

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

ÊMYLLE KAROLINE RAMOS PINTO

**Inibição dos Efeitos Tóxicos da Crotoxina pelo Fator
Neutralizante de *Crotalus* (CNF) em preparações
neuromusculares de camundongos**

BELO HORIZONTE

2019

ÊMYLLE KAROLINE RAMOS PINTO

**Inibição dos Efeitos Tóxicos da Crotoxina pelo Fator
Neutralizante de *Crotalus* (CNF) em preparações
neuromusculares de camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante

BELO HORIZONTE

2019

043 Pinto, Êmylle Karoline Ramos.

Inibição dos efeitos tóxicos da crotoxina pelo Fator Neutralizante de *Crotalus* (CNF) em preparações neuromusculares de camundongos [manuscrito] / Êmylle Karoline Ramos Pinto. - 2019.

50 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Crotoxina. 3. *Crotalus*. 4. Peçonha. 5. Junção Neuromuscular. I. Cavalcante, Walter Luís Garrido. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

**"INIBIÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA CROTOXINA PELO
FATOR NEUTRALIZANTE DE CROTALUS (CNF) EM
PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE CAMUNDONGOS"**

ÊMYLLE KAROLINE RAMOS PINTO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 02 de agosto de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



DRA. CONSUELO LA TORRE FORTES DIAS
FUNED



PROFA. DRA. CRISTINA GUATIMOSIM FONSECA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. WALTER LUÍS GARRIDO CAVALCANTE
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2019

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha avó
Angélica, a minha mãe Joana e aos
meus irmãos Ru e Duda.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu o dom da vida e a possibilidade de concluir esta etapa, mesmo que tenha sido tão árdua e ao mesmo tempo tão desejada, sei que foi Tu que me sustentastes.

Meu profundo agradecimento ao Prof. Dr. Walter Cavalcante, que abriu as portas do LFJT para mim, que não poupou esforços para me ensinar, que foi para a bancada, que sempre esteve disponível para sanar as dúvidas e pela compreensão. Obrigada por ser um ótimo mestre!

À minha psicóloga, Emanuely, minha eterna gratidão. Não sei o que teria sido da Êmylle nesse mestrado sem seu profissionalismo, dedicação e paciência em me ajudar a entender o meu papel enquanto estudante de mestrado e mulher na ciência, além de ajudar nessa incrível descoberta do autoconhecimento.

À minha mãe Joana, à minha avó Angélica, aos meus irmãos Ruaney e Maria Eduarda, à minha tia Aluana, minha prima Amanda e meus tios Sean e Joana: vocês foram extremamente importantes nessa caminhada, não somente no emocional mas também no financeiro. Obrigada por sempre acreditar em mim. Só cheguei até aqui devido o apoio incondicional de vocês.

Às minhas amigas e irmãs do LFJT: Natália e Fernanda vocês iniciaram a jornada comigo na especialização, e continuaram no mestrado. Obrigada por todo apoio, conselhos, discussão de papers e idas a congressos. Sem vocês teria sido mais difícil essa etapa. Aos ICs Brennda, Henrique e Thales muito obrigada por me ajudarem nos experimentos, pela alegria e empenho no laboratório.

À minha primeira família mineira Tatielle, Clarinha, Luna e Nunes: vocês abriram as portas da casa de vocês e me acolheram com todo amor e cuidado. A mudança para Belo Horizonte se tornou mais leve porque eu tinha vocês.

À Sara e Ingrid meu muito obrigado pelo cuidado, preocupação, almoços, jantares, idas à hospital, desabafos e mais tantas coisas! Eu sentia que tinha um lar aqui em BH. Vou sentir saudades de Tete fazendo do meu quarto o seu quarto de brinquedos, e das ligações de Sara me mandando voltar para casa.

Aos amigos que a pós-graduação me deu e nossa grande família nordestina aqui em minas: Antonio, você é o melhor conselheiro e amigo. Através de você conheci o restante do pessoal e sou eternamente grata por isso! Camila, a nossa amizade foi

construída com muitas coisas em comum e eu te admiro tanto! Obrigada pelos vários conselhos, cuidados, risadas, recomendações de séries e puxões de orelha. Rafael você tem o coração mais gigante que eu conheço e é meu amigo topa tudo. Obrigada por sempre estar disposto a me ouvir e por sua sinceridade. Fernando, sua alegria e inteligência contagiam a todos nós. Você sempre está disposto a dar sua opinião e faz comentários muito pertinentes nos nossos trabalhos. Além disso, as festas dadas por você são inesquecíveis! Flávio, você é maravilhoso homem! Sua leveza, cuidado e mente aberta inspiram!

Aos queridos Íris, Marcone, Andressa, Ildernandes, Elder, Caio, Carol Borges pelos desabaços da vida do pós-graduando, pelas saídas e pela força.

As minhas amigas de infância Atanaeli, Jainara, Jessica, Leticia e Ericka: já são quase vinte anos de amizade e sem dúvida vocês foram muito importantes durante esse período. Obrigada por me ouvirem, incentivarem, e por sempre acreditarem em mim! Atanaeli, obrigada por se preocupar, por cada ligação e conselho, em muitos momentos eu precisava disso e sem pedir você adivinhava!

Aos amigos que fiz durante a minha estadia no Espírito Santo: Patrícia, a faculdade me proporcionou essa amizade e foi uma das melhores coisas que ela podia me dar. Obrigada pela cumplicidade, conselhos, força, enfim, por sempre acreditar em mim! Fabiana, sua sinceridade e cuidado sempre me acompanharam e não seria diferente nesse período. Mesmo longe sei que orou por mim, e isso foi muito importante durante o processo. Maurício, obrigada pelos conselhos, pela força e por sempre acreditar em mim. Lena, você foi uma mãe, madrinha, conselheira, eu não poderia ter tido melhor pessoa para me acompanhar por todo esse tempo que morei lá, e por me fazer acreditar no meu potencial.

Aos amigos da especialização em farmacologia, em especial Valter, Grasiela, Carol, Marina, vocês me inspiram como profissional.

À Dr^a. Consuelo e a Paula pela colaboração com os animais, toxinas e inibidor.

À Dr^a. Cristina Guatimosim e seus alunos por me ensinar as técnicas histológicas e permitir o uso do microscópio.

Ao Prof. Dr. André de Oliveira por me auxiliar no emblocamento e corte histológicos, além do apoio.

Aos docentes da PGFisFar por todo ensinamento.

Aos funcionários do biotério e secretaria da pós-graduação pelo apoio e amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

ABREVIATURAS

CA – Crotopotina

CB – Crotoxina B

CNF – Fator neutralizante de *Crotalus*

CTX – Crotoxina

JNM – Junção neuromuscular

OMS – Organização Mundial de Saúde

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PLI – Inibidor de fosfolipase A₂

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo de ação da CTX na JNM.....	20
Figura 2 - Representação esquemática da interação da crotoxina com seu receptor alvo e CNF.....	23
Figura 3 – Ilustração do sistema de registro miográfico para as contrações musculares evocadas indiretamente a partir de preparações nervo-frênico músculo diafragma de camundongos.....	28
Figura 4 – Ilustração do sistema de registro miográfico para as contrações musculares evocadas diretamente a partir de preparações nervo-frênico músculo diafragma de camundongos.....	29
Figura 5 – Microscopia óptica do músculo diafragma de camundongos submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (HE).....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da CTX sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente (A) e diretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos..... 29

Gráfico 2 – Efeito do CNF sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente (A) e diretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos..... 30

Gráfico 3 – Efeito da CTX (5 µg/mL) e do produto de sua pré-incubação com o CNF em concentrações crescentes (5 µg/mL; 20 µg/mL e 50 µg/mL) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente (A) e diretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos..... 31

Gráfico 4 – Efeito da CB (20 µg/mL) e do produto de sua pré-incubação com concentrações crescentes de CNF (50 µg/mL e 100 µg/mL) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações neuromusculares de camundongos..... 32

Gráfico 5 – Índice de mionecrose avaliado a partir do efeito do CNF (50 µg/mL) sobre a miotoxicidade induzida pela CTX (5 µg/mL) no músculo diafragma de camundongos.....34

RESUMO

O Fator Neutralizante de *Crotalus* (CNF) é uma glicoproteína presente no plasma da serpente *Crotalus durissus terrificus* e capaz de inibir os efeitos tóxicos *in vivo* da Crotoxina (CTX), principal componente encontrado na peçonha desta serpente. Entretanto, não há estudos *in vitro* demonstrando a ação neutralizadora do CNF sobre as ações tóxicas da CTX na junção neuromuscular, principal local de ação desta toxina. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do CNF em inibir a neurotoxicidade e a miotoxicidade induzida pela CTX e sua subunidade CB em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A atividade paralisante foi avaliada através de registros de contrações musculares isoladas evocadas indiretamente e diretamente. Ao final dos experimentos miográficos, os músculos foram fixados e as lâminas submetidas à coloração de hematoxilina e eosina para posterior análise morfológica da miotoxicidade induzida pela CTX e capacidade de neutralização do CNF. Os resultados mostraram que os grupos controle e CNF não induziram alterações na amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente ou diretamente ao longo do tempo. A CTX 5 µg/mL induziu bloqueio total das contrações indiretas em 60 minutos e, nas contrações diretas, o bloqueio foi parcial. O CNF 50 µg/mL, quando pré-incubado com a CTX 5 µg/mL, foi capaz de inibir o bloqueio neuromuscular nas preparações evocadas indiretamente e, parcialmente, nas diretas. Em relação a subunidade CB 20 µg/mL, as concentrações de CNF propostas não foram suficientes para promover a inibição do efeito tóxico dessa PLA₂. O estudo morfológico mostrou que o produto da pré-incubação de CTX 5 µg/mL com o CNF 50 µg/mL reduziu o número de fibras lesadas em comparação aos músculos expostos apenas a CTX. Portanto, os resultados revelaram pela primeira vez que o CNF é capaz de inibir as atividades neurotóxicas e miotóxicas da CTX. Apesar da inibição da miotoxicidade ter sido parcial nos experimentos miográficos, a lesão muscular foi inibida completamente, como observado no estudo morfológico. Portanto, o CNF pode ser uma ferramenta importante para o estudo dos mecanismos de ação da CTX, visto que é capaz de neutralizar seus efeitos tóxicos, bem como, uma substância com potencial clínico para auxiliar no tratamento de indivíduos envenenados por serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus*.

Palavras-chave: Crotoxina, Fator Neutralizante de *Crotalus*, Junção Neuromuscular, Peçonha Ofídica.

ABSTRACT

Crotalus Neutralizing Factor (CNF) is a glycoprotein present in the blood plasma of *C.d. terrificus*, capable to inhibit the *in vivo* toxic effects of CTX, the main component found in the venom of this snake. However, there are no *in vitro* studies demonstrating the neutralizing action of CNF on the CTX toxic actions at the neuromuscular junction, the main site of action of this toxin. In this sense, the objective of this study was to evaluate the ability of CNF to inhibit neuromuscular blockade and myotoxicity induced by CTX and its CB subunit in mice phrenic nerve-diaphragm muscle preparations. The paralyzing activity was evaluated through the recording of muscle twitches evoked indirectly and directly. At the end of the myographic experiments, the muscles were fixed, and the blades subjected to hematoxylin and eosin staining, the myotoxicity was assessed by optical microscopy. The results showed that the control and CNF groups did not induce alterations in the amplitude of indirectly or directly evoked twitches over time. CTX 5 µg/mL alone induced total blockade of indirectly evoked twitches in 60 minutes, however, in the direct contractions, the blockade was partial. The CNF 50 µg/mL was able to inhibit neuromuscular block induced by CTX 5 µg/mL in indirectly evoked preparations, whereas in the direct twitches the inhibition was partial. Concerning the CB 20 µg/mL subunit, the proposed concentrations of CNF were not sufficient to promote the inhibition of the toxic effect of this PLA₂ alone. The morphological study showed that the pre-incubation of CTX 5 µg/mL with CNF 50 µg/mL reduced the number of injured fibers compared to the muscles exposed to CTX alone. Therefore, the results revealed for the first time that CNF is able to inhibit the neurotoxic and myotoxic activities of CTX. Although inhibition of myotoxicity was partial in myographic experiments, muscle injury was completely inhibit, as observed in the morphological study. Thus, CNF can be an important tool for the study of the CTX mechanisms of action, since it is able to neutralize its toxic effects, as well as a substance with clinical potential to assist in the treatment of individuals poisoned by snakes of the *Crotalus durissus terrificus* species.

Keywords: Crotoxin, *Crotalus* Neutralizing Factor, Neuromuscular Junction, Snake Venom.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂: a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.
- AZEVEDO-MARQUES, Marisa Mazzoncini de et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, p. 631-636, 1985.
- AZEVEDO-MARQUES, Marisa Mazzoncini de. Acidente Crotálico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2009. p.108-115.
- BON, Cassian et al. Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem**, v. 99, p. 471-481, 1979.
- BON, Cassian et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. **Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por Animais Peçonhentos – Serpentes: Casos de acidentes por serpentes**, 2018. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/05/16-Dados-Epidemiologicos-SiteSVS--maio-2019---OFIDISMO-CASOS.pdf>> Acesso em 10 de Abril de 2019a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por Animais Peçonhentos – Serpentes: INCIDÊNCIA (/100.000 HABITANTES) - OFIDISMO**. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/05/17-Dados-Epidemiologicos-SiteSVS--maio-2019---OFIDISMO-INCIDENCIA.pdf>>. Acesso em: 30 de Setembro de 2019b.
- BULBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, p. 3-26, 1946.
- BURKE, John E.; DENNIS, Edward A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **J. Lipid Res.**, v. 50, p. 237-242, 2008.
- CALMETTE, A. Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 8, p. 275-291, 1894.
- CAMPOS, Patrícia Cota et al. Endogenous phospholipase A₂ inhibitors in snakes: a brief overview. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p.1-7, 2016.
- CAVALCANTE, Walter Luís et al. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 490-497, 2007.
- CAVALCANTE, Walter Luís et al. Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom needs its acid chaperone to concurrently inhibit acetylcholine release and produce muscle blockage. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 334, p. 8-17, 2017.

CHANG, C. Chiung; LEE, J. Dong. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like beta-bungarotoxin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 296, n. 2, p. 159-168, 1977.

CHANG, C. Chiung et al. Effects of Sr^{2+} and Mg^{2+} on the phospholipase A and the presynaptic neuromuscular blocking actions of beta-bungarotoxin, crotoxin and taipoxin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 299, n. 2, p. 155–161, 1977.

CHIPPAUX, Jean-philippe. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! Letter to the Editor. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 23:38, 2017.

DE OLIVEIRA, R.C.; WEN, F.H.; SIFUENTES, D.N. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: Cardoso, J.L.C.; França, S.F.O.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad Junior, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, p.6-21, 2009.

DELOT, Emmanuele; BON, Cassian. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p. 10708-10713, 1993.

DENNIS, Edward A. et al. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851–2871, 2009.

DOS-SANTOS, Maria Cristina et al. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p.77-83, 1992.

FAURE, Grazyna; BON, Cassian. Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of Several Isoforms and Comparison of Their Molecular Structure and of Their Biological Activities. **Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 730–738, 1988.

FAURE, Grazyna et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **European Journal Of Biochemistry**, v. 223, n. 1, p.161-164, 1994.

FAURE, Grazyna. Natural inhibitors of toxic phospholipases A2. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 833–840, 2000.

FAURE, Grazyna et al. Crystal Structure of Crotoxin Reveals Key Residues Involved in the Stability and Toxicity of This Potent Heterodimeric β -Neurotoxin. **Journal Of Molecular Biology**, v. 412, n. 2, p.176-191, 2011.

FERNANDES, Carlos A. H. et al. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1844, n. 12, p. 2265-2276, 2014.

FÉLIX-SILVA, Juliana et al. Inhibition of local effects induced by Bothrops erythromelas snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v. 125, p. 74-83, 2017.

FRAENKEL-CONRATH H., SINGER B. Fractionation and composition of crotoxin. **Arch Biochem Biophys**, v.60, n.1, p.64-73, 1956.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. P. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier. p.81-95, 2009.

FORTES-DIAS, Consuelo Latorre et al. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 8, n. 29, p.997-1008,1991.

FORTES-DIAS, Consuelo Latorre et al. A Phospholipase A, Inhibitor from the Plasma of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*): PROTEIN STRUCTURE, GENOMIC STRUCTURE, AND MECHANISM OF ACTION*. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 269, n. 22, p. 156464-15641, 1994.

FORTES-DIAS, Consuelo Latorre et al. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A2 inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA2 from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, n. 12, p.1747-1759, 1999.

FORTES-DIAS, Consuelo Latorre et al. Identification of continuous interaction sites in PLA(2)-based protein complexes by peptide arrays. **Biochimie**, v. 91, n. 11-12, p. 1482-1492, 2009.

FORTES-DIAS, Consuelo Latorre et al. Insights on the structure of native CNF, an endogenous phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus terrificus*, the South American rattlesnake. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1844, n. 9, p.1569-1579, 2014.

GALIZIO, Nathália da Costa. et al. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. **Journal of Proteomics**, v. 186, p. 56-70, 2018.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, Barbara J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon**, v.22, p.791–804, 1984.

GUTIÉRREZ, José María; LOMONTE, Bruno. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, José María M.; OWNBY, Charlotte L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, José María et al. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v. 51, p. 80-92, 2008.

GUTIÉRREZ, José María; LOMONTE, Bruno. Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, p. 27-39, 2013.

GUTIÉRREZ, José María et al. Snakebite Envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3, n. 17079, 2017.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review. The crotoxin complex--an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HAWGOOD, Barbara J.; SMITH, J. W. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. **Br. J. Pharmacol.**, v. 61, n. 4, p. 597-606, 1977a.

HAWGOOD, Barbara J.; SMITH, J. The presynaptic action of crotoxin at the murine neuromuscular junction. **Physiological society**, n. December, p. 336-352, 1977b.

HAWGOOD, Barbara J.; SANTANA DE SA, Sonia. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**, v. 4, n. 2, p.293-303, 1979.

HAWGOOD, Barbara J.; SMITH, I. Christopher. The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials at the frog neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 27, n. 2, p. 272-276, 1989.

HAWGOOD, B.; BON, C. Snake venom presynaptic toxins. In: TU, A.T. (Ed.), **Handbook of Natural Toxins**, Vol. 5. Reptile Venoms and Toxins. New York: Marcel Dekker, p. 3-52, 1991.

JORGE, Roberta Jeane Bezerra et al. Differences between renal effects of venom from two Bothrops jararaca populations from southeastern and southern Brazil. **Toxicon**, v. 125, p. 84-90, 2017.

KAMIGUTI, Aura S.; SANO-MARTINS, Ida S. South american snake venoms affecting haemostasis. **Toxin Reviews**, v. 14, n. 3, p. 359-374, 1995.

KINI, R. Manjunatha; EVANS, Herbert J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

KINI, R. Manjunatha. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v.42, p.827-840, 2003.

KRIZAJ, Igor et al. Neurotoxic Phospholipases A₂Ammodytotoxin and Crotoxin Bind to Distinct High-Affinity Protein Acceptors inTorpedomarmorataElectric Organ†. **Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 2779-2787, 1997.

LIZANO, Sergio et al. Two phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of Cerrophidion (Bothrops) godmani which selectively inhibit two different group-II phospholipase A₂ myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 3, p.631-639, 2000.

LIZANO, Sergio; DOMONT, Gilberto; PERALES, Jonas. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963-977, 2003.

LOGONDER, U. et al. Ultrastructural evidence for the uptake of a neurotoxic snake venom phospholipase A2 into mammalian motor nerve terminals. **Experimental Neurology**, v. 219, n. 2, p. 591-594, 2009.

MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Preliminary X-ray crystallographic studies of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, n. 12, p. 1067–1069, 2007.

MARLAS, Guy; BON, Cassian. Relationship between the Pharmacological Action of Crotoxin and Its Phospholipase Activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 125, n. 1, p. 157–165, 1982.

MELO, Paulo A. et al. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, n. 5, p. 595–603, 1994.

MELO, Paulo A. et al. Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle. **Toxicon**, v. 43, n. 2, p.111-119, 2004.

MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 6, p. 266–270, 2000.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 18, p.2897-2912, 2008.

MURAKAMI, Makoto et al. A new era of secreted phospholipase A2. **Journal Of Lipid Research**, v. 56, n. 7, p.1248-1261, 2015.

OHKURA Naoki et al. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Biochem J**, v. 325, p.527–31, 1997.

OWNBY, Charlotte L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 17, p. 213-238, 1998.

OWNBY, Charlotte L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

PERALES, Jonas et al. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur. J. Biochem**, France, n. 227, p.19-26, 1995.

PIMENTA, Luciana de Araújo et al. Crotoxin promotes macrophage reprogramming towards an antiangiogenic phenotype. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.1-15, 2019.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

ROSA, Luana de Jesus Reis et al. The inhibitory effect of *Camellia sinensis* extracts against the neuromuscular blockade of *Crotalus durissus terrificus* venom. **J Venom Res**, v. 1, p. 1–7, 2010.

- RODRIGUES-SIMIONE, L.; HAWGOOD, B.J.; SMITH, I.C. Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. **Toxicon**, v. 28, n. 12, p. 1479-1489, 1990.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America In: Bucherl, W.; Buckley, E.; Deulofen, V. (Eds.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, v. 2, 1971.
- SALVADOR, Guilherme H. M. et al. Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A2-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.1-13, 2019.
- SAMPAIO, Sandra C. et al. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.
- SANTOS, Roberta Márcia Marques et al. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from *Crotalus durissus terrificus* (the South American rattlesnake). **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, v. 1717, n. 1, p. 27-33, 2005.
- SANTOS, Hildegard Loren Rebouças et al. Rattlesnakes bites in the Brazilian Amazon: Clinical epidemiology, spatial distribution and ecological determinants. **Acta Tropica**, v. 191, p.69-76, 2019.
- SANZ, Libia et al. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. **Journal Of Proteomics**, v. 200, p.90-101, 2019.
- SILVA, Ana da et al. Potential Utilization of a Polysaccharide from the Marine Algae *Gayralia oxysperma*, as an Antivenom for Viperidae Snakebites. **Marine Drugs**, v. 16, n. 11, p.412-426, 2018.
- SILVA JR, Nelson Jorge da; BUCARETCHI, Fábio. Mecanismo de Ação do Veneno Elapídico e Aspectos Clínicos dos Acidentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2009. p.96-107.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. **Acidentes por Animais Peçonhentos**. Análise dos Dados Epidemiológicos de 2014 a 2019. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>> Acessado em 10 de Abril de 2019.
- SLOTTA, C.H.; FRAENKEL-CONRAT, M. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v. 12, p. 505-513, 1938.
- SOUZA, Rodrigo C. G. de. Aspectos Clínicos do Acidente Laquétrico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2009. p.96-107.
- STRANSKY, Stephanie et al. In vitro assessment of cytotoxic activities of *Lachesis muta* snake venom. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p.1-17, 2018.

TRIVEDI, S. et al. Pharmacologic experiments on the interaction between crotoxin and the mammalian neuromuscular junction, v. 251, n. 2, p. 490-6, 1989.

TZENG, Mu-chin et al. Binding proteins on synaptic membranes for crotoxin and taipoxin, two phospholipases A2 with neurotoxicity. **Toxicon**, v. 33, n. 4, p.451-457, 1995.

VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 981-992, 1966.

VITAL BRAZIL, O.; FRANCESCHI, J.P.; WAISBICH, E. Pharmacology of Crystalline Crotoxin. I. Toxicity. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, n. 3, p.973-980, 1966.

VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol**, v. 212, n. 2, p. 34-35, 1971.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American rattle snake venom. **J. Formosan Med. Assoc**, v. 71, p. 394-400, 1972.

WEN, F.H. Soroterapia. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2009. p.432-441.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Snakebite envenoming**. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/snakebites/disease/en/> >. Acessado em 30 de Novembro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Snakebite: WHO targets 50% reduction in deaths and disabilities**. 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/detail/06-05-2019-snakebite-who-targets-50-reduction-in-deaths-and-disabilities>>. Acessado em 15 de Junho de 2019.