

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*:
análise de variações individuais**

Isadora Sousa de Oliveira

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*:
análise de variações individuais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Isadora Sousa de Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Candiani Arantes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 27/10/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RESUMO

OLIVEIRA, I. S. **Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*: análise de variações individuais**. 2016. 126f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As peçonhas ofídicas apresentam uma grande diversidade de componentes proteicos e estes podem variar dependendo de diversos fatores, como espécie, hábitos alimentares e comportamentais, ontogenia e até mudanças sazonais. Este alto grau de variabilidade pode levar a mudanças na fisiopatologia do envenenamento ofídico. No Brasil, as serpentes da espécie *Crotalus durissus* são capazes de habitar várias regiões do país e sua peçonha está sujeita a variabilidade, levando a uma grande dificuldade no tratamento do envenenamento, que é realizado por infusão do soro antiofídico. O estudo proteômico permite conhecer os componentes expressos pela glândula de peçonha. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos realizar uma análise comparativa das diferenças intraespecíficas na composição proteica das peçonhas de 22 espécimes de *Crotalus durissus collilineatus* através de técnicas ômicas, avaliar a capacidade neutralizante do soro antiofídico produzido pelo Instituto Butantan contra essas peçonhas, avaliar a atividade hialuronidásica de cada peçonha e comparar as alterações bioquímicas e imunológicas de camundongos após o envenenamento crotálico experimental. Para isto, as peçonhas de 22 serpentes da espécie *C. d. collilineatus*, da região de Catalão – GO, foram fracionadas em uma coluna de fase reversa C-18 acoplada a um sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e métodos de espectrometria de massas. Inicialmente, foi observado que as peçonhas destas 22 serpentes variaram entre as cores branca e amarela. Os perfis cromatográficos foram semelhantes, entretanto, apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas significativas de alguns componentes, por exemplo, apenas duas das peçonhas apresentaram a proteína crotamina. Outros componentes previamente relatados em outros estudos também foram identificados, como, o complexo da crotocina, serinoproteases, metaloproteases e convulxina. Pela primeira vez foi possível evidenciar por técnicas proteômicas alguns componentes para a subespécie *C. d. collilineatus*, como: fator de crescimento neural, enzima conversora de angiotensina, fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, carboxipeptidase, glutaminil ciclase, glutatona peroxidase, NADH desidrogenase e fosfolipase B. Através do método de ELISA, constatou-se que o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan foi capaz de reconhecer todas as peçonhas utilizadas, embora algumas frações isoladas não tenham sido reconhecidas com tanta eficácia. A atividade hialuronidásica também foi avaliada, evidenciando que as peçonhas de algumas serpentes não apresentaram atividade detectável desta enzima. Por fim, o envenenamento crotálico experimental em camundongos Balb/c revelou que peçonhas diferentes são capazes de produzir alterações bioquímicas e imunológicas distintas. Assim, as vítimas do envenenamento podem necessitar de tratamentos diferenciados. Este trabalho mostrou que existem variações intraespecíficas importantes nas peçonhas de *C. d. collilineatus*, sendo que algumas podem ser mais miotóxicas que outras, evidenciadas por induzirem grandes aumentos dos níveis de creatina quinase. Além disso, este estudo proteômico revelou a presença de novos componentes proteicos na peçonha de *C. d. collilineatus*, contribuindo significativamente para o conhecimento de sua composição. Adicionalmente, estes dados indicam que quanto mais diversificado for o *pool* de peçonhas utilizado para a imunização de cavalos, melhor será o soro anticrotálico produzido, de forma que o único tratamento para este acidente seja ainda mais eficaz.

Palavras-chave: *Crotalus durissus collilineatus*, peçonha de serpente, proteoma, venômica, variações individuais.

1. Introdução

1.1. Toxinas naturais e aplicações

Desde o início da história da humanidade, os venenos de animais ou plantas têm sido amplamente utilizados. Eles eram usados na caça, em guerras e, também, para assassinatos. Portanto, desde a pré-história, plantas, bem como serpentes e outros animais, têm sido classificados como perigosos ou não (GALLO, 2008).

Toxinas naturais, de origem animal ou vegetal, têm sido alvo de pesquisas desde épocas mais remotas, devido ao grande interesse em descobrir os mecanismos pelos quais esses componentes levam a efeitos tóxicos quando interagem com organismos vivos. Com o passar dos anos, esses compostos foram utilizados com diversas finalidades, como armas indígenas (secreção da pele de rãs em flechas) e ferramentas moleculares para estudos de diversos sistemas biológicos, tornando-se importantes alvos de pesquisa, mesmo quando produziam efeitos maléficos. O estudo de suas estruturas e a compreensão de seus mecanismos de ação permitiram o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos das vítimas de envenenamentos, bem como a identificação de substâncias capazes de antagonizá-las (CERNI, 2012).

O interesse do homem por serpentes existe desde a antiguidade, visto que sempre tiveram que conviver. Estes animais exerceram enorme fascínio sobre a humanidade desde os tempos dos babilônios, estando sempre relacionados às atividades médicas, fazendo parte de uma gama de símbolos relacionados à saúde, como é o caso do símbolo da Medicina. Este é constituído por um caduceu alado com duas serpentes enroladas. As serpentes, neste caso, são símbolos de sagacidade e rejuvenescimento, devido às constantes trocas de pele, além de serem consideradas símbolos do bem e do mal, representando a saúde e a doença, respectivamente (PRATES, 2002; NASCIMENTO; DE OLIVEIRA RAMOS; LICHTENSTEIN, 2006).

O motivo do fascínio e medo que as serpentes causam nos seres humanos encontra-se em sua peçonha. No passado, muitos acreditavam que as consequências da picada de serpentes peçonhentas eram forças além da natureza, imaginando que divindades vingativas estavam incorporadas às serpentes. Devido à violência dos efeitos causados pela picada ofídica, serpentes e suas peçonhas foram envolvidas por superstições e mitos (RUSSELL, 2001).

Embora produzam malefícios ao homem, venenos e peçonhas animais são importantes ferramentas de estudo, sendo capazes de se ligarem a diversos receptores com grande afinidade e especificidade. Peçonhas de serpentes, escorpiões, centopéias, conus e venenos de

sapos vêm se destacando em inúmeras aplicações farmacológicas (BALDO et al., 2015; HAKIM; YANG; LAI, 2015; ORTIZ et al., 2015; CHAN et al., 2016; MIR et al., 2016).

As peçonhas de serpentes são misturas complexas, constituídas por componentes enzimáticos, lipídeos, proteínas de alta e baixa massa molecular, aminoácidos livres, esteroides, histamina, além de outros componentes que têm a capacidade de interagir com enzimas, membranas celulares, proteínas de membranas, receptores e canais iônicos de diversos organismos (MÉNEZ; STÖCKLIN; MEBS, 2006).

Toxinas animais também são usadas como fármacos. Da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* foram isolados peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), o que levou ao desenvolvimento de um dos medicamentos mais prescritos para o tratamento de hipertensão, o Captopril (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). O Tirofiban e o Eptifibatide são duas drogas antiplaquetárias disponíveis no mercado, que foram baseadas em desintegrinas de peçonhas ofídicas (KOH; KINI, 2012). A fibrolase é uma metaloprotease isolada de *Agkistrodon contortrix contortrix*, utilizada como uma droga fibrinolítica (BAJWA et al., 1982; RANDOLPH et al., 1992).

1.2. Serpentes peçonhentas no mundo e no Brasil

As serpentes pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata (Opell, 1811) e subordem Serpentes (Linnaeus, 1758) (CALDWELL et al., 2015), a qual compreende mais de 3.400 espécies conhecidas (HSIANG et al., 2015). Habitando diversas partes do globo terrestre, as serpentes peçonhentas de importância médica pertencem a 4 famílias (WARRELL, 2012):

- Atractaspidinae – víboras buraqueiras;
- Colubridae – cobras arbóreas com presas posteriores;
- Elapidae – cobras, najas, cobras corais, mambas, serpentes australianas e marítimas;
- Viperidae – víboras asiáticas, cascavéis americanas e víboras do velho mundo.

A designação de “peçonhentos” refere-se a animais que produzem toxinas em glândulas especializadas e possuem aparatos capazes de inoculá-las em outro organismo (BERNARDE, 2009). Nas serpentes estes aparatos são constituídos por dois dentes modificados, que inoculam a peçonha na presa, associados a duas glândulas de peçonha, as quais produzem e armazenam as toxinas. Este sistema é utilizado pelas serpentes para se defenderem de outros animais, bem como para matar e digerir presas (KARDONG, 1982; MELGAREJO; CARDOSO, 2003).

No Brasil, foram catalogadas até o momento 10 famílias, 75 gêneros, compreendendo 392 espécies (COSTA; BÉRNILS, 2015), sendo que destas, apenas três famílias são consideradas peçonhentas, a Elapidae, Colubridae e Viperidae. Estas famílias incluem um total de 62 espécies, cuja mordida causa acidentes que necessitam de tratamento médico (CAMPBELL; LAMAR, 1989; LIRA-DA-SILVA et al., 2009; BERNARDE, 2014).

Serpentes da família Viperidae podem ser facilmente identificadas por possuírem uma cabeça triangular recoberta por pequenas escamas de aspecto semelhante às escamas do restante de seu corpo (Fig. 1) (MELGAREJO; CARDOSO, 2003).



Figura 1. Serpente da família Viperidae. A espécie *Crotalus durissus collilineatus* (Arquivo do Laboratório de Toxinas Animais – LTA).

Essas serpentes possuem um aparelho inoculador solenóglifo, ou seja, cada maxila possui apenas um dente funcional, sendo este, por sua vez, agudo, grande e oco (MELGAREJO; CARDOSO, 2003). Associadas a este aparato inoculador, encontram-se as glândulas de peçonha, que se localizam na região pós-orbital. Quando estas glândulas são comprimidas por músculos acessórios, a peçonha é injetada na presa (JACKSON, 2007; FRY et al., 2008; VONK et al., 2008).

Incluídas na família Viperidae, estão as subfamílias Viperinae e Crotalinae (WÜSTER et al., 2008). A subfamília Crotalinae apresenta a fosseta loreal, um órgão termorreceptor, que se localiza entre o olho e a narina da serpente, sendo capaz de detectar pequenas flutuações de

radiação termal, detectando assim a presença e a direção de presas endotérmicas (BULLOCK; COWLES, 1952; BAKKEN; KROCHMAL, 2007).

Esta subfamília é composta por diversos gêneros, dentre eles, *Bothrops* e *Bothrocophias*, anteriormente denominado apenas *Bothrops* (FENWICK; EVANS; PARKINSON, 2009), *Crotalus* (WÜSTER; BERNILS, 2011) e *Lachesis* (FERNANDES; FRANCO; FERNANDES, 2004). Esses gêneros podem ser diferenciados pela cauda: o gênero *Bothrops* possui uma cauda simples, sem modificações, apenas com escamas subcaudais em pares; o gênero *Crotalus*, apresenta uma estrutura denominada chocalho ou guizo, na terminação da cauda, que produz um ruído quando a serpente se encontra pronta para o ataque ou irritada; e o gênero *Lachesis* tem as últimas escamas subcaudais eriçadas e modificadas, que terminam num espinho (MELGAREJO; CARDOSO, 2003). *Bothrops* e *Bothrocophias* são gêneros que podem ser diferenciados por sua filogenia, entretanto, estudos anteriores demonstraram que este tipo de diferenciação não está muito claro, levando a incertezas na nomenclatura de espécies de importância médica (CARRASCO et al., 2016).

As serpentes do gênero *Crotalus* são, popularmente, conhecidas como cascavéis, maracambóia, cobra-de-quatro-ventas (VALLE; BRITES, 2012) e boicininga, ou serpente tininte, na língua indígena (AMARALL, 1973). Esse gênero também é caracterizado por ser predador ativo, o qual se alimenta de pequenos mamíferos (LEMA; ARAUJO; AZEVEDO, 1983), pássaros e lagartos (MACARTNEY, 1989).

No Brasil, as serpentes do gênero *Crotalus* são representadas apenas pela espécie *Crotalus durissus*, sendo subdividida em 5 subespécies: *C. d. collilineatus*, que é encontrada no centro-oeste, Minas Gerais e São Paulo (norte); *C. d. terrificus*, na região sul meridional e oriental, em zonas altas e secas; *C. d. marajoensis*, na região da Ilha de Marajó; *C. d. ruruima*, encontrada no norte do país; e *C. d. cascavella*, em regiões da caatinga do nordeste do país (CAMPBELL; LAMAR, 1989; PINHO; PEREIRA, 2001).

Existe ainda uma sexta subespécie reconhecida por alguns autores, *C. d. trigonicus*, que são encontradas em algumas regiões do estado de Roraima (CAMILLO, 1998; AUTO, 1999). Entretanto, as alterações climáticas, sucessões vegetais, bem como atividades humanas, podem levar a mudanças na distribuição/abundância destas espécies em diversas regiões (MENDELSON III; JENNINGS, 1992).

1.3. A peçonha crotálica e seus componentes

As peçonhas das serpentes do gênero *Crotalus* são consideradas mais tóxicas do que as do gênero *Bothrops*, pois apresentam maiores números de casos letais no Brasil. Os acidentes botrópicos, por sua vez, ocorrem com maior frequência (aproximadamente 10 vezes maior) que os crotálicos. Estes gêneros são os responsáveis pelos casos mais graves de envenenamento no país (BRAZIL, 1911; BELLUOMINI, 1984; FERREIRA JÚNIOR, 2003).

As peçonhas crotálicas são compostas majoritariamente por proteínas (90% a 95%) (DA SILVA ARAÚJO et al., 2016), carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos e uma pequena fração lipídica e de aminoácidos livres (CAPRONI, 2009). Os componentes proteicos podem ser divididos em componentes enzimáticos, como serinoproteinases, metaloproteinases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases A₂ e não enzimáticos como as desintegrinas, fatores de crescimento endotelial e neural, miotoxinas e peptídeos natriuréticos (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007).

Entre os componentes proteicos da peçonha crotálica, destaca-se a crotoxina, primeira toxina isolada e cristalizada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) (GRALÉN; SVEDBERG, 1938). Ela corresponde entre 65% a 68% da peçonha crotálica (DA SILVA; BIER, 1982), sendo o componente mais tóxico da peçonha (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971). A crotoxina é composta por duas subunidades, uma básica (fosfolipase A₂) e outra ácida (crotapotina), esta sem atividade enzimática, mas capaz de inibir a atividade enzimática e aumentar a letalidade da fosfolipase A₂. Esta fosfolipase apresenta, especialmente, ações miotóxicas e neurotóxicas, sendo capaz de inibir a liberação de neurotransmissores na placa motora. Porém, esta ação só é realizada se a fosfolipase A₂ estiver complexada com a crotapotina, pois esta atua como chaperona, prevenindo ligações inespecíficas da fosfolipase A₂, certificando que esta atue na junção pré-sináptica (CHANG; SU, 1981; BON et al., 1988; CHOUMET et al., 1993; CLISSA, 1997).

A crotamina, isolada pela primeira vez por Gonçalves e Vieira (1950), é uma proteína com ação miotóxica, que atua nas membranas das fibras musculares, despolarizando as células (OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005). Essa toxina pode estar presente ou não em serpentes brasileiras, dependendo da região que habitam (SCHENBERG, 1959).

A giroxina, toxina que também faz parte da composição da peçonha crotálica, é uma enzima trombina-símile (ALEXANDER et al., 1988), capaz de agir sobre proteínas plasmáticas, levando a distúrbios hematológicos (SERRANO; MAROUN, 2005). Essa toxina causa uma lesão no labirinto e induz o animal envenenado a girar em torno do seu próprio eixo (BACILA, 1961; BARRABIN et al., 1978; SEKI; VIDAL; BARRIO, 1980).

A convulxina é um heterodímero de cadeias α e β (MARLAS, 1985), isolado pela primeira vez por Prado-Franceschi e Vital-Brazil (1981). Essa toxina é um potente ativador da agregação plaquetária (VARGAFTING et al., 1980; FRANCISCHETTI et al., 1997).

Além desses quatro componentes, existem muitos outros pouco estudados, devido às suas baixas quantidades nas peçonhas crotálicas, tais como metaloproteases (JIA et al., 1996), L-aminoácido oxidases (DU; CLEMETSON, 2002), hialuronidase (BORDON et al., 2012), lectinas tipo – C (OGAWA et al., 2005), serinoproteases (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2015), desintegrinas (CALVETE et al., 2005) e peptídeos potencializadores de bradicinina (HIGUCHI et al., 2006).

Atualmente já foram descritos componentes com atividades terapêuticas, como a crotalina, peptídeo capaz de promover analgesia (KONNO et al., 2008) e enzimas trombina-símile, utilizadas como “selante de fibrina” para a sutura de feridas (BARROS et al., 2009).

Além de contribuírem para o acidente crotálico, estes componentes proteicos foram essenciais para a evolução das serpentes, imobilizando, paralisando, matando e digerindo animais maiores que as serpentes, fazendo com que este evento predatório deixasse de ser mecânico, passando a ser químico (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007).

Todos estes componentes estão suscetíveis a variação qualitativa e quantitativa, sujeitando as peçonhas a alterações em suas propriedades e atividades biológicas características. Por consequência, pode haver alterações na toxicidade, a qual é representada pelas manifestações clínicas ocasionadas pela composição da peçonha, potência e toxicocinética de cada toxina (DA SILVA ARAÚJO et al., 2016).

1.4. Acidentes ofídicos e a produção do soro antiofídico

Os acidentes ofídicos em regiões tropicais são considerados um grave problema de saúde pública, devido à sua frequência e à relação morbidade/mortalidade, entrando no rol de condições negligenciadas pertencentes à lista do Departamento de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em janeiro de 2007 (PINHO; PEREIRA, 2001; WHO, 2007; CRUZ et al., 2009; GUTIÉRREZ; PEREAÑEZ, 2016). Esse problema afeta principalmente trabalhadores rurais, com destaque para os homens, e crianças de países pobres e em desenvolvimento da América Latina e Oceania, bem como do continente africano e asiático (WHO, 2007).

Com relação à epidemiologia do ofidismo, verifica-se que existe uma subnotificação dos acidentes em todas as partes do globo terrestre. Isto ocorre porque, muitas vezes, os

pacientes não procuram atendimento médico, ou são atendidos e transferidos, não sendo registrados pelo sistema de saúde. Além disso, existe a falha de notificação (CUPO, 2015).

Pouco conhecidas, porém impactantes, são as sequelas anatômicas e funcionais causadas pelo acidente ofídico, que, apesar de não ser conhecido o número de ocorrências, é maior que os casos de óbito. Aproximadamente, mil pacientes por ano são vítimas deste problema, com gravidade ainda desconhecida (GUTIÉRREZ et al., 2010; CHIPPAUX, 2015).

A partir dos dados epidemiológicos obtidos através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), entre os anos de 2011 e 2015 é perceptível a oscilação entre os números de acidentes ofídicos, variando entre 18 mil e 30 mil casos notificados por ano até o momento (os dados entre os anos de 2013 e 2015 ainda estão sujeitos à revisão), além dos números de acidentes que não foram notificados. Os acidentes crotálicos oscilaram entre 1.400 a 2.500 casos notificados por ano (Tab. 1).

Tabela 1. Acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2011 e 2015.

Ano	<i>Bothrops</i>	<i>Crotalus</i>	<i>Lachesis</i>	<i>Micrurus</i>	Não-peçonhentas	Não identificadas	Total
2010	21.584	2.378	1.031	210	1.185	3.275	29.663
2011	21.791	2.487	1.002	227	1.247	3.338	30.092
2012	21.062	2.295	894	246	1.296	3.513	29.306
2013*	20.530	1.934	939	252	1.376	3.363	28.394
2014*	19.404	1.911	835	213	1.403	3.404	27.170
2015*	13.373	1.422	524	139	897	2.210	18.565

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação

*Dados sujeitos à revisão

No Brasil, a notificação compulsória dos acidentes ofídicos levou à criação de um sistema de troca de informações epidemiológicas e soros antiofídicos entre as Secretarias Estaduais de Saúde e o Ministério da Saúde. Desta forma, houve um melhor dimensionamento do ofidismo na população brasileira, possibilitando, assim, o aprimoramento no controle desse tipo de acidente (CARDOSO; WEN, 2003).

O envenenamento crotálico tem uma ação neurotóxica devido, principalmente, à presença de neurotoxinas como a crotoxina, atingindo o sistema nervoso central e periférico. Sua ação é semelhante à do curare, induzindo uma paralisia devido à inibição da liberação de acetilcolina na fenda sináptica (TOKARNIA et al., 2014). Entre os efeitos do envenenamento, destacam-se a ptose palpebral, parestesia de músculos faciais (face miastênica) e paralisia gradual dos músculos respiratórios (AZEVEDO-MARQUES, CUPO; HERING, 2003).

A crotoxina, bem como a crotamina, causam os efeitos miotóxicos, levando a uma lesão tecidual sistêmica de músculos esqueléticos. Consequentemente, o processo de

rabdomiólise é desencadeado, seguido de mioglobínúria (TOKARNIA et al., 2014). Uma lesão tubular renal pode surgir devido à mioglobínúria, o que pode ocasionar insuficiência renal aguda (IRA) e consequente oligúria ou anúria, sendo uma das principais causas de óbito do paciente, assim como o choque cardiovascular (WHO, 2007; TOKARNIA et al., 2014).

Além disso, a vítima apresenta um quadro de dor difusa e valores aumentados de lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), aldolase e creatinoquinase (CK) (AZEVEDO-MARQUES, CUPO; HERING, 2003).

Semelhante à ação da trombina, a peçonha crotálica consome os fatores da coagulação, em especial, o fibrinogênio, levando a um quadro de hipofibrinogenemia, o que torna o sangue incoagulável (THOMAZINI; BARRAVIERA; BARRAVIERA, 1994; SAÚDE, 1998; TOKARNIA et al., 2014).

O único tratamento existente para o acidente ofídico é o soro antiofídico, ou seja, imunoglobulinas hiperimunes obtidas a partir de animais imunizados com a peçonha específica (WHO, 2010). Mais de um século depois de sua introdução na clínica dos envenenamentos por Albert Calmette, em 1895, este tipo de tratamento é essencial, porém sempre é necessário que o paciente seja reavaliado e, também, limitações dos pacientes devem ser consideradas. Por exemplo: pacientes com problemas cardíacos, respiratórios e que apresentem o quadro de insuficiência renal devem ser tratados com o soro e técnicas de emergência devem ser utilizadas (WARRELL, 2010).

Desde 1986, com a implantação do Programa Nacional de Controle de Acidentes Ofídicos pelo Ministério da Saúde no Brasil, ampliado para outros animais peçonhentos em 1988, a produção do soro antiofídico foi padronizada. Atualmente, é realizada apenas por três instituições: Instituto Vital-Brazil, Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias, as quais distribuem o soro gratuitamente para instituições de saúde (WEN et al., 2015).

A produção do soro antiofídico inicia-se com a extração das peçonhas ofídicas, na qual uma mistura de peçonhas de diferentes subespécies do mesmo gênero é preparada e denominada antígeno. Este antígeno é inoculado em cavalos, seguido de uma sangria exploratória, em que é realizada a titulação de anticorpos específicos, sangria de produção e plasmaférese. O plasma é colhido e fracionado para extração e purificação de imunoglobulinas ativas. Dependendo da técnica de fracionamento, podem ser obtidas três diferentes preparações de imunoglobulinas (PARRA et al., 2009; GUTIÉRREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011):

- Fab monovalente – plasma digerido com papaína e fracionado com sulfato de amônio (AL-ABDULLA et al., 2003);

- Fragmentos de F(ab')₂ – plasma digerido com pepsina e fracionado com sulfato de amônio ou ácido caprílico (RAW et al., 1991; GRANDGEORGE et al., 1996);
- IgG inteira – plasma fracionado com sulfato de amônio e ácido caprílico (BOLAÑOS, 1977; ROJAS; JIMÉNEZ; GUTIÉRREZ, 1994).

Após algum destes processos, os antivenenos (AV) são mantidos líquidos ou podem ser liofilizados, o que garante sua estabilidade (WHO, 2010).

Atualmente existem cinco tipos de AV produzidos no Brasil: *Bothrops* AV, *Crotalus* AV, *Micrurus* AV, *Bothrops-Crotalus* AV e *Bothrops-Lachesis* AV, sendo o *Crotalus* AV produzido por peçonhas de *C. d. terrificus* (50%) e *C. d. collilineatus* (50%) (WEN et al., 2015).

Antigamente, para essa produção, os aspectos bioquímicos e imunoquímicos das toxinas do envenenamento não eram levados em consideração. Apesar dos avanços em relação à eficácia e segurança, a produção do soro não foi significativamente modificada, faltam medidas para que haja melhorias no desenvolvimento e fabricação, a fim de atender esses, e outros parâmetros de qualidade (GUTIÉRREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011).

Os componentes de uma peçonha ofídica sofrem variações de acordo com a espécie, gênero, idade, habitat, hábitos alimentares, comportamentais, além de variarem conforme mudanças climáticas. Devido a estas variações, é difícil selecionar as peçonhas que vão compor o antígeno a ser usado na produção do soro antiofídico (WILLEMSE, 1978; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; FERREIRA et al., 1992; LOURENÇO et al., 2013). Desta forma, estudos de variações intraespecíficas tornam-se necessários para uma melhor compreensão dos quadros de envenenamento, além de auxiliar no desenvolvimento de um soro antiofídico mais eficaz.

1.5. Proteômica, venômica e venômica de *C. d. collilineatus*

A partir de diferentes metodologias para elucidar mecanismos bioquímicos e fisiológicos de determinadas patologias, foi criada a proteômica. Esta abordagem permite realizar comparações quantitativas e qualitativas de componentes proteicos expressos por células, tecidos ou órgãos, identificando-os individualmente, para que possam ser caracterizados e relacionados aos estados fisiológicos ou patológicos do organismo estudado em determinadas condições (NOVOA-HERRÁN; SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2011; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012).

Wasiinger e colaboradores (1995) introduziram o conceito de proteoma e, a partir disso, a análise proteômica foi sendo caracterizada, a qual faz uso, principalmente, de técnicas de eletroforese bidimensional (2D) e espectrometria de massas, fundamentais na caracterização de marcadores biológicos, identificação de moléculas e descoberta de vias metabólicas de etapas celulares (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012). Com o advento de técnicas proteômicas, Calvete e colaboradores (2007) iniciaram o projeto “*Snake Venomics*”, realizando estudos proteômicos de peçonhas de serpentes da família Viperidae (Fig. 2) e, a partir deste projeto, abordagens sobre a proteômica e o transcriptoma das glândulas de peçonha de mais de 120 *taxa* foram realizados (GAO et al., 2014).

O protocolo proposto no projeto “*Snake Venomics*” para o estudo proteômico inicia com o fracionamento das peçonhas ofídicas através de cromatografia líquida de alta pressão, utilizando uma coluna de fase reversa C-18 (RP-HPLC), seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida com tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sequenciamento aminoterminal ou N-terminal, determinação de massas moleculares por espectrometria de massas e determinação do conteúdo de cisteínas (S-S ou SH). Assim, é feita a caracterização inicial do conteúdo proteico de cada fração da peçonha. As frações que apresentarem uma única banda eletroforética, massa molecular e sequência aminoterminal podem dar início a caracterização do proteoma da peçonha. Entretanto, frações que apresentam N-terminal bloqueado ou conteúdo eletroforético heterogêneo, têm as bandas de interesse extraídas do gel e estas são reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. Os peptídeos gerados serão analisados por espectrometria de massas, a fim de obter a identidade de cada proteína. Desta forma, é possível obter a identidade de proteínas que representam mais de 0,05% da peçonha e, assim, determinar a composição dessa peçonha (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007).

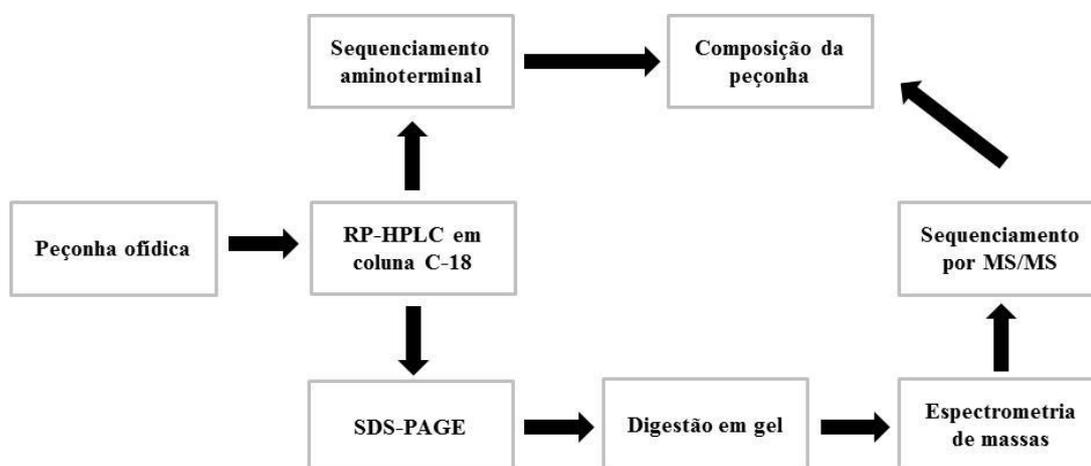


Figura 2. Projeto “*Snake Venomics*”. Esquema simplificado da abordagem proteômica de peçonhas ofídicas (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007; LOMONTE et al., 2014).

Com a introdução dessa técnica, algumas vantagens em relação ao estudo de peçonhas ofídicas foram reveladas, por exemplo, além de determinar os componentes presentes na peçonha, a abundância semi-quantitativa dos mesmos também pode ser estimada (LOMONTE et al., 2014). Outra vantagem é a determinação da capacidade do soro antiofídico em reconhecer e neutralizar os componentes proteicos existentes na peçonha, denominada “Antivenômica”, a qual combina a técnica proteômica com técnicas de imunologia (CALVETE et al., 2009b).

A venômica das peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* já foi determinada por diversos autores de forma indireta através do transcriptoma da glândula de peçonha, associado à bioinformática ou diretamente, utilizando técnicas proteômicas propriamente ditas (Tab. 2) (CALVETE, 2013b).

Tabela 2. Peçonhas ofídicas do gênero *Crotalus* as quais foram submetidas a análises transcriptômicas e proteômicas (adaptada de Calvete (2013b), com atualizações).

Espécie	Transcriptoma	Proteoma
<i>Crotalus adamanteus</i>	ROKYTA et al., 2011 ROKYTA et al., 2012	MARGRES et al., 2014
<i>Crotalus atrox</i>		FOX et al., 2006 CALVETE et al., 2009a
<i>Crotalus durissus cascavella</i>		BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009	BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010
<i>Crotalus durissus cumanensis</i>		CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus durissus durissus</i>		CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus durissus ruruima</i>		CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus durissus terrificus</i>		CALVETE et al., 2009c GEORGIEVA et al., 2010
<i>Crotalus horridus</i>	ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013	ROKYTA et al., 2015
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>		MASSEY et al., 2012
<i>Crotalus simus</i>	DURBAN et al., 2011	CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus tigris</i>		CALVETE et al., 2012
<i>Crotalus vegrandis</i>	VIALA et al., 2015	VIALA et al., 2015
<i>Crotalus viridis viridis</i>		SAVIOLA et al., 2015

Em relação à venômica de *C. d. collilineatus*, Boldrini-França e colaboradores (2009) realizaram o transcriptoma da glândula de peçonha, demonstrando que a crotoxina representa 88% do total de transcritos desta peçonha. Nesse trabalho, foram identificadas toxinas que também são expressas na peçonha de *C. d. terrificus*, como o fator de crescimento neural

(NGF), bem como toxinas desconhecidas para a espécie *C. durissus*, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a cardiotoxina.

Boldrini-França e colaboradores (2010) também determinaram o proteoma destas peçonhas, bem como o da subespécie *C. d. cascavella*, com o intuito de comparar o perfil proteico expresso por estas subespécies. Esse estudo demonstrou que a peçonha de *C. d. collilineatus* apresenta crotamina em sua composição, enquanto a de *C. d. cascavella* apresentou altas concentrações de uma fosfolipase A₂ miotóxica. As peçonhas destas subespécies se assemelham à da subespécie *C. d. terrificus*, sendo que as diferenças encontradas podem ser devido à localização geográfica onde estas três subespécies são encontradas.

O estudo proteômico também permite a comparação entre indivíduos pertencentes a uma mesma espécie. No caso de serpentes, através do conhecimento da peçonha individual, o soro antiofídico poderá ser produzido com maior especificidade, aumentando sua eficácia frente ao envenenamento (MENDOZA et al., 2009; GUTIÉRREZ, 2011).

Desta forma, estudos mais aprofundados sobre a composição das peçonhas ofídicas puderam ser realizados. Entretanto, as variações individuais entre peçonhas de serpentes da mesma espécie são raramente documentadas, apesar da ciência de muitos pesquisadores sobre a ocorrência destas. Essas variações individuais podem ser um fator de impacto nos estudos de peçonhas ofídicas (KOPPER et al., 2015).

Frente aos poucos estudos proteômicos realizados com peçonhas de *C. d. collilineatus*, serpente que habita a região sudeste do país, a ocorrência de variações individuais que podem inferir na eficácia do soro antiofídico, único antídoto utilizado na terapia do envenenamento, a proposta deste trabalho foi analisar comparativamente o proteoma dessa subespécie, utilizando a peçonha de 22 indivíduos, bem como verificar as diferenças bioquímicas e imunológicas que poderiam ocorrer diante do envenenamento por estes indivíduos. Comparações qualitativas e quantitativas de componentes proteicos da peçonha são importantes para a compreensão do envenenamento, bem como para a escolha de serpentes utilizadas para a produção do soro utilizado na terapêutica (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003).

5. Conclusões

O acidente ofídico é uma das doenças ocupacionais negligenciadas em todo o mundo, em especial no Brasil, onde existe a ocorrência de, aproximadamente, 30 mil casos de envenenamento por ano. Sendo assim, estudos relacionados aos acidentes ofídicos tem se tornado muito relevantes, em relação a melhoria do tratamento e profilaxia destes acidentes, bem como, em relação a busca de novas ferramentas biotecnológicas a partir das peçonhas de serpentes.

O presente estudo fez uso de técnicas ômicas para a identificação de proteínas presentes nas peçonhas de 22 serpentes da subespécie *Crotalus durissus collilineatus*, de forma que o proteoma desses indivíduos foi elucidado, evidenciando proteínas pela primeira vez na peçonha desta subespécie.

Os resultados demonstraram que existem variações intraespecíficas entre os 22 indivíduos desta subespécie, sendo que estas variações são qualitativas, mostrando que apenas dois desses indivíduos apresentaram a proteína crotamina, e quantitativas, as quais mostram que todos os componentes da peçonha variam entre os indivíduos. Estas diferenças podem levar a alterações quanto à toxicidade das peçonhas dessas serpentes, interferindo no tratamento do acidente ofídico.

A toxina hialuronidase, além de apresentar sequências peptídicas que não estão depositadas no banco de dados UniProtKB, também mostrou que diferentes peçonhas podem conter diferenças quantitativas importantes desta enzima. Desta forma, a toxicidade pode também ser diferente.

Apesar de todas as diferenças intraespecíficas, as imunorreatividades do soro anticrotálico do Instituto Butantan com as peçonhas desses 22 indivíduos foram semelhantes, mostrando que o soro produzido por esta instituição é adequado para o tratamento do envenenamento crotálico, pois foi capaz de reconhecer todas as peçonhas. Porém não foi capaz de reconhecer com tanta eficiência todos os componentes das peçonhas.

As análises do soro de animais envenenados por peçonhas de diferentes indivíduos de *C. d. collilineatus* mostraram que estas peçonhas podem produzir diversos efeitos imunológicos e bioquímicos nas vítimas, dependendo da variabilidade dos seus componentes, o que pode interferir na sintomatologia deste tipo de envenenamento.

6. Referências

6. REFERÊNCIAS¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Citocinas. In: ELSEVIER (Ed.). **Imunologia celular e molecular**. 5 ed., 2005.

AL-ABDULLA, I. et al. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 399 - 404, 2003.

ALAPE-GIRÓN, A. et al. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **J Proteome Res**, v. 7, n. 8, p. 3556 - 3571, 2008.

ALEXANDER, G. et al. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953 - 960, 1988.

ALMEIDA, C. D. et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1 - 19, 2015.

AMARALL, A. **Ofionímia ameríndia na ofiologia brasileira**. 1973.

AMORA, D. N. **Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus***. 2005. 100p (Mestrado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

AMORA, D. N. et al. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 260 - 264, 2006.

AMORIM, F. G. **Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas toxinas obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha de *Tityus serrulatus***. 2015. 112p (Doutorado). Universidade de São Paulo.

ANDE, S. R. et al. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Yeast**, v. 25, n. 5, p. 349 - 357, 2008.

ANDRIANI, E. P. **Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas**. 1995. 111p Universidade de São Paulo.

¹As referências utilizadas para a produção do presente trabalho estão citadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 512 - 519, 2012.

AUTO, H. J. F. **Animais peçonhentos**. Maceió: EdUFAL: 1999.

AZEVEDO-MARQUES, M.; HERING, S.; CUPO, P. Acidente crotálico. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo, p. 91 - 98, 2003.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 480 - 489, 2003.

BACILA, M. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiologica Latinoamericana*, 1961, ASSN LATINOAMER CIENC FISIOL SERRANO 665, 1414, Buenos Aires, Argentina. p. 224.

BAJWA, S. S. et al. Thrombin-like and fibrinolytic enzymes in the venoms from the Gaboon viper (*Bitis gabonica*), eastern cottonmouth moccasin (*Agkistrodon p. piscivorus*) and southern copperhead (*Agkistrodon c. contortrix*) snakes. **Toxicon**, v. 20, n. 2, p. 427 - 432, 1982.

BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A. R. The imaging properties and sensitivity of the facial pits of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 16, p. 2801 - 2810, 2007.

BALDO, E. C. F. et al. Toad Poison and Drug Discovery. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. (Ed.). **Toxins and Drug Discovery**: Springer Netherlands, 2015. p.1 - 22. (Toxinology). ISBN 978-94-007-6726-3.

BARBOSA, C. F. et al. Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunoassay. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 28, n. 10, p. 1077 - 1080, 1995.

BARRABIN, H. et al. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxins: Animals, Plant and Microbial**. New York: Pergamon, p. 113 - 114, 1978.

BARRAVIERA, B.; PERAÇOLI, M. T. S. Soroterapia heteróloga. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas Ltda, 1994.

BARRAVIERA, B. et al. Use of an ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM human antibody levels in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 2, n. 1, p. 14 - 27, 1996.

BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 12, n. 8, p. 553 - 571, 2009.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. 1424 - 1437, 1996.

BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Rev. bras. Saúde ocup**, v. 12, p. 82 - 96, 1984.

BERNARDE, P. S. **Acidentes fídicos** 2009.

BERNARDE, P. S. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil. 2014.

BIN, A. M. H. et al. 5'-nucleotidases of *Naja naja karachiensis* snake venom: their determination, toxicities and remedial approach by natural inhibitors (medicinal plants). **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 73, n. 3, 2016.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7 - 16, 2003.

BOLAÑOS, R. **Antivenenos. Manual de Procedimientos. Producción y Pruebas de Control en la Preparación de Antisueros Diftérico, Tetánico, Botulínico, Antivenenos y de la Gangrena Gaseosa.** SALUD, O. P. D. L. Washington, DC: 104 - 141 p. 1977.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. **Characterization of Hyaluronidase Activity from Several Viperidae Snake Venoms and Partial Isolation of Hyaluronidase from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom.** XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Salvador, 2007.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, n. 5, p. 586 - 595, 2009.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758 - 1776, 2010.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9971 - 9986, 2015.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta physiologica et pharmacologica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y de la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia**, v. 39, n. 4, p. 439 - 448, 1988.

BORDON, K. C. F. et al. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2740 - 2748, 2012.

BORDON, K. C. F. et al. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 1, 2015.

BRAZIL, V. **A defesa contra o ophidismo**. Pocai & Weiss, 1911.

BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1263 - 1276, 2012.

BULLOCK, T. H.; COWLES, R. B. Physiology of an infrared receptor: the facial pit of pit vipers. **Science**, v. 115, n. 2994, p. 541 - 543, 1952.

BUTANTAN, Instituto. Soros. 2016. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/producao/soros/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 7 de setembro.

CALDWELL, M. W. et al. The oldest known snakes from the Middle Jurassic-Lower Cretaceous provide insights on snake evolution. **Nature communications**, v. 6, 2015.

CALVETE, J. J. Brief history and molecular determinants of snake venom disintegrin evolution. In: (Ed.). **Toxins and hemostasis**: Springer, 2010. p. 285 - 300. ISBN 9048192943.

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Rev Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 739 - 758, 2011.

CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, v. 62, p. 40 - 49, 2013a.

CALVETE, J. J. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. **Toxicon**, v. 75, p. 44-62, 2013b.

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063 - 1074, 2005.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**, v. 42, n. 11, p. 1405-14, 2007.

CALVETE, J. J. et al. Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. **J Proteome Res**, v. 8, n. 6, p. 3055 - 3067, 2009a.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS Lett**, v. 583, n. 11, p. 1736 - 1743, 2009b.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **J Proteome Res**, v. 9, n. 1, p. 528 - 544, 2009c.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics and disintegrins: portrait and evolution of a family of snake venom integrin antagonists. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**, p. 337 - 357, 2009d.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest neartic rattlesnake venom. Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. **J Proteome Res**, v. 11, n. 2, p. 1382 - 1390, 2012.

CAMILLO, M. **Contribuição ao estudo das gioxinas (enzimas semelhantes à trombina) dos venenos das serpentes brasileiras *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus* 75f.** 1998. 75p (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. 1989.

CANTÚ, M. D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 669 - 675, 2008.

CAPRONI, P. **Ação da Bothropstoxina-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o sistema imune.** 2009. 60 (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

CARDOSO, D. F. et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 3, p. 125 - 133, 2001.

CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H. Introdução ao ofidismo. In: (Ed.). **Animais peçonhentos do Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, 2003. cap. 1, p.3 - 6.

CARNIELLI, C. M. **Análise proteômica diferencial de proteínas superficiais da membrana de *Xanthomonas spp.* em interação com hospedeiro cítrico**. 2013. 91p (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos.

CARRASCO, P. A. et al. Nomenclatural instability in the venomous snakes of the *Bothrops* complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon**, v. 119, p. 122 - 128, 2016.

CASTANHEIRA, L. E.; BRANDEBURGO, M. I. H. Purificação e caracterização enzimática e biológica parciais da hialuronidase presente na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*. **Horizonte Científico**, v. 2, n. 2, 2008.

CERNI, F. A. **Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das toxinas Ts6 e Ts7**. 2012. (Mestrado). Universidade de São Paulo.

CHAN, Y. S. et al. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1 - 17, 2016.

CHANG, C. C.; SU, M. J. A study on the interaction of crotopotin with crotoxin phospholipase A2, notexin and other presynaptic neurotoxins. **British journal of pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 495 - 503, 1981.

CHAPEAUROUGE, A. et al. Interrogating the venom of the viperid snake *Sistrurus catenatus edwardsii* by a combined approach of electrospray and MALDI mass spectrometry. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0092091, 2015.

CHEN, X. et al. Purification and Characterization of 5'-nucleotidase from *Trimeresurus albolabris* Venom. **Zoological Research**, v. 29, n. 4, p. 399 - 404, 2008.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279 - 1303, 1991.

CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 1, 2015.

CHOUMET, V. et al. Snake venom phospholipase A2 neurotoxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, n. 1/2, p. 57 - 62, 1993.

CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imonológicas**. 1997. 79p (Doutorado). Universidade de São Paulo.

COSTA, E. S. et al. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, v. 74, p. 167 - 178, 2013.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 4, n. 3, p. 75 - 93, 2015.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & Disease**, v. 19, n. 1, p. 42, 2009.

CUPO, P. Bites and stings from venomous animals: a neglected Brazilian tropical disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 639 - 641, 2015.

CUPO, P. et al. Immediate hypersensitivity reactions following intravenous use of antivenom sera: predictive value of hypersensitivity skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 2, p. 115 - 122, 1991.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 742 - 780, 1997.

DA-SILVA-FREITAS, D.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; ARANTES, E. C. PEGylation: a successful approach to improve the biopharmaceutical potential of snake venom thrombin-like serine protease. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 12, p. 1133 - 1139, 2015.

DA SILVA ARAÚJO, L. et al. *Crotalus durissus* venom: biological effects and relevant applications. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 10, n. 1, p. 9 - 21, 2016.

DA SILVA, M. H.; BIER, O. G. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by inhibition of phospholipase A2 activity. **Toxicon**, v. 20, n. 3, p. 563 - 569, 1982.

DA SILVA, N. J.; AIRD, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 128, n. 3, p. 425 - 456, 2001.

DEORAS, P. J. Studies on Bombay snakes; snake farm yield records and their probable significance. In: (Ed.). **Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region**: Pergamon Press Oxford, 1963. p. 337.

DHANANJAYA, B. L.; D'SOUZA, C. J. M. An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 1, p. 1 - 6, 2010.

DI FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopoly-saccharides and hyaluronidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 220, n. 1, p. 303 - 306, 1956.

DIMITROV, G. D.; KANKONKAR, R. C. Fractionation of *Vipera russelli* venom by gel filtration-ii comparative study of yellow and white venoms of *Vipera russelli* with special reference to the local necrotizing and lethal actions. **Toxicon**, v. 5, n. 4, p. 283 - 288, 1968.

DOS SANTOS, M. C. et al. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 31, n. 11, p. 1459 - 1469, 1993.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659 - 665, 2002.

DURBAN, J. et al. Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 435 - 450, 2003.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 80 - 91, 1967.

EL-CHAMY-MALUF, S. et al. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. **Peptides**, v. 78, p. 11 - 16, 2016.

FENWICK, A. M.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617 - 640, 2009.

FERNANDES, D. S.; FRANCO, F. L.; FERNANDES, R. Systematic revision of the genus *Lachesis* Daudin, 1803 (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, v. 60, n. 2, p. 245 - 260, 2004.

FERNANDES, T. A.; AGUIAR, C. N.; DAHER, E. F. Envenenamento crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 2, p. 1 - 10, 2008.

FERREIRA JÚNIOR, R. S. **Avaliação da resposta humoral e da capacidade de neutralização do soro de camundongos *Swiss* inoculados com venenos nativo e irradiado com cobalto-60 de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni***. 2003. 115p (Mestrado). Universidade Estadual Paulista.

FERREIRA, M. L. et al. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1603 - 1608, 1992.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583 - 2593, 1970.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75 - 82, 2013.

FOX, J. W. et al. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 700 - 714, 2006.

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

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200 - 209, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1217 - 1228, 1997.

FRY, B. G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **nature**, v. 439, n. 7076, p. 584 - 588, 2006.

FRY, B. G. et al. Evolution of an arsenal structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 215 - 246, 2008.

GALLO, M. A. History and scope of toxicology. In: (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7. New York: McGraw-Hill, 2008. cap. 1, p.3 - 11.

GAO, J. F. et al. Proteomic and biochemical analyses of short-tailed pit viper (*Gloydius brevicaudus*) venom: age-related variation and composition-activity correlation. **J Proteomics**, v. 105, p. 307 - 322, 2014.

GEORGIEVA, D. et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus* - Correlation with pharmacological activities. **Journal of Proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2302 - 2316, 2010.

GIRISH, K. S. et al. Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 240, n. 1 - 2, p. 105 - 110, 2002.

GONÇALVES-MACHADO, L. et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **J Proteomics**, v. 135, p. 73 - 89, 2016.

GONÇALVES, J. M.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. **An. Acad. Bras. Cienc**, v. 22, p. 141 - 150, 1950.

GRALÉN, N.; SVEDBERG, T. The molecular weight of crotoxin. **Biochemical Journal**, v. 32, n. 8, p. 1375 - 1377, 1938.

GRANDGEORGE, M. et al. Preparation of improved F(ab')₂ antivenoms. An example: new polyvalent anti-European vipers (equine). **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 148 - 148, 1996.

GREEN, L. C.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional Snakebite poisoning in Latin America and the Caribbean: An integral view from a regional perspective. **Boletín de Malariología Y Salud Ambiental**, v. 51, n. 1, p. 1 - 16, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 4, p. 1 - 19, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. **Biologicals**, v. 39, n. 3, p. 129 - 142, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223 - 1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; PEREAÑEZ, J. A. The need for an integrated approach in confronting snakebite envenoming in Latin America: the relevance of endogenous scientific and technological research. **Vitae**, v. 23, n. 2, p. 103 – 105, 2016.

HAKIM, M. A.; YANG, S.; LAI, R. Centipede venoms and their components: resources for potential therapeutic applications. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 11, p. 4832 - 4851, 2015.

HAMMOUDA, M. B. et al. Lebein, a snake venom disintegrin, induces apoptosis in human melanoma cells. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 7, p. 1 - 14, 2016.

HART, M. L. et al. Direct treatment of mouse or human blood with soluble 5'-nucleotidase inhibits platelet aggregation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 8, p. 1477 - 1483, 2008.

HAWGOOD, B. J. Crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 21 - 22, 1990.

HECHTER, O. Studies on spreading factors i. The importance of mechanical factors in hyaluronidase action in skin. **The Journal of experimental medicine**, v. 85, n. 1, p. 77 - 97, 1947.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560 - 1563, 1971.

HERNANDEZ CRUZ, A. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators Inflamm**, v. 2008, p. 874962, 2008.

HIGUCHI, S. et al. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 107 - 121, 2006.

HSIANG, A. Y. et al. The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. **BMC evolutionary biology**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.

HUANG, S. et al. Carboxypeptidase E is a prediction marker for tumor recurrence in early-stage hepatocellular carcinoma. **Tumor Biology**, p. 1 - 9, 2016.

IMIG, J. D. ACE Inhibition and bradykinin-mediated renal vascular responses EDHF involvement. **Hypertension**, v. 43, n. 3, p. 533 - 535, 2004.

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed Res Int**, v. 2014, 2014.

JACKSON, K. The evolution of venom-conducting fangs: insights from developmental biology. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 975 - 981, 2007.

JIA, L. G. et al. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, v. 34, n. 11, p. 1269 - 1276, 1996.

JOHNSON, E. K.; KARDONG, K. V.; OWNBY, C. L. Observations on white and yellow venoms from an individual southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1169 - 1180, 1987.

KARDONG, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. **Mem. Inst. Butantan**, v. 46, p. 105 - 118, 1982.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 265 - 293, 1992.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics – cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497 - 506, 2012.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 24, p. 3030 - 3041, 2006.

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293-304, 2008.

KOPPER, R. A. et al. Comparison of total protein and enzyme levels in successive regenerations of venom from individual coralsnakes. **Toxicon**, v. 101, p. 19 - 22, 2015.

KORNALIK, F.; MASTER, R. W. P. A comparative examination of yellow and white venoms of *Vipera ammodytes*. **Toxicon**, v. 2, n. 2, p. 109 - 111, 1964.

KREIL, G. Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. **Protein Science**, v. 4, n. 9, p. 1666 - 1669, 1995.

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

LAURIDSEN, L. P. et al. Exploring the venom of the forest cobra snake: Toxicovenomics and antivenom profiling of *Naja melanoleuca*. **Journal of proteomics**, 2016.

LECHT, S. et al. Anti-angiogenic activities of snake venom CRISP isolated from *Echis carinatus sochureki*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 6, p. 1169 - 1179, 2015.

LEE, T. K. et al. An N-terminal truncated carboxypeptidase E splice isoform induces tumor growth and is a biomarker for predicting future metastasis in human cancers. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 3, p. 880 - 892, 2011.

LEIS, L. B.; CHEBABO, A. **Diretrizes Diagnósticas de Acidentes com Animais Peçonhentos**. Serviços de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ. 30 p., N/A. Disponível em: www.hucff.ufrj.br/download-de-arquivos/category/26-dip?download=332:rotinas.

LEMA, T.; ARAUJO, M. L.; AZEVEDO, A. C. P. Contribuição ao conhecimento da alimentação e do modo alimentar de serpentes do Brasil. **Comun. Mus. Ciênc. PUCRS, Sér. Zool**, v. 26, n. 1, p. 41 - 121, 1983.

LIRA-DA-SILVA, R. M. et al. Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LOMONTE, B. et al. Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. **Journal of proteomics**, v. 105, p. 323 - 339, 2014.

LOMONTE, B. et al. Venom of the coral snake *Micrurus clarki*: proteomic profile, toxicity, immunological cross-neutralization, and characterization of a three-finger toxin. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 5, p. 1 - 15, 2016.

LOPES, C. T. A. et al. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crotálico experimental em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 843 - 849, 2012.

LOURENÇO, A., JR. et al. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. **Toxicon**, v. 69, p. 75 - 81, 2013.

MACARTNEY, J. M. Diet of the Northern Pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*, in British Columbia. **Herpetologica**, v. 45, n. 3, p. 299 - 304, 1989.

MARGRES, M. J. et al. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **Journal of proteomics**, v. 96, p. 145 - 158, 2014.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749 - 1800, 1998.

MARLAS, G. Isolation and characterization of the α and β subunits of the platelet-activating glycoprotein from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Biochimie**, v. 67, n. 12, p. 1231 - 1239, 1985.

MARTINS, A. M. C. et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1165 - 1171, 2002.

MASSEY, D. J. et al. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2576 - 2587, 2012.

MCCLEARY, R. J. R. et al. Proteomic comparisons of venoms of long-term captive and recently wild-caught Eastern brown snakes (*Pseudonaja textilis*) indicate venom does not change due to captivity. **Journal of proteomics**, p. 51 - 62, 2016.

MELANI, R. D. et al. Seeing beyond the tip of the iceberg: a deep analysis of the venom of the Brazilian rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **EuPA Open Proteomics**, v. 8, p. 144 - 156, 2015.

MELGAREJO, A. R.; CARDOSO, J. L. C. Serpentes peçonhentas do Brasil. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, p. 33 - 61, 2003.

MENDELSON III, J. R.; JENNINGS, W. B. Shifts in the relative abundance of snakes in a desert grassland. **Journal of Herpetology**, p. 38 - 45, 1992.

MENDOZA, J. et al. Patrones electroforéticos de los venenos de serpientes peruanas de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. **Revista de la Sociedad química del Perú**, v. 75, n. 2, p. 235 - 242, 2009.

MÉNEZ, A.; STÖCKLIN, R.; MEBS, D. 'Venomics' or: the venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 255 - 259, 2006.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304 - 312, 2006.

MIR, R. et al. Conotoxins: Structure, therapeutic potential and pharmacological applications. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 5, p. 582 - 589, 2016.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12 - 20, 2012.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in immunology**, v. 46, p. 111 - 147, 1989.

MOTTA, V. T. Enzimas. In: MASSAU, M. (Ed.). **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**, 2000.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 3, p. 263 - 269, 1996.

NASCIMENTO, C. N. G.; DE OLIVEIRA RAMOS, M.; LICHTENSTEIN, A. Símbolo da medicina. **Revista de Medicina**, v. 85, n. 2, p. 66 - 70, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: LTDA, A. E. (Ed.). **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6 ed., 2014. p. 75 - 114.

NESVIZHSHKII, A. I.; AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data the protein inference problem. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 1419 - 1440, 2005.

NG, K. K. F.; VANE, J. R. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. **nature**, v. 216, n. 5117, p. 762 - 766, 1967.

NOVOA-HERRÁN, S. S.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. Obtención de un sub-proteoma de citoplasma de una línea celular de trofoblasto mediante fraccionamiento con detergentes. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 35, n. 136, p. 277 - 285, 2011.

OGAWA, T. et al. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 1 - 14, 2005.

OGUIURA, N. et al. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **The Journal of antibiotics**, v. 64, n. 4, p. 327 - 331, 2011.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363 - 370, 2005.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255 - 265, 2011.

ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125 - 135, 2015.

OUYANG, C.; HUANG, T. F. Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Toxicon**, v. 21, n. 4, p. 491 - 501, 1983.

PARRA, A. C. et al. Alterações hematológicas durante a imunização e após a sangria e plasmaferese em equinos de produção de soro hiperimune anticrotálico. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1225 - 1230, 2009.

PAWLAK, J.; KINI, R. M. Snake venom glutaminyl cyclase. **Toxicon**, v. 48, n. 3, p. 278 - 286, 2006.

PEIGNEUR, S. et al. Crotamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. **Mol Pharmacol**, v. 82, n. 1, p. 90 - 96, 2012.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**, v. 5, n. 1, p. 57 - 65, 2003.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 47, n. 1, p. 24 - 29, 2001.

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 875 - 887, 1981.

PRATES, P. R. Do bastão de Esculápio ao caduceu de Mercúrio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 434 - 436, 2002.

PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. The hyaluronidase activities of some southeast asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629 - 637, 1988.

RÁDIS-BAPTISTA, G. et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 44, n. 3, p. 412 - 423, 2006.

RADVANYI, F. et al. Binding of crotoxin, a presynaptic phospholipase A₂ neurotoxin, to negatively charged phospholipid vesicles. **Journal of neurochemistry**, v. 53, n. 4, p. 1252 - 1260, 1989.

RANDOLPH, A. et al. Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **Protein Science**, v. 1, n. 5, p. 590 - 600, 1992.

RANG, H. P. et al. Hormônios locais: citocinas, lipídeos biologicamente ativos, aminas e peptídeos. In: ELSEVIER (Ed.). **Farmacologia**. Rio de Janeiro, 2011. cap. 17, p. 778.

RAW, I. et al. **Antivenins in Brazil: Preparation**. HANDBOOK OF NATURAL TOXINS. T, T. A. New York: 557 - 581 p. 1991.

RIBEIRO, C. B. et al. *Crotalus durissus collilineatus* venom induces TNF- α and IL-10 production in human peripheral blood mononuclear cells. **ISRN Inflamm**, v. 2014, p. 1 - 7, 2014.

RIBEIRO, P. H. et al. Mechanism of the cytotoxic effect of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 329 - 337, 2016.

RICARDI, R. **Estudo dos mecanismos de supressão da resposta imune induzida pela crotocina do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2010. (Doutorado). Universidade de São Paulo.

ROJAS, G.; JIMÉNEZ, J. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 351 - 363, 1994.

ROKYTA, D. R. et al. A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 657 - 671, 2011.

ROKYTA, D. R. et al. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC genomics**, v. 13, n. 1, 2012.

ROKYTA, D. R. et al. The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). **Toxicon**, v. 98, p. 34 - 48, 2015.

ROKYTA, D. R.; WRAY, K. P.; MARGRES, M. J. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

RUSSELL, F. E. Toxic effects of terrestrial animal venoms and poisons. In: (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6 ed., 2001. cap. 26, p. 945 - 964.

RUSSELL, F. E.; BUSS, F. W.; WOO, M. Y. Zootoxicological properties of venom phosphodiesterase. **Toxicon**, v. 1, n. 3, p. 99 - 108, 1963.

SAMPAIO, S. C. et al. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 4, p. 551 - 558, 2001.

SAMPAIO, S. C. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899 - 907, 2003.

SANTORO, M. L. et al. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 61 - 73, 1999.

SANTORO, M. L. et al. NPP-BJ, a nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Bothrops jararaca* snake venom, inhibits platelet aggregation. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 499 - 512, 2009.

SANTOS, W. G. et al. Envenenamento crotálico em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 13, n. supl., p. 5 - 6, 2013.

SAÚDE, Ministério da. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde: 131 p. 1998.

SAVIOLA, A. J. et al. Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®. **Journal of proteomics**, v. 121, p. 28 - 43, 2015.

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science (New York, NY)**, v. 129, n. 3359, p. 1361 - 1363, 1959.

- SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 235 - 247, 1980.
- SELVANAYAGAM, Z. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987–1997). **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 565 - 586, 1999.
- SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115 - 1132, 2005.
- SHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-SDS-PAGE for the separation of proteins in the 1–100 kDa range. **Anal Biochem**, v. 168, p. 368 - 379, 1987.
- SHARMA, M. et al. Unveiling the complexities of *Daboia russelii* venom, a medically important snake of India, by tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v. 107, p. 266 - 281, 2015.
- SIIGUR, E. et al. Isolation and characterization of nerve growth factor from *Vipera lebetina* (snake) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 211 - 215, 1985.
- SILVA, J. A. A. et al. Gyroxin and its biological activity: effects on CNS basement membranes and endothelium and protease-activated receptors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 281 - 291, 2012.
- SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Atualidades proteômicas na sepse. **Rev Ass Med Brasil**, v. 58, n. 3, p. 376 - 382, 2012.
- SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. L. Schlangengifte, III. Mitteil.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 71, n. 5, p. 1076 - 1081, 1938.
- SOMMER, C.; WHITE, F. A. Cytokines, chemokines, and pain. In: PRESS, I. (Ed.). **Pharmacology of Pain**. 1. Seattle, 2010. p. 279 - 302.
- STRACK, R. Milestone 9: Solving the primary structure of peptides. **Nature Milestones**, p. 11 - 11, 2015.
- SUNAGAR, K. et al. Molecular evolution of vertebrate neurotrophins: co-option of the highly conserved nerve growth factor gene into the advanced snake venom arsenal. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. E81827, 2013.

THEAKSTON, R. D. G.; LLOYD-JONES, M. J.; REID, H. A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. **The Lancet**, v. 310, n. 8039, p. 639 - 641, 1977.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 541 - 557, 2003.

THOMAZINI, I. A.; BARRAVIERA, B.; BARRAVIERA, B. Alterações hematológicas nos acidentes por animais peçonhentos. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, p. 81 - 96, 1994.

TOKARNIA, C. H. et al. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops spp.* em animais de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 301 - 312, 2014.

TOYAMA, M. H. et al. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 585 - 591, 2001.

TRUMMAL, K. et al. Phosphodiesterase from *Vipera lebetina* venom - structure and characterization. **Biochimie**, v. 106, p. 48 - 55, 2014.

TRUMMAL, K. et al. 5'-Nucleotidase from *Vipera lebetina* venom. **Toxicon**, v. 93, p. 155 - 163, 2015.

TU, A. T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: (Ed.). **Rattlesnakes Venoms: Their Action and Treatment**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1982. p.247 - 312.

UTKIN, Y. N.; OSIPOV, A. V. Non-lethal polypeptide components in cobra venom. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 28, p. 2906 - 2915, 2007.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Ecologia e nomes populares de *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral, 1926) em áreas sob efeito antrópico do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zociências** v. 14, n. 1, 2, 3, p. 71 - 79, 2012.

VARGAFTING, B. B. et al. Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **European journal of pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 451 - 464, 1980.

VASQUEZ, M. L. M. et al. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO. In: (Ed.). **Medicamentos na prática clínica**, 2009. p. 45 - 59. ISBN 8536323175.

VIALA, V. L. et al. Proteomic analysis of the rare Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis* venom: evidence of a broad arsenal of toxins. **Toxicon**, v. 107, p. 234 - 251, 2015.

VONK, F. J. et al. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 630 - 633, 2008.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77 - 88, 2010.

WARRELL, D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 207 - 223, 2012.

WASIINGER, C. V. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090 - 1094, 1995.

WEN, F. H. et al. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 5, p. e0003701, 2015.

WHO. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a consultative meeting**. World Health Organization, Geneva, 10 de janeiro de 2007. 2007.

WHO. **Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins**. World Health Organization, p. 8 - 9, 2010.

WIEZEL, G. A. et al. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, v. 107, p. 359 - 368, 2015.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. **Comp Biochem Physiol**, v. 61B, p. 553 - 557, 1978.

WÜSTER, W.; BERNILS, R. S. On the generic classification of the rattlesnakes, with special reference to the Neotropical *Crotalus durissus* complex (Squamata: Viperidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 28, n. 4, p. 417 - 419, 2011.

WÜSTER, W. et al. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 445 - 459, 2008.

YAMAZAKI, Y. et al. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2708 - 2715, 2002.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 51985 - 51988, 2003.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 9885 - 9891, 2009.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 227 - 231, 2004.

ZHANG, B. et al. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 1 - 11, 2006.

ZHANG, C.; WU, S.; XU, D. Catalytic mechanism of angiotensin-converting enzyme and effects of the chloride ion. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 22, p. 6635 - 6645, 2013.