

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento
endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus
durissus collilineatus***

Isabela Gobbo Ferreira

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Isabela Gobbo Ferreira

**Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento
endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus
durissus collilineatus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

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

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira Gobbo, Isabela

Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, 2017.

31 p.: il. fig., graf. tab.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

1. VEGF. 2. *Crotalus durissus collilineatus*. 3. Peçonha de serpente 4. Angiogênese. 5. Espectrometria de massas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabela Gobbo Ferreira

Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família,
Jarbas, Marta e Fernando
por ser meu alicerce, pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder a vida com saúde para poder batalhar por este sonho.

A minha família maravilhosa, meus tesouros: meus pais! Vocês são minha inspiração, agradeço pelo amor infinito, educação, carinho, compreensão e paciência. Ao meu querido irmão, Fernando, pela paciência e companheirismo. Vocês são meu porto seguro, amo muito vocês!

Ao meu querido Matheus, meu amigo, companheiro, meu amor. Agradeço pela paciência, compreensão e, principalmente, por me incentivar a batalhar por mais este sonho. Obrigada por estar ao meu lado sempre que precisei. Te amo!

À minha querida orientadora, Prof.^a. Dr.^a. Eliane Candiani Arantes, dona de um enorme coração, uma segunda mãe para todos do Laboratório de Toxinas Animais. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada, obrigada pelas inúmeras palavras de incentivo, pelo amor, educação. Durante os anos que estive no laboratório, a senhora sempre me incentivou, orientou, consolou e ensinou muito. Espero um dia, me tornar a metade da mulher e profissional que a senhora é. Muito obrigada por tudo!

À Prof.^a. Dr.^a. Manuela Berto Pucca pela paciência nas inúmeras explicações, pela amizade, e pelas considerações com relação ao trabalho, sempre muito enriquecedoras! Muito obrigada!

Ao Prof. José Cesar Rosa pela colaboração e ensinamentos sobre espectrometria de massas, e também a especialista Clarice Izumi, a pós-doutoranda Helen Julie, a ex-técnica Cirlei Vanni e demais membros do Centro de Química de Proteínas, muito obrigada.

À Prof.^a. Dr.^a. Vera Lucia de Campos Brites, coordenadora do setor de Manutenção de Répteis da UFU-MG, pela colaboração e concessão das peçonhas utilizadas neste trabalho.

À Prof.^a. Dr.^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, coordenadora do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais da UFU-MG e à pós-doutoranda Daiana Silva Lopes, pela colaboração, pela atenção, educação e profissionalismo. Agradeço imensamente pela disponibilidade e carinho todas as vezes que precisei.

Ao Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho, do Laboratório de Inflamação e Dor da FMRP-USP, e ao pós-doutorando André Luís Lopes Saraiva pela colaboração com o ensaio funcional de migração celular. Agradeço a oportunidade de trabalhar com pessoas tão dedicadas e atenciosas, muito obrigada!

À Dr^a. Karla de Castro Figueiredo Bordon, colaboradora deste trabalho, muito obrigada por toda paciência, compreensão, explicações e aprendizados. Você sempre esteve disposta a me auxiliar no que eu precisasse, desde o primeiro dia que entrei no laboratório, somos parceiras de dia de aniversário, geminianas. Muito obrigada por tudo!

À querida técnica do laboratório, Iara Aimê Cardoso, presente em quase todos os meus experimentos, com sua calma e serenidade sempre pronta para ajudar, explicar, dar atenção. A sua ajuda foi fundamental em muitos momentos, muito obrigada Iara!

À minha querida amiga Isadora, par de vaso, obrigada por compartilhar todos os dias essa alegria e simpatia que você tem, agradeço pela paciência, pela amizade, pelos conselhos profissionais e pessoais, sempre presente nos momentos bons e ruins. Muito obrigada, você é muito especial!

Aos demais amigos do Laboratório de Toxinas Animais, Ernesto, Fran, Johara, Anna Laura, Felipe e Fernando pela amizade no dia a dia, por tornar momentos pesados e difíceis em momentos mais leves e alegres. À amiga Gisele, pela enorme paciência em inúmeras explicações sobre espectrometria de massas, pelos conselhos, ideias, pela persistência, muito obrigada a todos vocês!

À pós-doutoranda do laboratório, Camila agradeço muito pela atenção e disponibilidade em ensinamentos diversos, muito obrigada!

À Dr^a. Fernanda Gobbi Amorim, pela disposição em me ajudar nos momentos que mais precisei, você com sua calma e atenção sempre me acolheu, sou muito grata por você estar presente, mesmo longe, sempre fará parte da família do LTA, muito obrigada!

Aos amigos que a pós-graduação me presenteou, Ana Carolina, Paula, João, Cecília e Andréia, que sempre se fizeram presentes nos momentos bons e difíceis, muito obrigada!

Por fim, agradeço à CAPES, FAPESP, CNPq, ao projeto Temático (nº do processo: 2011/23236-4) e ao NAP-TOXAN-USP pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

FERREIRA, I. G. **Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus***. 2017. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As peçonhas de serpentes são consideradas ricas fontes de componentes com importantes ações farmacológicas. Estudar seus componentes permite esclarecer a patogenia do envenenamento e identificar moléculas com potenciais aplicações biotecnológicas. As serpentes da espécie *Crotalus durissus* habitam diversas regiões do Brasil e suas peçonhas são compostas de grande quantidade de proteínas (cerca de 95%), carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos, componentes não enzimáticos, aminoácidos livres e uma pequena fração lipídica. Muitos componentes ainda não foram isolados, embora alguns já tenham sido identificados em análises ômicas (transcriptoma e proteoma), como é o caso do VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) identificado por estas técnicas na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* (*C.d.c.*). Os VEGFs são homodímeros não enzimáticos com massas moleculares de 20 a 30 kDa, para o dímero, e de 13 a 16 kDa, para o monômero. Eles desempenham o papel principal na angiogênese (crescimento de novos vasos). No entanto, seu papel no envenenamento ainda não está elucidado. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo isolar e realizar a caracterização estrutural e funcional de um novo VEGF da peçonha da serpente *C.d.c.* A peçonha foi inicialmente submetida a uma análise por LC-MS para um conhecimento geral dos seus componentes. Em seguida, foi fracionada por cromatografia líquida de fase reversa em sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) e, posteriormente, todas as frações obtidas foram submetidas ao ELISA para identificação do VEGF. As frações 23, 24 e 25 foram positivas para VEGF e, por isso, escolhidas para serem estudadas. Estas frações foram recromatografadas por meio de três protocolos (troca catiônica, fase reversa e troca aniônica). Após os fracionamentos, todas as subfrações foram submetidas ao ELISA para identificação do VEGF e à eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise da composição das mesmas. Em seguida, essas amostras foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina e submetidas a ensaios de espectrometria de massas (ESI-Q-TOF e PMF), para identificar peptídeos tripticos de VEGF e, as que mostraram maior pureza na eletroforese, foram analisadas por sequenciamento amino-terminal, a fim de elucidar sua estrutura primária. Nestes estudos foram identificados um FGF e duas isoformas de VEGF. A cromatografia em coluna de troca iônica (HiTrap QXL) foi a mais efetiva na purificação dos compostos das frações 23, 24 e 25. As 6 subfrações obtidas, após confirmação da presença de VEGF pelo ELISA, eletroforese e espectrometria de massas, foram submetidas a uma análise de reconhecimento do VEGF pelo soro anticrotálico comercial por meio do ELISA e o VEGF foi reconhecido com alta afinidade pelo soro, indicando que a molécula é imunogênica. Em seguida, essas amostras foram analisadas por ELISA com anticorpo anti-FGF a fim de confirmar a presença do FGF, porém, este não foi reconhecido nas amostras pelo anticorpo, nas concentrações utilizadas. As frações contendo VEGF, denominado de *Cdc*VEGF, foram submetidas aos ensaios funcionais. No ensaio de angiogênese *in vitro*, no qual se analisa a indução da formação de tubos em Matrigel® pelas células HUVECs, todas as 6 subfrações induziram a angiogênese, confirmando que mantiveram sua atividade após os fracionamentos. A subfração 24-QXL3 foi a mais potente, mostrando uma indução da formação dos tubos ainda mais potente que o controle positivo (bFGF). No ensaio *in vitro* de migração de células mononucleares de sangue periférico humano (quimiotaxia em câmara de *boyden*), os *Cdc*VEGFs não alteraram significativamente a migração das células, nas concentrações testadas. Os dados obtidos neste trabalho ampliam o conhecimento sobre a composição da peçonha de *C.d.c.*, além de caracterizar um novo VEGF, que possui potencial aplicação como ferramenta molecular para o estudo dos sistemas relacionados aos fatores de crescimento vascular endotelial. Adicionalmente, foi possível a identificação de um novo FGF, o qual ainda não havia sido identificado na peçonha de *C.d.c.*

Palavras-chave: VEGF, *Crotalus durissus collilineatus*, peçonha de serpente, angiogênese e espectrometria de massas.

1. Introdução

1.1. Serpentes do Brasil

A classificação das serpentes é essencial para o reconhecimento das espécies de importância médica, o que facilita os estudos toxicológicos. As serpentes pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata (Opell, 1811) e subordem Serpentes (CALDWELL et al., 2015). Esta subordem é composta de aproximadamente 3.000 espécies, 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, até o momento, foram catalogadas 10 famílias, 75 gêneros, compreendendo 392 espécies (BÉRNILS e COSTA, 2015) e apenas três famílias são consideradas peçonhentas, a Elapidae, Colubridae e Viperidae. Dentre estas, estão incluídas um total de 62 espécies que causam acidentes de importância médica (CAMPBELL e LAMAR, 1989; LIRA-DA-SILVA et al., 2009; BERNARDE, 2014).

As serpentes da família Viperidae apresentam cabeça triangular recoberta por escamas pequenas, com aspecto semelhante às outras escamas do seu corpo (Fig. 1). Possuem um aparelho inoculador solenóglifo (as maxilas possuem apenas um par de dentes funcional agudo e oco) (MELGAREJO et al., 2003). Em associação ao aparato inoculador, estão presentes as glândulas de peçonha na região pós-orbital e, quando comprimidas por músculos acessórios, secretam seu conteúdo (JACKSON, 2007; FRY et al., 2008; VONK et al., 2008).



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

A subfamília Crotalinae, incluída na família Viperidae, apresenta um par de fosseta loreal, um órgão que é termorreceptor e se encontra localizado entre a narina e o olho da serpente. Este órgão é capaz de detectar pequenas flutuações de radiações termais, identificando as presas endotérmicas e a direção delas (BULLOCK e COWLES, 1952; BAKKEN e KROCHMAL, 2007). Esta subfamília é composta por diferentes gêneros que se diferenciam pela cauda: *Bothrops* (FENWICK et al., 2009), *Crotalus* (WÜSTER e BERNILS, 2011) e *Lachesis* (FERNANDES et al., 2004).

O gênero *Bothrops* possui uma cauda simples, sem alterações, apenas com escamas subcaudais em pares (MELGAREJO et al., 2003); o gênero *Crotalus*, apresenta uma estrutura denominada de guizo ou chocalho, localizada na parte final da cauda, que produz um ruído quando a serpente se encontra pronta para o ataque ou irritada; já o gênero *Lachesis* apresenta as últimas escamas subcaudais eriçadas e modificadas, terminando em um espinho (MELGAREJO et al., 2003).

Mais recentemente, os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* foram diferenciados por meio de sua filogenia, porém, em estudos prévios foi demonstrado que esta diferenciação não é muito clara, o que pode levar a incertezas na nomenclatura de espécies que poderiam ser de importância médica (CARRASCO et al., 2016).

Neste trabalho, apenas a peçonha de serpente do gênero *Crotalus* será objeto de estudo.

1.2. A espécie *C. durissus*

No Brasil, existe somente uma espécie pertencente ao gênero *Crotalus* (popularmente conhecidas como cascavéis) denominada *Crotalus durissus*. No entanto, ela é subdividida em 6 subespécies: *C. d. colillineatus*, encontrada no centro-oeste do país, Minas Gerais e norte do estado de São Paulo; *C. d. terrificus*, encontrada na região meridional e oriental, nas zonas altas e secas; *C. d. marajoensis*, exclusiva da região da Ilha de Marajó; *C. d. ruruima*, encontrada no norte do país; e *C. d. cascavella*, comum em regiões da caatinga do nordeste do país (CAMPBELL e LAMAR, 1989; PINHO e PEREIRA, 2001). Existe também na região norte do país, mais especificamente no estado de Roraima, duas outras subespécies: *C. d. trigonicus* e *C. d. ruraima* (CAMILLO, 1998; AUTO, 2005). Estas distribuições geográficas estão exemplificadas na figura 2.

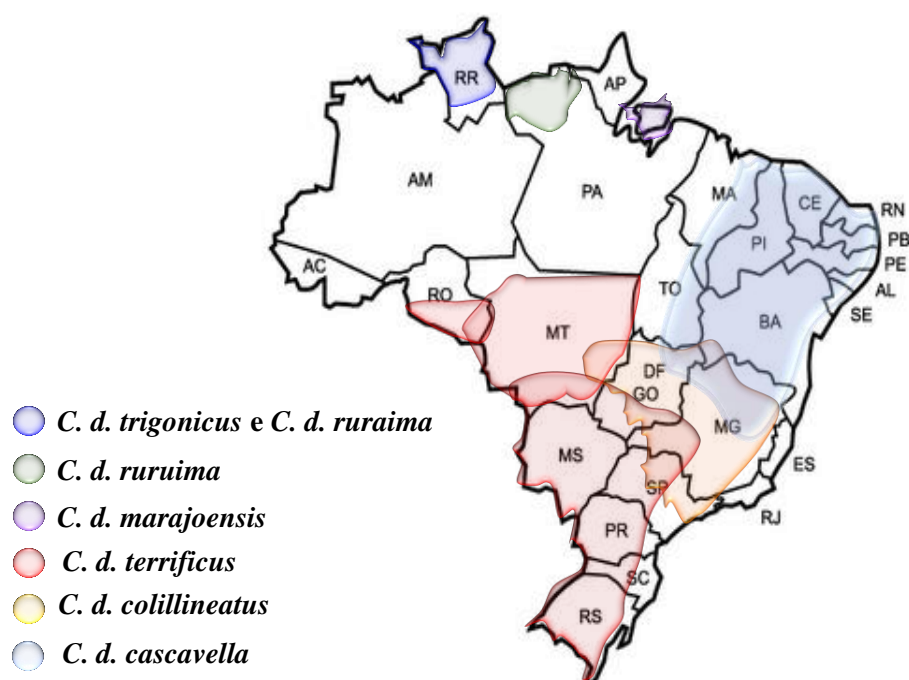


Figura 2. Distribuição geográfica das serpentes do gênero *Crotalus* pelo Brasil. Os dados foram obtidos com base nos trabalhos de Campbell e Lamar (1989), Pinho e Pereira (2001) e Camillo (1998).

1.3. Epidemiologia e envenenamento por *C. durissus*

Com relação aos acidentes ofídicos, verifica-se que existe uma subnotificação dos acidentes em todas as partes do globo terrestre. Isto se deve ao fato de que, ainda existe falha nas notificações uma vez que os pacientes não procuram atendimento médico ou ainda, muitas vezes, são atendidos e transferidos, não sendo registrados pelo sistema de saúde (CUPO, 2015).

Os dados epidemiológicos obtidos através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos de 2013 e 2015 demonstra que é perceptível a oscilação entre os números de acidentes ofídicos sendo registrados, até o momento, 18.165 casos (os dados entre os anos de 2013 e 2015 ainda estão sujeitos à revisão). Com relação aos acidentes crotálicos, estes oscilam entre 1.400 a 1.900 casos notificados por ano (Tabela. 1).

Tabela 1 - Acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2013 e 2015.

Ano	<i>Crotalus</i>	<i>Bothrops</i>	<i>Lachesis</i>	<i>Micrurus</i>	Não-peçonhentas	Não identificadas	Total
2013	1.934	20.530	939	252	1.376	3.363	28.394
2014	1.911	19.404	835	213	1.403	3.404	27.170
2015	1.422	13.373	524	139	897	2.210	18.565

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação Os dados estão sujeitos à revisão

O envenenamento crotálico é caracterizado principalmente por sua ação neurotóxica. Este fato se deve à ação de neurotoxinas como a crotóxina, que atua tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Sua ação é semelhante à do curare¹, induzindo uma paralisia através da inibição da liberação de acetilcolina na fenda sináptica (TOKARNIA et al., 2014). Os principais sinais e sintomas são ptose palpebral, parestesia de músculos faciais (face miastênica) e paralisia gradual dos músculos respiratórios (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

Além disso, a crotamina e crotóxina da peçonha causam efeitos miotóxicos, levando a uma lesão tecidual sistêmica de músculos esqueléticos e, conseqüentemente, ao processo de rbdomiólise seguido de mioglobínúria (TOKARNIA et al., 2014). A vítima pode apresentar um quadro de dor difusa e valores aumentados de algumas enzimas bioquímicas como lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), aldolase e creatina cinase (CK) (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

Adicionalmente, já foi relatado que a peçonha crotálica consome os fatores de coagulação, semelhante à ação da trombina, principalmente o fibrinogênio, resultando em um quadro de hipofibrinogenemia, deixando o sangue do indivíduo envenenado incoagulável (THOMAZINI e BARRAVIERA, 1994).

A lesão tubular renal também é comum, sendo causada pela mioglobínúria, o que pode levar a uma insuficiência renal aguda (IRA), uma das grandes responsáveis pelos casos de óbito (TOKARNIA et al., 2014).

1.4. A peçonha de *C. durissus*

A peçonha de *C. durissus collilineatus*, objeto de estudo dessa dissertação, é composta majoritariamente por proteínas (90 - 95%), enzimas como por exemplo L-aminoácido oxidase, 5'- nucleotidase, proteases, fosfodiesterase, embora também apresente carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos e uma pequena fração de lipídios e aminoácidos livres (ARAÚJO et al., 2016). Dentre os componentes proteicos, a crotóxina corresponde a maior fração da peçonha, sendo responsável por cerca de 65 % do total da peçonha, além de ser classificada como o principal componente tóxico. Esta proteína é composta de duas subunidades, uma básica (fosfolipase A₂) que apresenta ações miotóxica e neurotóxica e outra

¹ **Curare:** preparação indígena de mistura de componentes extraídos de cascas e folhas que induz paralisia muscular na presa.

ácida (crotapotina), capaz de inibir a atividade enzimática e aumentar a letalidade da fosfolipase A₂ quando complexada com esta (CLISSA, 1997; CUNHA e MARTINS, 2012).

Outra importante proteína presente nesta peçonha é a crotamina (GONÇALVES e VIERA, 1950), a qual apresenta ação tóxica em membranas de fibras musculares - miotoxicidade (OGUIURA et al., 2005). A giroxina também está presente na peçonha crotálica e seu nome é em alusão ao seu efeito em modelos animais (o animal envenenado gira em torno de seu próprio eixo). Além disso, essa proteína apresenta efeito sobre proteínas plasmáticas levando a distúrbios hematológicos (ALEXANDER et al., 1988).

Ainda, na peçonha crotálica, podemos encontrar metaloproteases, peptídeos natriuréticos, convulxinas, proteínas semelhantes à lectinas tipo-C, L-aminoácido oxidases, desintegrinas e peptídeos potencializadores de bradicinina (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009), além de outros componentes com ações farmacológicas já conhecidas e descritas, como a crotalfina (KONNO et al., 2008) e a hialuronidase (BORDON et al., 2012). Os componentes não enzimáticos presentes nas peçonhas de serpentes como fatores de crescimento neural e endotelial vascular, também apresentam interesse científico. Esses compostos, apesar de serem pouco estudados, contribuem significativamente para o quadro de envenenamento crotálico.

1.5. A produção do soro anticrotálico

O único tratamento específico existente para acidentes ofídicos é o soro antiofídico, composto por imunoglobulinas obtidas a partir de animais imunizados com um *pool* de peçonhas específicas (WHO, 2007).

A história da soroterapia antiofídica se iniciou em 1894 na França com o Dr. Albert Calmette, o qual produziu o primeiro soro contra a cobra *Naja tripudians*, denominando-o antiveneno. Paralelamente, no Brasil, o médico Vital Brazil Mineiro da Campanha iniciou seus estudos na produção de antivenenos e, trabalhando com serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, produziu os primeiros antivenenos do país (HAWGOOD, B. J., 1992; HAWGOOD, BARBARA J, 1992; CRAPS, 1993). Assim, por mais de um século, a soroterapia é considerada o tratamento específico para o envenenamento ocasionado por animais peçonhentos.

Atualmente, no Brasil, três instituições são as principais responsáveis pela produção dos soros antiofídicos: Instituto Vital-Brazil, Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias, as quais distribuem o soro para instituições de saúde (WEN et al., 2015).

Brevemente, para a produção de antivenenos um *pool* de peçonhas (de vários indivíduos de uma mesma espécie) é inoculado em doses crescentes em animais de grande porte, no país em

cavalos, através do processo de hiperimunização. Posteriormente, os anticorpos que constituirão o soro heterólogo² específico são obtidos através de plasmaferese dos animais (PARRA et al., 2009).

Embora a soroterapia tenha provado a sua eficiência na redução da mortalidade em casos de acidentes ofídicos, a produção do soro para o tratamento destes acidentes ainda possui alguns problemas:

- 1) dificuldade em se obter grande quantidade da peçonha que é a matéria prima para a produção do soro antiofídico;
- 2) grande variação intraespécie das peçonhas (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010), o que resulta em variações da eficiência do lote de soro, visto que esta depende das amostras utilizadas para a hiperimunização e, dependendo do conteúdo da peçonha da serpente que ofendeu a vítima;
- 3) alto custo na produção do soro, principalmente na manutenção dos cavalos, além do tempo de vida desses animais ser reduzido drasticamente (de 25 para 5 anos) devido à alta toxicidade da peçonha e utilização dos adjuvantes (MARCUSSE et al., 2011);
- 4) 70% dos anticorpos do soro são não-neutralizantes, ou seja, são anticorpos específicos para antígenos de patógenos que o cavalo entrou em contato durante sua vida, sendo considerados não neutralizantes (LAUSTSEN et al., 2015).
- 5) os anticorpos de cavalo, que são heterólogos para humanos, podem causar reações de hipersensibilidade, como anafilaxia (CUPO et al., 1991; LEON et al., 2013) e doença do soro (CUNNINGHAM et al., 1987; SOFER et al., 1994; DESCOTES e CHOQUET-KASTYLEVSKY, 2001).

Até o momento, cinco tipos de soros antiofídicos (ou antivenenos – AV) são produzidos no Brasil: anti-botrópico (*Bothrops* AV), anti-elapídico (*Micrurus* AV), anti-botrópico/crotálico (*Bothrops-Crotalus* AV), anti-botrópico/laquétrico (*Bothrops-Lachesis* AV) e anticrotálico (*Crotalus* AV), sendo que este último é produzido por peçonhas de *C. d. terrificus* (50%) e *C. d. collilineatus* (50%) (HUI WEN et al., 2015).

² **Soro heterólogo:** soro produzido em uma espécie e administrado em outra (ex. soro anticrotálico produzido em cavalos e administrado em humanos).

1.6. Angiogênese e vasculogênese

Angiogênese e vasculogênese são fenômenos regulados por meio de fatores de crescimento e seus receptores de tirosina quinase. Angiogênese é a formação de novos capilares de vasos sanguíneos a partir de microvasos já existentes e envolve o recrutamento de células de suporte a diferentes segmentos da vasculatura, com ações na ativação, migração e proliferação de células endoteliais (PANDYA et al., 2006).

A angiogênese pode ocorrer de duas maneiras, fisiológica ou patológica, e sua distinção é baseada nos diferentes tipos de vasos que cada uma induz. A angiogênese fisiológica tem seu início no desenvolvimento fetal e continua após o nascimento para a formação de vasos sanguíneos normais em tecidos adultos. Esta se mantém em equilíbrio com a ativação de moléculas indutoras, como fatores de crescimento endoteliais vasculares ou inibidoras (TOMANEK e SCHATTEMAN, 2000; PANDYA et al., 2006). A angiogênese do tipo patológica é iniciada por algum tipo de disfunção, como tumores ou infarto do miocárdio, fazendo com que apareçam vasos sanguíneos distribuídos de maneira não uniforme e estrutural e funcionalmente heterogêneos, devido à ativação do fator de crescimento endotelial vascular (DVORAK, 2005).

A angiogênese patológica foi inicialmente proposta com base na resposta neovascular potente induzida por tumores. Posteriormente, foi demonstrado que tecidos normais também são fontes de atividade angiogênica e que diversas moléculas estão envolvidas neste processo. Dentre elas destacam-se as reguladoras positivas de angiogênese, como por exemplo, fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento transformador α e β , fator de crescimento do hepatócito, fator de necrose tumoral, angiogenina, interleucina-8 (IL-8) e angiopoietinas (FOLKMAN, 1992; YANCOPOULOS et al., 2000).

Adicionalmente, tem sido demonstrado que algumas proteínas encontradas nas peçonhas de serpentes são capazes de induzir o crescimento de células endoteliais e também ativar a angiogênese. Tais proteínas são correlacionadas com os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs- *Vascular Endothelial Growth Factor*) de humanos e com os fatores de crescimento de fibroblasto de humanos (FGF- *Fibroblast Growth Factor*). Essas moléculas possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, o que pode facilitar o acesso de outras proteínas e toxinas presentes na peçonha aos seus alvos finais. Com isso, estas proteínas podem ser utilizadas como ferramentas para o estudo de angiogênese e vasculogênese assim como para o tratamento de doenças isquêmicas (ALLOUI et al., 2009).

A família dos fatores de crescimento, mais especificamente, a dos VEGFs e FGFs é de reconhecida importância para a angiogênese e vasculogênese. Sua importância deriva de suas especificidades pelas células endoteliais vasculares, atuando na regulação da proliferação e sobrevivência de células endoteliais vasculares de artérias, veias, vasos linfáticos e fibroblastos (DVORAK, 2005; PANDYA et al., 2006).

1.7. Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento estão associados com o crescimento e proliferação celular. Eles constituem a principal classe de proteínas envolvidas com a angiogênese, vasculogênese, proliferação e sobrevivência de células endoteliais vasculares. Ainda são poucos os relatos de literatura descrevendo a presença e o isolamento destes compostos em peçonhas de serpentes. Elas são consideradas moléculas minoritárias presentes nas peçonhas de serpentes (BOLDRINI-FRANCA et al., 2016).

Diversos tipos de fatores de crescimento identificados em humanos e mamíferos já foram estudados e seu papel elucidado e existem depositados em banco de dados (*UniProt databank - Universal protein resource knowledge database*) vários tipos de fatores de crescimento: fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*), interferon (IF), fator de crescimento epidermal (EGF - *Epidermal growth factor*), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF – *Platelet-derived growth factor*), fator de necrose tumoral (TNF – *Tumor necrosis factor*), fator de crescimento de insulina - like proteína 5 (IGF – *Insulin-like growth factor-binding protein 5*), fator de crescimento de fibroblasto (FGF – *Fibroblast growth factor*), fator de crescimento neural (svNGF – *Snake venom nerve growth factor*) e fator de crescimento endotelial vascular (svVEGF – *Snake venom vascular endothelial growth factor*).

No presente trabalho serão citados três fatores de crescimento, considerados os mais estudados em peçonhas de serpentes: o fator de crescimento neural, fator de crescimento de fibroblasto e o fator de crescimento endotelial vascular, sendo este último, o principal objeto de estudo do referido trabalho.

1.7.1. Fator de crescimento de fibroblasto (FGF- *Fibroblast growth factor*)

Esta classe de fatores de crescimento foi descrita em 1974 em extratos da glândula pituitária e no cérebro. Os estudos demonstraram que essas moléculas possuem ação mitogênica de fibroblastos do tipo 3T3, estimulando sua proliferação. O grupo de pesquisa identificou nessas amostras duas moléculas nomeadas de acordo com seu ponto isoelétrico: aFGF (*acidic fibroblast growth factor*) também denominado de FGF-1 e o bFGF (*basic fibroblast growth factor*) também denominado de FGF-2 (GOSPODAROWICZ, 1974).

Os FGFs são polipeptídeos de cadeia única que, em sua maioria, possuem na região amino-terminal um peptídeo sinal que facilita sua secreção por meio de mecanismos clássicos. Atuam por interagirem com diferentes receptores para FGF (FGFR – *Fibroblast growth factor receptor*) que as células expressam. Os FGFs necessitam de cofatores para que o complexo de sinalização entre eles e seu receptor ocorra, além de estes cofatores também serem necessários para a sinalização de sua ação. Dentre eles está o quimicamente heterogêneo sulfato de heparan e, no caso de FGFs envolvidos com metabolismo estão os cofatores *Klotho* (LI et al., 2016).

Até hoje, estão descritos em literatura 22 tipos de FGFs (LI et al., 2016) sendo que os FGFs dos tipos 19, 21 e 23 são descritos como moléculas *hormone-like*, envolvidos no metabolismo de glicose, lipídeos, vitamina D e fosfatos. Porém, o mecanismo pelo qual medeiam essas ações ainda não está totalmente elucidado (KHARITONENKOV, 2009). Em peçonhas de serpentes, até o momento, o FGF só foi identificado no estudo do genoma da serpente *Ophiophagus hannah* (VONK et al., 2013).

1.7.2. Fator de crescimento neural (NGF- *Nerve growth factor*)

Os NGFs são homodímeros ligados não covalentemente, denominados neurotrofinas, que participam do processo de crescimento, diferenciação, sobrevivência e neuroproteção de células neuronais do sistema nervoso central e periférico (REICHARDT, 2006). Também possuem ação em células não neuronais como, células do sistema hematopoiético, células de rins e fígado (KOSTIZA e MEIER, 1996).

O primeiro NGF foi identificado como um fator estimulante de células de sarcoma (COHEN et al., 1954). Exercem sua função através de ligação a dois tipos de receptores: receptor do tipo tirosina quinase denominado de tropomiosina quinase (Trk), o qual após ter o NGF ligado, sofre uma dimerização e ativação. O outro tipo é o receptor p75^{NTR} de baixa afinidade, que leva a regulação da sobrevivência de células neuronais e sua diferenciação.

Ambos os receptores atuam em sinergismo para aumentar a afinidade dos sítios de ligação do NGF (OSIPOV et al., 2014; SKAPER, 2017).

Em peçonhas de serpentes, os NGFs correspondem a cerca de 0,1 a 0,5 % e, portanto, também são considerados minoritários (BOLDRINI-FRANCA et al., 2016), tornando seu isolamento e purificação muito mais desafiadores. O NGF de peçonha de serpente mais descrito é o cvNGF (*cobra venom NGF*), isolado da peçonha de *Naja kaouthia*. Foi descrito em modelos *in vitro* e *in vivo*, por suprimir o crescimento do carcinoma de ascite de Ehrlich por meio de um mecanismo indireto, em que os receptores de tropomiosina quinase do tipo A (TrkA) estão envolvidos (OSIPOV et al., 2013; OSIPOV et al., 2014).

Interessantemente, este fator de crescimento está relacionado com a angiogênese pois existem relatos que o descrevem como um ativador indireto do crescimento de células endoteliais por meio da estimulação da liberação de outros fatores de crescimento. Também pode agir como pró-angiogênico de acordo com estudos pré-clínicos e clínicos, que demonstraram que NGFs têm propriedades de curar feridas. Sendo assim, eles podem ser considerados como promissores medicamentos ou ferramentas moleculares (CALZA et al., 2001; SKAPER, 2017).

1.7.3. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *Vascular endothelial growth factor*)

O primeiro VEGF foi descoberto há mais de 25 anos, identificado em humanos, denominado de VEGF-A (LEUNG et al., 1989). Foi inicialmente denominado de fator de permeabilidade vascular (VPF), devido à indução de extravasamento de líquido vascular que este promovia (TOMANEK e SCHATTEMAN, 2000).

Os VEGFs são reconhecidos como fatores específicos para células endoteliais vasculares. São glicoproteínas homodiméricas ligadas não covalentemente com massa molecular de 45 kDa, com duas subunidades de massas de 23 kDa cada. Possuem oito resíduos de cisteínas conservados na mesma posição, os quais funcionam como um dímero, uma vez que dois de seus resíduos de cisteínas geram pontes dissulfeto inter e intra cadeias (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997). Sua expressão é regulada em diferentes tecidos por diversos fatores, como hipóxia, liberação de citocinas, hormônios, oncogenes e genes supressores, no caso de tumores (FERRARA, 2004).

Eles são essenciais em processos de angiogênese e vasculogênese, sejam eles fisiológicos ou patológicos. A indução de proliferação de células endoteliais é realizada por meio de

interação com dois receptores de tirosina quinase: VEGFR-1 (*Vascular endothelial growth factor receptor 1*) e VEGFR-2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*). Também estimulam a linfangiogênese por meio de interação com um terceiro tipo de receptor de tirosina quinase, o VEGFR-3 (*Vascular endothelial growth factor receptor 3*).

Atualmente, existem sete famílias de VEGFs: VEGFs de humanos, que incluem os tipos A, B, C e D, e os exógenos, que incluem o tipo E (vírus Orf) e o F, encontrado nas peçonhas de serpentes que será detalhado no item 1.7.3.1 (NAKAMURA et al., 2014).

O VEGF é produzido em diversos tipos celulares como células endoteliais, células de músculo liso, macrófagos, linfócitos T ativados, fibroblastos, monócitos e neutrófilos. Estas células expressam, pelo menos, nove diferentes isoformas de VEGF-A_n onde, “n” pode ser 121, 145, 165, 183, 189 e 206 e representa o número de aminoácidos que compõe a proteína. Essa grande diversidade ocorre devido a um *splicing* alternativo de um único gene (FERRARA et al., 2003; ANCELIN et al., 2004; TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005; OTROCK et al., 2007).

No entanto, embora exista esta grande diversidade de VEGFs, as células têm uma preferência pela expressão de VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₈₉ e, principalmente, VEGF-A₁₆₅, sendo esta a isoforma mais estudada. As diversas isoformas muitas vezes acabam apresentando a mesma função, como por exemplo, indução de permeabilidade vascular, estimulação da proliferação, migração de células endoteliais, assim como promoção da sobrevivência das células (FERRARA, 2004).

O VEGF-A já demonstrou induzir, em estudos *in vitro*, o crescimento de células endoteliais derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos e a promoção de angiogênese por induzir células endoteliais microvasculares a invadir géis com colágeno e formar estruturas capilares (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997).

Além de promover a angiogênese, foi comprovado que o VEGF-A pode induzir quimiotaxia de monócitos através da modulação da migração transendotelial. Este mecanismo pode ocorrer ou por meio da produção de quimiocinas pelas células ou por meio de ligação do VEGF a receptores para VEGF que as células possam expressar (ANCELIN et al., 2004).

Embora o VEGF-A seja o principal e o mais estudado, outros tipos de VEGFs (Tab. 2) também são bem descritos, porém são menos relevantes (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005).

Tabela 2 - Outros tipos de VEGFs.

Tipo de VEGF	Distribuição	Ação
VEGF-B	Tecidos, músculo esquelético e miocárdio	Ligação no VEGFR-1 com indução de proliferação celular e angiogênese
VEGF-C	Produzido como uma pré-proteína	Ligação no VEGFR-2 e 3 com indução de proliferação e migração de células endoteliais e linfangiogênese
VEGF-D	Produzido como uma pré-proteína	Ligação no VEGFR-2 e 3 com indução de proliferação e migração de células endoteliais e linfangiogênese
VEGF-E	Genoma do vírus parapoxi Orf	Ligação no VEGFR-2 com indução de proliferação celular e angiogênese

1.7.3.1 VEGFs de peçonhas de serpentes (svVEGFs – *Snake venom vascular endothelial growth factors* ou VEGF-F)

Após a descoberta do primeiro VEGF de serpente isolado da peçonha de *Vipera aspis*, um fator com alta atividade hipotensora, denominado de HF (*hypotensive factor*), os VEGFs se tornaram proteínas não enzimáticas com uma grande importância em peçonhas de serpentes (KOMORI et al., 1999).

O termo svVEGFs foi primeiramente proposto em 2001 pelo grupo de Junqueira de Azevedo, o qual descreveu a primeira biblioteca de DNA complementar (cDNA) da glândula da peçonha da serpente *Bothrops insularis* no qual foi descrito o cDNA que codifica o VEGF.

Desde então, diversos VEGFs isolados e/ou identificados em peçonhas de serpentes de diferentes espécies por meio de técnicas distintas já foram descritos, e eles se encontram resumidos na tabela 3.

No geral, os svVEGFs são proteínas homodiméricas com um domínio de ligação à heparina. Possuem massa molecular que varia entre 20 e 30 kDa em condições nativas e entre 13 e 16 kDa em condições reduzidas. Reconhecem seletivamente receptores para VEGFs dos tipos VEGFR-1 e 2. O motivo de cisteína (*cysteine knot motif*) característico da família de VEGF é completamente conservado e, sua estrutura primária possui cerca de 50% de homologia quando comparada com a do VEGF-A₁₆₅ de humanos. Os svVEGFs possuem uma região C-terminal mais curta com relação à região C-terminal de VEGFs de humanos (YAMAZAKI, Y. et al., 2003; TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005; YAMAZAKI et al., 2005).

Existem relatos que a região C-terminal de svVEGFs funciona como um sítio de ligação à heparina e, especificamente, inibe a atividade biológica do VEGF-A₁₆₅. Este dado foi

comprovado pelo grupo de Yamazaki em 2005. O grupo demonstrou que, este sítio de ligação localizado na região C-terminal do svVEGF denominado Vammin (isolado da peçonha da serpente *Vipera ammodytes*) conseguiu inibir a atividade biológica do VEGF-A₁₆₅ *in vitro* e *in vivo* (YAMAZAKI et al., 2005).

Tabela 3 - VEGFs identificados em peçonhas de serpentes.

VEGF	Espécie de serpente	Técnica	Referência
HF	<i>Vipera aspis</i>	Isolado da peçonha	KOMORI et al., 1999
VEGF	<i>Bothrops insularis</i>	Clonagem e expressão	JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2001
ICPP	<i>Daboia deserti</i>	Isolado da peçonha	GASMI et al., 2002
Vammin	<i>Vipera ammodytes</i>	Isolado da peçonha	YAMAZAKI, Y. et al., 2003
VR-1	<i>Daboia russelli</i>	Isolado da peçonha	YAMAZAKI, YASUO et al., 2003
TfsvVEGF	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	Isolado da peçonha	TAKAHASHI et al., 2004
VEGF	<i>Bothrops erythromelas</i>	Clonagem e expressão	JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE et al., 2004
Pm-VEGF	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	Isolado da peçonha	CHEN et al., 2005
IC 1 e 2	<i>Macrovipera lebetina</i>	Isolado da peçonha	ALOUI et al., 2009
VEGF	<i>Crotalus atrox</i>	Transcriptoma	YAMAZAKI et al., 2009
VEGF	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Transcriptoma Proteoma	BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009 BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010
VEGF	<i>Crotalus tigris</i>	Proteoma	CALVETE et al., 2012
GtVF	<i>Gloydus tsushimaensis</i>	Isolado da peçonha	NAKAMURA et al., 2014
VEGF	<i>Crotalus oreganus helleri</i>	Transcriptoma	SUNAGAR et al., 2014
TjsvVEGF	<i>Protobothrops jerdonii</i>	Isolado da peçonha	ZHONG et al., 2015
VEGF	<i>Crotalus horridus</i>	Transcriptoma	ROKYTA et al., 2015
VEGF	<i>Dispholidus typus</i>	Transcriptoma	PLA et al., 2017

Baseando-se em suas atividades de induzir um aumento da permeabilidade vascular, existem especulações que esta classe de proteínas possa contribuir para o aumento da toxicidade durante o envenenamento, por meio do extravasamento de líquido decorrente desse aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, aumento do influxo de toxinas e outras proteínas presentes na peçonha (TAKAHASHI et al., 2004).

Diversos svVEGFs já isolados tiveram sua atividade testada em relação à proliferação de células endoteliais. Em sua maioria, esta atividade, quando comparada a um VEGF humano (VEGF₁₆₅), é mais potente (KOMORI et al., 1999; YAMAZAKI, Y. et al., 2003; CHEN et al.,

2005). Mas existem casos contraditórios em que o svVEGF testado, quando comparado ao VEGF₁₆₅, demonstrou ter uma atividade de proliferação muito menor, podendo ter uma outra função primordial no envenenamento, ao invés de atuar como um fator para a angiogênese e/ou aumento de permeabilidade vascular (TAKAHASHI et al., 2004).

1.8. Receptores para VEGF (VEGFR)

Os VEGFs se ligam e ativam diferentes receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase (Fig. 3). Essa ligação do VEGF aos seus diferentes receptores inicia vias de sinalização intracelular distintas levando a uma dimerização do receptor e, em seguida, uma autofosforilação de resíduos de tirosina. Estes, por sua vez, conduzem a uma ativação de transdução de sinal de moléculas específicas para que, no fim, ocorra o aumento da permeabilidade vascular, angiogênese, migração celular e proliferação de células endoteliais vasculares, linfáticas, macrófagos, monócitos e células do sistema hematopoiético (CAPP et al., 2009). Os tipos de receptores para VEGF pertencentes à família de tirosina quinase estão listados e detalhados na tabela 4.

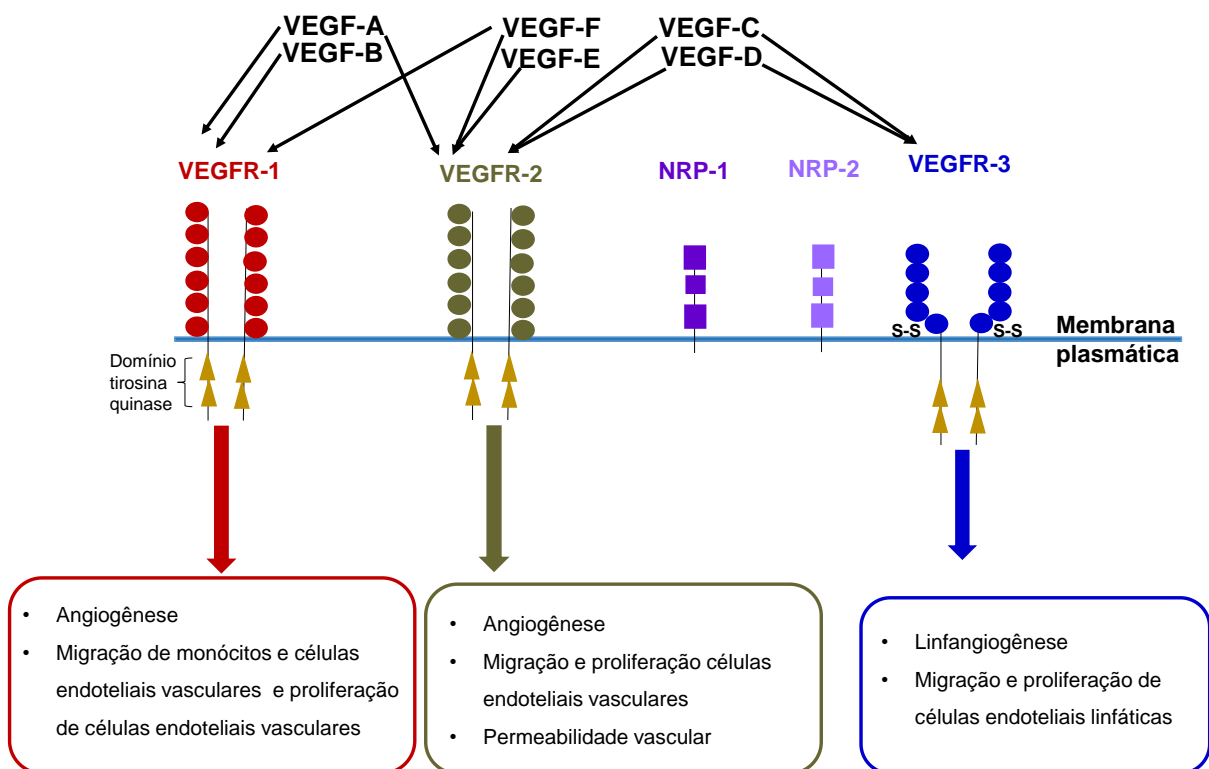


Figura 3. Representação esquemática da interação dos diferentes tipos de VEGFs a seus receptores e os efeitos decorrentes dessa interação. Adaptado de (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005).

Além dos receptores de tirosina quinase, existem ainda dois tipos de co-receptores para VEGF: as neuropilinas (NRP) dos tipos 1 e 2. Estas possuem um papel na modulação da ligação do VEGF aos outros receptores levando a um aumento da afinidade dessa ligação (LEE et al., 2002; HICKLIN e ELLIS, 2005; TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005).

Tabela 4 - Receptores para VEGFs.

Receptor	Afinidade	Tipos de células que os expressam	Efeitos
VEGFR-1	VEGFs A, B e F	Monócitos envolvidos com quimiotaxia, células endoteliais vasculares	Angiogênese, aumento de permeabilidade vascular, proliferação e migração
VEGFR-2	VEGFs A, C, D, E e F	Células endoteliais vasculares e do sistema hematopoiético	Aumento permeabilidade vascular, angiogênese e mitogênese
VEGFR-3	VEGFs C e D	Células endoteliais linfáticas	Linfangiogênese, migração e proliferação de células endoteliais vasculares

1.9. Aplicações biotecnológicas de VEGFs

O banco de dados *Clinical Trials*, que é mantido pelos órgãos *National Library of Medicine* (NLM) e *National Institutes of Health* (NIH) em conjunto com o *Food and Drug Administration* (FDA), reúne os estudos clínicos em andamento, concluídos ou em recrutamento do mundo todo. A busca de estudos clínicos neste banco de dados utilizando como descritor VEGF resultou em 1830 estudos, sendo que desses 293 se encontram abertos com recrutamento. Como exemplos de aplicações terapêuticas do uso de VEGFs e anti-VEGFs destacam-se a neovascularização intraocular, edema macular ocasionado pela diabetes, degeneração macular, tratamento de câncer e isquemias (U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2017).

Ainda, é importante destacar que já existem drogas comerciais envolvendo esta molécula, como é o caso do Neovasculgen® (Regenera Global) - medicamento desenvolvido pelo órgão *Human Stem Cell Institute* (HSCI), da Rússia. Este medicamento é composto de VEGF-A₁₆₅ acoplado a um vetor de plasmídeo, para ser utilizado em terapia gênica para o tratamento de isquemia arterial periférica. O medicamento atua na estimulação do crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) promovendo um efeito terapêutico prolongado e, conseqüentemente, melhora de vida do paciente (HUMAN STEM CELL INSTITUTE, 2016).

Recentemente, o HSCI iniciou o recrutamento de pessoas para um estudo clínico envolvendo o uso do Neovasculgen® em pacientes com neuropatia diabética para verificar qual o efeito do medicamento nesta patologia (U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015). Assim, medicamentos como o Neovasculgen® podem apresentar diversas aplicações.

1.10. Importância de estudar novos componentes

Embora várias toxinas provenientes da peçonha de *C. durissus collilineatus* já tenham sido estudadas, dados de transcriptoma e proteoma demonstram que este coquetel de moléculas é imensamente maior (Boldrini-França, Rodrigues et al. 2009; Boldrini-França, Corrêa-Netto et al. 2010). Em particular, na subespécie *C. d. collilineatus* foi demonstrada a existência de transcritos para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em análises de transcriptoma e proteoma. No entanto, o VEGF, até o momento, não havia sido isolado da peçonha bruta.

Desta forma, a proposta desse trabalho foi isolar um novo VEGF da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, visto que este já foi identificado em análises ômicas (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Seu estudo estrutural e funcional poderá servir como base para novas pesquisas em que esta molécula possa ser usada como ferramenta molecular para o estudo da angiogênese, principalmente em patologias isquêmicas. Adicionalmente, os resultados obtidos ampliarão o conhecimento sobre a peçonha de *C. d. collilineatus* e o papel do VEGF para o quadro de envenenamento, além de auxiliar na produção de melhores antivenenos.

5. Conclusões

Apesar da heterogeneidade do *pool* das peçonhas, das frações brutas e das subfrações contendo o *Cdc*VEGF, o soro anticrotálico comercial do Instituto Butantan foi capaz de reconhecê-lo com alta afinidade demonstrando que este é imunogênico.

As análises dos ensaios funcionais realizados demonstraram a potente ação angiogênica em células HUVEC do *Cdc*VEGF, demonstrando que a molécula pode ser utilizada como ferramenta molecular para estudos que envolvam VEGFs. Ainda, neste trabalho foi desenvolvido um novo protocolo de isolamento de VEGF e realizada a sua caracterização estrutural parcial.

6. Referências

REFERÊNCIAS¹

AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem Rev**, v. 101, n. 2, p. 269-95, 2001.

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.

ALOUI, Z. et al. Novel svVEGF isoforms from *Macrovipera lebetina* venom interact with neuropilins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 389, n. 1, p. 10-5, 2009.

ANCELIN, M. et al. Vascular endothelial growth factor VEGF₁₈₉ induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. **Lab Invest**, v. 84, n. 4, p. 502-12, 2004.

ARAÚJO, L. D. S. et al. *Crotalus durissus* venom: biological effects and relevant applications. A Review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, 2016.

AUTO, H. Animais peçonhentos. **Editora da Universidade Federal de Alagoas**, 2005.

AZEVEDO-MARQUES, M.; HERING, S.; CUPO, P. Acidente crotálico. **Sao Paulo: Sarvier**, p. 91-98, 2003.

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.

BARLEON, B. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3336-3343, 1996.

BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T. High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. **Anal. Chem**, v. 62, n. 17, p. 1836-1840, 1990.

BERNARDE, P. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**: São Paulo: Anolis Books 2014.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Répteis brasileiros: Lista de espécies **São Paulo: SBH** 2015.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

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-FRANCA, J. et al. Minor snake venom proteins: structure, function and potential applications. **Biochim Biophys Acta**, 2016.

BORDON, K. C. 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.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 115, n. 3, p. 453-466, 1962.

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.

CALDWELL, M. W. et al. The oldest known snakes from the Middle Jurassic-Lower Cretaceous provide insights on snake evolution. **Nat Commun**, v. 6, p. 5996, 2015.

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

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

CALVETE, J. J. et al. Snake venomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest Nearctic rattlesnake venom. Evolutionary Clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms [corrected]. **J Proteome Res**, v. 11, n. 2, p. 1382-90, 2012.

CALZA, L. et al. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 4160-5, 2001.

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

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

CAPP, C. et al. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Clinical & Biomedical Research**, v. 29, n. 1, 2009.

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. 122-8, 2016.

CEBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJALLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 5, p. 601-15, 2006.

CHEN, Y. L. et al. Crotalid venom vascular endothelial growth factors has preferential affinity for VEGFR-1. Characterization of *Protobothrops mucrosquamatus* venom VEGF. **Thromb Haemost**, v. 93, n. 2, p. 331-8, 2005.

CLAFFEY, K. P.; SENGER, D. R.; SPIEGELMAN, B. M. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. **Biochim Biophys Acta**, v. 1246, n. 1, p. 1-9, 1995.

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

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 40, n. 10, p. 1014-8, 1954.

CRAPS, L. **The Birth of Immunology.** Basle: Sandoz Pharma Ltd. , 1993.

CUNHA, E.; MARTINS, O. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*—uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

CUNNINGHAM, E. et al. Acute serum sickness with glomerulonephritis induced by antithymocyte globulin. **Transplantation**, v. 43, n. 2, p. 309-12, 1987.

CUPO, P. et al. Reações de Hipersensibilidade imediatas após o uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 33, n. 2, p. 115-122, 1991.

CUPO, P. Bites and stings from venomous animals: a neglected Brazilian tropical disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 6, p. 639-41, 2015.

DESCOTES, J.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? **Toxicology**, v. 158, n. 1, p. 43-49, 2001.

DOERNER, K. C.; WHITE, B. A. Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain. **Analytical biochemistry**, v. 187, n. 1, p. 147-150, 1990.

DVORAK, H. Angiogenesis: update 2005. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1835-1842, 2005.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem**, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric beta-neurotoxin. **J Mol Biol**, v. 412, n. 2, p. 176-91, 2011.

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.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FOLKMAN, J. The role of angiogenesis in tumor growth. In: **Seminars in cancer biology**, v. 3, n. 2, p.65-71, 1992.

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.

GASMI, A. et al. Purification and characterization of a growth factor-like which increases capillary permeability from *Vipera lebetina* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 268, n. 1, p. 69-72, 2000.

GASMI, A. et al. Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling. **J Biol Chem**, v. 277, n. 33, p. 29992-8, 2002.

GEORGIU, C. D. et al. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, n. 1, p. 391-403, 2008.

GERWINS, P.; SKÖLDENBERG, E.; CLAESSION-WELSH, L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 34, n. 3, p. 185-194, 2000.

GONÇALVES, J.; VIERA, L. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. **Anais Acad. bras. Ciênc.**, v. 32, p. 141-150, 1950.

GOSPODAROWICZ, D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. **Nature**, v. 249, n. 453, p. 123-7, 1974.

GRANT, D. S. et al. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 933-943, 1989.

HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v. 30, n. 5-6, p. 573-9, 1992.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1011-27, 2005.

HUI WEN, F. 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.

HUMAN STEM CELL INSTITUTE. **Neovasculgen®**. Disponível em: <<https://eng.hsci.ru/products/neovasculgen>>. Acesso em: 01. jul. 2017.

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

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Ion-Exchange Chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 349-371, 2009.

JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. et al. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pitviper. A new member of the VEGF family of proteins. **J Biol Chem**, v. 276, n. 43, p. 39836-42, 2001.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L. et al. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 571-5, 2004.

KAVRAN, J. M.; LEAHY, D. J. Silver staining of SDS-polyacrylamide gel. **Methods Enzymol**, v. 541, p. 169-76, 2014.

KECK, R. G. et al. Disulfide structure of the heparin binding domain in vascular endothelial growth factor: characterization of posttranslational modifications in VEGF. **Arch Biochem Biophys**, v. 344, n. 1, p. 103-13, 1997.

KHARITONENKOV, A. FGFs and metabolism. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 6, p. 805-10, 2009.

KOMORI, Y. et al. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11796-11803, 1999.

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. 1293-1304, 2008.

KOPACIEWICZ, W. et al. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 266, p. 3-21, 1983.

KOSTIZA, T.; MEIER, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**, v. 34, n. 7, p. 787-806, 1996.

KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. **Pharmacol Rev**, v. 33, n. 1, p. 17-53, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAUSTSEN, A. H. et al. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. **Toxicon**, v. 104, p. 43-5, 2015.

LEE, P. et al. Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10470-10475, 2002.

LEON, G. et al. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 76, p. 63-76, 2013.

LEUNG, D. W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306-1309, 1989.

LI, X. et al. Fibroblast growth factors, old kids on the new block. **Semin Cell Dev Biol**, v. 53, p. 155-67, 2016.

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

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. FUNPEC-Editora, v. 3, n. 1, 2011.

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

NAKAMURA, H. et al. Discovery of a novel vascular endothelial growth factor (VEGF) with no affinity to heparin in *Gloydius tsushimaensis* venom. **Toxicon**, v. 86, p. 107-15, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: LTDA, A. E. (Ed.). **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6 ed., 2014. p. 129.

NESVIZHSKII, A. I.; AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 1419-40, 2005.

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.

OSIPOV, A. V. et al. Nerve growth factor from cobra venom inhibits the growth of Ehrlich tumor in mice. **Toxins (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 784-95, 2014.

OSIPOV, A. V. et al. Nerve growth factor suppresses Ehrlich carcinoma growth. **Dokl Biochem Biophys**, v. 451, p. 207-8, 2013.

OTROCK, Z. K.; MAKAREM, J. A.; SHAMSEDDINE, A. I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. **Blood Cells Mol Dis**, v. 38, n. 3, p. 258-68, 2007.

PANDYA, N. M.; DHALLA, N. S.; SANTANI, D. D. Angiogenesis - a new target for future therapy. **Vascul Pharmacol**, v. 44, n. 5, p. 265-74, 2006.

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

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

PLA, D. et al. What killed Karl Patterson Schmidt? Combined venom gland transcriptomic, venomous and antivenomous analysis of the South African green tree snake (the boomslang), *Dispholidus typus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 4, p. 814-823, 2017.

PONCE-SOTO, L. et al. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of protein chemistry**, v. 21, n. 3, p. 131-136, 2002.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Biological and structural characterization of crotoxin and new isoform of crotoxin B PLA₂ (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom. **Protein J**, v. 26, n. 4, p. 221-30, 2007.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1473, p. 1545-64, 2006.

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.

SCHRATZBERGER, P.; KÄHLER, C.; WIEDERMANN, C. Use of fluorochromes in the determination of chemotaxis and haptotaxis of granulocytes by micropore filter assays. **Annals of hematology**, v. 72, n. 1, p. 23-27, 1996.

SCOPEL, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Anal Biochem**, v. 59, n. 1, p. 277-82, 1974.

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.

SKAPER, S. D. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. **Immunology**, 2017.

SOFER, S.; SHAHAK, E.; GUERON, M. Scorpion envenomation and antivenom therapy. **J Pediatr**, v. 124, n. 6, p. 973-8, 1994.

STÖCKLIN, R. et al. Identification of snake species by toxin mass fingerprinting of their venoms. **Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Mass Spectrometry of Proteins and Peptides**, p. 317-335, 2000.

SUNAGAR, K. et al. Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): biodiscovery, clinical and evolutionary implications. **J Proteomics**, v. 99, p. 68-83, 2014.

TAKAHASHI, H. et al. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 44, p. 46304-14, 2004.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 3, p. 227-41, 2005.

THOMAZINI, I.; 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.

TOKUNAGA, Y.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Specific distribution of VEGF-F in Viperinae snake venoms: isolation and characterization of a VGEF-F from the venom of *Daboia russelli siamensis*. **Arch Biochem Biophys**, v. 439, n. 2, p. 241-7, 2005.

TOMANEK, R. J.; SCHATTEMAN, G. C. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. **The Anatomical Record**, v. 261, n. 3, p. 126-135, 2000.

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Clinical Trials**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=VEGF&Search=Apply&age_v=&gndr=&type=&rslt=>>. Acesso em: 01. jul. 2017.

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

VONK, F. J. et al. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 51, p. 20651-6, 2013.

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.

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.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **J Biol Chem**, v. 278, n. 52, p. 51985-8, 2003.

YAMAZAKI, Y. et al. C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 34, n. 4-5, p. 197-9, 2005.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. **J Biol Chem**, v. 284, n. 15, p. 9885-91, 2009.

YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242-248, 2000.

YEH, C.-H. et al. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective $\alpha v \beta 3$ blockade of endothelial cells. **Molecular pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 1333-1342, 2001.

ZHONG, S. et al. Vascular endothelial growth factor from *Trimeresurus jerdonii* venom specifically binds to VEGFR-2. **Biochimie**, v. 116, p. 1-7, 2015.

