

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

**A Corrida Armamentista Predador Presa Entre Serpentes e Mamíferos na
América Do Sul: Uma Revisão do Conhecimento e Metodologias para
Estudo da Resistência de Marsupiais Didelphidae (Didelphimorphia) ao
Veneno de Jararaca**

Fernanda Gianisela Pricoli

São Paulo
2019

Fernanda Gianisela Pricoli

A Corrida Armamentista Predador Presa Entre Serpentes e Mamíferos na América Do Sul: Uma Revisão do Conhecimento e Metodologias para Estudo da Resistência de Marsupiais Didelphidae (Didelphimorphia) ao Veneno de Jararaca

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal do Instituto Butantan, sob orientação de Erika Hingst-Zaher.

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Pricoli, Fernanda

A Corrida Armamentista Predador Presa Entre Serpentes e Mamíferos na América Do Sul: Uma Revisão do Conhecimento e Metodologias para Estudo da Resistência de Marsupiais Didelphidae (Didelphimorphia) ao Veneno de Jararaca; orientador Erika Hingst-Zaher ; coorientadora Danielle H. Drabeck. – São Paulo, 2019.

25 p. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal.

1. Assunto. I. Hingst-Zaher, Erika. II. Drabeck, Danielle H. III. Instituto Butantan. IV. Curso de Especialização Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir de modelo desenvolvido pela
Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Fernanda Gianisela Bricoli, aluno(a) do curso Especialização em Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal do Programa de Aprimoramento Profissional - PAP, autorizo a divulgação do meu Trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste Trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do Trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique: *parte dos dados é fruto de uma colaboração ainda em andamento.*

São Paulo, 19 de fevereiro de 2019

Fernanda G. Bricoli
aluno(a)

Dra. Erika Hingst-Zaher
Pesquisador Científico VI
Museu Biológico
Instituto Butantan

De acordo:.....
Orientador(a):

Agradecimentos

Agradeço a orientação da Dra. Erika Hingst-Zaher, pelos ensinamentos e auxílios que tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço à Dra. Danielle Drabeck pela paciência e dedicação em me ensinar, em pouco tempo, a técnica de agregação plaquetária e pelas correções “em cima da hora”.

Agradeço à Dra. Ana M. Moura da Silva por me guiar com as pesquisas teóricas e por fornecer o espaço no Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan para realizar as análises.

Agradeço ao Dr. José Antonio Portes Junior por me auxiliar e aconselhar e dedicar seu tempo quando eu me sentia perdida.

Sou grata aos meus colegas do Laboratório do Museu Biológico por me ajudarem nas coletas de campo e pelo apoio que me ajudou a encarar os desafios.

Agradeço ao CEFOR e ao Instituto Butantan pela oportunidade de participar do Programa de Especialização em Biologia Animal, que tornou esse trabalho possível.

Este trabalho teve o apoio da FAPESP através do Projeto Temático Biota n°2016/50127-5 (Scales Of Biodiversity: Integrated Studies Of Snake Venom Evolution And Function Across Multiple Levels Of Diversity).

Resumo

Este trabalho compreende em uma revisão bibliográfica sobre a resistência ao veneno de serpentes do complexo *Bothrops* de espécies de pequenos mamíferos silvestres, especialmente da família Didelphini que constituem presas e predadores destas serpentes, e a descrição de metodologias que aprendi como parte do meu treinamento para poder dar continuidade ao projeto na pós-graduação. O veneno das serpentes possui inúmeros componentes que apresentam diversas atividades tóxicas no organismo de suas presas. Apesar disso, alguns mamíferos desenvolveram resistência a esses fatores. Essa resistência surgiu por conta de uma corrida armamentista coevolutiva na qual ambos os participantes desenvolvem mecanismos de adaptações recíprocas para continuarem a sobreviver nessa interação. Com as técnicas de captura dos indivíduos de interesse e utilizando o teste de agregação de plaquetas, foi possível avaliar a ação do fator de von Willebrand presente no plasma desses animais, recolhendo dados de botrocetina e aspercetina a partir do veneno de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*. O teste de agregação plaquetária utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) de 3 indivíduos de gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*), permitiu observar que não houve a agregação das plaquetas do plasma na presença de botrocetina e aspercetina. Os resultados obtidos sugerem que *D. aurita* possa apresentar substituições de aminoácidos em uma região do vWF, fazendo com que a botrocetina e a aspercetina não consigam se ligar e ativar a cascata de coagulação, como já descrito antes na literatura em *Didelphis*. Dessa forma, é possível obter maior conhecimento sobre o conceito de corrida armamentista coevolucionária entre predadores e presas em espécies de pequenos mamíferos sul-americanos.

Palavras-chave: Coevolução; Didelphídeos; jararaca; resistência; veneno.

Abstract

This work comprises a bibliographical review on the resistance to snake venom of the *Bothrops* complex of wild small mammal species, especially the Didelphini family, which constitute prey and predators of these snakes, and the description of methodologies that I learned as part of my training for power to continue the project in graduate school. The venom of snakes has numerous components that present various toxic activities in the body of their prey. Despite this, some mammals have developed resistance to these factors. This resistance arose because of a coevolutionary arms race in which both participants develop mechanisms of reciprocal adaptations to continue to survive in this interaction. With the techniques of capturing individuals of interest and using the platelet aggregation test, it was possible to evaluate the action of von Willebrand factor present in the plasma of these animals, collecting botrocetin and aspercetin data from the venom of *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper*. The platelet aggregation test using platelet-rich plasma (PRP) of 3 individuals of black-ear possum (*Didelphis aurita*), allowed to observe that there was no aggregation of plasma platelets in the presence of botrocetin and aspercetin. The results suggest that *D. aurita* may exhibit amino acid substitutions in a region of vWF, causing botrocetin and aspercetin to fail to bind and activate the coagulation cascade, as previously described in the literature in *Didelphis*. In this way, it is possible to obtain more knowledge about the concept of coevolutionary arms race between predators and prey in species of small South American mammals.

Key-words: Coevolution; Didelphini; jararaca; resistance; poison.

Introdução

O presente trabalho compreende duas partes: uma revisão bibliográfica sobre o histórico do conhecimento sobre a resistência de mamíferos ao veneno de serpentes, e uma descrição das etapas de treinamento que realizei para aprender as técnicas necessárias na área de toxilogia e evolução para a realizar pesquisas nessa área.

Na primeira parte, discorro sobre as relações entre presas e predadores, e mais especificamente sobre o fenômeno da corrida armamentista coevolutiva entre estes, buscando compreender quais os mecanismos que os indivíduos participantes possuem para continuarem coexistindo. Alguns animais, entre eles mamíferos alguns mamíferos, desenvolveram a resistência ao veneno das serpentes. Apesar de alguns estudos já terem sido realizados com alguns gambás sul americanos (alguns *Didelphis* e *Philander*), pouco se sabe, na região Neotropical, sobre a resistência dos demais marsupiais a família Didelphini (Ordem Didelphimorphia) e de alguns roedores.

Na segunda parte, descrevo o treinamento que realizei como aluna de pós-graduação do Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Butantan, detalhando os procedimentos aprendidos e realizados, e os passos necessários para poder compreender alguns aspectos dos mecanismos envolvidos entre presas e predadores envolvendo algumas espécies de mamíferos e serpentes comuns na América do Sul

1. Revisão do conhecimento sobre a evolução do veneno e a corrida armamentista

O veneno das serpentes

A peçonha de animais é uma mistura complexa de componentes tóxicos e não tóxicos, de tipo proteico, orgânico e mineral, podendo ter atividade farmacológica, com ou sem atividade enzimática. Isto faz com que os efeitos biológicos produzidos sejam muito complexos, pois cada um dos componentes exerce a sua atividade e ao mesmo tempo potencializa a atividade dos outros componentes (CHIPPAUX *et al.*, 1991; TANIZAKI *et al.*, 1991; CALVETE *et al.*, 2005; KINI, 2005; PORTO *et al.*, 2007; TAKEDA, TAKEYA & IWANAGA, 2012). O veneno das serpentes é constituído por diversos componentes com diferentes

atividades fisiológicas, neurotransmissoras e hematológicas (MARTINS E CUNHA, 2012).

Das serpentes peçonhentas a Subfamília *Crotalinae* compreende a todos os viperídeos do mundo novo, e dentro deste grupo há três gêneros responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos: Gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis), raros casos de *Lachesis* (surucucus) e *Micrurus* (corais) (AMARAL *et al.*, 1986).

Estatísticas de 1990 a 1993 levantadas pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), do Ministério da Saúde (MS) e dados levantados na Casuística do Centro de Controle de Intoxicações (CCI) de 1955 a 2000 mostram que os acidentes ofídicos com o gênero *Bothrops* foi o que teve maior porcentagem de incidência (AZEVEDO-MARQUE, CUPO & HERING, 2003).

As serpentes desse gênero possuem cerca de 30 espécies distribuídas no Brasil, onde as espécies mais conhecidas popularmente são: *B. atrox* encontradas no norte do Brasil, *B. erythromelas* na região nordeste, *B. neuwiedi* cujo encontradas em todo território nacional com excessão na região norte do país, *B. jararaca* que estão distribuídas na região sul e sudeste, *B. jararacussu* encontradas no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste e *B. alternatus* que estão distribuídas apenas ao sul do país (BRASIL, 1998). Habitam tanto as zonas rurais e periféricas das cidades, em ambientes mais úmidos com matas e onde há a proliferação de roedores como em áreas de cultivo, por exemplo (BRASIL, 1998; CUPO *et al.*, 1990).

Dentre os principais componentes do veneno do gênero *Bothrops* estão as serinoproteinases, fosfolipases, lectinas do tipo C e metaloproteinases. As metaloproteinases são divididas em PI, PII, PIII e PIIId. A PI possui apenas o domínio metaloproteinase em sua cadeia, a PII apresenta um domínio metaloproteinase e uma desintegrina. A PIII apresenta uma desintegrina e um domínio rico em sisteína, sendo a que possui maior atividade hemorrágica. Já a PIIId possui domínios tipo desintegrina, rico em cisteína e lectina tipo C (SILVA, 2009; FOX & SERRANO, 2008). A hemorragia causada pelas metaloproteinases provém da degradação da membrana basal e das células epiteliais dos capilares (CASTRO, 2011), extravasamento de componentes sanguíneos devido à ação de forças biofísicas hemodinâmicas operando na microvasculatura (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; ESCALANTE *et al.*, 2011).

A espécie *Bothrops jararaca* é a mais abundante na região da Mata Atlântica, o que determina ser a principal causa de envenenamento por esta aqui no Brasil (RIBEIRO & JORGE, 1990). Dentre as famílias de proteínas do veneno dessa espécie estão as lectinas do tipo C que interagem com os fatores da cascata de coagulação causando aglutinação das plaquetas (CLENETSON, LU & CLEMETSON, 2005). A botrocetina, uma lectina do tipo C isolada do veneno de *B. jararaca* possui grande afinidade de ligação com o fator de von Willebrand (vWF), uma proteína presente no plasma e que esta diretamente ligada aos eventos de agregação plaquetária (FUKUDA et. al., 2005). Em condições fisiológicas normais o vWF e as plaquetas não interagem entre si, apenas em locais de dano vascular. Em ensaios *in vitro* a botrocetina regula essa interação promovendo a aglutinação de plaquetas-vWF em várias espécies de mamíferos (READ et al., 1978; BRINKHOUS et al., 1983; SANDERS et al., 1988). Rucavado et al. (2001) isolou a aspercitina, uma proteína presente no veneno de *Bothrops asper*, que possui atividade semelhante a botrocetina.

As fosfolipases A2 (PLA2) são classificadas em duas classes, onde a classe I são encontradas no veneno de serpentes da família Elapidae, e a classes II no veneno de viperídeos (OWNBY, 1998; MEBS, 1998; LAMBEAU & LAZDUNSKI, 1999; DENNIS, 1997, 2000). Possuem atividade anticoagulantes, onde hidrolisam e destróem a membrana necessária para a formação do complexo de coagulação (SILVA, 2009), causam mionecrose, desorganizam os fosfolídeos e interrompem o fluxo de Ca²⁺ na membrana sarcoplasmática (CASTRO, 2011).

Já as serinoproteinases são enzimas de atividade do tipo trombina por ativar os componentes sanguíneos que estão envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação de plaquetas, afetando a cascata de coagulação (SERRANO & MAROUM, 2005).

A evolução do veneno e a corrida armamentista entre mamíferos e serpentes

Ainda não se tem muita compreensão sobre as funções adaptativas do veneno para as serpentes (KOCHVA, 1987), porém estudos recentes indicam a relação das ações do veneno, com o tipo de presa, auxílio na alimentação e

digestão, e para a defesa contra eventuais inimigos (ANDRADE & ABE, 1999; DALTRY, WUSTER & THORPE, 1996, 1998; JORGE-DASILVA & AIRD, 2001; URDANETA, BOLAÑOS & GUTIERREZ, 2004; ZELANIS, 2006; KARDONG, 1980, 1983; MEBS, 1999). Estudos moleculares sobre a evolução do veneno das serpentes indicam uma variabilidade da expressão fenotípica dos genes responsáveis pela produção dos componentes deste, conseqüentemente variando sua composição proteômica dentro de um mesmo grupo. Essa ampla diversificação na composição se dá não apenas dentro e entre espécies, mas também em níveis taxonômicos mais altos (por exemplo, CHIPPAUX, WILLIAMS & WHITE, 1991; WOOLDRIDGE *et al.*, 2001; MACKESSY, 2008; GIBBS *et al.*, 2011). Podemos interpretar esse fato por conta da necessidade desses animais precisarem ter diferentes proteínas “disponíveis” em seu veneno e assim ter efeitos diferenciais para os tipos de presas (Mackessy *et al.*, 2006). Apesar disso, muitos mamíferos evoluíram medidas de resistência para proteção contra picada de serpentes (VOSS & JANSA, 2012).

O termo “corrida armamentista” é usado para situações em que ocorre coevolução entre os táxons envolvidos, implicando em adaptações recíprocas entre predadores e presas onde não existe um equilíbrio estável (DAWKINS & KREBS, 1979). A compreensão de como essa coevolução pode moldar vários traços fenotípicos em predadores e presas, avalia a importância desses mecanismos (ZANGERL *et al.*, 2008; GOMULKIEWICZ *et al.*, 2007). As adaptações moleculares podem conferir resistência a toxinas em espécies de mamíferos rotineiramente envenenados, e um exemplo desse tipo de adaptação pode ser encontrado entre as serpentes e suas relações com presas e predadores (JANSA & VOSS, 2011).

Pelo menos 48 espécies de mamíferos pertencentes a ordens diferentes se alimentam de serpentes, destacando-se os marsupiais australianos, os insetívoros, primatas, carnívoros e cetartiodáctilos, e marsupiais do Novo Mundo (VOSS & JANSA, 2012).

O gambá-da-Virgínia (*Didelphis virginiana*) e o texugo (*Taxidea taxus*) são considerados predadores de serpentes venenosas mais frequentes dentre os outros mamíferos norte-americanos. Estudos com *D. virginiana* documentaram uma incrível resistência destes ao veneno de espécie ao envenenamento

por víboras (KILMON, 1976 ; WERNER & VICK, 1977 ; PÉREZ *et al.*, 1978a ; PÉREZ, PICHYANGKUL & GARCIA, 1979). Cowles, 1938 sugere que alguns Mephitids norte-americanos também se alimentam de serpentes venenosas, após observações das reações de cascavéis em cativeiro ao odor de *Spilogale gracilis* e o comportamento predatório dos gambás cativos com cascavéis vivas.

Na Europa Ocidental o ouriço comum (*Erinaceus europaeus*) e o texugo Europeu (*Meles meles*) são os mamíferos predadores reportados predando cobras venenosas e ambas as espécies são conhecidas por serem resistentes ao veneno (PHISALIX & BERTRAND, 1895 ; BILLARD, 1910 ; OGNEV, 1962b). Já na Ásia tropical e subtropical, espécies de mangustos comuns (*Herpestes* spp.) foram introduzidas para controlar populações de cobras venenosas. A resistência ao veneno desses animais tem sido objeto de numerosos estudos experimentais (por exemplo, CALMETTE, 1895; OVADIA & KOCHVA, 1977; BDOLAH *et al.*, 1997).

Entre os mamíferos africanos, o texugo do mel (*Mellivora capensis*) obtém 25% de sua dieta a partir de serpentes venenosas em certos habitats (BEGG *et al.*, 2003). A doninha-das-costas-listrada (*Ictonyx striatus*) e espécies de mangustos também possuem relatos de ofiofagia.

Na América do Sul, marsupiais (Ordem Didelphimorphia) são parte integrante da dieta de algumas espécies de serpentes. Adicionalmente, algumas espécies de marsupiais, com destaque para os gambás (gênero *Didelphis*) são conhecidas por predarem serpentes (JARED, ANTONIAZZI E ALMEIDA-SANTOS, 1998; OLIVEIRA & SANTORI, 1999; ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2000; RODRIGUES, 2005; GÓMEZ-MARTÍNEZ, GUTIÉRREZ & DECLERCK, 2008) e pesquisas experimentais relataram propriedades protetoras contra o veneno de serpentes em frações de soro de gambá (MENCHACHA & PEREZ, 1981; PERALES, MUÑOZ & MOUSSATCHÉ 1989; MOUSSATCHÉ & PERALES, 1989; VELLARD, 1945, 1949; PERALES *et al.*, 1994.). Jansa e Voss (2011) relataram evidências de uma relação entre predadores e presas entre viperídeos (subfamília Crotalinae) e gambás (família de marsupiais Didelphidae) (Tabela 1).

Tabela 1. Resistência *in vivo* de Didelphídeos aos venenos de serpentes

Táxon	Origem do veneno	Referência
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Bothrops</i> ssp., <i>Crotalus durisus</i> , <i>Lachesis muta</i>	Vellard, 1945; 1949
	<i>Crotalus durisus</i>	Farah <i>et al.</i> , 1996
<i>Didelphis aurita</i>	<i>Bothrops</i> ssp., <i>Crotalus durisus</i> , <i>Lachesis muta</i>	Vellard, 1945; 1949
	<i>Bothrops jararaca</i>	Perales <i>et al.</i> , 1994
<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Bothrops jararaca</i> , <i>Crotalus adamanteus</i> , <i>Crotalus durisus</i>	Moussatché <i>et al.</i> , 1978; 1979
	<i>Bothrops asper</i> e/ou <i>Bothrops venezuelensis</i>	Pifano <i>et al.</i> , 1993
<i>Didelphis virginiana</i>	<i>Crotalus</i> sp., <i>Agkistrodon</i> spp.	Kilmon, 1976; Werner e Vick, 1977
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	Perales <i>et al.</i> , 1994
<i>Filander frenatus</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	Perales <i>et al.</i> , 1994

Dados adaptados de Voss & Jansa, 2012; Voss, 2013.

A resistência natural desses pequenos mamíferos pode-se dar por dois mecanismos: por mudanças estruturais nos receptores, que impedem a ligação das toxinas do veneno (BARCHAN *et al.*, 1992) ou a presença de inibidores ou

neutralizantes que agem como ligantes das toxinas da peçonha, presentes no seu plasma, soro ou músculo, que inibem os efeitos de envenenamento (NEVES-FERREIRA *et al.*, 2000; JURGILAS *et al.*, 2003; PERALES *et al.*, 2005; BIARDIAB & COSS, 2011).

- Inibidores de metaloproteinases

PERALES *et al.*, 2005 e outros estudos descreveram a imunidade natural contra as metaloproteinases (e outros componentes) do veneno de serpente, onde discutem as propriedades estruturais e biológicas desses inibidores, assim também como suas famílias de proteínas e genes envolvidos. Ensaio *in vivo* foram feitos com os mamíferos de interesse para evidenciar essa imunidade contra as metaloproteinases do veneno de serpentes (CALMETTE, 1895; VELLARD, 1949; WERNER & VICK, 1977).

A Tabela 2 resume os principais inibidores de SVMPs conhecidos ou isolados do plasma, soro e músculo de mamíferos resistentes ao veneno de serpentes.

Tabela 2. Inibidores de metaloproteinases isolados do plasma, soro ou músculo de Didelphideos

Plasma/soro animal	Nome do inibidor	Referência
<i>Didelphis albiventris</i>	DA2-II	Farah <i>et al.</i> , 1996
<i>Didelphis marsupialis</i>	DM40	Perales <i>et al.</i> , 1986
	DM43	
<i>Didelphis virginiana</i>	Oprin	Neves-Ferreira <i>et al.</i> , 2000
<i>Philander opossum</i>	PO41	Jurgilas <i>et al.</i> , 2003

Dados adaptados de Perales *et al.*, 2005.

- Inibidores de lectinas

Em humanos, a botrocetina liga-se ao vWF em sua superfície no domínio A1 dobrado através de duas hélices alfas (FUKUDA *et al.*, 2002, 2005) desencadeando a cascata de coagulação. Trabalhos recentes de filogenia encontraram em *Didelphini* taxas de substituição de aminoácidos em uma região do vWF em gambás, podendo ser um indicativo de evolução adaptativa dessa possível corrida armamentista entre serpentes venenosas, seus predadores e presas (JANSA & VOSS, 2011; FUKUDA *et al.*, 2005).

- Inibidores de fosfolipases

Em 1997, Soares *et al.* relatou a inibição das atividades dos venenos botrópicos e isolou um complexo antibotrópico (Complexo ABC) que foi purificado do soro de *Didelphis albiventris* capaz de neutralizar hemorragia, miotoxidade, edema e a ação da miotoxina-I dos venenos. Observaram também que as atividades de fosfolipases (PLA2) e de coagulação foram reduzidas.

Testes *in vivo* demonstraram que o ABC de *D. marsupialis* inibe as atividades anti-hemorrágicas, anti-miocronótica e antiletal (MOUSSATCHÉ & PERALES, 1989). Neves-Ferreira (1997) demonstrou que o fator foi capaz de inibir a proteólise na matriz extracelular e no sistema de coagulação, induzidas pelo veneno de *B. jararaca*. Já as PLA2s de *Bothrops moojeni* foram parcialmente inibidas após terem sido incubadas com o soro de *D. albiventris* (ou ABC). Houve também o aumento do tempo de coagulação quando o veneno de *Bothrops alternatus* e *B. moojeni* foram incubados com o ABC.

DM64 é uma proteína ácida antimiotóxica presente no soro de gambá (isolada de *Didelphis marsupialis*). Foi analisado que o DM64 inibiu quase completamente a miotoxidade induzida pelas miotoxinas I e II (pertencentes a família das PLA2) de *Bothrops asper*, apresentou atividade anti-hemorrágica contra os venenos brutos de *B. jararaca* e *B. asper* e inibiu a atividade fibrinolítica da jararagina ou Bothrolisina (ROCHA *et al.*, 2002).

Apesar de vários trabalhos *in vitro* e *in vivo* terem apontado mecanismos de resistência ao veneno de jararacas (*Bothrops spp.*) em marsupiais sul-americanos, são necessários estudos que apontem dados, quantifiquem e detalhem como funcionam esses mecanismos em várias espécies de presas e predadores resistentes. Sendo assim este trabalho pode corroborar de forma

efetiva as teorias existentes.

Objetivo

Este projeto teve como objetivo explorar a resistência ao veneno da *Bothrops jararaca* em predadores e presas dessas serpentes, e descrever o treinamento realizado desde as experiências com o trabalho em campo e com a Dra. Danielle Drabeck para aprender a técnica necessária para avaliar o potencial de agregação plaquetária no agregômetro. Assim poderei continuar o estudo futuramente investigando I) a agregação plaquetária em resposta a Botrocetina e II) a ação hemorrágica do veneno utilizando soro de grupos escolhidos. Realizar testes *in vitro* para analisar a ação catalítica do veneno combinado com o soro em um substrato proteolítico, e testes *in vivo* onde será medido o alo hemorrágico causado pelo veneno. Estes ensaios serão realizados com espécies de marsupiais da tribo Didelphini (possíveis predadores de serpentes), marsupiais fora do clado Didelphini (potencialmente presas) e ainda duas espécies de roedores silvestres (subfamília Sigmodontinae) que sejam considerados como presa.

2. Técnicas empregadas para o estudo da resistência de marsupiais ao veneno de jararaca

O Laboratório do Museu Biológico do Instituto Butantan, tem parceria com a Universidade de Minnesota, dentro do projeto temático NSF/FAPESP Scales of Biodiversity. Dentro desta colaboração, a Dra. Erika Hingst-Zaher visitou a Universidade de Minnesota para aprender as técnicas de purificação da botrocetina a partir do veneno de jararaca. Posteriormente, a Dra. Danielle Drabeck veio ao Brasil, para realização de trabalho de campo e capacitação de alunos e pesquisadores ligados ao mesmo projeto. Durante este período, realizamos no parque do Instituto Butantan, a captura dos gambás *Didelphis aurita*. Os resultados obtidos com a Dra. Drabeck fazem parte da sua tese de doutorado, portanto aqui apresento apenas uma análise superficial destes. Realizei então as atividades descritas abaixo, e desta forma pude obter o conhecimento teórico e prático para dar continuidade ao projeto durante a pós-

graduação. Todas as atividades foram realizadas com as licenças do SISBio para coleta de animais silvestres (lic. No. 63803; 64934 e 65441) e do Comitê de Ética em experimentação animal (CEUA-IBu no. 8346081018)

- Captura das espécimes e coleta de amostras de sangue

Para a captura de animais foram utilizadas armadilhas de contenção do tipo Tomahawk e Sherman. As armadilhas, usando como isca pasta de amendoim, foram abertas ao entardecer e vistoriadas ao amanhecer, permanecendo fechadas durante o dia. Os indivíduos capturados, das espécies de interesse, foram retirados das armadilhas e colocados em sacos de tecido para evitar a claridade e minimizar o estresse. Os demais foram fotografados soltos no mesmo local da captura.

Os indivíduos capturados forneceram amostras de sangue em quantidades de 10% do volume total. A fórmula geral para o cálculo do volume sanguíneo utilizada é: peso do animal (g) X 0,06 = volume total de sangue (mL) X 0,10 = 10% da amostra máxima permitida. Os animais são levemente anestesiados com o uso de isoflurano inalatório, antes da coleta de sangue. O sangue foi coletado através da veia da cauda ventral e / ou vasos femorais (Krupp & Quillin, 1964), com o uso de uma seringa contendo citrato de sódio. Posteriormente acondicionado em vacutainers com citrato de sódio para armazenamento (para o teste de agregação plaquetária). A coleta de sangue e o processamento do material devem ser feitos em um intervalo de no máximo 4 horas.

Após período de recuperação da sedação, os animais foram marcados com caneta permanente na cauda e libertados no local de coleta.

- Processamento do material e testes para agregação plaquetária

Os testes foram realizados com o sangue de 3 indivíduos de *Didelphis aurita* e como controle foram utilizados sangue humano de 2 voluntários.

Após a extração de sangue, os tubos foram submetidos a duas centrifugações, onde na primeira centrifuga (800 rpm a 24°C por 10 minutos), foi retirado o plasma rico em plaquetas (PRP) e após a segunda (a 13.000 rpm por 10 minutos), o plasma pobre em plaquetas (PPP). As amostras são colocadas em tubos apropriados para a análise no agregômetro. O PPP será utilizado como branco, e o PRP será utilizado para o teste de agregação plaquetária utilizando 50 ul de botrocetina e de aspercetina, com duas concentrações diferentes de

cada (40 ug/ul e 100 ug/ul) e 5 ul de ADP (difosfato de adenosina) como controle positivo da agregação das plaquetas. A intensidade de agregação plaquetária foi avaliada através dos valores de densidade ótica das amostras testadas.

- Análise dos resultados de agregação de plaquetas

No primeiro ensaio de agregação plaquetária, no plasma rico em plaquetas (PRP) de *D. aurita* primeiramente foi adicionado 50ul de botrocetina a 40 ug/ul, após dois minutos foi adicionado mais 50ul de botrocetina a 100 ug/ul.

No segundo ensaio, no plasma desses mesmos indivíduos foi adicionado 50 ul de aspercetina a 40 ug/ul, após dois minutos foi adicionado mais 50 ul de aspercetina a 100 ug/ul.

Com o sangue de humano foi realizado os mesmos ensaios descritos, para a obtenção de um controle.

Em ambos os ensaios realizados com o plasma de *D. aurita* foi possível observar que ao adicionar a botrocetina em ambas as concentrações, não houve a agregação de plaquetas. O mesmo ocorreu ao adicionar as duas concentrações diferentes de aspercetina. O gráfico abaixo retrata a transmissão média da agregação de plaquetas no plasma de *D. aurita* e de humanos (Figura 1).

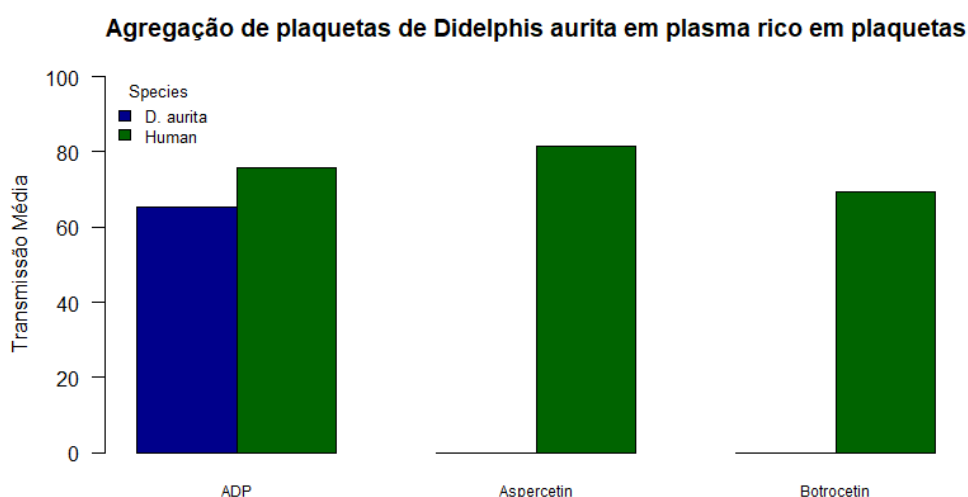


Figura 1. Média da transmissão da agregação plaquetária em *Didelphis aurita* e humanos, realizada no agregômetro. Autor: Danielle Drabeck.

Diversos trabalhos apontam a atividade das proteínas contra as propriedades dos venenos de serpentes em gambás (E.G. MOUSSATCHE *et al.*,

1979; MENCHACA E PEREZ, 1981; PERALES, MUNOZ E MOUSSATCHE, 1986). Entre os didelfídeos, *Didelphis aurita* e *Didelphis virginiana*, o gambá-de-orelha-preta da Mata Atlântica e o gambá da América do Norte, respectivamente, são as espécies que possuem soro com a maior capacidade de neutralizar a ação coagulatória do veneno de viperídeos (JANSA & VOSS, 2011).

Os resultados obtidos indicam que *D. aurita* pode também apresentar a substituição de aminoácidos em uma região do vWF, fazendo com que a botrocetina e a Aspercetina não consigam se ligar e ativar a cascata de coagulação. Esses resultados obtidos corroboram com o conceito de corrida armamentista coevolucionária entre predadores e presas, apesar de que ainda há a necessidade de maiores estudos.

Conclusão

Em mamíferos, a resistência do veneno parece ter evoluído apenas em espécies que são atacadas ou predadas rotineiramente, portanto as adaptações tróficas precisam de mais atenção na área da biologia evolutiva, podendo ter correlação com a evolução do veneno das serpentes.

Informações sobre a resistência de pequenos mamíferos silvestres da América do Sul, especialmente entre as ordens Didelphimorphia e Rodentia, são escassos ou inexistentes, indicando a importância de realizar estudos que permitam observar, quantificar e analisar a existência dos mecanismos dessa relação coevolutiva.

Alguns aspectos importantes:

- O veneno das serpentes é composto por inúmeros componentes tóxicos e não tóxicos que possui diversas atividades no organismo de suas presas;
- Apesar da letalidade dos venenos das serpentes serem fatais, diversos mamíferos, sendo eles presas ou predadores, desenvolveram a resistência aos fatores deste;
- Essa resistência surgiu por conta de uma corrida armamentista coevolutiva na qual ambos os participantes possuem adaptações recíprocas para continuarem a sobreviver nessa interação;
- A resistências deses mamíferos se dá por dois mecaninsmos: por mudanças estruturais nos receptores de ligação as toxinas do veneno, ou

pela presença de inibidores ou neutralizantes dessas toxinas no plasma, soro e músculos desses animais;

- Na América do Sul o grupo de Didelphideos inclui os gêneros *Didelphis* e *Philander*, que são conhecidos por apresentarem essa resistência ao veneno ao gênero *Bothrops*; além disso, outros gêneros podem apresentar estas mesmas características.
- Para compreender e estudar melhor esses mecanismos de resistência entre presas e predadores de serpentes da América do Sul, foi necessário me familiarizar com as técnicas envolvidas para o trabalho de captura de mamíferos em campo, assim como as técnicas de laboratório necessárias para o teste de agregação plaquetária do vWF á bothrocetina e aspercetina.

Com tais conhecimentos e vivência serei capaz de dar continuidade ao projeto como pós-graduação onde pretendo explorar e quantificar a resistência de marsupiais pertencentes e não pertencentes á tribo Didelphini e mais duas espécies de roedores silvestres.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA-SANTOS S. M. *et al.* Predation by the opossum *Didelphis marsupialis* on the rattlesnake *Crotalus durissus*. **Current Herpetology** 19(1), p. 1-9, 2000

AMARAL C.F.S., Rezende N.A., Silva A.O. *et al.* Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. **Rev Inst Med Trop** 28(4), São Paulo, p. 220-227, 1986

ANDRADE D.V. & ABE A.S. Relationships of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica** 55(2), p. 200-204, 1999

AZEVEDO-MARQUES M. M, CUPO P. & HERING S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina, Ribeirão Preto** 36(2), p. 480-489, 2003

BARCHAN D., KACHALSKY S., NEUMANN D. *et al.* Fuchs how the mongoose can fight the snake - the binding-site of the mongoose acetylcholine-receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 89(16), p. 7717–7721, 1992

BDOLAH A. *et al.* Resistance of the Egyptian mongoose to sarafotoxins. **Toxicon** 35, p. 1251-1261, 1997

BEGG C.M. *et al.* Sexual and seasonal variation in the diet foraging behavior of a sexually dimorphic carnivore, the honey badger (*Mellivora capensis*). **Journal of Zoology London** 260(3), p. 301-316, 2003

BILLARD G. Immunité naturelle du lerot après hibernation et immunité naturelle du blaireau contre le venin de vipère. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances et Memoires de la Societe de Biologie** 68, p. 982, 1910

BIARDIAB J.E. & COSS R.G. Rock squill (*spermophilus variegatus*) blood sera affects proteolytic and hemolytic activities of rattlesnake enoms. **Toxicon** 57(2), p. 323-331, 2011 doi:10.1016/j.toxicon.2010.12.011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**, 1998

BRINKHOUS K.M. *et al.* Botrocetin (venom coagglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80(5), p. 1463–1466, 1983

CALMETTE A. Contribution à l'étude des venins, des toxines et des serums antitoxiques. **Annales de l'Institut Pasteur** 9, p. 225-254, 1895

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

CASTRO F.O.F. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops Pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico humano.** 67f. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2011

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

CHIPPAUX J.P. *et al.* Snake - venom variability - methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29(11), p. 1279-1303, 1991

CLEMETSON K. J., LU Q. & CLAMETSON J. M. Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis** 34, n. 4–5, p. 150-155, 2005 doi: 10.1159/000092414

COWLES R.B. Unusual defensive postures assumed by rattlesnakes. **Copeia**, p. 13-16, 1938

CUNHA E. & MARTINS O. A. Principais Compostos Químicos Presente Nos Venenos De Cobras Dos Gêneros *Bothrops* E *Crotalus* – Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência** 02(2), p. 21–26, 2012

CUPO P, AZEVEDO MM, HERING SE *et al.* Acidentes ofídicos: Análise de 102 casos. **Livro de Resumos do XXI Congresso da Soc Bras Med Trop**, p. 23-24, 1990

DALTRY J.C., WUSTER W. & THORPE R.S. **Diet and snake venom evolution.** **Nature** 379, p. 537-540, 1996 doi:10.1038 / 379537a0

DALTRY J.C., WUSTER W. & THORPE R.S. Intraspecific variation in the feeding ecology of the Crotaline snake *Calloselasma rhodostoma* in Southeast Asia. **Journal Herpetology** 32(2), p. 198-205, 1998

DAWKINS R & KREBS JR. Arms races between and within species. **Proc Roy Soc Lond B Bio** 205, p. 489–511, 1979

DENNIS E.A. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochem. Sci.** 22(11), p. 1–2, 1997

DENNIS E.A. Phospholipase A2 in eicosanoid generation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 161, p. 532–535, 2000

DOMONT G.B., PERALES J. & MOUSSATCHÉ H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon** 29(10), p. 1183–1194, 1991

DOMONT G.B. *et al.* Inibidores naturais de metaloproteinasas hemorrágicas de veneno de cobra. **Toxicon** 45(8), p. 1013–102, 2005

ESCALANTE T. *et al.* Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **J Proteomics** 74(9), p. 1781–1794, 2011

FARAH M. de F.L. *et al.* Isolation of protein factors from opossum (*Didelphis albiventris*) serum which protect against *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** 34(9), p. 1067–1071, 1996

FOX J. W. & SERRANO S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The Febs Journal** 275(12), p. 3016–3030, 2008

FUKUDA K. *et al.* Structural basis of von Willebrand factor activation by the snake toxin botrocetin. **Structure** 10(7), p. 943–950, 2002

FUKUDA K. *et al.* The snake venom protein botrocetin acts as a biological brace to promote dysfunctional platelet aggregation. **Nature Structural and Molecular Biology** 12(2), p. 152–159, 2005

GIBBS H.L. *et al.* **Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult dusky pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*)**. *Journal of Proteomics* 74, p. 2169–2179, 2011

GÓMEZ-MARTÍNEZ M.J., GUTIERREZ A. & DECLERCK F. Four-eyed opossum (Philander opossum) predation on a coral snake (*Micrurus nigrocinctus*). **Mammalia** 72, p. 350–351, 2008

GOMULKIEWICZ R. *et al.* Dos and don'ts of testing the geographic mosaic theory of coevolution. **Heredity** 98(5), p. 249–258, 2007

GUTIÉRREZ J.M. *et al.* Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon** 45(8), p. 997–1011, 2005

GUTIÉRREZ J.M. *et al.* Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. **Toxins** 8(4), 2016

JANSA S. A. & VOSS, R. S. Adaptive evolution of the Venom-targeted vWF protein in opossums that Eat Pitvipers. **PLoS ONE** 6(6), 2011

JURGILAS P.B. PO41, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolated from *Philander opossum* serum. **Toxicon** 42(6), p. 621-628, 2003

JORGE-DA-SILVA N. & AIRD S.D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 128(3), p. 425-456, 2001

KARDONG K.V. Evolutionary patterns in advanced snakes. **American Zoologist** 20(1), p. 269-282, 1980

KILMON J.A. High tolerance to snake venom by Virginia opossum, *Didelphis virginiana*. **Toxicon** 14(4), p. 337-340, 1976

KINI R.M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis** 34, p. 200-204, 2005

KOCHVA E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** 25(1), p. 65-106, 1987

KRUPP J.H. & QUILLIN R.M. Revisão do Uso do Gambá para Pesquisa-Manejo, Técnicas Experimentais e Medidas de Saúde de Rotina. **Laboratory animal care** 14, p. 189-94, 1964

KUNIYOSHI A.K. *et al.* Angiotensin-degradin serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. **Toxicon** 59(1), p. 124e131, 2012

LAMBEAU G. & LAZDUNSKI M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. **Trends Pharmacol Sci.** 20(4) p. 162–170, 1999

MACKESSY S.P. *et al.* Venom of the Brown Treesnake, *Boiga irregularis*: Ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. **Toxicon** 47, p. 537-548, 2006

MACKESSY P. **Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance.** The Biology of Rattlesnakes, Loma Linda University Press, Loma Linda, CA, USA, pp. 495-510, 2008

MEBS D. 1998. Enzymes in snake venom: an overview. **In: Bailey, G.S., Enzymes from Snake Venom, Alaken Inc,** Fort Collins, CO, p. 1–10, 1998

MEBS D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. **Kaupia** 8, p. 145-148, 1999

MENCHACA, J.M. & PEREZ, J.C. The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (*Didelphis virginiana*) serum. **Toxicon** 19(5), 62332, 1981

MOUSSATCHÉ H. & PERALES J. Factors underlying the natural resistance of animals against snake venoms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 84(IV), p. 391-394, 1989

MOUSSATCHÉ H. *et al.* Experimentos sobre la resistencia del *Didelphis venezolano* (rabi-pelado) a los venenos de serpientes. **Acta cient. venezolana** 29(1), p. 55, 1979

MOUSSATCHÉ H. *et al.* Obtención de una fracción del suero de *Didelphis* activa contra la acción tóxica del veneno de *B. jararaca*. **Acta cient. venezolana** 31(I), p. 104, 1980

MOUSSATCHÉ H. *et al.* Inhibición por una proteína aislada del suero de *D. marsupialis* a la acción hemorrágica por una fracción del veneno de *Bothrops jararaca*. **Acta cient. Venezolana** 32(1), p. 173, 1981

NEVES-FERREIRA A.G. *et al.* Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.** 1474(3), p. 309-320, 2000

NEVES-FERREIRA A.G.C. *et al.* Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. **J. Biol. Chem.** 277(15), p. 13129–13133, 2002

OGNEV S.I. **Mammals of Eastern and Northern Asia, Volume 2: Carnivora (Fissipedia).** Israel Program for Scientific Translations, 1962b

OLIVEIRA E.P. & TANIZAKI M. M. Effect of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* on coagulant and myotoxic activities of *Bothrops* venoms. **Toxicon** 30(2), p. 123-128, 1992

OLIVEIRA M.E. & SANTORI R.T. Predatory behavior of the opossum *Didelphis*

albiventris on the pitviper *Bothrops jararaca*. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 34(2), p. 72–75, 1999 doi:10.1076/snfe.34.2.72.2105

OVADIA M. & KOCHVA E. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. **Toxicon** 15(6), p. 155-162, 1977

OWNBY C.L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.** 17(2), p. 213–238, 1998

PERALES J., MUÑOZ R. & MOUSSATCHÉ H. Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (*Didelphis marsupialis*) serum, with protecting properties against the *Bothrops jararaca* snake venom. **An Acad Bras Cienc.** 58, p. 155-162, 1986

PERALES J. *et al.* New findings on the purification and characterization of an anti-bothropic factor from *Didelphis marsupialis* (opossum) serum. **Braziliam J. Med. Biol. Res.** 22(1), p. 25-28, 1989a

PERALES J. *et al.* **Physicochemical characterization of the antithropic fraction from *Didelphis marsupialis* serum.** Brazilian-Sino Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products, p. 10-14, 1989b

PERALES J, MUÑOS R. & MOUSSATCHÉ H. Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (*Didelphis marsupialis*) serum, with protecting properties against the *Bothrops jararaca* snake venom. **Academia Brasileira de Ciências** 58, p. 155 – 162, 1986

PERALES J. *et al.* Isolation and partial characterization of an anti-bothropic complex from the serum of South American Didelphidae. **Toxicon** 32(10), p. 1237–1249, 1994

PERALES J. *et al.* Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Toxicon** 45(8), p. 1013-1020, 2005

PEREZ J.C. *et al.* Resistance of warm-blooded animals to snake venoms. **Toxicon** 16(4), p. 375-383, 1978a

PEREZ J.C., PICHYANGKUL S. & GARCIA V.E. The resistance of three species of warm-blooded animals to western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Toxicon** 17(6), p. 601-641, 1979

PHISALIX C. & BERTRAND G. **Recherches sur l'immunité hérisson contre le venin de vipere.** Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances et Memoires de la Societe de Biologie 47, p. 639-642, 1895

PICHYANGKUL S. & PEREZ J.G. Purification and characterization of a naturally occurring anti-hemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*). **Toxicon** 19(2), p. 205-215, 1981

PORTO B.N. *et al.* Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon** 50(2), p. 270-277, 2007

READ M.S. *et al.* Role of botrocetin in plated agglutination: formation of an active complex of botrocetin and von Willebrand factor. **Blood** 74(3), p. 1031-1035, 1989

RIBEIRO L. A. & JORGE M.T. Epidemiologia e quadros clínicos dos pacientes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 32(6), p. 436 – 442, 1990

ROCHA S.L.G. *et al.* Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. **Eur. J. Biochem.** 269(24), p. 6052–6062, 2002

RODRIGUES F.H.G. *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Jararaca, Rabo-de-osso). Predation. **Herpetological Review** 36, p. 67–68, 2005

RUCAVADO A. *et al.* Characterization of Aspercetin, a Platelet Aggregating Component from the Venom of the Snake *Bothrops asper* which Induces Thrombocytopenia and Potentiates Metalloproteinase induced Hemorrhage. **Thromb Haemost** 85(4), p. 710- 715, 2001

SANDERS W.E. *et al.* Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin. An animal model. **Lab Invest** 59(4), p. 443-452, 1988

SERRANO S. M. & MAROUN R. C. (2005). Snake venom serine proteinase: sequence homology vs substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon** 45(8), p. 1115-1132, 2005

SILVA J.G. **Estudo dos efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre o metabolismo o estresse oxidativo em fígado de ratos.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009

SOARES A.M. *et al.* Inhibition Of Proteases, Myotoxins And Phospholipases A2 From *Bothrops* Venoms By The Heteromeric Protein Complex of *Didelphis albiventris* Opossum Serum. **Biochemistry and Molecular Biology International** 43(5), p. 1091-10, 1997

TAKEDA S. TAKEYA H. & IWANAGA S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochim Biophys Acta.**1824(1), p. 164-176, 2012

TANIZAKI M. M. *et al.* Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon** 29(6), p. 673–681, 1991

THEAKSTON R.D. & REID H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. **Bull World Health Organ.** 61(6), p. 949-56, 1983

URDANETA A.H., BOLAÑOS, F. & GUTIÉRREZ, J.M. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 138(4), p. 485-492, 2004

VELLARD J. Resistencia de los *Didelphis* (zarigueya) a los venenos ofídicos (nota previa). **Revista Brasileira de Biologia** 5, p. 463–467, 1945

VELLARD J. Investigaciones sobre inmunidad natural contra los venenos de serpientes. **Publicaciones del Museo de Historia Natural “Javier Prado” Serie A (Zoología)** 1(2), p. 1–61, 1949

VOSS, R.S & JANSA S.A. Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: Lessons from didelphid marsupials. **Biological Reviews** 87(4), p. 822–837, 2012

WERNER R.M. & VICK J.A. Resistance of the opossum (*Didelphis virginiana*) to envenomation by snakes of the family Crotalidae. **Toxicon** 15(1), p. 29-32, 1977

WOOLDRIDGE B. J. *et al.* Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*) lacking the acidic subunit DNA sequence lack Mojave toxin in their venom **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 130, pp. 169-179, 2001

ZANGERL A.R. *et al.* Selection for chemical trait remixing in an invasive weed after reassociation with a coevolved specialist. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 105(12), p. 4547–4552, 2008

ZELANIS A. **Análise da variabilidade ontogenética do veneno de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) (Serpentes, Viperidae): implicações adaptativas aos itens alimentares.** Dissertação (Mestrado, Fisiologia) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, p. 97, 2006