destes valores nessa escala espacial (Tabela 9). O agrupamento dessas distâncias reflete essa heterogeneidade. Considerando a escala geográfica em estudo (maior distância igual a 851,83 km – Tabela 10), algumas populações que estão próximas geograficamente apresentam uma considerável

divergência genética, como é o caso das populações Sonora-MS e Jataí-GO (343,38 Km); Minaçu-GO e Goiânia-GO (361,84 Km) com Φ_{ST} igual a 0,15 e Φ_{ST} igual a 0,11, respectivamente. Apesar de estarem mais próximas essas populações ocorrem em áreas predominantemente urbanizadas e quase completamente cobertas por monocultura e pastagens, isso poderia tornar restrito o movimento das serpentes, dificultando a possibilidade de fluxo gênico aumentando, desta maneira, a estruturação da variabilidade genética.

A estruturação genética entre Canabrava-MT e Sonora-MS (818,54 Km; Φ_{ST} = 0,08) se mostrou menor comparando com Sonora-MS e Jataí-GO (343,38; Φ_{ST} = 0,15). Apesar das distâncias geográfica e genética não estarem correlacionadas, os dados obtidos não se tornam inconsistentes se analisados à luz do padrão de degradação ambiental que ocorre no Centro-Oeste nas últimas décadas. Áreas de lavouras predominam na região do Estado de Goiás e Mato Grosso do Sul (Jataí e Sonora, respectivamente). Ao contrário da área correspondente ao Estado do Mato Grosso que é o menos afetado pelo cultivo e pastagens. Desta forma, as populações de Sonora-MS e Jataí-GO estão restritas à ilhas de vegetação, o que contribui sobremaneira para o isolamento das populações, tornando uma distância geográfica pequena praticamente intransponível. Entretanto, a maior área contínua de Cerrado se concentra entre as populações de Sonora-MS e Canabrava-MT. Isso possibilita o fluxo de indivíduos entre as duas áreas distantes mais de 800 km, justificando os valores de Φ_{ST} encontrados.

O processo de fragmentação proporciona a formação de “ilhas” de remanescentes que levam as populações à evoluir independentemente umas das outras, produzindo, desta forma, heterogeneidade espacial da variabilidade genética (alta estruturação) e ausência de padrão espacial na variabilidade genética (Sokal, 1986), como o que foi encontrado nestas populações de *B. moojeni* neste estudo.

Tabela 9. Valores de Φ_{ST} par a par entre as cinco populações de *Bothrops moojeni*, com base em locos RAPD.

	1. Sonora (MS)	2. Canabrava (MT)	3. Goiânia (GO)	4. Jataí (GO)	5. Minaçu (GO)
1. Sonora (MS)	0	0,08771	0,12307	0,15079	0,12691
2. Canabrava (MT)	0,08771	0	0,16343	0,33987	0,08403
3. Goiânia (GO)	0,12307	0,16343	0	0,09259	0,11998
4. Jataí (GO)	0,15079	0,33987	0,09259	0	0,25541
5. Minaçu (GO)	0,12691	0,08403	0,11998	0,25541	0

Tabela 10. Distância geográfica (km) entre as cinco populações de *Bothrops moojeni*.

	1. Sonora (MS)	2. Canabrava (MT)	3. Goiânia (GO)	4. Jataí (GO)	5. Minaçu (GO)
1. Sonora (MS)	0	818,54	605,15	343,38	851,83
2. Canabrava (MT)	818,54	0	671,73	739,37	454,7
3. Goiânia (GO)	605,15	671,73	0	290,99	361,84
4. Jataí (GO)	343,38	739,37	290,99	0	607,87
5. Minaçu (GO)	851,83	454,7	361,84	607,87	0

Em geral, grandes populações têm uma maior variação genética e, portanto, a probabilidade de depressão por endogamia vai diminuir. Os efeitos da depressão por endogamia são encontrados numa grande variedade de animais (Frankham *et al.*, 1996; Frankham *et al.*, 2003; Frankham *et al.*, 2004; Beebee & Rowe, 2004) e também em serpentes. Numa pequena e endogâmica população de *Vipera berus* na Suécia, as fêmeas possuíam uma prole de tamanho menor do que o esperado e uma taxa maior de recém nascidos com deformidades (Madsen *et al.*, 1996).

Újvári *et al.* (2002), utilizando dados provenientes de marcador do tipo RFLP avaliou e comparou a diversidade genética de pequenas populações da serpente *Vipera ursinii rakosiensis* da Hungria com grandes populações de *Vipera ursinii renardi* da Ucrânia. Nessas populações húngaras, severamente acometidas pelos efeitos da depressão por endogamia, observou-se reduzida variabilidade genética comparando-se com as serpentes Ucrânicas. Deste modo, pode-se perceber que um aumentado grau de

endogamia poderia afetar também *B. moojeni* de forma semelhante, tendo em vista que suas populações também estão ameaçadas pela destruição de seu habitat e conseqüente redução da variabilidade genética.

Na serpente *Notechis scutatus* com a ampliação do isolamento populacional, foi percebido um aumento no número de observações de anomalias nas escamas ventrais. Também foi observado um aumento na freqüência de indivíduos anômalos em populações suecas de *Vipera berus* amostrada em ilhas situadas bem distante do continente (Merilä *et al.*, 1992). Újvár *et al.* (2002) relatou casos de sérias anomalias nas escamas que comprometiam não só a movimentação, mas também a posição dos olhos nos indivíduos; ainda foram descritos diminuição do tamanho da prole e baixa taxa de sobrevivência. Esse tipo de anomalia nas escamas diminui a chance de sobrevivência, uma vez que é um fator de dificuldade na locomoção do animal, isso pode aumentar o risco de predação e diminuir a habilidade de caçar uma presa (Forsman *et al.*, 1994).

A fragmentação de habitat, a qual estão sujeitas as populações das diferentes espécies pode levar a um grau de isolamento nas populações que, por sua vez, também pode aumentar a estruturação, o isolamento, e a redução do tamanho das suas populações (Stow & Briscoe, 2005), podendo também causar uma depressão por endogamia em médio e longo prazo. No caso das populações de *B. moojeni* o isolamento atualmente observado, como conseqüência da degradação de seu habitat, pode se tornar um grande problema para esta espécie.

Em *B. moojeni*, não foram encontrados estudos abordando a presença de anomalias em populações selvagens. Existem relatos de anomalias como lipomas apenas em populações há muitos anos em cativeiro (Cassali *et al.*, 2004). Foi registrada, todavia, a infecção por trematódeos parasitas da cavidade oral e esôfago em uma população selvagem de *B. moojeni* proveniente de resgate de fauna em Porto Primavera

em São Paulo, depois da construção da Hidroelétrica de Sergio Motta (Barrela & Silva, 2003; Silva *et al.*, 2005). Neste caso, a presença de parasitas não teria relação com isolamento populacional ou depressão por endogamia (causada por uma redução de habitat), mas sim à drástica alteração ambiental e o estresse multi-fatorial aos quais os animais foram submetidos, que poderiam ter favorecido o ciclo dos parasitas. Apesar de não haver nenhum registro na literatura de anomalias resultantes de efeitos de isolamento populacional em indivíduos selvagens de *B. moojeni*, não é possível descartar que implicações semelhantes de isolamento populacional e depressão por endogamia poderiam acometer também indivíduos dessa espécie.

5.3. Divergência e padrão espacial da variabilidade genética

As distâncias genéticas quando agrupados pelo UPGMA mostraram uma correlação cofenética do agrupamento relativamente baixa (0,59), de modo que as ligações do dendrograma não refletem corretamente os padrões multivariados de distância genética (Figura 10). Essa correlação cofenética baixa é esperada para sistemas que não apresentam uma estruturação hierárquica muito clara (Rodrigues & Diniz-Filho, 1998).

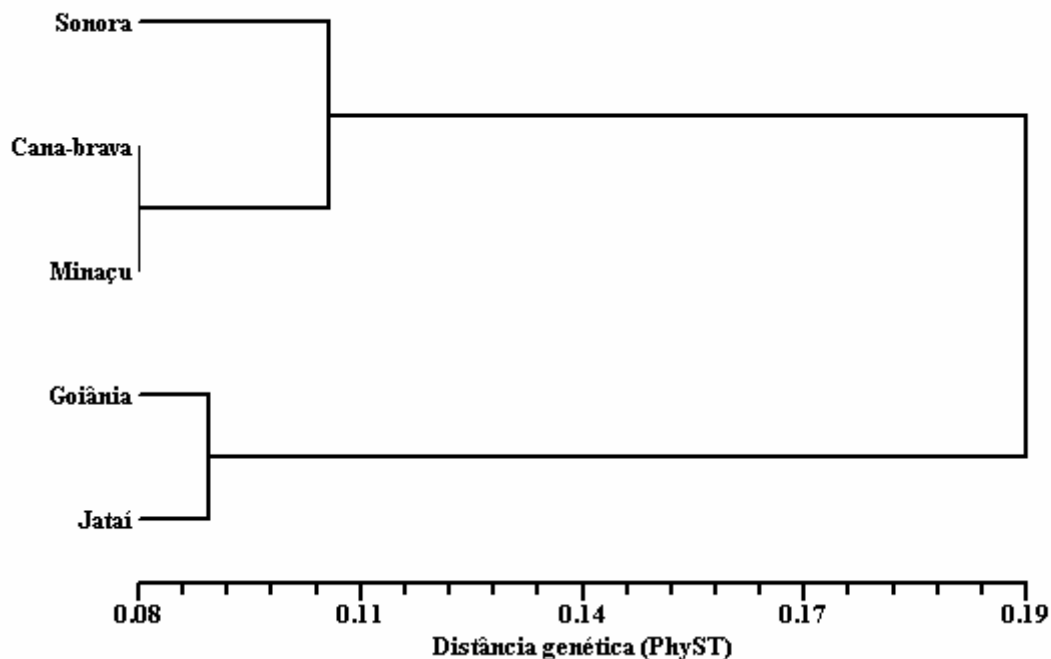


Figura 10. Padrão de divergência genética entre as 5 populações de *Bothrops moojeni*, definido pelo agrupamento por UPGMA, com base nas distâncias genéticas (Φ_{ST}). Correlação cofenética igual a 0,59.

Ainda no sentido de investigar o padrão espacial, o teste de mantel apresentou uma correlação matricial entre distância genética (Φ_{ST}) e geográfica igual a 0,294 ($P = 0,22$, com 5000 permutações) (Figura 11). Esses resultados mostram que, de fato, a distância geográfica sozinha não explica a heterogeneidade da variabilidade genética entre as populações de *B. moojeni*. Isso pode ser explicado pelo pequeno número de populações utilizado neste estudo, considerando que a área total distribuição da espécie não foi contemplada, necessitando, desta forma, um estudo em maior escala espacial para a confirmação deste padrão.

Todavia, outros estudos com serpentes, que amostraram populações por toda a área de ocorrência da espécie, também não puderam estabelecer uma forte correlação entre padrões de distribuição genético e espacial das espécies de serpentes *Sistrurus caetenatus* e *Vipera aspis* (Gibbs *et al.*, 1997; Jäggi *et al.*, 2000). Foi sugerido que, nessas populações, o processo de isolamento populacional começou num período

relativamente recente, para que se pudesse estabelecer uma relação clara entre as estruturas geográfica e genética. Isso também poderia ser utilizado para explicar a fraca correlação nas populações de *B. moojeni*, todavia, seria necessário um outro estudo mais abrangente para esse tipo de inferência seja feita com segurança.

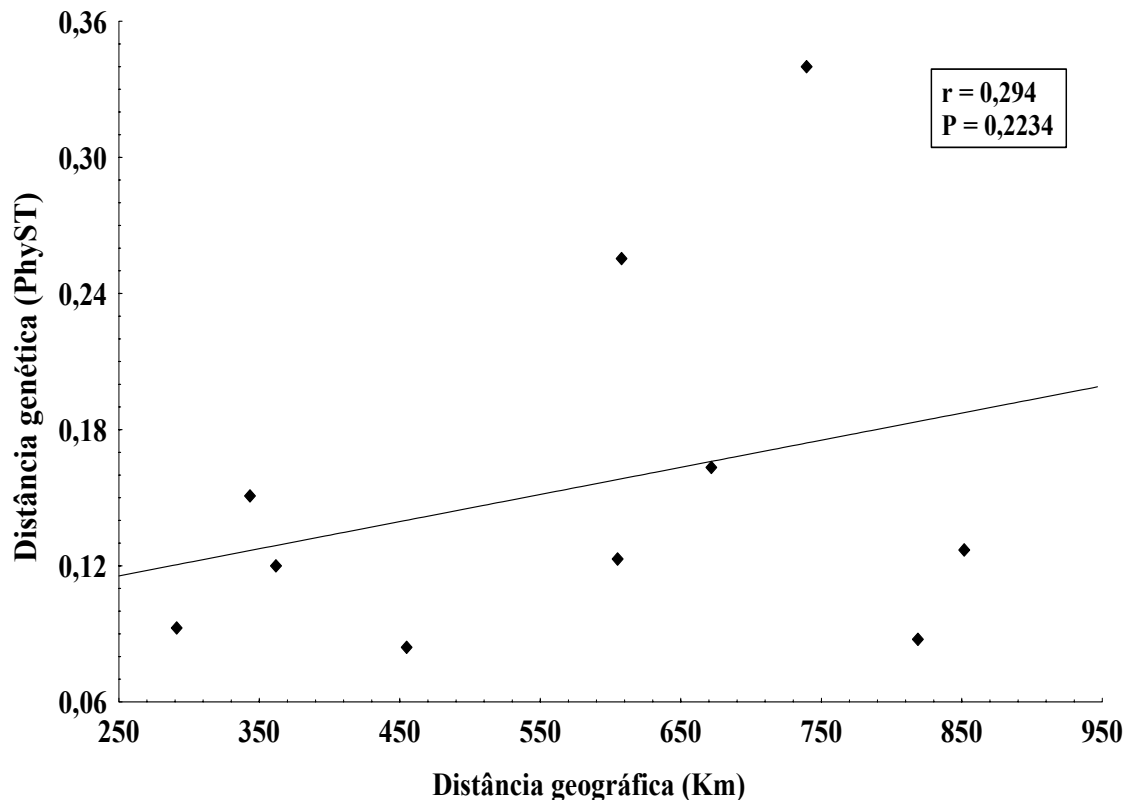


Figura 11. Relação entre as distâncias genéticas obtidas na AMOVA e as distâncias geográficas ($r = 0,294$; $P = 0,2234$ com 1000 permutações do teste de Mantel), para as cinco populações de Caiçaca.

5.4. Levantamento cienciométrico e bibliográfico do nível de conhecimento e da importância da espécie *B. moojeni* para a área da saúde.

A partir do resultado do levantamento cienciométrico no sítio “*Institute for Scientific Information*” (ISI), pôde-se perceber que quando a palavra utilizada na busca

foi “serpente” dos 869 artigos encontrados, 51% são oriundos da área de zoologia, sugerindo que ainda são básicos os conhecimentos acerca das espécies deste grupo de animais (Figura 12). Nesta mesma busca ainda é possível observar que apenas cerca de 9% dos artigos dizem respeito às áreas de genética e conservação da biodiversidade. É interessante ressaltar que este resultado diz respeito às serpentes do mundo todo.

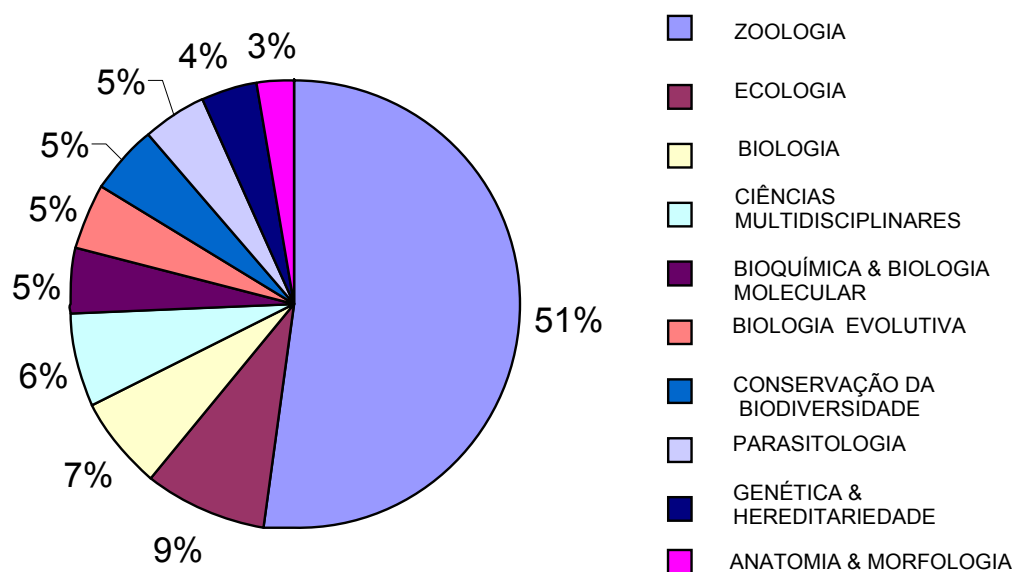


Figura 12. Porcentagem de artigos utilizando a palavra-chave “serpente” no sítio “*Institute for Scientific Information*” (ISI).

Quando se analisa o resultado da busca com a palavra-chave “*Bothrops*” foram encontrados 1429 artigos e o que se pode perceber é que a grande maioria destes é oriunda de pesquisas com aplicações na área da saúde que tais como Farmacologia & Farmácia (32%), Toxicologia (30%), Bioquímica & Biologia Molecular (25%), Biofísica (7%) e cerca de 6% dos artigos na área de zoologia (Figura 13).

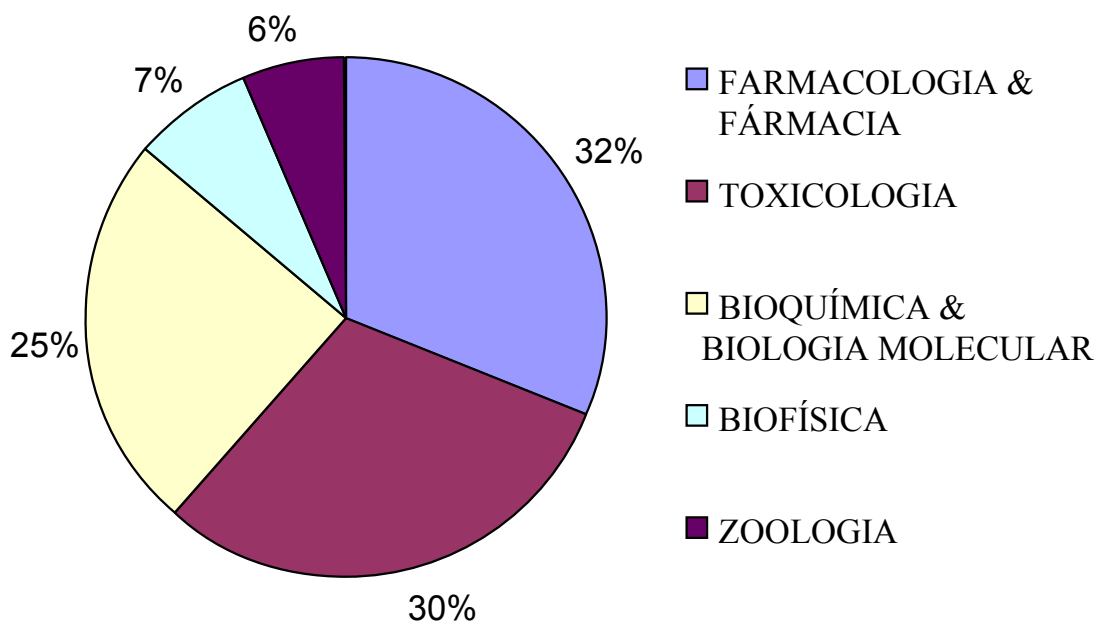


Figura 13. Porcentagem de artigos utilizando a palavra-chave “*Bothrops*” no sítio “*Institute for Scientific Information*” (ISI).

Infelizmente quando a busca foi realizada utilizando como palavra-chave o nome da espécie *B. moojeni* apenas 104 artigos foram encontrados. Semelhante ao resultado encontrado para os trabalhos com *Bothrops*, cerca de 65% se concentram nas áreas de Bioquímica & Biologia Molecular, Toxicologia e Farmacologia & Farmácia (Figura 14). O restante está praticamente com artigos nas áreas correlatas à saúde e cerca de 9% em zoologia. Da análise conjunta de toda esta busca percebe-se que a grande maioria dos estudos com serpentes estão sendo desenvolvidos nas áreas mais estritamente relacionadas à saúde, mostrando a importância de se investir tanto em estudos genético-populacionais quanto genético-evolutivos, fornecendo desta maneira mais informações para subsidiar, complementar e direcionar os trabalhos com aplicações mais imediatas na área da saúde.

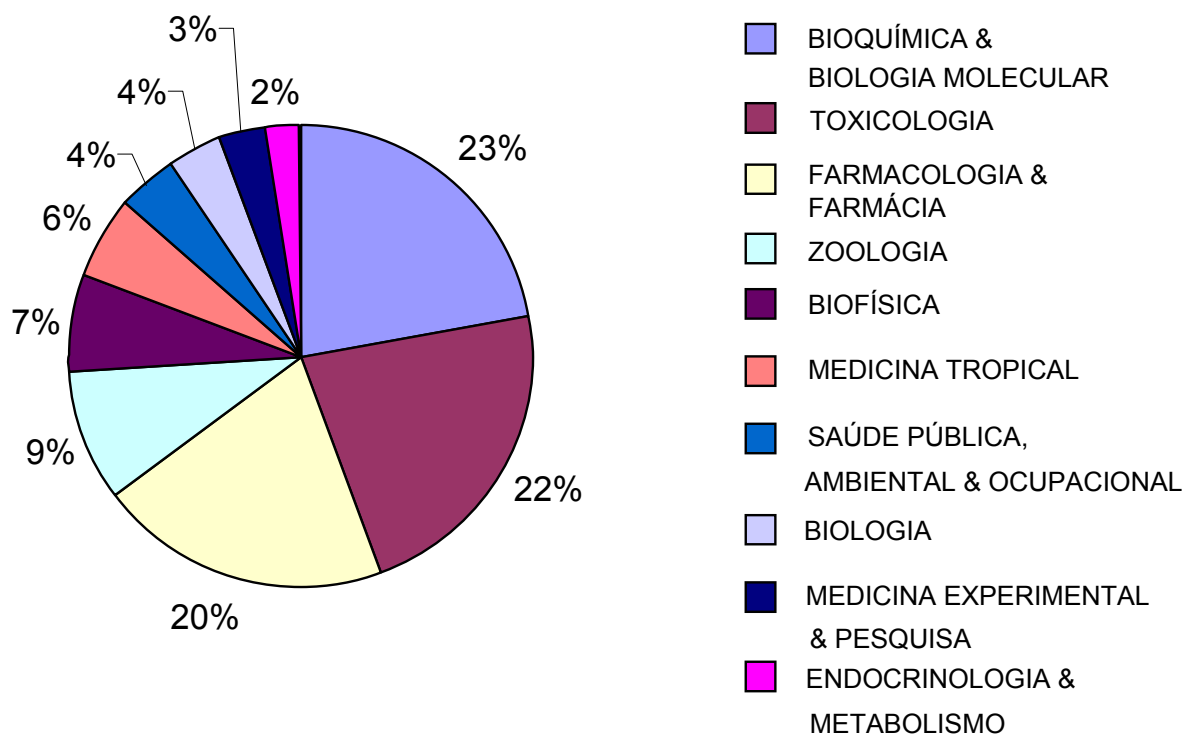


Figura 14. Porcentagem de artigos utilizando a palavra-chave “*Bothrops moojeni*” no sítio “*Institute for Scientific Information*” (ISI).

Tradicionalmente, a herpetofauna não costuma inspirar afinidade aos homens. E as serpentes não são uma exceção, apesar de seu papel importante na natureza, ao contribuírem para o controle de pequenos roedores que se reproduzem rapidamente, se alimentam das safras de grãos e são potencialmente transmissores de doenças (Marques & Sazima, 2003).

O trabalhador rural sempre foi, e continua sendo, registrado como a vítima mais freqüente dos acidentes ofídicos (Figura 15), e os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* ainda são os mais comuns, sempre aparecendo em maior porcentagem nos registros ao longo dos anos (Ribeiro & Jorge 1995; Araújo *et al.*, 2003; Bochner & Struchiner, 2003).



Figura 15. Lesão causada por picada de *Bothrops moojeni* (Lanzenotter, 2006).

Os acidentes com serpentes podem possuir diferentes níveis de gravidade, os quais são determinados por alguns fatores como peso, idade, estado de saúde geral do acidentado, local da picada e tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento (França & Málaque, 2003). Os acidentes botrópicos resultam em amputação de membros em 0,7% dos casos, e morte da pessoa picada em 0,3% dos casos (Araújo *et al.*, 2003). Percebe-se que a morte é rara, principalmente, se o tratamento com o soro específico é iniciado logo após a picada. Mas o dano local ao tecido pode ser severo e amputações de membros necrosados não é pouco comum quando ocorre a demora da aplicação do tratamento. O veneno dessa serpente pode ter um efeito tão violento que até mesmo funcionários do Butantan que receberam o soro dentro de minutos após a picada sofreram danos permanentes no tecido do membro atingido. Uma das características dos sintomas na ação do veneno de *Bothrops moojeni* é que ele varia de acordo com a idade dos animais. Picadas de espécimes juvenis tem mais chance de desencadear a não-coagulação do sangue do que dano local no tecido atingido pela

picada (que é característico de espécies adultas) (Wüster, 1997; França & Málaque, 2003).

O veneno de *B. moojeni*, bem como de outras serpentes do gênero *Bothrops*, possui diversas características que ainda não estão totalmente elucidadas, porém, sabe-se que este veneno pode causar edema, necrose, intensa dor no local da picada, intensa inflamação, equimose, contaminação bacteriana, formação de abscessos, acentuada mionecrose, ação proteolítica, hemorrágica e coagulante. Apesar de parecer contrastante, o veneno de *B. moojeni* possui esses dois tipos de atividades antagônicas. Sendo que sua atividade hemorrágica é devida principalmente a componentes específicos, chamados hemorraginas (que são metaloproteinases que contém zinco), elas são inibidoras da agregação plaquetária e degradam vários componentes da matriz extracelular. A atividade coagulante do veneno de *B. moojeni* foi observada *in vitro*, não possuindo efeito importante no acidente ofídico, apesar de seu potencial aplicação na saúde sob a forma da cola de fibrina, discutido adiante (Cardoso *et al.*, 2003; França & Málaque, 2003).

Boer-Lima *et al.* (2002) demonstraram que o veneno de *Bothrops moojeni* tem uma atividade direta nos rins de cobaias causando proteinúria e alterações estruturais no epitélio e em capilares. Isso explica as manifestações clínicas de dano renal depois de mordidas desta e de outras espécies do gênero *Bothrops*.

Alguns tratamentos preconizados pela sabedoria popular como extrato da planta *Casearia silvestris* tem demonstrado *in vitro* sucesso na neutralização de algumas das várias atividades biológicas do veneno de *B. moojeni*, como a indução de edema e também a inibição de miotoxinas presentes no veneno. Esses estudos são preliminares e ainda não mostram resultados que permita a sua utilização, sendo a soroterapia considerada o único tratamento eficaz para a neutralização da peçonha ofídica (Borges, 2001).

A soroterapia é utilizada em conjunto com outros tratamentos, como o uso de antibióticos para prevenir ou curar infecções bacterianas locais; também antiinflamatórios, para diminuição de reações inflamatórias; e diuréticos, para uma rápida eliminação do veneno, podem ser usados para auxiliar melhora do quadro clínico, jamais substituindo, entretanto, a utilização da soroterapia (Santos *et al.*, 2000; Amaral, 2003).

Tradicionalmente utiliza-se o cavalo para o processamento do soro, entretanto, diversos tipos de animais podem ser usados para a produção de soros antitoxinas (ovelhas, cabras, cães, coelhos, galinhas- onde os anticorpos são isolados da gema de ovo). O sucesso da neutralização de veneno animal depende principalmente da constituição do soro. Ele deve ser constituído pelos principais anticorpos contra as principais toxinas responsáveis pela ação sistêmica e local do veneno. Outro fator importante, é o isolamento e purificação das imunoglobulinas que constituem esse soro, devido, principalmente à reações de hipersensibilidade que podem ser observadas. Muitos métodos de purificação do veneno se baseiam em técnicas não seletivas, por exemplo, precipitação por sulfato de amônio (Figura 16). No entanto as metodologias ideais são aquelas que envolvem o isolamento das imunoglobulinas por método seletivo. Neste tipo de método ocorre a ligação das imunoglobulinas a resinas acopladas com proteínas bacterianas (proteína A ou G) que interagem de forma específica com moléculas de Imunoglobulinas. Nessa metodologia observa-se a diminuição da presença de proteínas heterólogas no soro, sendo estas relacionadas com a hipersensibilidade (Cardoso *et al.*, 2003).

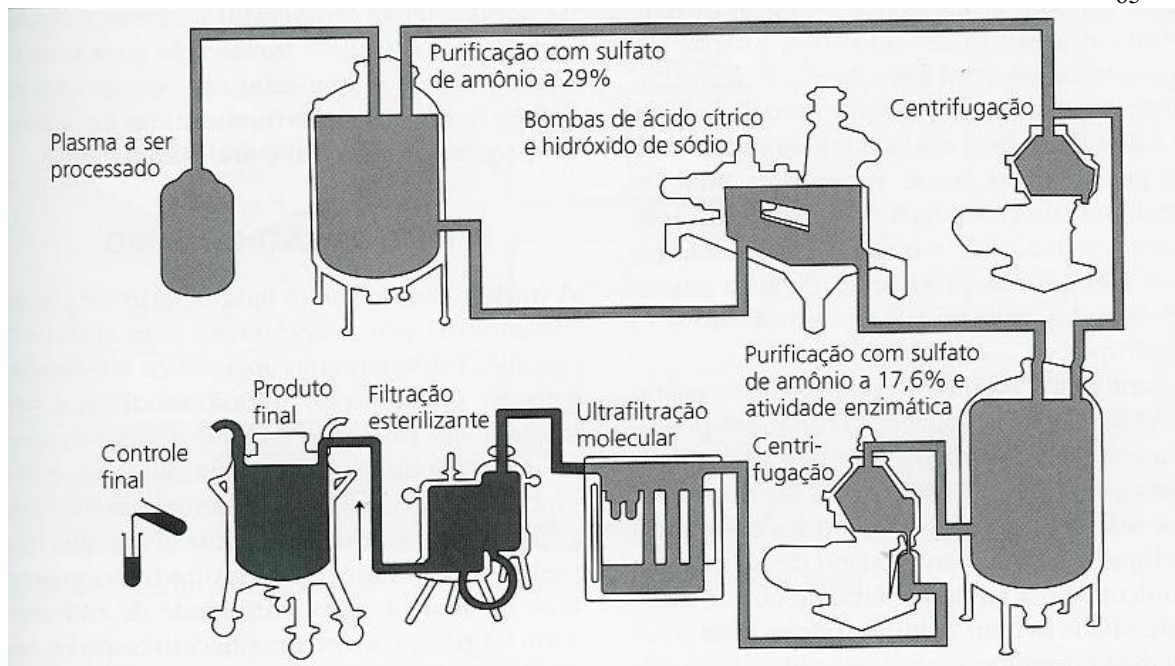


Figura 16. Planta de Fracionamento de soro antiofídico da produção de soro pelo Instituto Butantan (Cardoso *et al.*, 2003).

Outra técnica considerada mais eficiente é a cromatografia por alta afinidade. Essa técnica ocorre o isolamento do isotipo de imunoglobulina de cavalo - IgG(T)-predominante nos antivenenos de serpentes. Para a realização da técnica são utilizadas colunas cromatográficas, nelas, ocorre o acoplamento da resina com os anticorpos monoclonais anti-IgG(T) de cavalo (Cardoso *et al.*, 2003).

Silva *et al.*, (1989) estudaram o veneno de 10 serpentes do gênero *Bothrops* e são responsáveis pela composição atual do antígeno botrópico, uma mistura do veneno de cinco espécies de serpente deste gênero, sendo elas, *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. neuwidi* e *B. moojeni*. A proporção do veneno de cada uma é 50%, 12,5%, 12,5%, 12,5%, respectivamente.

O veneno de *Bothrops moojeni* (bem como de outras serpentes peçonhentas) é uma mistura complexa de proteínas com atividade biológica, possuindo grande interesse médico-científico e podendo ser utilizado como modelo para o desenho de novos fármacos de aplicação na saúde (Marcussi, 2003).

A miotoxina II (Figura 17) é uma miotoxina do tipo fosfolipase A2 (atuando catalisando fosfolípidos) isolada do veneno de *Bothrops moojeni*, foi caracterizada funcional e estruturalmente. A sua caracterização funcional revelou seus efeitos antitumorais, antimicrobianos e antiparasitários. Esse estudo também demonstrou que a miotoxina II de *B. moojeni* apresenta atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (*Escherichia coli* e *Candida albicans*), atividade antitumoral contra o tumor ascítico de Erlich (uma hiperplasia prostática benigna), adenocarcinoma de mama, leucemia de células T e efeitos antiparasitários contra *Schistosoma mansoni* e *Leishmania* spp., o que faz da miotoxina II um promissor modelo molecular de futuras aplicações terapêuticas desta proteína multifuncional ou peptídeos derivados. Existem indícios da presença de sítios catalíticos diferentes daqueles descritos até hoje, o que acenaria para um ainda maior número de possíveis aplicações na saúde (Marcussi, 2003; Stábeli, 2006).

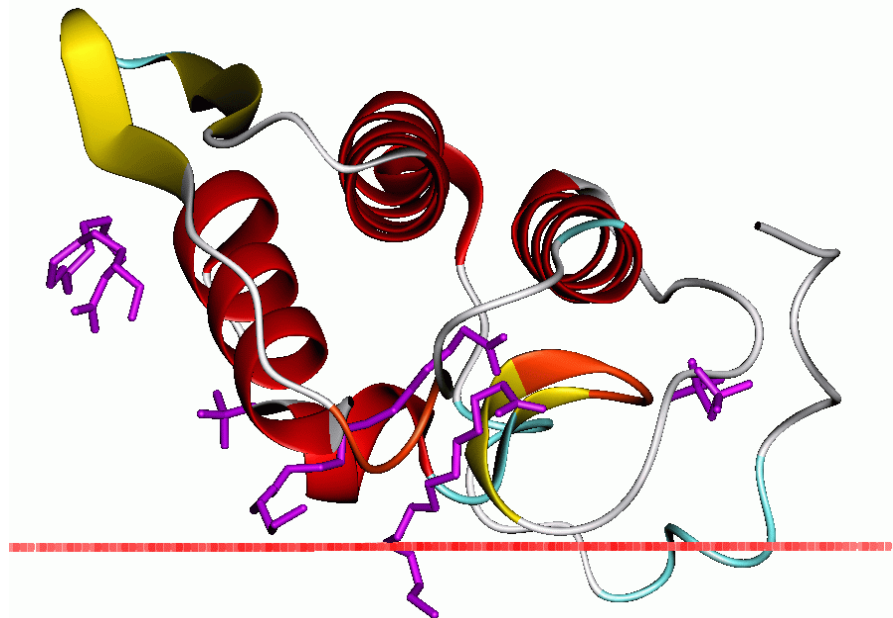


Figura 17. Estrutura terciária da Miotoxina II isolada do veneno de *Bothrops moojeni* (Watanabe *et al.* 2005).

Outro tipo de enzima também isolada e que compõe o veneno de *Bothrops moojeni* é a enzima L-aminoácido oxidase que participa do envenenamento atuando sobre plaquetas, induzindo citotoxicidade e apoptose celular. Isolada e purificada ela apresenta atividades coagulante; edematogênica; hemorrágica; proteolítica sobre fibrinogênio, bactericida sobre *Escherichia coli* e antiparasitária sobre diferentes espécies de *Leishmania*, demonstrando o potencial para o desenvolvimento de fármacos (Marcussi *et al.*, 2003).

Outra enzima que foi purificada e caracterizada do veneno de *B. moojeni* é a Trombin-Like (BthT1). Essa enzima age de maneira similar à trombina, proteína humana que atua na coagulação do sangue, tendo potencial ação clínica na prevenção e no tratamento de doenças vasculares como infarto, derrame cerebral e trombose. Essa enzima teria utilidade em transplantes de órgãos e cirurgias vasculares, pois melhora a circulação sanguínea e previne a formação de novos coágulos na superfície desses órgãos (Oliveira, 2001). Uma outra possível utilização dessa enzima seria na suturação em cirurgias. A chamada cola de fibrina vem sendo estudada há alguns anos por suas potencialidades de uso na medicina (Thompson & Letassy, 1988). Geralmente, ela é composta por duas soluções separadas de fibrinogênio e trombina. Quando misturados, esses componentes imitam os últimos estágios de coagulação para formar um coágulo de fibrina. A cola de fibrina já está disponível na Europa, mas não é comercializada nos Estados Unidos. Ela pode ser aplicada via seringa ou por aspersão e tem sido utilizada numa grande variedade de procedimentos cirúrgicos, sua utilização é bastante útil em pacientes que receberam heparina e requerem circulação extra corporal, o principal problema é a transmissão de doenças através do doador do sangue. O modo mais seguro é preparar a fibrina com o sangue do próprio paciente para preparar a cola de fibrina. De modo geral, é bastante útil para o controle de sangramento em pacientes que vão se

submeter à procedimento cirúrgico (Narakas, 1988; Caldas Neto *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003).

A partir da verificação da atividade coagulante *in vitro*, tornou-se viável a possibilidade da produção da “cola de fibrina”, derivada do veneno de *B. moojeni*. Essa cola de fibrina, geralmente utiliza como componente a trombina humana. No organismo, a trombina entra em contato com o fibrinogênio, proteína inativa do plasma, responsável pela coagulação do sangue. A trombina ativa essa proteína, que se transforma em fibrina. A combinação da trombina com o fibrinogênio plasmático dá origem a uma espécie de coágulo (fibrina) na região onde ocorreu a lesão ou onde foi fechada a cirurgia, resultando na cicatrização. O maior benefício de sua utilização em relação aos métodos clássicos de suturação é o poder aumentado de coagulação, evitando excessivas perdas de sangue. A “cola de fibrina” também impede a formação de marcas ou cicatrizes no local da lesão. Outra vantagem da cola é não ser necessário retirar os pontos, pois o organismo reabsorve essa substância. Ainda não existem dados publicados a cerca da cola de fibrina proveniente de *B. moojeni*, apenas informações no site do Jornal de Uberlândia e notas publicadas no site do Renctas.

Dados referentes à relatórios do Instituto Butantan ilustram como a atividade humana tem causado um grande impacto nas populações de serpentes. Há algumas décadas já se vem percebendo uma inversão no número de espécies peçonhentas e não peçonhentas nas áreas agrícolas. Das serpentes recebidas pelo Instituto Butantan no período de 1901 até 1977, 817.681 eram peçonhentos, e 281.587 eram não peçonhentos (Bochner & Struchiner, 2003; Melgarejo, 2003). A proporção que se espera entre serpentes não peçonhentas e peçonhentas seria de 4:1 a 5:1, ou seja a proporção observada foi quase o inverso do esperado (3 venenosas para 1 não venenosa). A caissaca (*B. moojeni*) foi recebida em número de 1,6% do total no primeiro período (1901-1977), contra 4,4% no segundo (1994-1995). Isso vem a corroborar a teoria de

que esta espécie possui uma grande habilidade de se adaptar aumentado, deste modo, o número de suas populações (Melgarejo, 2003).

Como a maioria dos espécimes recebidos pelo Instituto Butantan originam-se de áreas agrícolas, o aumento do número de serpentes venenosas se deve, principalmente, à maior quantidade de alimento disponível. Serpentes venenosas se alimentam de roedores considerados pragas nas áreas agrícolas, sendo, portanto, sua quantidade bem maior nessas áreas do que em matas. Os viperídeos, que agrupam a grande maioria das serpentes venenosas, alimentam-se de roedores, o que pode explicar o fato apresentado (Melgarejo, 2003).

5.5. Implicações e sugestões para a conservação da espécie *Bothrops moojeni*

Os resultados do presente trabalho demonstram que a diversidade genética dessas populações é baixa para uma espécie que é considerada abundante na região do Cerrado, denotando a importância de estratégias de manejo e conservação para *B. moojeni*. Uma parte considerável da diversidade se encontra dentro das populações que apresentaram também um considerável nível de isolamento. Esta é uma espécie de serpente que utiliza pequenas áreas por um longo período de tempo e apresenta baixa mobilidade. Esse comportamento justificaria o nível de isolamento encontrado entre várias das populações estudadas neste trabalho.

Dentro deste contexto, percebe-se que a extinção da população de Minaçu (He = 0,16) seria uma importante perda da diversidade genética dessa espécie no Estado de Goiás. Neste Estado, a baixa estruturação genética entre as populações do estado de Goiás Goiânia e Jataí, pode ser considerada como uma evidência de que deslocar indivíduos entre essas populações pode ser uma alternativa para aumentar a viabilidade de uma população com o menor nível de diversidade encontrado e, portanto, muito vulnerável à extinção.

No entanto, estudos neste sentido devem ser realizados com *B. moojeni*, pois em algumas espécies a introdução de indivíduos oriundos de outras populações não é bem sucedida. Como os dados aqui apresentados se baseiam em marcadores genéticos em regiões do genoma consideradas neutras do ponto de vista evolutivo, esse tipo de inferência deve ser feito com cautela, uma vez que outras porções do genoma de *B. moojeni* podem ser altamente diferenciadas. Desta forma, mesclar essas populações poderia causar depressão por exogamia. Entretanto, Madsen *et al.* (1999) tiveram sucesso em restaurar a variabilidade genética de uma população da serpente *Vipera berus*, através da introdução de novos indivíduos (provenientes de população grande e geneticamente variável) tendo como base dados genéticos gerados por marcadores RFLP, mostrando a importância de estudos de caracterização da variabilidade genética na conservação das espécies.

A baixa divergência genética entre Jataí e Goiânia, no Estado de Goiás, mostra que a extinção de uma das duas populações não implicaria numa grande perda de diversidade genética para a espécie no Estado de Goiás, mas a extinção de ambas seria altamente prejudicial. Levando em conta que muitas vezes a decisão de escolher entre determinadas áreas a serem conservadas é necessária, este é um dado importante. É de comum acordo que populações que estão isoladas ou localizadas periféricamente na área de distribuição de uma espécie deveriam apresentar reduzida heterozigosidade exatamente pela impossibilidade de fluxo gênico nessas populações isoladas ou situadas periféricamente (Frankham *et al.*, 2004). No entanto, este estudo mostra que isso não é verdadeiro para a população de Canabrava-MT que se localiza no limite noroeste da distribuição da espécie e apresentou a maior diversidade genética para os locos RAPD analisados. Esse resultado concorda com Dessauer *et al.* (1987) que estudando populações da serpente *Tamnophis ssp.*, também não encontrou baixos níveis de diversidade para populações situadas na periferia da distribuição da espécie.

Apesar do nível de Heterozigosidade das populações de Canabrava-MT e Sonora-MS serem classificados como baixo, essas foram as populações que exibiram o maior nível de diversidade genética entre as populações de *Bothrops moojeni*. Entretanto, o fato dessas serpentes terem sido coletadas num resgate da fauna e flora de uma região que foi completamente inundada (sofreram a destruição de seu habitat) demonstra que *B. moojeni*, provavelmente, já perdeu uma considerável porção da sua variabilidade genética.

Entre as populações analisadas neste estudo, as populações do Estado de Goiás: Goiânia, Minaçu e Jataí apresentam os menores níveis de heterozigosidade. Schwaner *et al.* (1990) estudaram a variação de proteínas em populações da serpente *Notechis scutatus* e mostraram a correlação negativa que existe entre a baixa heterozigosidade e o grau de isolamento das populações. O estudo de Schwaner *et al.* (1990) mostrou também que a heterozigosidade baixa estava fortemente relacionada com a presença de anormalidades no esqueleto e em escamas, isso poderia ser um indicativo das conseqüências geradas pela perda de diversidade genética. Estudando serpentes *Vipera berus* Madsen *et al.* (1996) também apóiam a idéia que isolamento populacional, variabilidade genética e características adaptativas estão interrelacionados em serpentes.

Em relação à estruturação da variabilidade genética, foi demonstrado que existe uma baixa divergência entre as populações de Sonora-MS e Canabrava-MT que estão separadas entre si por 818,54 km de distância. Já em Canabrava-MT e Jataí-GO, com uma distância geográfica similar (739,37 km), foi encontrado um grau de estruturação genética quase 4 vezes maior comparando com aquele entre Sonora-MS e Canabrava-MT. Considerando o grau de fragmentação que percebemos no Bioma Cerrado, no entanto, esses dados não são contrastantes. Se observamos no mapa (Figura 18), veremos que região geográfica entre as populações de Canabrava-MT e Jataí-GO é uma área extremamente degradada, possuindo grandes extensões de lavoura. Apesar de ser uma

serpente bem adaptada às áreas de lavoura, a extensão da antropização na área que separa essas duas populações proporciona um obstáculo grande à movimentação dessa espécie, explicando o baixo nível de estruturação encontrado entre elas. A antropização no Estado de Goiás seguiu tal padrão, que tornou a população de Jataí-GO praticamente isolada e cercada por todos os lados de área antropizada, o que justificaria o nível de estruturação tão alta. Dentro deste contexto, podemos perceber que a população de Jataí-GO apresenta os maiores valores de Φ_{st} comparando com as outras populações (Jataí-GO e Sonora-MS = 0,15; Jataí-GO e Minaçu-GO = 0,25). O único valor baixo de estruturação foi entre Jataí-GO e Goiânia-GO (0,09), esse valor pode ser explicado pela distância geográfica bem menor entre elas. Por outro lado, a área entre as regiões de Sonora-MS e Canabrava-MT, apesar de extensa, se encontra bem menos fragmentada, mostrando que a espécie teria mais facilidade para atravessar essa área.



Figura 18. Mapa mostrando o nível de antropização na região Centro-Oeste (IBGE, 2006).

Outro fator que apóia essa hipótese é o fato de Sonora-MS apresentar uma estruturação genética bem maior (50%) em relação às populações de Goiás. Isso concorda com o padrão de antropização atual do Centro-Oeste que coloca Sonora-MS como estando isolada em relação às populações de Goiás. Assim, observamos que os dados aqui apresentados de estruturação genética também são compatíveis com o padrão de antropização da região que cerca Minaçu-GO, deixando essa população

isolada em relação a todas as demais populações. Sendo que o menor valor de Φ_{st} encontrado, é justamente em relação à Canabrava-MT, entre essas duas populações existe a área de antropização mais estreita, permitindo o deslocamento de *B. moojeni*.

Neste sentido, os dados aqui apresentados sugerem que, nas populações de *B. moojeni* analisadas, estratégias de manejo e conservação devam ser aplicadas com urgência, no sentido de preservar uma espécie de grande importância não só para o bioma Cerrado, mas também para a área da saúde. A região de Minaçu pode ser considerada a área mais importante para ser conservada, no sentido de se preservar uma boa quantidade da variabilidade genética avaliada neste estudo para esta espécie *Bothrops moojeni*.

6. CONCLUSÕES

- Com base em uma avaliação do padrão de bandas foram selecionados 14 *primers* RAPD (OPA-01, OPA-03, OPB-04, OPB-06, OPB-18, OPM-01, OPP-04, OPP-06, OPP-07, OPP-08, OPP-13, OPP-14, OPP-15, OPP-16);
- As populações de *Bothrops moojeni* apresentam baixos níveis de diversidade genética para os cinco *primers* locos RAPD avaliados (OPB-18, OPP-04, OPP-06, OPP-15, OPP-16);
- A variabilidade genética se encontra significativamente estruturada entre e dentro das cinco populações de *Bothrops moojeni* avaliadas;
- Não foi encontrado um padrão espacial significativo da variabilidade genética nas populações de *Bothrops moojeni* para estes locos RAPD;
- A grande maioria dos artigos publicados no sítio “*Institute for Scientific Information*” (ISI) utilizando a espécie *Bothrops moojeni* se concentram nas áreas de Bioquímica & Biologia Molecular, Toxicologia e Farmacologia & Farmácia, não existindo nenhum trabalho publicado, até a presente data, que avalie a variabilidade genética desta espécie;
- Pode-se verificar que existe uma ampla possibilidade de utilização do veneno de *B. moojeni*, não só na soroterapia mais também para o desenho de novos fármacos de aplicação na saúde, tais como antitumorais, antimicrobianos e antiparasitários;
- Deve-se proceder com certa urgência a uma análise mais sistemática e de maior magnitude para avaliar a variabilidade genética desta espécie que além de sua importância para a conservação é uma espécie de muito interesse para a área de saúde.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. *et al.* Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, 1998.

AMARAL, C. F. S. Cuidados intensivos por acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 394-401, 2003.

ARAÚJO, F. A. A; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R.F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 33-61, 2003.

AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L. Conservation Genetics: case histories from nature. Chapman & Hall, New York, 1996.

AVISE J.C. The scope of Conservation Genetics. In: Avise J.C., Hamrich J.L. (eds.) Conservation Genetics. Case histories from nature, Chapman & Hall, New York, 1-9, 1996

BARRELLA, T.H. & SILVA, R.J. Digenetic trematodes infection in a *Bothrops moojeni* (Viperidae) population from a fauna rescue in Porto Primavera, São Paulo State. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 55, 2, 2005.

BEEBEE, T. & ROWE, G. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press, 2004.

BEIGUELMAN, B. Genética de Populações Humanas. [http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/Genetica Populacoes/](http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/Genetica%20Populacoes/) Acessado em 02 de agosto de 2006.

BITTNER, D.N & KING, R.B. Gene flow and melanism in garter snake revisited: a comparison of genetic markers and island vs. coalescent models. Biological Journal of the Linnean Society, 79, 389-399, 2003.

- BOCHNER, R.& STRUCHINER, C.J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. *Cadernos de Saúde Pública*, 19, 7-16, 2003.
- BOER-LIMA, A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HOFLING, M. A. *Bothrops moojeni* Snake Venom-Induced Renal Glomeruli Changes In Rat. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 217–222, 2002.
- BORGES, R. C., & ARAÚJO, A. R. B. Seleção de habitat entre duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge and *B. neuwiedi* Wagler) (Serpentes: Viperidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 58,591-601, 1998.
- BORGES, M. H.; SOARES A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia silvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*, 39, 1863-1869, 2001.
- CALDAS NETO, S.; OLIVEIRA, R. L.; CALDAS, N. Use of fibrin glue in the prevention of postoperative bleeding and hematomas after septoplasties. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, São Paulo,68 , 5, 2002.
- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. Venomous reptiles of the western hemisfere. Volumes I e II. Cornell university press, New York. 2004.
- CARDOSO, J. L. C & WEN, F.H. Introdução ao Ofidismo. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 33-61, 2003.
- CARDOSO, D. F.;YAMAGUCHI, I. K.; SILVA, A. M. M. Produção de soros e antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de Biologia Molecular. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 367-379, 2003.

CASSALI, G.D.; AMARAL, V.F.; SILVA, A.E.; MACRI, I.; MACIEL,R.

Cytological and histopathological aspects of lipomas in *Bothrops moojeni*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.56, 6,799-801, 2004.

COLLI, G.R.; BASTOS, R. P.; ARAÚJO, A.F.B. The character and dynamics of Cerrado herpetofauna, Pp 223-239 in *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*, edited by Oliveira P.S. & R.J. Marquis. Columbia University Press, New York, 2002.

COTRIM, H.& PAIS, M. S. A biologia molecular na conservação biológica: o caso RAPD em *Silene rothmaleri* P. Silva. Biotecnologia, Portugal, 59, 1998.

COCKERHAM, C.C. Variance of Gene Frequencies. *Evolution*, 23: 72-84, 1969.

COCKERHAM, C.C. Analyses of gene frequencies. *Genetics*, 74: 679-700, 1973.

CRANDALL, K. A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; MACE, G. M.; WAYNE, R. K. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15, 290-295, 2000.

CREER, S.; MALHOTRA, A.; THORPE, R. S.; RETO S. STÖCKLIN; FAVREAU P. S.; CHOU, W. S. H. Genetic and Ecological Correlates of Intraspecific Variation in Pitviper Venom Composition Detected Using Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) and Isoelectric Focusing. *Journal of Molecular Evolution*, 56, 1432-1432, 2003.

CHIARELLO, A G. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Biological Conservation*, 89, 71-82, 1999.

DESALE, R. AMATO, G. The expansion of Conservation Genetics. *Nature*, 5, 702-712, 2004.

EPPERSON B.K. *Geographical Genetics*. Princeton University Press, New Jersey, 2003.

- EWERS R.M. Are conservation and development compatible? Trends in Ecology and Evolution 20, 159, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA data. Genetics.131, 479-491, 1992.
- FAHRING L. Effects of fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 34, 487-515, 2003.
- FELFILI, J. A.; NOGUEIRA, P. E.; SILVA-JÚNIOR, M. C.; MARIMON, B. S.; DELITTI, W.B.C. Composição Florística E Fitossociologia Do Cerrado Sentido Restrito No Município De Água Boa – MT. Acta bot. bras. 16,1, 103-112, 2002.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2.ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1998.
- FISHER, R. A. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford, Claredon Press. 1930.
- FORSMAN, A., MERILÄ, J. LINDELL, L.E. Do scale anomalies cause differential survival in *Vipera aspis*. Journal of Herpetology, 28, 435-440, 1994.
- FRANÇA, F.O.R & MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 33-61, 2003.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conservation Biology 10, 1500-1508, 1996.
- FRANKHAM, R. Predictive accuracy of population viability analysis in conservation biology. *Nature* 404,385-387, 2000.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, 2003.

- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, 2004.
- FRASER, D.J. & BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10, 2741-2752, 2001.
- FUTUYMA, D. J. *Biologia Evolutiva*, Sinauer Associates, Sunderland, 1998.
- GALINKIN M. (ed.). *GeoGoiás: Estado Ambiental de Goiás 2002*. Fundação CEBRAC: PNUMA: SEMARH, Goiânia, 2003.
- GIBBS, H.L.; PRIOR, K.A.; WEATHERHEAD, P.J.; JOHNSON, G. Genetic structure of populations of threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 6, 1123-1132, 1997.
- GILLESPIE, J. H. *Population genetics: a concise guide*. The Johns Hopkins Press, London, 1998.
- GRAZZIOTIN, F. & ECHEVERRIGARAY, S. Genetic Relationships Among Species of the Genus *Bothrops* based on RAPD Markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 3, 359-365, 2005.
- HARTL, D.L. & CLARK, A. G. *Principles of Population Genetics* Sinauer Associates, Sunderland, 1997.
- HARTL, D.L. *A Primer of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, 2000.
- HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 629-638, 2001
- HILDE, N. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*.13, 1143–1155, 2004.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Instrução normativa n. 03, de 27 de maio de 2003. IBAMA, Brasília. 2003.

- IBGE. 2005. Mapa da fauna em extinção I. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. (IBGE). <http://www.ibge.org.br>. Acessado em 24 de setembro de 2006.
- JÄGGI, C.; WIRTH, T.; BAUR, B. Genetic Variability of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy. *Biological Conservation*, 94, 69-77, 2000.
- KIMURA, M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge, Cambridge University Press. 1983.
- KLINK, C. & MACHADO, R. A Conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1,1, 2005.
- LANZENOTTER. Disponível em: [http://www.schlangenliebhaber.de/biss_von bothrops moojeni](http://www.schlangenliebhaber.de/biss_von_bothrops_moojeni). Acessado em 21 de setembro de 2006.
- LAWSON, R. & KING, R. B. Gene flow and melanism in Lake Erie garter snake populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 59, 1–19, 1996.
- LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding in large scale. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia*. 78,177-198, 1984.
- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA T.; BEILES A.; NEVO E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*.11, 2453–2465, 2002.
- LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3, 91-99, 1994.
- McCRACKEN, G. F.; BURGHARDT, G. M.; HOUTS, S. E. Microsatellite markers and multiple paternity in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Molecular Ecology*, 8, 1475–1479,1999.

- MACHADO, R.B.; RAMOS NETO, M.B.; PEREIRA, P.G.P.; CALDAS, E.F.; GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR, K.; e STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF. 2004.
- MADSEN, T.; STILLE, B.; SHINE, R. Inbreeding depression in a isolated population of *Vipera berus*. *Biological Conservation*, 75, 113-118, 1996.
- MADSEN, T.; OLSSON, M.; SHINE, R. Restoration of an Inbred population of adder (*Vipera berus*). *Biological Conservation*, 75, 113-118, 1999.
- MANIER, M.K. & ARNOLD, S.J. Population genetic analysis identifies source-sink dynamics for two sympatric garter snake species (*Thamnophis elegans* and *Thamnophis sirtalis*). *Molecular Ecology*, 14, 3965-3976, 2005.
- MANLY, B.F.J. *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. Chapman & Hall, London, 1986.
- MANLY, B.F.J. *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman & Hall, London, 1997.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220, 1967.
- MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; OLIVEIRA, E.B.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A. M. Isolamento e Caracterização Funcional de uma L-Aminoácido Oxidase do veneno de *Bothrops moojeni* com atividades bactericida. *Toxicon*, 41, 251–255, 2003.
- MARRIS, E. The forgotten ecosystem. *Nature*, 437, 13, 2005.
- MARQUES, A.R. & SAZIMA, I. História Natural das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 62-71, 2003.

- MARTINS, M.; ARAÚJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *Journal of Zoology*. 254, 529-538, 2001.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 33-61, 2003.
- MERILÄ, J.; FORSMAN, A.; LINDELL, L.E. High frequency of ventral scale anomalies in *Vipera berus* populations. *Copeia*, 1992, 1127-1130.1992.
- MILLER, M. Tools For Populations Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data (Distribuído pelo autor) 1997.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403, 853-858, 2000.
- NARAKAS, A. The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop. Clin. North Am.*, 19, 87-199, 1988.
- NEEL, M.C. & CUMMINGS, M.P.. Effectiveness of Conservation Targets in Capturing Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17, 219-229, 2003.
- NEI, M. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 70, 3321-3323, 1973.
- NKININ, S.W.; CHIPPAUX, J.P.; PIETIN, D.; DOLJANSKY, Y. TREMEAU, O.; MENEZ, A. Genetic origin of venom variability: impact on the preparation of antivenom serums. *Bull Soc Pathol Exot.* 90, 277-81,1997.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology*, 37, 653-659, 2003.

OLIVEIRA, F. “Novas Proteases da Peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca): Purificação de Quatro Isoformas de Fibrinogenases (Bthls) e Caracterização Bioquímica da BthTI” Tese. 1; 141. Brasília: UNB, 60p. 2001.

PAVAN, D. Considerações ecológicas sobre a fauna de sapos e lagartos de uma área do Cerrado Brasileiro sob o impacto do enchimento do reservatório de Serra da Mesa. M.S. Teses. São Paulo, USP. 2002.

PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. Pp 343-380 in Cullen Jr. L., R. Rudran & C. Valladares-Padua, editores. Métodos de estudos em biologia da conservação & manejo da vida silvestre. Editora UFPR e Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, 2004.

PETIT, J.R.; MOUSADIK, A.E.; PONS, O. Identifying populations for conservations on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*.12, 844-855, 1998.

PRIMACK, R. B. & RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. Londrina: E. Rodrigues, 2001.

PRIOR, K.A.; GIBBS, H.L.; WEATHERHEAD, P.J. Population Genetic structure in the black rat snake: implications for manegemant.. *Conservation Biology*, 11, 1147- 1158, 1997.

PROSSER, M.R.; GIBBS, H.L; WEATHERHEAD, P.J. Microgeographic population structure en the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon* detected using microsatellite DNA loci. *Molecular Ecology*, 8, 329-333, 1999.

REED, D.H. & FRANKHAM, R. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*. 17, 230, 2003.

RIBEIRO, R. F. O Eldorado do Brasil central: história ambiental e convivência sustentável com o Cerrado. In: *Ecología Política. Naturaleza, sociedad y utopía*. ALIMONDA, H. CLACSO, 2002.

- RIBEIRO, L.A. & JORGE, M.T. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* série de 3.139 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, 475-80, 1995.
- RODRIGUES, M.T. The Conservation of Brazilian Reptiles: Challenges for a Megadiverse Country. *Conservation Biology*, 19, 3, 659–664, 2005.
- RODRIGUES, F.M. & DINIZ-FILHO, J.A.F. Hierarchical structure of genetic distances: effects of matrix size, spatial distribution and correlation structure among gene frequencies. *Genetics and Molecular Biology* 21, 233-240, 1998.
- ROHLF, F.J. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter publishers, New York, 1989.
- ROUSSET, F. Genetic Structure and Selection in Subdivided Population. Princeton University Press, New Jersey, 2004.
- SALOMÃO, M.G.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. MtDNA evolution in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia*, 8, 127-134, 1999.
- SANTOS, P.; RESENDE, E.M.; SILVEIRA, P.V.P.; FAGUNDES, D.J. Acta Cir. Brás. Efeitos do soro antibotrópico nas alterações hemodinâmicas induzidas em cães pelo veneno de *Bothrops moojeni*. *Acta Cir Brás*, 15, 2000.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin Ver. 2.000: A software for population genetic data analysis. Universidade de Geneva, mar. 2000. Disponível em: <http://anthro.unige.ch/arlequin>. Acesso em 12 fev. 2006.
- SEBBEN, A.; NEO, F. A.; NASCIMENTO, C. L. A.; BRANDÃO, R. A.; DUAR, B. A. Cartilha de Ofidismo: Cobras do Distrito Federal e Entorno. Brasília: Editora UnB, 1996.
- SILVA, D. W. *et al.* Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten species of *Bothrops* species. *Memórias do Instituto Butantan*. 51,153-168, 1989.

- SILVA, C.J.; JORGE M.T.; RIBEIRO L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon*, 41, 251–255, 2003.
- SILVA, T.B.; ROSSELLINI, M.; DAL PAI SILVA, M.; SILVA, R.J. Histological Characterization of *Sticholecitha serpentis* Prudhoe, 1949 (Digenea, Bieriidae, Sticholecithinae), parasite of *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Serpentes, Viperidae). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 11, 4, 510-531, 2005.
- SMOUSE P.E., LONG, J.C.; SOKAL, R.R. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* 35: 627-632, 1986.
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 172-192, 2001.
- SOLFERINI, V. N. & SCHEEPMAKER, D.S. Polimorfismos de isozimas. In: MATIOLI, S.R. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos. 137-142, 2001.
- SPIELMAN, D.; BROOK, B.W.; FRANKHAM, R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. 101, 15261-15264, 2004.
- STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, D. C.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142,371–381,2006.
- SOKAL, R.R. Spatial data analysis and historical processes. In: *Data Analysis and Informatics IV*. (Diday *et al.*, eds). Holland, Science publishers. 29-43. 1986.
- STOW, A J. & BRISCOE, D.A. Impact of habitat fragmentation on allelic diversity at microsatellite loci in Cunningham's skink (*Egernia cunnunghami*); a preliminary study. *Conservation Genetics*. 6, 455-459, 2005.

- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Tree*.15:199- 203, 2000.
- TELLES, M. P. C.; MONTEIRO, M. S. R.; RODRIGUES, F. M.; SOARES, T. N.; RESENDE, L. V.; AMARAL, A G.; MARRA, P. R. Marcadores RAPD na Análise Da Divergência Genética Entre Raças De Bovinos E Número De *Locos* Necessários Para A Estabilidade Da Divergência Estimada. *Ciência Animal Brasileira* 2, 87-95, 2001.
- TELLES, M. P. C.; RESENDE, L. V.; SOARES, T. N.; RODRIGUES, F. M.; JÁCOMO, A T. A; SILVEIRA, L. Avaliação do Padrão de Amplificação de Marcadores RAPD em Bandos de Queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas. *Ciência Animal Brasileira* 4, 7-14, 2003.
- TELLES, M. P. C. Estrutura Genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura Leptodactylidae) e padrões de ocupação humana no Estado de Goiás. 2005. 91f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais), Universidade Federal de Goiás, 2005.
- THEAKSTON, R.D.G; WARREL, D.A. Systematics of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 70,99-113, 2002.
- THOMPSON, D.F., LETASSY, N.A.; THOMPSON, G.D. Fibrin glue: a review of its preparation, efficacy, and adverse effects as a topical hemostat. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy*,22, 946-952, 1988.
- TORRES, M.F.P.; GRACA, D.L.; FARIAS, E.L.P.. Microsurgical repair of peripheral nerve by means of suture, fibrin glue or BioFill® sheath in Wistar rats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, 55 ,5 , 2003.
- UEB. União dos escoteiros do Brasil (UEB). Disponível em: <http://www.escoteiros.org.br/Aventura/animais/cobras/B.%20moojeni.jpg>, acessado em 21 de agosto de 2006.

- ÚJVÁRI, B.; MADSEN, T.;KOTENKO, T.; OLSSON, M.; SHINE, R.; WITTZELL,H. low genetic diversity threatens imminent extinction for the Hungarian meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis*). *Biological Conservation*, 105,107-130,2002.
- WATANABE, L.; SOARES A.M.; WARD, R.J.; FONTES, M.R.M.; ARNI, R.K. Myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic. *Biochimie*. 87, 161–167,2005.
- WAYNE, R. K. & MORIN, P. Conservation genetics in new molecular age. *Front Ecol. Environ.* 2, 89-97, 2004.
- WEIR, B.S. *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland/MA, 1996.
- WÜSTER, W. Jararaca! An introduction to Brazilian pitvipers of the genus *Bothrops*. *Reptile & Aphantian Magazine*. 51, 12-21, 1997.
- WÜSTER, W.; THORPE, R. S.; SALOMÃO, M. G.; THOMAS, L.; PUERTO, G.; THEAKSTON, R. D.G. origin and phylogenetic position of the Lesser Antillean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): Biogeographical and medical implications. *The Natural History Museum*, 68, 101-106, 2002.

8. ANEXO

Protocolo de extração de DNA a partir de sangue adaptado de *GFXtm* – Kit De Purificação De Dna A Partir De Sangue.

1. Coleta do material

- O sangue deve ser coletado em *vacuteiner* contendo EDTA, em seguida estocado em geladeira a 4°C para evitar a coagulação do sangue e a degradação do DNA. Para melhores resultados o sangue deve permanecer na geladeira por no máximo 2 dias. O sangue congelado apresentará menor rendimento do que o sangue fresco.

2. Preparo do material a ser utilizado na extração para cada amostra:

- 1 tubo eppendorf de 2,0ml
- 1 tubo coletor
- 1 coluna com matriz de fibra
- 1 eppendorf de 1,5ml

obs.: ligar o banho-maria e colocar os tampões de extração e eluição para aquecer

3. Método *Scalable* – para extração de DNA a partir de pequenas amostras de sangue

Este procedimento pode processar mais de 300µl de sangue, com um rendimento de 4,5 a 7,5µg de DNA, proveniente de 300µl de sangue total (o qual contém aproximadamente 3×10^6 de células nucleadas).

◆ Procedimento:

3.1 Lise das células

- adicionar 3X do volume da amostra do tampão RBC Lysis Solution e misturar por inversão.
- Para a extração do DNA de *Bothrops moojeni* acrescentava-se 10 µl de tampão RBC Lysis Solution para 30µl de sangue. Caso a quantidade de

sangue fosse menor do que 10 μ l, a quantidade de RBC Lysis Solution acrescentada era sempre de 30 μ l.

- incubar a mistura de *lise* por 5 minutos em temperatura ambiente, em seguida centrifugar a 14000rpm em microcentrífuga por 35 segundos.
- remover o sobrenadante, o resíduo (aproximadamente 20 μ l) é utilizado para resuspender as células antes da extração.

3.2 Extração:

- resuspenda as células brancas do sangue, no mesmo tubo de *lise*, com o auxílio de um vortex .
- adicionar 500 μ l de tampão de extração (*Extraction Solution*), para suspender as células brancas do sangue, e misturar com o auxílio de um vortex.
- incubar a mistura de extração por 5 minutos em temperatura ambiente. Durante a incubação, colocar as colunas em tubos coletores para o número de amostras analisadas.
- obs.: pré-aquecer o tampão até 70°C.

3.3 Recuperação do DNA

- transferir toda a mistura da extração para uma coluna (*GFX Column*), em seguida centrifugar a 8000rpm por 1'10".
- descartar o líquido do tubo coletor e em seguida, colocar a coluna novamente no mesmo tubo coletor.

3.4 Lavagem

- adicionar novamente mais 500 μ l de solução de extração (*Extraction Solution*) a coluna dentro do tubo coletor e em seguida, centrifugar a 8000rpm por 1'10".

- descartar o líquido do tubo coletor e em seguida, colocar a coluna no mesmo tubo coletor.
- adicionar 500µl de solução de lavagem (*Wash Solution*) a uma coluna dentro dos tubos e em seguida, centrifugar a 14000rpm por 3'15"
- descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo eppendorf de 1,5ml.

3.5 Eluição

- adicionar 100µl de tampão de eluição (TE) pré aquecido a coluna dentro do eppendorf.
- incubar a amostra a temperatura ambiente por 1'.
- centrifugar a 8000rpm por 1'10" para recuperar o DNA purificado.
- obs.1: antes de começar, pré-aqueça o tampão (TE) até atingir 70°C. Esta temperatura maximiza a recuperação de DNA da coluna.

OBS.2: volume de eluição menor que 100µl pode ser usado para concentrar a amostra, mas ele diminui o rendimento. Por exemplo, utilizando 50µl ao invés de 100µl, o DNA passará para uma concentração 2X, com uma perda na recuperação de aproximadamente 20%.

4. Reagentes e materiais adicionais

- Tubos eppendorf de 1,5ml
- Tubos eppendorf de 2,0ml
- Etanol absoluto
- TAMPÃO TE:
 - 10 mM Tris-HCl
 - 1 mM EDTA
 - pH 8,0
- TAMPÃO RBC *LYSIS SOLUTION*

- 10mM KHCO₃
- 155mM NH₄Cl
- 0.1 mM EDTA (2)

9. APÊNDICE

Matriz de dados binários obtida a partir dos 5 *primers* de RAPD utilizados nos 75

indivíduos das cinco populações.

primer	loco	frag.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35						
B18	1	2200	0	0	?	0	0	0	0	?	1	0	0	0	?	0	?	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1						
B18	2	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1						
B18	3	1900	0	0	?	0	0	0	0	?	1	1	0	0	?	0	?	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1						
B18	4	1600	1	1	?	1	0	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1					
B18	5	1400	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	?	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1					
B18	6	1300	1	1	?	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	7	1200	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0					
B18	8	+1100-1000	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1					
B18	9	1100-1000+	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
B18	10	1000	1	1	?	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	13	+900-800	1	1	?	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	14	900-800+	1	1	?	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	15	700	0	0	?	1	1	1	0	?	1	1	1	1	?	0	?	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1					
B18	16	+700-600	1	1	?	1	0	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	17	700-600+	0	0	?	1	0	0	0	?	1	1	0	0	?	0	?	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	18	+600-400	1	1	?	1	0	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	19	600-400+	0	1	?	0	1	1	1	?	1	0	1	1	?	1	?	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
B18	20	400	1	0	?	1	0	1	1	?	1	1	0	1	?	0	?	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1					
primer	loco	frag.	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
B18	1	2200	1	?	0	1	?	0	1	?	?	?	?	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	?	1	1	
B18	2	2000	1	?	1	1	?	0	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	1	0	?	?	1	0	
B18	3	1900	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	0	0	0	?	1	1	1	1	?	?	1	1	
B18	4	1600	1	?	1	1	?	0	0	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	0	1	1	1	1	1	0	?	1	1	1	0	?	?	1	0	
B18	5	1400	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	0	1	1	?	1	1	0	1	?	?	1	1	
B18	6	1300	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	?	1	1
B18	7	1200	0	?	0	0	?	0	0	?	?	?	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	?	0	1	0	0	?	?	0	1	
B18	8	+1100-1000	1	?	0	1	?	0	1	?	?	?	?	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	?	?	0	0	0	1	0	0	0	?	0	1	0	0	?	?	1	0
B18	9	1100-1000+	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	?	?	0	0	0	0	0	0	0	?	0	0	0	0	?	?	0	0
B18	10	1000	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	?	1	1	
B18	13	+900-800	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	?	1	1	
B18	14	900-800+	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	?	1	1	
B18	15	700	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	?	?	0	0	0	1	1	1	1	?	1	1	1	1	?	?	1	1
B18	16	+700-600	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	?	0	0	1	1	?	?	1	1	
B18	17	700-600+	1	?	1	1	?	0	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	0	0	0	?	0	0	1	1	?	?	1	1	
B18	18	+600-400	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	0	1	1	1	?	1	1	1	1	?	?	1	1	
B18	19	600-400+	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	?	?	1	1	1	1	0	1	0	?	0	0	1	1	?	?	1	1	
B18	20	400	1	?	1	1	?	1	1	?	?	?	?	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	1	1	?	?	1	1	

primer	loco	frag.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35			
P-15	1	2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
P-15	2	1900	?	0	?	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
P-15	3	1700-1600	?	0	?	1	1	1	0	0	0	0	?	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
P-15	4	1500	?	0	1	1	1	1	0	0	0	1	?	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	5	1400	?	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	6	1300-1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	7	1100-1000	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	8	1000	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	?	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
P-15	9	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

primer	loco	frag.	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
P-15	1	2000	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	2	1900	0	?	0	0	?	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	3	1700-1600	1	?	1	0	?	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	?	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P-15	4	1500	1	?	1	1	?	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
P-15	5	1400	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	6	1300-1200	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	7	1100-1000	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-15	8	1000	0	?	1	0	?	0	0	1	0	0	0	0	0	0	?	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
P-15	9	800	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

primer	loco	frag.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35					
P-16	1	1800	0	1	?	?	?	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
P-16	2	1600-1500	1	1	?	?	1	1	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-16	3	1500	1	1	?	?	1	1	0	0	1	1	?	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
P-16	4	1400	1	1	?	?	1	1	1	?	1	1	?	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-16	5	1200	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-16	6	1100	0	1	?	?	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	
P-16	7	900	1	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-16	8	800	1	1	?	?	1	1	1	?	0	1	?	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-16	9	700	1	1	?	?	0	1	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

primer	loco	frag.	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
P-16	1	1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	?	?	1	
P-16	2	1600-1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	?	?	1
P-16	3	1500	1	0	1	1	1	0	1	1	0	?	1	1	1	1	0	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	?	0	1	1	1	1	1	?	1	?	?	1	
P-16	4	1400	0	0	0	0	0	0	1	1	0	?	1	1	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	?	?	1
P-16	5	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P-16	6	1100	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	?	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
P-16	7	900	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	?	1	0	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-16	8	800	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	0	0	?	0	1	?	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-16	9	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	?	1	1																						

primer	loco	frag	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75		
P-06	1	2200	1	1	0	?	?	1	1	?	0	?	?	?	?	?	1	?	?	0	?	?	?	?	0	?	0	0	0	?	0	?	0	?	?	?	0	0	0	1	0	0		
P-06	2	1900	1	1	0	?	?	1	1	?	1	?	?	?	?	?	1	?	1	1	1	?	?	1	1	?	1	0	0	1	?	0	?	0	?	?	1	1	1	1	1	1		
P-06	3	1700	1	1	0	?	?	0	0	?	1	?	?	?	?	?	0	?	1	1	?	?	?	1	1	?	1	0	0	1	?	1	?	1	?	?	0	1	1	1	0	0		
P-06	4	1500-1400	1	1	1	1	?	1	1	?	1	?	?	?	?	?	1	?	?	1	1	?	?	1	0	?	0	0	0	?	0	?	0	?	?	1	1	1	1	1	1	1		
P-06	5	1400-1300	1	1	1	?	?	0	0	?	1	?	?	?	?	?	1	1	?	1	1	1	?	1	1	1	?	1	0	0	0	?	1	?	1	?	?	1	1	1	1	1	1	
P-06	6	1100-1000	1	1	0	?	?	0	0	?	1	?	?	?	?	?	1	?	1	0	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	?	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	
P-06	7	1000	1	1	0	?	?	0	0	?	1	?	?	?	?	?	0	?	?	0	?	?	?	?	1	?	1	1	0	1	?	0	?	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	
P-06	8	900	1	0	1	?	?	1	0	?	1	?	?	?	?	?	1	?	1	1	1	?	?	?	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	?	?	1	1	1	1	1	0	0	
P-06	9	800	1	1	1	?	?	0	0	?	1	?	?	?	?	?	1	?	1	1	?	?	?	1	1	?	1	1	1	1	?	1	?	1	?	?	1	1	1	1	1	0	0	
P-06	10	700-600	1	1	0	?	?	1	1	?	1	?	?	?	?	?	0	?	?	1	?	?	?	1	1	1	0	1	0	1	?	1	?	1	?	?	0	0	0	0	0	0	0	
P-06	11	600	1	1	1	1	?	1	0	?	0	?	?	?	?	?	1	?	?	1	?	?	1	?	0	?	0	0	1	0	1	1	1	1	?	1	0	0	0	0	1	0	0	
P-06	12	600-500	1	1	0	1	?	1	1	?	1	?	?	?	?	?	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	?	?	1	1	1	1	1	1	1