

Reconhecimento de frações do veneno de cobras corais brasileiras pelo soro antielapídico

Recognition of venom fractions from Brazilian coral snakes by antielapid serum

Bruno Prado Cortizo Vidal¹, Ellen Souza do Nascimento¹, Anita de Moura Pessoa², Nelson Jorge da Silva Jr.³✉

¹ Departamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

RESUMO

Objetivos: Investigar a capacidade do soro antielapídico produzido no Brasil na identificação de frações do veneno de seis espécies, incluindo as que constituem o pool de inoculação: *Micrurus brasiliensis*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* e *M. surinamensis*.

Métodos: As amostras utilizadas fazem parte do banco de venenos do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. O soro antielapídico foi cedido pela Fundação Ezequiel Dias. As metodologias empregadas foram eletroforese e imunoblotting.

Resultados: Foi demonstrada uma variabilidade toxinológica e uma capacidade também variável de reconhecimento desses componentes pelo soro antielapídico. A partir da técnica de *western-blotting* o soro antielapídico da Fundação Ezequiel Dias foi capaz de reconhecer a maioria, mas não todos os componentes presentes nos venenos analisados.

Conclusões: Os resultados sugerem uma eficácia restrita do soro antielapídico já que o mesmo possui limitações quanto as espécies Amazônicas, o que reforça a necessidade de uma revisão dos estudos intra e interespecíficos dos venenos micrúricos.

DESCRITORES: *Micrurus corallinus*; coral verdadeira; Elapidae; venenos de serpentes; venenos elapídicos; peçonhas.

ABSTRACT

Aims: To investigate whether the antielapid serum produced in Brazil could identify venom fractions from six species of *Micrurus*, including those in the inoculation pool: *Micrurus brasiliensis*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. spixii*, and *M. surinamensis*.

Methods: The samples belong to the venom bank of the Center for Biological Studies and Research from the Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Brazil. The antielapid serum was granted by the Ezequiel Dias Foundation. Both electrophoresis and immunoblotting methods were used.

Results: Variability in venom components and in the ability to recognize such components was demonstrated by the antielapid serum. Based on the western-blotting technique, the antielapid serum from Ezequiel Dias Foundation was able to recognize most, but not all the components present in the analyzed venoms.

Conclusions: The results suggest restricted efficacy of the antielapid serum, due to its limitations against species from the Amazon region, reinforcing the need for a review of intraspecific and interspecific studies of *Micrurus* venoms.

KEY WORDS: *Micrurus corallinus*; coral snake; Elapidae; snake venoms; elapid venoms; venoms.

Recebido: junho, 2015

Aceito: setembro, 2015

✉ Correspondência: nelson.jorge.silvajr@gmail.com



Este artigo está licenciado sob forma de uma licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional, que permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que a publicação original seja corretamente citada. http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt_BR

Abreviaturas: SAE, soro antielapídico; PBS, tampão fosfato-salino; SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; TEMED, *tetramethylethylenediamine*; TTBS, tris-buffered saline acrescido de Tween.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os acidentes ofídicos representam um dos agravos de maior relevância na construção e manutenção do conceito ampliado de saúde. No período de 2007 a 2010 ocorreram 96.349 acidentes com serpentes peçonhentas no Brasil. Dentre os casos em que o gênero da serpente foi informado, *Bothrops* foi responsável por 86% dos casos, *Crotalus* por 9%, *Lachesis* por 4% e *Micrurus* por 1%. A média brasileira de letalidade com serpentes peçonhentas é de 0,5% [1]. Nesse mesmo período, segundo informações disponibilizadas pelo SINAN, foram notificados 787 casos de acidentes com *Micrurus*, serpentes que representam as cobras corais de interesse médico no Brasil. Destes, 52% foram registrados na região Nordeste, 22% região Sudeste, 12% região Norte, 8% região Centro-Oeste e 6% região Sul. Geralmente, a ocorrência de acidentes ofídicos está vinculada a fatores climáticos e ao aumento da atividade humana em trabalhos do campo [2,3].

Embora pouco comum, o envenenamento por corais verdadeiras em seres humanos sempre foi considerado grave, constituindo um relevante problema de saúde pública. Os venenos desse grupo são conhecidos experimentalmente por serem neurotóxicos, miotóxicos, hemorrágicos e causarem alterações cardiovasculares. Entretanto, até o momento, em acidentes humanos, somente os efeitos neurotóxicos e miotóxicos foram observados [4-8].

Dados clínicos sobre os acidentes são escassos e sugerem um grande conjunto de atividades farmacológicas. Fica clara a importância da interpretação segura dos sinais e sintomas do envenenamento elapídico, fundamental na classificação da gravidade do acidente e, conseqüentemente, na soroterapia a ser adotada. A soroterapia administrada em tempo hábil, aliada ao procedimento adequado, é ainda a conduta mais indicada para evitar complicações, sequelas e reações adversas. Com isso, uma questão importante a ser considerada é em relação à administração do soro antielapídico (SAE) e a eficácia da ação de neutralização do mesmo diante da grande diversidade espécies conhecidas no Brasil [6,7].

O SAE é basicamente produzido a partir do veneno de duas espécies consideradas comuns, *Micrurus*

corallinus e *M. frontalis*. Quando há disponibilidade, utiliza-se também o veneno de *M. lemniscatus*. Estudos realizados mostram diferentes toxinas presentes em seus venenos. Sabe-se, também, que as espécies que compõem o pool, se usadas isoladamente, não conseguem neutralizar o veneno umas das outras [8-10].

A combinação das ações antropogênicas da ocupação do solo pelas atividades agropastoris, principalmente no Centro-Oeste brasileiro, e a grande diversidade de espécies de cobras corais no Brasil, reforçam a preocupação sobre a avaliação da neutralização cruzada e o uso do SAE para todas as regiões do Brasil.

Este estudo objetiva avaliar a eficácia do reconhecimento do SAE contra venenos de amostras selecionados, tendo como preocupação os acidentes no Brasil com as espécies que não pertencem ao *pool* antigênico e podem demonstrar manifestações clínicas diversas das esperadas para essa espécie.

MÉTODOS

Amostras de Veneno

Foram utilizadas amostras de veneno coletadas por um dos autores (NJS Jr.), as quais possuem os dados cadastrados no Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, e depositados no banco de venenos da instituição. As amostras são *pools* de coleta das espécies *M. brasiliensis*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e *M. spixii*, procedentes dos estados de Goiás, Maranhão e Pará. Como controle externo foi utilizada uma amostra de veneno de *Naja kaouthia*. Para cada espécie, 3 µg de veneno foi diluído em 750 µL de Tampão fosfato-salino (PBS) (10 mM de fosfato de sódio com 150 mM de NaCl, pH 7.2). Todos os procedimentos foram realizados em colaboração com o Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ.

Soro antielapídico

O SAE é produzido a partir dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis* (50% cada), e o mesmo foi cedido pela Fundação Ezequiel Dias, Lote LFS 1410-1, vencimento em outubro de 2017. As condições de transporte e armazenamento foram adequadas.

Eletroforese em gel de poliacrilamida e western blotting

O protocolo foi desenvolvido de acordo com a técnica de Laemmli (1970), onde duas placas de gel

de poliacrilamida (SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) foram preparadas, sendo uma utilizada para eletroforese e a outra para transferência do *western blotting*. O gel de empilhamento (*stacking*) foi preparado a partir de acrilamida-bis-acrilamida (33,9%) – 600 μ L, Tris pH 6,8 (1M) – 560 μ L, H₂O – 3,24 μ L, SDS – 45 μ L, APS – 50 μ L, e *tetramethylethylenediamine* (TEMED) – 4 μ L. Para o gel de corrida (*running*), utilizaram-se acrilamida-bis-acrilamida (33,9%) – 8,8 ml, Tris pH 8,5 (2,5M) – 3,0 ml, H₂O – 7,8ml, SDS – 200 μ L, APS – 150 μ l, TEMED – 10 μ L.

Em microtubos tipo *ependorf*, individualizados, foram adicionados 50 μ L de solução tampão de aplicação da amostra (80 mM de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 12% de glicerol, 5% de mercaptoetanol, 0,015% de azul de bromofenol) e 50 μ L da diluição do veneno, sendo todos homogeneizados com auxílio de um vortex. Dessa mistura, 30 μ L foram aplicados em cada spot com 11 dentes, e a eletroforese realizada a 20 mA/placa, em tampão tris-buffered saline (TBS) acrescido de Tween (TTBS) (10X) 0.1M; Tris-HCl pH 8,6 0,14 M NaCl e 0,1% de Tween 20. Após a corrida o gel foi corado com 0.1% de azul de Coomassie R-250 em metanol, ácido acético e água (30:10:60, v/v), durante a noite. Posteriormente o gel foi lavado (descoloração) com a mesma solução sem o Coomassie Blue, e água destilada até a visualização das bandas. Como marcador de peso molecular foi utilizado o kit SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos).

Para o *western blotting*, após o término da corrida o gel foi mantido no tampão de transferência para membrana de nitrocelulose na proporção de 80 ml do tampão de corrida e 20 ml de metanol por 15 minutos, e posteriormente na cuba de transferência em membrana de sanduíche a 200 mA por 1 hora. Para confirmar a transferência, o gel de poliacrilamida foi corado com Ponceau 0,2% em ácido acético 3%. A membrana foi lavada com água destilada até serem visualizadas as bandas de proteínas. Para bloquear as ligações, a membrana foi mantida em 5% de leite desnatado em pó *overnight* a 4°C (H₂O). Feito esse processo, a membrana foi lavada com TTBS três vezes por 15 minutos.

As membranas foram então incubadas com o SAE na proporção de 1:10.000 em 5% de leite em TTBS por três horas e lavado com TTBS três vezes por 15 minutos, seguido pela incubação em anticorpo secundário (IgG de cavalo) na proporção 1:2000 por 2 horas. Ambos os processos foram realizados em temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas com TTBS

três vezes por 15 minutos e reveladas de acordo com as instruções do kit HRP Conjugate Substrate (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos).

RESULTADOS

Caracterização eletroforética

Os perfis proteicos dos venenos de *Micrurus* analisados por SDS-PAGE demonstraram que a maioria dos componentes possui peso molecular entre 66 e 20 kDa, característico desse grupo de serpentes. Com poucas variações evidentes, os componentes podem ser facilmente agrupados em proteínas de alto peso molecular (40 a 80 KDa) e proteínas de baixo peso molecular (abaixo de 21 KDa) (**Figura 1**).

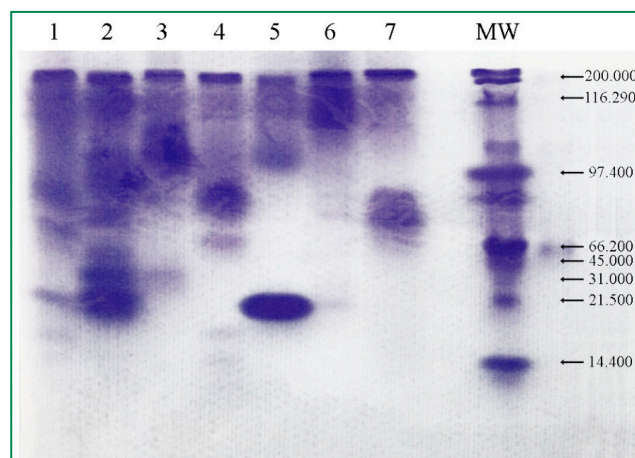


Figura 1. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em SDS-PAGE (15%) corado com azul de Coomassie. Amostras (30 μ L) de: 1. *Micrurus brasiliensis*, 2. *M. lemniscatus*, 3. *M. frontalis*, 4. *M. spixii*; 5. *M. surinamensis*, 6. *M. corallinus*. 7. *Naja kaouthia*; MW = marcador de peso molecular: Miosina = 200.000 Da; β -galactosidase = 116.250 Da; Fosforilase b = 97.400 Da; Albumina sérica = 66.200 Da; Ovoalbumina = 45.000 Da; Anidrase carbônica = 31.000 Da; Inibidor de tripsina = 21.500 Da; Lisozima = 14.400 Da; Aprotinina = 6.500 Da.

Western-blotting do veneno das espécies de *Micrurus*

A partir da técnica de *western-blotting* o SAE da Fundação Ezequiel Dias foi capaz de reconhecer a maioria, mas não todos os componentes presentes nos venenos analisados (**Figura 2**). A princípio, o SAE não reconheceu (visualmente) a maioria dos componentes do veneno de *M. brasiliensis* (nº 1). Independentemente, as bandas, mesmo que muito claras, são comparáveis ao veneno de *M. frontalis* (nº 5). De outro lado, o SAE reconheceu muito bem os componentes

do veneno de *M. spixii* e *M. frontalis* (nº 4 e 5), o que reflete a própria produção desse imunobiológico, para o qual o veneno de *M. frontalis* faz parte do *pool* antigênico inoculatório.

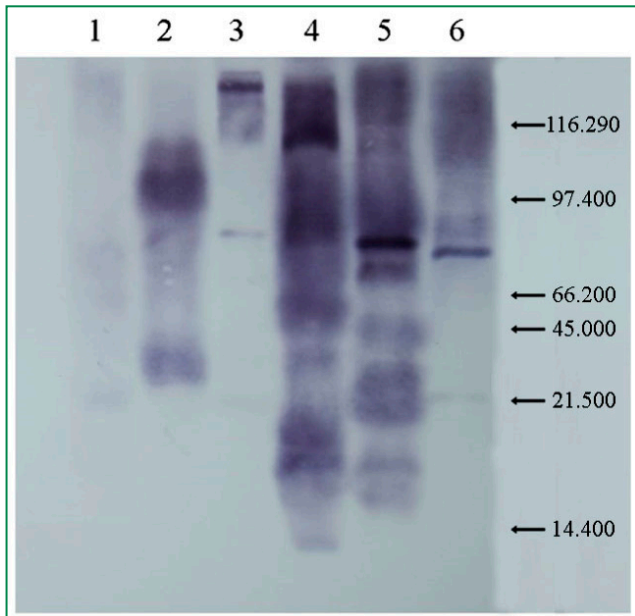


Figura 2. Reação de atividade imunológica do soro antielapídico (SAE) da Fundação Ezequiel Dias sobre amostras de venenos de *Micrurus*: 1. *Micrurus brasiliensis*; 2. *M. lemniscatus*; 3. *M. surinamensis*; 4. *M. spixii*; 5. *M. frontalis*; 6. *M. corallinus*. Marcação molecular de comparação: β -galactosidase = 116.250 Da; Fosforilase b = 97.400 Da; Albumina sérica = 66.200 Da; Ovoalbumina = 45.000 Da; Anidrase carbônica = 31.000 Da; Inibidor de tripsina = 21.500 Da; Lisozima = 14.400 Da.

DISCUSSÃO

O perfil eletroforético obtido apresenta, potencialmente, componentes semelhantes a α -neurotoxinas e fosfolipasas A_2 em praticamente todas as amostras. As α -neurotoxinas são proteínas básicas entre 6 e 14 Kda, com ação bloqueadora de receptores colinérgicos das membranas pós-sinápticas da junção neuromuscular de nervos motores. O estudo da variabilidade dessas toxinas nos venenos micrúricos está ainda em sua fase inicial. O grupo de alto peso molecular inclui proteínas com atividade fosfolipásica A_2 (PLA $_2$) e se demonstra presente em todos os venenos de *Micrurus*. Atuam de diversas formas nas terminações axônicas da junção neuromuscular, impedindo a liberação da acetilcolina, sendo denominadas β -neurotoxinas [6,7,10].

Apesar do padrão eletroforético semelhante, ou comparável, fica muito evidente uma banda de baixo peso molecular (<21 KDa) no veneno de

M. surinamensis, já documentada anteriormente em trabalhos eletroforéticos, enzimáticos e cromatográficos [10-13]. Essa característica chegou a ser aventada como um possível agravante em acidentes ofídicos, pela maior facilidade de difusão e, principalmente, pela observação de casos clínicos publicados [6,7]. Esse aspecto ficou mais evidente em estudos de toxicidade comparativa e a possibilidade de outro tipo de ação neurotóxica, diferente da ação nos receptores colinérgicos [9].

Algumas semelhanças também são passíveis de comparação entre os venenos de *M. frontalis* e *M. brasiliensis*, por muito tempo considerado como subespécies e entre si, e *M. spixii*, consideradas próximas filogeneticamente, principalmente no grupo de alto peso molecular [14-15]. O perfil de *M. frontalis* possui ainda muitos componentes intermediários, incluindo alguns com baixo peso molecular, próximo ao de *M. surinamensis*. Apesar de algumas semelhanças, separa-se o perfil de *M. corallinus*, por possuir componentes diferenciáveis em peso molecular, quantidade e mecanismo de ação [10-13].

O SAE produzido no Brasil é de responsabilidade de três diferentes instituições estaduais: Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais), Instituto Butantan (São Paulo) e Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro), a partir de um *pool* de venenos que inclui, prioritariamente, *M. corallinus* e *M. frontalis*. A inclusão do veneno de *M. lemniscatus* deve-se, provavelmente, aos estudos pioneiros e únicos de Vital Brazil [4,16]. Entretanto, dificuldades com a obtenção e manutenção de espécimes em cativeiro, extração de veneno e garantia de ter as espécies inclusas no *pool* levaram a um desequilíbrio na produção e no compromisso dos produtores de imunobiológicos. Atualmente, somente a Fundação Ezequiel Dias e o Instituto Butantan seguem com a produção do SAE.

No presente estudo, inicialmente o SAE não reconheceu (visualmente) os componentes do veneno de *M. brasiliensis* (nº 1), o que deve ser considerado como um artefato técnico, pois se trata de uma espécie do complexo *M. frontalis* [14]. O SAE reconheceu muito bem os componentes do veneno de *M. spixii* e *M. frontalis*, o que reflete a própria produção desse imunobiológico, para o qual o veneno de *M. frontalis* faz parte do *pool* antigênico inoculatório e além disso, já havia sido demonstrada a relação filogenética próxima entre essas espécies, bem como suas semelhanças toxinológicas [9,11,13,15]. O reconhecimento dos componentes do veneno de *M. lemniscatus* também é explicado pelas semelhanças toxinológicas com *M. frontalis* [9,11,13,17].

Nestes resultados duas situações apareceram. Primeiro, o SAE possui baixa reatividade com os componentes do veneno de *M. surinamensis*, o que já era de se esperar pelos mesmos motivos de relações filogenéticas e toxinológicas. Além disso, é o único veneno neste estudo com componentes de baixo peso molecular, o que ainda não foi esclarecido. Segundo, surpreendentemente houve baixa reatividade do SAE com os componentes do veneno de *M. corallinus*. Este dado é peculiar devido ao fato de esse veneno também fazer parte do *pool* antigênico inoculatório. De forma semelhante às comparações com *M. surinamensis*, o fato é comparável com os relacionamentos filogenéticos e toxinológicos [9,11,13]. Entretanto, não justifica o não reconhecimento dos componentes do veneno pelo SAE.

Os resultados de baixa reatividade com o veneno de *M. corallinus* levanta outro tipo de preocupação, que é o da possibilidade da não inclusão desse veneno no *pool* antigênico inoculatório. Isso se justifica, em parte, pela imensa dificuldade de obtenção de espécimes dessa espécie, a manutenção em cativeiro e as quantidades ínfimas de veneno obtidas por extração [17]. Aliada a isso, toda a burocracia ambiental criada pelos órgãos de controle (como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) para a doação de serpentes venenosas aos institutos produtores de imunobiológicos.

Os resultados demonstram claramente que o SAE disponibilizado possui uma capacidade variável de reconhecimento dos antígenos de venenos das espécies de *Micrurus* incluídas no estudo, o que fica evidenciado na análise comparativa das espécies. Mesmo sendo um preliminar, este estudo aponta para as limitações de reconhecimento de espécies Amazônicas, como *M. lemniscatus* e *M. surinamensis*. Apesar da proximidade filogenética, as frações de veneno dessas cobras não são reconhecidas pelo *pool* de imunização. A grande

limitação do estudo se refere ao não uso de técnicas mensuráveis como ELISA, mas serve como balizador de uma avaliação simples e direta.

Outros estudos apontam para resultados semelhantes de reatividade parcial do SAE com outras espécies como *M. altirostris*, que até pouco tempo era interpretada como uma subespécie de *M. frontalis* e completamente negligenciada em estudos comparativos [10,11,13].

Em outro trabalho comparativo, foi demonstrada a necessidade de uma reavaliação do *pool* antigênico, uma vez que os resultados de vários testes de soros monovalentes contra espécies de importância médica como *M. altirostris*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. spixii* foram discrepantes e preocupantes [17].

Questões sobre a validade de estudos toxinológicos comparativos, especialmente com o veneno de espécies amazônicas, já haviam sido levantadas, mas pouco tem sido feito. No estudo pioneiro de Bolaños et al. [18] os autores sugeriram um *pool* antigênico inoculatório para a América com a inclusão de nove espécies de *Micrurus*, incluindo *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*, todas de ocorrência no Brasil. Surpreendentemente, mesmo esse soro polivalente da América não conseguiu uma neutralização eficiente do veneno de *M. surinamensis*, sugerindo a inclusão dessa espécie nesse *pool* experimental [18]. Os dados gerados no presente estudo reforçam essa teoria.

Os resultados deste estudo são preliminares, mas reforçam a necessidade de estudos contínuos e complementares de bioquímica e farmacologia dos venenos micrúricos, bem como suas variações intra e interespecíficas. Esses dados são essenciais para a melhora de nosso conhecimento sobre esse curioso e diverso grupo de serpentes, sua importância na casuística dos acidentes ofídicos e como base na produção de um soro antielapídico mais eficiente.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN [Internet]. Acidentes por animais peçonhentos. Brasília; 2003 [cited 2003 Jan 15]. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>
2. Pessoa AM. Aspectos biológicos na avaliação dos acidentes causados por cobras corais no Brasil [dissertation]. [Goiânia]: Pontifícia Universidade Católica de Goiás; 2012. 60 p.
3. Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of western hemisphere. Ithaca and London: Cornell University Press; 2004.
4. Vital Brazil O, Fontana MD. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. Mem Inst Butantan. 1984;40/41:221-40.
5. Gutierrez JM, Rojas G, Silva Junior NJ, Nunes J. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coralsnakes). Toxicon. 1992 Oct;30(10):1299-302. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90446-C](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(92)90446-C)

6. Silva Junior NJ, Bucarechi F. Mecanismos de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos de acidentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Junior V. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 99-107.
7. Silva Junior NJ, Bucarechi F. Mecanismos de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos de acidentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Junior V. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 116-24.
8. Carvalho AV, David CF, Pessoa AM, Silva Jr NJ. Um estudo do rendimento do veneno de cobras corais brasileiras e seu uso na avaliação do soro antielapídico. *Sci Med*. 2014;24(2):142-9. <http://dx.doi.org/10.15448/1980-6108.2014.2.16119>
9. Silva Junior NJ, Aird SD. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of Brazilian coral snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2001 Mar;128(3):425-56. [http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456\(00\)00215-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456(00)00215-5)
10. Tanaka GD, Furtado Mde F, Portaro FC, Sant'Anna OA, Tambourgi DV. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Mar 9;4(3):e622. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000622>
11. Aird SD, Silva Junior NJ. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snakes (*Micrurus*) venom. *Comp Biochem Physiol B*. 1991;99(2):287-94. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90043-D](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(91)90043-D)
12. Alape-Girón A, Lomonte B, Gustafsson B, Silva Junior NJ, Thelestam M. Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon*. 1994 June;32(6):713-23. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90340-9](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(94)90340-9)
13. Silva Junior NJ, Griffin PR, Aird SD. Comparative chromatography of Brazilian coral snakes (*Micrurus*) venom. *Comp Biochem Physiol B*. 1991;100(1):117-26. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90093-S](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(91)90093-S)
14. Silva Junior NJ, Sites JWS. Revision of the *Micrurus frontalis* Complex (Serpents, Elapidae). *Herpetol Monogr*. 1999;13:142-94. <http://dx.doi.org/10.2307/1467062>
15. Silva Junior NJ, Sites JW. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: *Micrurus*) based on molecular characters. *Herpetologica*. 2001;57(1):1-22.
16. Vital Brazil O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1987;29(3):119-26. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651987000300001>
17. Higashi HG, Guidolin R, Caricati CP, Fernandes I, Marcelino JR, Morais JF, Yamagushi IK, Stephano MA, Dias-da-Silva W, Takehara HA. Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. *Braz J Med Biol Res*. 1995 July;28(7):767-71.
18. Bola-os R, Cerdas L, Abalos JW. Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): report on a multivalent antivenin for the Americas. *Bull Pan Am Health Organ*. 1978;12(1):23-7. 