

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

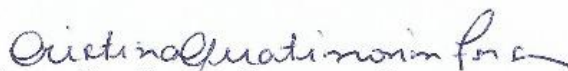
**"INIBIÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA CROTOXINA PELO
FATOR NEUTRALIZANTE DE CROTALUS (CNF) EM
PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE CAMUNDONGOS"**

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 LATORRE 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 desabafos 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! Atana, 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 o 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.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos	14
1.2 Características dos principais envenenamentos ofídicos no Brasil	14
1.3 Soroterapia	16
1.4 Peçonhas ofídicas	16
1.5 Crotoxina	17
1.6 Inibidores naturais de fosfolipases de serpentes	22
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Animais	27
4.2. CTX, CB e CNF	27
4.3 Solução nutriente	27
4.4. Estudo miográfico	27
4.4.1. Registro das contrações musculares evocadas indiretamente	28
4.4.2. Registro das contrações musculares evocadas diretamente	28
4.4.3. Protocolo Experimental do Estudo Funcional	29
4.5. Estudo morfológico	29
4.6. Análise estatística	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Estudo Funcional	31
5.1.1 Influência da CTX sobre as contrações musculares indiretas e diretas em preparações frênico-diafragma de camundongos	31

5.1.2 Influência do CNF sobre as contrações musculares indiretas e diretas em preparações frênico-diafragma de camundongos	32
5.1.3 Influência do CNF sobre o efeito paralisante da CTX em preparações frênico-diafragma de camundongos	33
5.1.4 Influência do CNF sobre o efeito paralisante da CB em preparações frênico-diafragma de camundongos	34
5.2 Estudo Morfológico	35
5.2.1. Aspecto Morfológico Geral das Fibras Musculares	35
5.2.2. Índice de Mionecrose	36
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos provocam elevada morbidade e mortalidade nos países tropicais, tornando-se um problema de saúde pública. Em todo o mundo são registrados entre 1.8 a 2.7 milhões de casos, com maior número de incidência nas regiões da África, Ásia, Oceania e América Latina (GUTIERRÉZ et al., 2017). Relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelaram a ocorrência de 81 a 130 mil mortes por ano, com 400 mil amputações e outras sequelas incapacitantes (WHO, 2017). Em razão disso, em 2019 a OMS lançou uma estratégia para prevenir e controlar os envenenamentos por picadas de serpentes. O objetivo é de reduzir em 50% o número de mortes e incapacitações nos próximos 12 anos, através de melhorias na educação e prevenção nas comunidades afetadas, assegurando tratamento seguro e eficaz. Além disso, a OMS irá promover o incentivo a pesquisas sobre novas formas de tratamento e diagnóstico que possam auxiliar na recuperação das vítimas (WHO, 2019). As picadas de serpentes afetam principalmente indivíduos de níveis socioeconômicos baixos, devido ao acesso limitado à educação e a saúde. Por isso, os acidentes ofídicos são comuns entre trabalhadores rurais com idade entre 10 a 40 anos, que são os mais produtivos nas comunidades rurais (GUTIERRÉZ et al., 2017). Em 2017, registros obtidos através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) mostraram que o período do ano com o maior número de acidentes no Brasil são os meses de outubro a maio, devido a fatores climáticos (chuvas), reprodução e ao aumento da atividade humana na área rural.

Dados do Ministério da saúde (BRASIL, 2019a) registraram 28.841 acidentes ofídicos no ano de 2018, destacando-se as regiões com o maior número de casos às do Norte, Nordeste e Sudeste. Dentre esses registros, o coeficiente de incidência foi de 127,2 acidentes/100.000 habitantes, mostrando a elevada ocorrência no país (BRASIL, 2019b). As serpentes de importância médica no Brasil são as das famílias Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) e Elapidae (gênero *Micrurus*). Em números, o gênero *Bothrops* (jararaca, jararacuçu) é responsável por 87% dos casos, com índice de letalidade de 0,4%, seguido pela *Crotalus* (cascavel), com incidência de 8% e letalidade de 1,1%, sendo raros os acidentes por *Lachesis* e *Micrurus* (PINHO; PEREIRA, 2001; DE OLIVEIRA et al., 2009; SINAN, 2017; SILVA et al., 2018).

1.2 Características dos principais envenenamentos ofídicos no Brasil

As ações tóxicas das peçonhas ofídicas podem atingir vários órgãos e sistemas, de modo direto ou indireto, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas. As peçonhas

crotálicas produzem poucas reações locais, sendo o envenenamento caracterizado por atividades sistêmicas, como a neurotóxica, a miotóxica e a coagulante (AZEVEDO-MARQUES et al., 2009). A atividade neurotóxica é evidenciada pela paralisia flácida dos músculos esqueléticos, observando-se inicialmente a “fáceis miastênica”, caracterizada por ptose palpebral e flacidez da musculatura da face. Trata-se de uma das principais manifestações clínicas do envenenamento crotálico. Em casos graves, a neurotoxicidade pode evoluir para a insuficiência respiratória (ROSENFELD, 1971). A atividade miotóxica sistêmica decorre da lesão das células musculares esqueléticas ao longo de todo o organismo, determinando a rabdomiólise. O escurecimento da urina devido à mioglobínúria é a manifestação clínica mais evidente da rabdomiólise e da gravidade do envenenamento, podendo ocasionar a insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985). A atividade coagulante do veneno crotálico está relacionada ao consumo de fibrinogênio que prolonga o tempo de coagulação ou até mesmo torna o sangue incoagulável (KAMIGUTI; SANO-MARTINS, 1995; AZEVEDO-MARQUES et al., 2009; SANTOS et al., 2018).

Os acidentes provocados por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por sintomas locais, sendo as manifestações clínicas rápidas e intensas como edema de tonalidade violácea, devido a sangramento subcutâneo, dor na região da picada ou membro acometido, linfadenomegalia, equimoses, bolhas, inflamação local, necrose e síndrome compartimental (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). A mionecrose é relevante do ponto de vista clínico, tanto pela sintomatologia apresentada no envenenamento, quanto pela dificuldade em neutralizá-la *in vivo*. A miotoxicidade das peçonhas botrópicas pode ser decorrente da isquemia do tecido muscular causada por fatores hemorrágicos presentes nestas peçonhas, ou da presença de miotoxinas que afetam diretamente o tecido muscular (DOS-SANTOS et al., 1992; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). Complicações sistêmicas ocorrem na ausência da administração do soro antiofídico, levando a casos de alterações cardiovasculares (sangramento intenso, choque) e insuficiência renal aguda que podem evoluir para a morte do paciente (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; FÉLIX-SILVA et al., 2017; JORGE et al., 2017).

Apesar de raros, os acidentes provocados pelo gênero *Lachesis* devem ser considerados graves devido à grande quantidade de peçonha inoculado durante os acidentes (SOUZA, 2009). Os efeitos sistêmicos observados são hemorragia espontânea, náuseas, vômitos, diarreia, distúrbios da coagulação, hipotensão, alterações sensoriais (para cor e som), choque cardiovascular e disfunção renal. No local da picada foi verificado dor intensa, edema e equimose local discreta (SOUZA, 2009; STRANSKY et al., 2018).

Quanto aos acidentes provocados pelo gênero *Micrurus*, estes são de pouca frequência no Brasil e apresentam baixa letalidade em humanos, apesar da elevada toxicidade mostrada em estudos *in vivo* e *in vitro* (SILVA JR; BUCARETCHI, 2009). As manifestações locais são discretas, com dor de intensidade variável, leve edema e ausência de hemorragia local. Os efeitos sistêmicos são caracterizados por paralisia flácida dos músculos, podendo ocasionar síndrome miastênica aguda, parada respiratória e morte (SILVA JR; BUCARETCHI, 2009; SANZ et al., 2019).

1.3 Soroterapia

A terapêutica do envenenamento por serpentes é realizada através da soroterapia. Os princípios desta terapia são baseados nos estudos de Albert Calmette (CALMETTE, 1984), o primeiro a utilizar o antiveneno no tratamento de indivíduos envenenados por serpentes. Porém, foi Vital Brazil que demonstrou pela primeira vez que a especificidade do soro antiofídico estava relacionada ao gênero das serpentes (WEN, 2009).

O antiveneno é formado por imunoglobulinas produzidas principalmente por cavalos, mas, também, por ovelhas e camelos imunizados com a peçonha por meses e/ou anos. A eficácia do soro antiofídico é restrita às espécies de serpentes cujas peçonhas foram utilizadas no processo de imunização, não havendo um soro antiofídico universal (WEN 2009). Ademais, os soros antiofídicos não são capazes de neutralizar alguns efeitos tóxicos das peçonhas causados por componentes pouco imunogênicos, como as miotoxinas, não apresentando benefícios na evolução do quadro clínico local (WEN 2009; GUTIERRÉZ et al., 2017). Assim, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de se obter algum progresso no tratamento dos acidentes ofídicos, além de melhorar a segurança, a eficácia e o acesso aos antivenenos (BERMÚDEZ-MENDÉZ et al., 2018; SILVA et al., 2018).

1.4 Peçonhas ofídicas

As peçonhas ofídicas são uma mistura de substâncias, sendo mais de 90% do peso seco formado por proteínas, compreendendo complexos enzimáticos, não-enzimáticos e proteínas tóxicas e não-tóxicas. Também apresentam carboidratos, lipídios, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). A variabilidade das peçonhas das serpentes pode ocorrer por variações ontogenética, geográficas, dieta, idade e dimorfismo sexual (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; GALIZIO et al., 2018).

Entre os componentes das peçonhas ofídicas, destacam-se as fosfolipases A₂ (PLA₂s) e proteínas homólogas, devido a fração significativa nas peçonhas e a ampla variedade de efeitos

biológicos. Estas proteínas são encontradas principalmente nas serpentes das famílias Viperidae e Elapidae (MONTECUCCO; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008).

As PLA₂s (EC 3.1.1.4) são enzimas que hidrolisam glicerofosfolípidos na posição sn-2 da ligação acil, liberando lisofosfolípidos e ácidos graxos (BURKE; DENNIS, 2008; DENNIS et al., 2011). Essas proteínas são uma superfamília formada por vários grupos e subgrupos, que apresentam como características: baixa massa molecular, dependência do íon Ca²⁺ e uma díade catalítica formada pelos aminoácidos His-Asp (MURAKAMI et al., 2015). As PLA₂s se diferenciam quanto a localização (citoplasmática, secretada), independente de Ca²⁺, sequência de aminoácidos, massa molecular, número e posição de pontes dissulfeto, demanda do íon Ca²⁺, entre outras características, exibindo atividades biológicas distintas devido sua ampla distribuição celular e seletividade ao substrato (BURKE; DENNIS, 2008; MURAKAMI et al., 2015).

As PLA₂s ofídicas pertencem aos grupos I e II da classificação geral (BURKE; DENNIS, 2008) e são proteínas de baixo peso molecular (aproximadamente 14 kDa) e diversos efeitos biológicos, destacando-se o neurotóxico (pré e/ou pós-sinápticos), cardiotoxico, miotóxico, indutor ou inibidor da agregação plaquetária, hemolítico, anticoagulante, convulsivante e hipotensor (ROSENBERG, 1989; KINI; EVANS, 1989; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY, 1998; OWNBY et al., 1999). As enzimas do grupo II são classificadas em dois subgrupos, as PLA₂s que apresentam um resíduo de ácido aspártico conservado na posição 49 e são cataliticamente ativas, denominadas de PLA₂s Asp49 (ARNI; WARD, 1996); e as PLA₂s homólogas, que apresentam uma substituição do resíduo aspartato por uma lisina na mesma posição (PLA₂s Lys 49) tornando-a cataliticamente inativa (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY et al., 1999).

1.5 Crotoxina

A Crotoxina (CTX) foi a primeira toxina isolada de uma peçonha animal, por Slotta e Fraenkel-Conrat, em 1938 e sua estrutura foi descrita quase duas décadas depois por Fraenkel-Conrat e Singer (1956). Trata-se de uma proteína de 23 kDa constituída de duas subunidades, uma ácida sem atividade enzimática, denominada crotapotina ou CA (9,5 kDa), e uma básica com atividade enzimática, conhecida como crotoxina B ou CB (14,5 kDa), que é uma PLA₂ Asp49. Essas subunidades se encontram unidas por forças eletrostáticas, requerendo condições drásticas para sua separação, como pH ácido (próximo de 4) ou uréia 6 M (BREITHAUP; RUBSAMEN; HABERMANN, 1974; BON et al., 1979; FAURE et al., 2011).

Os primeiros estudos farmacológicos realizados com a CTX revelaram que a junção neuromuscular (JNM) constitui um dos principais sítios de sua atividade tóxica (VITAL BRAZIL, FRANCESCHI, WAISBICH, 1966; VITAL BRAZIL, 1966). Em 1966, Vital Brazil e colaboradores demonstraram que a CTX produzia paralisia flácida muscular semelhante aos curares em várias espécies animais (ratos, coelhos, cães, gatos, cobaias e macacos) e, em adição, diminuição da resposta de preparações hemidiafragma desnervado de ratos à acetilcolina (ACh), indicando um bloqueio do tipo pós-sináptico (VITAL BRAZIL, 1966; VITAL BRAZIL, FRANCESCHI, WAISBICH, 1966). Posteriormente, experimentos realizados em eletroplaca de *Electrophorus electricus* (peixe elétrico da bacia amazônica) e microvesículas de *Torpedo marmorata* (peixe elétrico) confirmaram a ação pós-sináptica, sugerindo que a CTX estabiliza o receptor nicotínico no estado dessensibilizado quando administrada em baixas concentrações (BON et al., 1979).

A CTX também possui efeitos pré-sinápticos na JNM, demonstrados a partir de técnicas eletrofisiológicas (VITAL BRAZIL; EXCELL, 1971; CHANG; LEE, 1977; HAWGOOD; SMITH, 1977a; 1977b; RODRIGUES-SIMIONI, HAWGOOD; SMITH, 1990). A toxina promove um efeito trifásico na liberação evocada do neurotransmissor, com supressão inicial da transmissão, seguida de facilitação e posterior declínio e ausência completa da transmissão neuromuscular (VITAL BRAZIL, 1972; CHANG; LEE, 1977; HAWGOOD; SMITH, 1977b; HAWGOOD; SANTANA DE SÁ, 1979). Também foram observadas alterações na liberação espontânea do neurotransmissor, como o aumento inicial da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura, associado com potenciais “gigantes” ocasionais e posterior depressão (VITAL BRAZIL; EXCELL, 1971; CHANG; LEE, 1977, HAWGOOD; SMITH, 1977b; HABERMANN; BREITHAUPT, 1978; HAWGOOD; SANTANA DE SÁ, 1979; RODRIGUES-SIMIONI, HAWGOOD; SMITH, 1990). Estudos paralelos, realizados com a subunidade CB, forneceram evidências de que a atividade fosfolipásica é vital para o bloqueio neuromuscular (MARLAS; BON, 1982; HAWGOOD; SMITH, 1989; HAWGOOD; BON, 1991). A CB altera de forma semelhante a CTX a liberação evocada e espontânea do neurotransmissor, bem como, as propriedades da membrana da fibra muscular. Entretanto, a neurotoxicidade é menos marcante (HAWGOOD; SANTANA DE SÁ, 1979). Em vista do exposto, foi sugerido que a CTX promove ataque enzimático nos fosfolipídios da terminação nervosa motora (HAWGOOD; SMITH, 1977b; CHANG et al., 1977) e a baixa neurotoxicidade da CB pode ser o resultado da perda de especificidade ao sítio de ligação quando a subunidade é administrada isoladamente.

Estudos de *binding* mostraram que as subunidades CA e CB da CTX se dissociam a partir da interação com as membranas biológicas (BON et al., 1979; BON et al., 1989; DELOT; BON 1993). A CB, que é uma PLA₂, liga-se de forma não saturável e não específica em qualquer tipo de membrana biológica, enquanto que, na presença da CA, a CB interage apenas com um número limitado de sítios de ligação de alta afinidade presentes nas membranas sinápticas. Embora o alvo da CTX ainda não tenha sido identificado, os experimentos de *binding* indicaram que alguns fosfolípidos carregados negativamente poderiam ser um componente importante do local de ação da CTX (BON et al., 1979; BON et al., 1989; DELOT; BON 1993).

No final da década de 80 e início de 90 foi proposto parte do mecanismo de ação da CTX que, apesar de antigo, ainda é parcialmente aceito; porém, muitas incógnitas permanecem (BON et al., 1979; BON et al., 1989; DELOT; BON 1993) (**Figura 1**). Foi sugerido que a CA, apesar da ausência de ação tóxica, potencializa os efeitos neurotóxicos da CB (CA.CB), atuando como um carreador que auxilia a ligação da CB a sítios específicos na JNM e, provavelmente, também do músculo esquelético, potencializando as ações neurotóxicas e miotóxicas do complexo (BON et al., 1979; DELOT; BON, 1993). Na época não eram compreendidos o exato mecanismo de ação e nem os resíduos de aminoácidos envolvidos na neurotoxicidade da CTX, bem como, de outras toxinas pré-sinápticas. Os estudos iniciais com a CTX propunham uma ação direta da toxina nas membranas plasmáticas, iniciando eventos que culminariam em bloqueio neuromuscular, sem internalização. Entretanto, dados mais recentes sugerem que toxinas pré-sinápticas ofídicas, em geral, entram no lúmen das vesículas sinápticas, após a endocitose, e hidrolisam os fosfolípidos do folheto interno da membrana, afetando a liberação do mediador químico (MONTECUCCO; ROSSETTO, 2000). Além disso, estudos com neurotoxinas mutantes mostram degeneração mitocondrial, que poderia estar associada a uma ação direta da toxina ou ao influxo de íons cálcio e depleção das vesículas na maioria dos botões terminais (LOGONDER et al., 2009; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013). Portanto, a ligação e a internalização ao terminal nervoso *in vivo* é um fator importante para a toxicidade das PLA₂s neurotóxicas. Neste sentido, novas abordagens experimentais são importantes para avançar no conhecimento do mecanismo de ação da CTX.

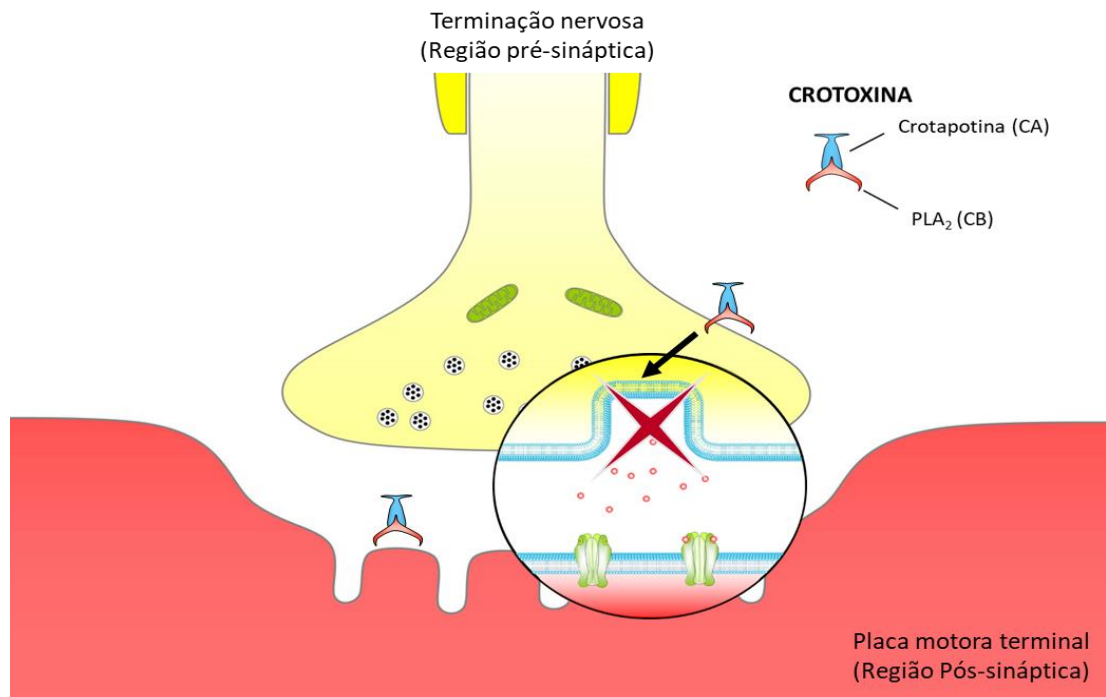


Figura 1 – Mecanismo de ação da CTX na JNM. Na membrana pré-sináptica da terminação nervosa a toxina atua impedindo a liberação da ACh, enquanto que na membrana pós-sináptica (placa motora terminal) sua ação estaria relacionada a dessensibilização dos receptores nicotínicos. Em maior aumento é destacado o comprometimento da liberação do mediador químico.

Estudos funcionais recentes demonstraram pela primeira vez a interferência direta da CTX e da CB na liberação do mediador químico na JNM de camundongos, através de técnicas radioquímicas e de vídeo-microscopia de fluorescência em tempo real (CAVALCANTE et al., 2017). Os resultados radioquímicos, realizados para avaliar a liberação de ACh marcada com trítio ($^3\text{H-ACh}$), mostraram que a CTX e a CB, após 54 minutos de contato com as preparações, reduzem a liberação do neurotransmissor. A técnica de vídeo-microscopia em tempo real, que permite observar a cinética das vesículas na terminação nervosa, mostrou aumento significativo da exocitose vesicular em 20 minutos, induzido tanto pela CTX como pela CB, seguido por diminuição em 90 minutos. Apesar desses achados diferirem do efeito trifásico da CTX e da CB apresentado nos estudos eletrofisiológicos (CHANG; LEE, 1977; HAWGOOD; SANTANA DE SA, 1979; RODRIGUES-SIMIONI, HAWGOOD; SMITH, 1990), é importante salientar que, nesses experimentos, as preparações neuromusculares são mantidas em condições com baixa concentração de Ca^{2+} e elevada de Mg^{2+} , interferindo diretamente no processo de liberação do neurotransmissor. Logo, os experimentos radioquímicos e de vídeo-microscopia em tempo real conservam as preparações em condições mais próximas da fisiológica e, em adição, demonstram uma ação direta da CTX e da CB na cinética de liberação da ACh na JNM (CAVALCANTE et al., 2017).

Em relação a estrutura da CTX, por meio da identificação de uma mistura de isoformas dessa toxina na peçonha da *C.d.terrificus*, Faure e Bon (1988) purificaram de uma única serpente, duas isoformas de CA e quatro isoformas de CB. Além de observarem a presença de sete resíduos de aminoácidos diferentes, foram combinadas ao caso várias isoformas de CA e CB, resultando em diferentes isoformas de CTX que, após reconstituição, apresentavam propriedades enzimáticas e farmacológicas diferentes, atribuídas a influência das isoformas CB no complexo (FAURE; BON, 1988). Posteriormente, foi demonstrado na peçonha crotálica uma mistura de quatro isoformas de CA (CA1, CA2, CA3 e CA4) e quatro isoformas de CB (CBa2, CBb, CBc e CBD), resultando em uma combinação aleatória de dezesseis complexos (FAURE et al., 1994). As diferentes combinações promovem variabilidade nas propriedades biológicas e farmacológicas da CTX. A maior estabilidade entre as subunidades CA e CB está relacionada com o aumento do efeito tóxico, pois ocorre uma dissociação lenta entre as subunidades, possibilitando ao carreador levar a CB aos locais de ação com maior eficiência (FAURE et al., 2011). As isoformas mais tóxicas são denominadas de Classe I e são representadas por associações das diferentes isoformas da CA com as subunidades CBb, CBc ou CBD. As CTXs da Classe II, representadas pela associação da CBa2 com diferentes isoformas de CA, são menos tóxicas, por serem menos estáveis e dissociarem-se mais rapidamente, apesar de serem enzimaticamente mais ativas (FAURE et al., 1994).

Estudos cristalográficos elucidaram a estrutura tridimensional da CB, revelando um arranjo tetramérico composto de dois heterodímeros, resultante da associação das isoformas CBc e CBa2 (MARCHI-SALVADOR et al., 2007). Esta associação pode estar relacionada com o aumento da atividade neurotóxica da CB, devido ao aparecimento de novos sítios de ligação que não são encontrados nos monômeros. A estrutura em cristal da CTX foi resolvida somente em 2011, por Faure e colaboradores, devido à dificuldade na obtenção de isoformas puras da CTX, sendo utilizado o complexo CA2CBb no estudo. Trata-se do primeiro modelo em alta resolução da CA, mostrando que esta subunidade é formada por três cadeias polipeptídicas (α , β e γ) ligadas por pontes de dissulfeto, as quais estão complexadas de forma não covalente com a PLA₂ (CB). Além disso, o triptofano 36 (Trp 36) da CA e os triptofanos 31 e 70 (Trp 31 e Trp 70) da CB fazem parte da interface de contato entre CA e CB, desempenhando papéis importantes na estabilidade do complexo. Posteriormente, Fernandes e colaboradores em 2017, utilizando técnicas biofísicas, confirmaram a importância desses resíduos de triptofano para a atividade tóxica da CTX. Os resíduos de Trp 31 e Trp 70 estão na entrada do sítio catalítico da CB e os resíduos His 48 e Asp 49 estão envolvidos no ataque nucleofílico e coordenação do

cofator de Ca^{2+} , compondo o sítio catalítico desta PLA_2 . A interação entre CA e CB obstrui os Trp 31 e Trp 70 da CB, causando o bloqueio do sítio catalítico. A partir destes achados foi sugerido um mecanismo de ação para a toxicidade da CTX. Foi proposto que a região N-terminal da CB poderia ser o primeiro local de ligação da CTX aos locais de destino. Após a ligação da região N-terminal da CB ao alvo, a CA se dissocia da CB, permitindo a interação da região C-terminal da CB com o alvo e exposição do sítio catalítico. A partir deste momento, a CB pode formar heterodímeros que potencializam seus efeitos (FERNANDES et al., 2017).

O avanço no conhecimento da relação estrutura-atividade da CTX tem sido possível devido a utilização de agentes neutralizadores, como compostos sintéticos e naturais (MELO et al., 1994; FAURE, 2000; CAVALCANTE et al., 2007; MARCHI-SALVADOR et al., 2007; ROSA et al., 2010). O uso conjunto de técnicas funcionais e estruturais permite a identificação de inibidores e a caracterização das regiões de contato da CTX ou de suas subunidades com estes inibidores, revelando assim, possíveis sítios tóxicos ou responsáveis pelo contato com a membrana e, conseqüentemente, o avanço no mecanismo de ação da toxina.

1.6 Inibidores naturais de fosfolipases de serpentes

Muitas espécies de serpentes peçonhentas e não peçonhentas são naturalmente resistentes às ações deletérias dos componentes da peçonha, devido à presença de antitoxinas específicas no sangue (CAMPOS et al., 2016). Estas antitoxinas são proteínas secretadas pelo fígado capazes de impedir danos causados por toxinas que alcançam a corrente sanguínea da serpente, seja por vazamento do conteúdo da glândula de peçonha ou por picada de outra serpente. Entre essas substâncias destacam-se os inibidores de fosfolipase A_2 (PLI) encontrados no sangue das serpentes, que desempenham importante papel na resistência endógena desses animais (SANTOS et al., 2005; CAMPOS et al., 2016).

A maioria dos PLIs são glicoproteínas oligoméricas, com massa molecular entre 75 a 180 kDa, classificados em três classes estruturais denominados de $\text{PLI}\alpha$, $\text{PLI}\beta$, $\text{PLI}\gamma$. Os $\text{PLI}\alpha$ apresentam um domínio semelhante a lectina do tipo C altamente similar ao domínio de reconhecimento de carboidratos das lectinas dependentes de cálcio. Estes inibidores neutralizam preferencialmente PLA_2 ácidas. Os $\text{PLI}\beta$ exibem repetições em série ricas em leucina e são capazes de inibir especificamente PLA_2 básicas. Por sua vez, os $\text{PLI}\gamma$, o maior dentre os três grupos, são compostos por uma estrutura conservada representada por uma sequência de repetições de cisteínas, conhecida como motivos de três dedos (“three-finger motifs”). Estas proteínas são menos específicas e inibem PLA_2 ofídicas neutras, ácidas e básicas, destacando-se as PLA_2 do grupo II encontradas nas peçonhas das serpentes das famílias

Crotalidae e Viperidae (OHKURA et al., 1997; CAMPOS et al., 2016). Além disso, como os PLI γ podem ser encontrados nas formas de heterômeros ou homômeros, uma subclassificação foi realizada a partir da composição dos monômeros. A subclasse I constitui os heterômeros e a subclasse II os homômeros (FORTES-DIAS et al., 2014; CAMPOS et al., 2016). Apesar do crescente número de PLI γ s descritos, as estruturas e os mecanismos de ação destas proteínas ainda não são totalmente compreendidos (FORTES-DIAS et al., 2014). Estudos realizados com o sangue da serpente *C.d.terrificus* mostraram propriedades antitóxicas contra a própria peçonha, bem como, o seu principal componente tóxico, a CTX. O composto antitóxico foi isolado e caracterizado, sendo denominado de Fator Neutralizante de *Crotalus* (CNF) (FORTES-DIAS et al., 1991). O CNF é um oligômero de subunidades individuais glicosiladas e não glicosiladas de 24 kDa e 20 kDa pertencente aos PLI γ da subclasse II (FORTES-DIAS et al., 1994; LIZANO; DOMONT; PERALES 2003; CAMPOS et al., 2016). O CNF se liga de maneira saturável à CB, deslocando a CA, formando um complexo solúvel e estável na proporção 1:1 (molécula:molécula) que é dissociado apenas sob condições desnaturantes. Dessa forma, o mecanismo de ação proposto para o CNF é a capacidade de deslocar a subunidade CA da CTX, formando um complexo estável com a CB (**Figura 2**) (FORTES-DIAS et al., 1994). Além disso, foi sugerido semelhanças entre o CNF e o alvo da CTX na região pré-sináptica da junção neuromuscular (FORTES-DIAS et al., 1994). Entretanto, o local exato de ação da CTX ainda é pouco conhecido. Portanto, o CNF poderia auxiliar no avanço do conhecimento do mecanismo de ação desta toxina.

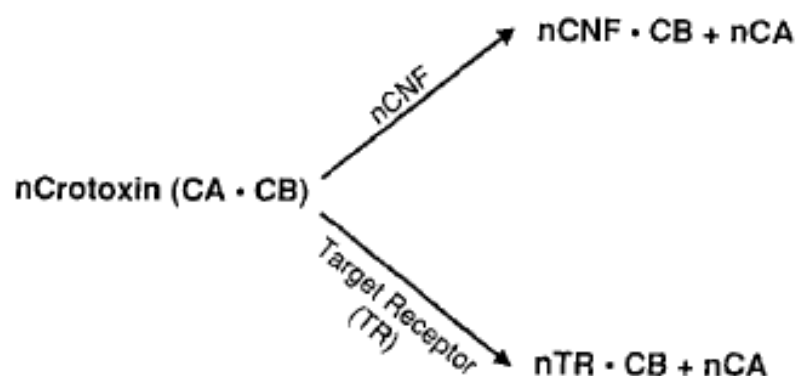


Figura 2 – Representação esquemática da interação da crotoxina com seu receptor alvo e o CNF. Fonte: FORTES-DIAS et al., 1994.

Em 1995, outro grupo de pesquisadores identificaram uma proteína do soro de *C.d.terrificus* e denominaram CICS (inibidor de crotoxina do soro de *Crotalus*). Esta proteína apresentou características e mecanismo de ação semelhantes aos do CNF, diferenciando-se

apenas na descrição de sua formação, composta por oligômeros com duas subunidades associadas de forma não covalente, com 23 e 25 kDa. Quando a sequência do CNF e do CICS foi comparada, uma única diferença foi vista no resíduo 27, onde o CNF contém uma cisteína e o CICS um ácido aspártico. O CICS também apresentou capacidade de deslocar a subunidade CA do completo CTX, formando um complexo estável com a subunidade CB, inibindo os efeitos tóxicos tanto da CTX quanto da CB. O mecanismo de ação proposto para o CICS é que atue como um falso acceptor da CTX, retendo a toxina no sistema vascular, impedindo sua ação na junção neuromuscular. Portanto, considera-se que o CICS e o CNF sejam denominações distintas para a mesma proteína (PERALES et al., 1995; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

É importante salientar que o CNF não apresenta efeito inibitório significativo na atividade enzimática de PLA₂ secretadas de pâncreas suíno e PLA₂ secretadas humana (FORTES-DIAS et al., 1994; FAURE et al., 2000), favorecendo o estudo dessa substância como um modelo alternativo para o tratamento do envenenamento ofídico (SANTOS et al., 2005).

2 JUSTIFICATIVA

O avanço no conhecimento das ações da CTX revelou atividades biológicas com potencial valor terapêutico, como imunomodulatória, antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e analgésica (SAMPAIO et al., 2010; PIMENTA et al., 2019). No entanto, para assegurar a possível aplicabilidade terapêutica da CTX ou de novas drogas derivadas desta, torna-se fundamental o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas atividades tóxicas desta proteína, bem como de sua relação estrutura-atividade.

O estudo de inibidores de toxinas endógenas de serpentes promoveu uma nova perspectiva quanto à sua utilização para o tratamento de acidentes ofídicos, bem como, para o avanço no conhecimento do mecanismo de ação de PLA₂s ofídicas, porém mais informações são necessárias a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na ação desses inibidores e da interação com as toxinas para assegurar a aplicabilidade. O CNF, apesar do mecanismo pouco conhecido, constitui uma ferramenta importante de pesquisa com potencial valor terapêutico, pois além de inibir a CTX e as peçonhas de outras serpentes, não se liga à PLA₂s secretadas humanas (FORTES-DIAS et al., 1994; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; CAMPOS et al., 2016). Apesar de estudos bioquímicos e de bioinformática terem mostrado a capacidade do CNF de deslocar a subunidade CA da CTX e de se ligar à subunidade CB, formando um complexo não tóxico e estável, ainda não foram realizados estudos funcionais com o intuito de demonstrar a inibição dos efeitos tóxicos da CTX pelo CNF no principal sítio de ação desta toxina, a JNM, através de preparações neuromusculares de camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do Fator Neutralizante de *Crotalus* (CNF) sobre as atividades tóxicas da Crotoxina (CTX) em preparações neuromusculares de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade do CNF de neutralizar o bloqueio das contrações musculares, evocadas de forma direta e indireta, induzido pela CTX.

- Avaliar a capacidade do CNF de neutralizar o bloqueio das contrações musculares, evocadas de forma indireta, induzido pela CB.

- Avaliar a integridade do tecido muscular após a exposição à CTX, ao CNF ou ao produto da pré-incubação da CTX com o CNF, através de técnicas morfológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos fêmeas adultos, linhagem Swiss (20-25 g), foram fornecidos pelo biotério da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum* em ambiente com temperatura (24 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro (12/12 horas) controlados. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo CEUA: 17/2017.

4.2. CTX, CB e CNF

A CTX e a CB foram isoladas a partir da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*. O CNF foi isolado do plasma do sangue desta mesma serpente. Todos os compostos foram fornecidos pela Dr^a. Consuelo Latorre Fortes Dias da FUNED.

4.3 Solução nutriente

A solução nutriente (Ringer) foi preparada em água destilada utilizando os seguintes sais (mM): NaCl - 135; KCl - 5; MgCl₂ - 2; NaHCO₃ -15; Na₂HPO₄ - 1; CaCl₂ - 2; glicose - 11.

4.4. Estudo miográfico

O estudo miográfico foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular e Toxinologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e posteriormente exanguinados por secção dos grandes vasos cervicais (protocolo CEUA: 17/2017). Após toracotomia ampla, a preparação do nervo frênico-músculo diafragma foi removida (BULBRING, 1946). Durante este período a preparação foi umedecida intermitentemente com solução Ringer. A seguir, o hemidiafragma esquerdo foi cortado em forma de triângulo e montado verticalmente em cuba para órgão isolado, contendo 12 ml de solução nutriente, constantemente borbulhada com carbogênio (95 % O₂ e 5 % CO₂). O bordo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro em forma de L. O centro tendíneo do músculo foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03), acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50). Os registros foram efetuados em um computador, através de um sistema de aquisição de dados (Gould Sytems, Summit ACQUIRE) e analisados através do aplicativo *Summit DataViewer*.

4.4.1. Registro das contrações musculares evocadas indiretamente

As contrações musculares foram evocadas através de estímulos indiretos. A extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo de platina “de sucção”, que estava acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88). Um outro eletrodo de platina, mergulhado na solução, servia como eletrodo de referência e serviu para fixar o bordo costal do músculo diafragma (**Figura 3**). A tensão de base foi de 5 gramas e as contrações musculares foram evocadas indiretamente por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz.

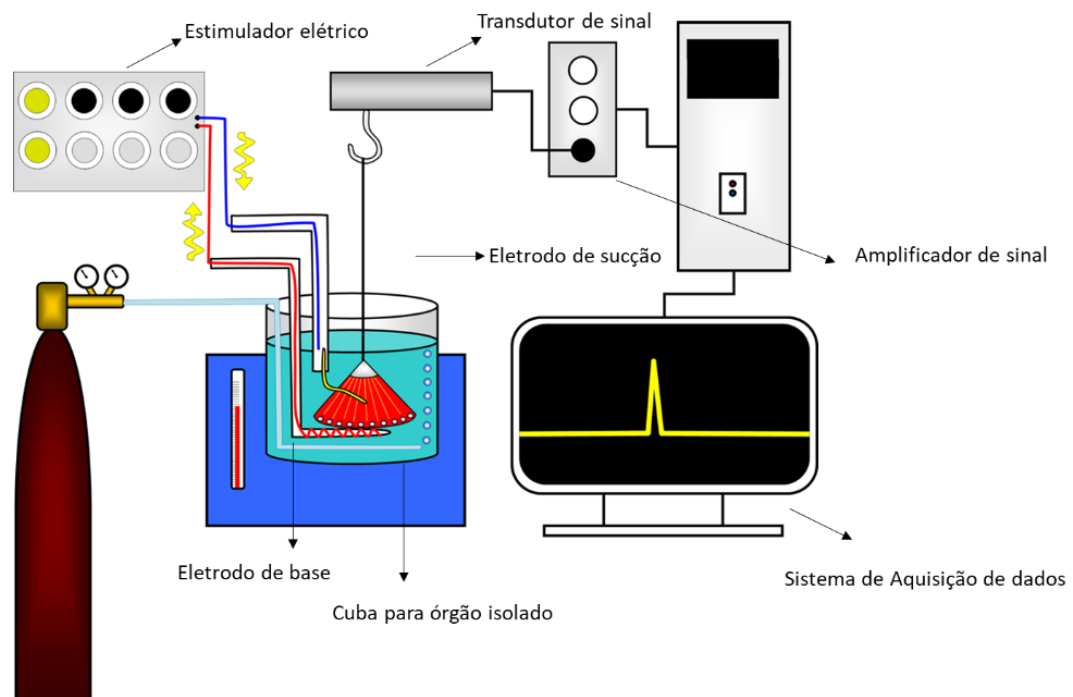


Figura 3 – Ilustração do sistema de registro miográfico para as contrações musculares evocadas indiretamente a partir de preparações nervo-frênico músculo diafragma de camundongos.

4.4.2. Registro das contrações musculares evocadas diretamente

O músculo diafragma foi posicionado entre os pólos de um eletrodo bipolar de platina (**Figura 4**), e este foi acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88). A tensão de base foi de 5 gramas e as contrações musculares foram evocadas através de pulsos elétricos retangulares com duração de 5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz. Para evitar qualquer contribuição da contração indireta, o Brometo de Pancurônio (Sigma-Aldrich®), um bloqueador não-despolarizante que atua como antagonista competitivo dos receptores nicotínicos presentes na placa motora terminal, foi adicionado à solução nutritiva na concentração de 2×10^{-6} M.

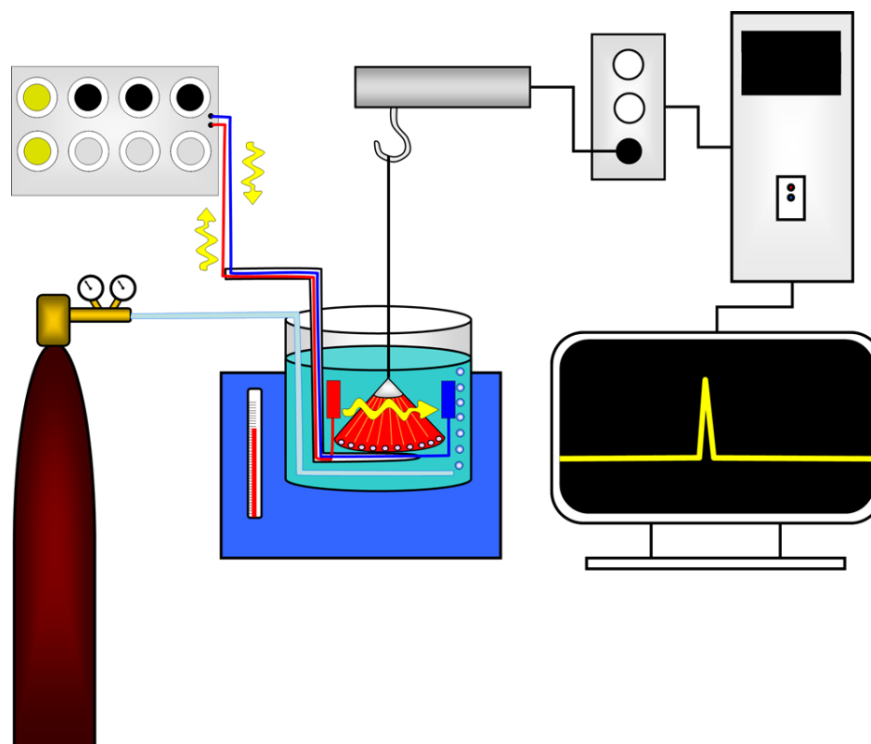


Figura 4 – Ilustração do sistema de registro miográfico para as contrações musculares evocadas diretamente a partir de preparações nervo-frênico músculo diafragma de camundongos.

4.4.3. Protocolo Experimental do Estudo Funcional

Em todos os experimentos, as preparações foram mantidas a 35 ± 2 °C e submetidas a um período de estabilização de 30 minutos, durante os quais o líquido nutriente foi trocado a cada 15 minutos. A seguir, foram registrados 15 minutos de contrações controle (na ausência de qualquer agente). Posteriormente, uma das substâncias (CTX 5 µg/mL; CB 20 µg/mL; CNF 50 µg/mL) ou o produto da pré-incubação por 15 minutos (CTX + CNF; CB + CNF; concentrações crescentes do CNF estabelecidas ao longo dos experimentos) foi adicionado ao banho e o decréscimo percentual das contrações musculares evocadas de forma indireta ou direta foi avaliado por 120 e 240 minutos, respectivamente.

4.5. Estudo morfológico

Após os experimentos miográficos diretos, as preparações foram cuidadosamente retiradas e fixadas em solução de Formaldeído 10%. Em seguida, os fragmentos do músculo diafragma foram submetidos à desidratação em série ascendente de álcool (álcool 70%, 80%, 95% e mais três banhos em 100%, 30 minutos cada). Após a desidratação, os músculos foram infiltrados em resina pura (Leica Histo-resin) para posterior inclusão. A inclusão foi feita utilizando-se a resina pura adicionando-se a solução polimerizante na proporção: 15 mL de

resina glicolmetacrilato para 1 mL da solução polimerizante. Os músculos foram orientados nos moldes para permitir a secção transversal dos mesmos e em seguida embebidos na solução de inclusão. Para completa polimerização, os blocos permaneceram por, no mínimo, 24 horas em temperatura ambiente. Após inclusão, os blocos contendo os músculos foram montados em suportes para micrótomo e cortados utilizando-se navalhas de vidro (Leica). Os músculos foram cortados transversalmente, montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE). Em cada lâmina foram colocados até 5 cortes de um mesmo músculo, sendo montadas 5 lâminas por grupo experimental, ou seja, 5 músculos de animais diferentes.

As lâminas foram submetidas à análise qualitativa, para observar o aspecto morfológico geral das fibras, e quantitativa, para a determinação do índice de mionecrose. Em cada músculo foram analisados cinco campos microscópicos diferentes com a objetiva de 20 X; uma imagem de todo o hemidiafragma foi feita para cada corte transversal com a objetiva de 10 X. O número de fibras com lesão foi representado como porcentagem do número total de fibras (normal + lesada) em cada campo a partir da fórmula: índice de mionecrose = (número de células lesadas/número total de células) x 100. Este estudo foi realizado utilizando um sistema de análise de imagens (programa ImageJ).

4.6. Análise estatística

Os resultados experimentais foram agrupados em média e erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os valores médios foram testadas através de análise estatística utilizando-se o teste “t Student” (para comparação de duas amostras) e a análise de variância (ANOVA, para a comparação de mais de duas amostras). Neste último caso, a análise foi complementada através do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O nível de significância estabelecido foi de 5 %.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo Funcional

5.1.1 Influência da CTX sobre as contrações musculares indiretas e diretas em preparações frênico-diafragma de camundongos

Para avaliar a influência da CTX nas preparações musculares evocadas de forma indireta e direta, avaliou-se a CTX na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A toxina foi capaz de promover o bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações evocadas indiretamente e diretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (**Gráfico 1 A e B**).

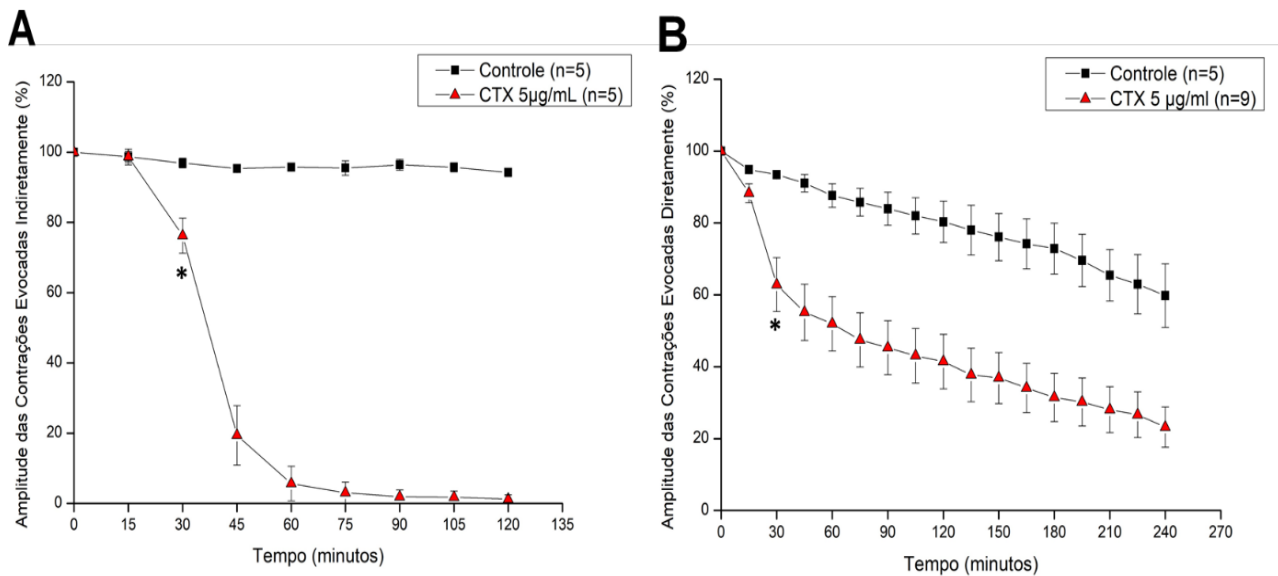


Gráfico 1 – Efeito da CTX (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente (A) e diretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). * indica o tempo a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle.

5.1.2 Influência do CNF sobre as contrações musculares indiretas e diretas em preparações frênico-diafragma de camundongos

Para avaliar a influência do CNF nas preparações musculares evocadas de forma indireta e direta foi utilizado o CNF na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Observou-se que isoladamente essa substância não promoveu alterações das contrações musculares evocadas de forma indireta (**Gráfico 2 A**) ou direta (**Gráfico 2 B**) quando comparado ao controle.

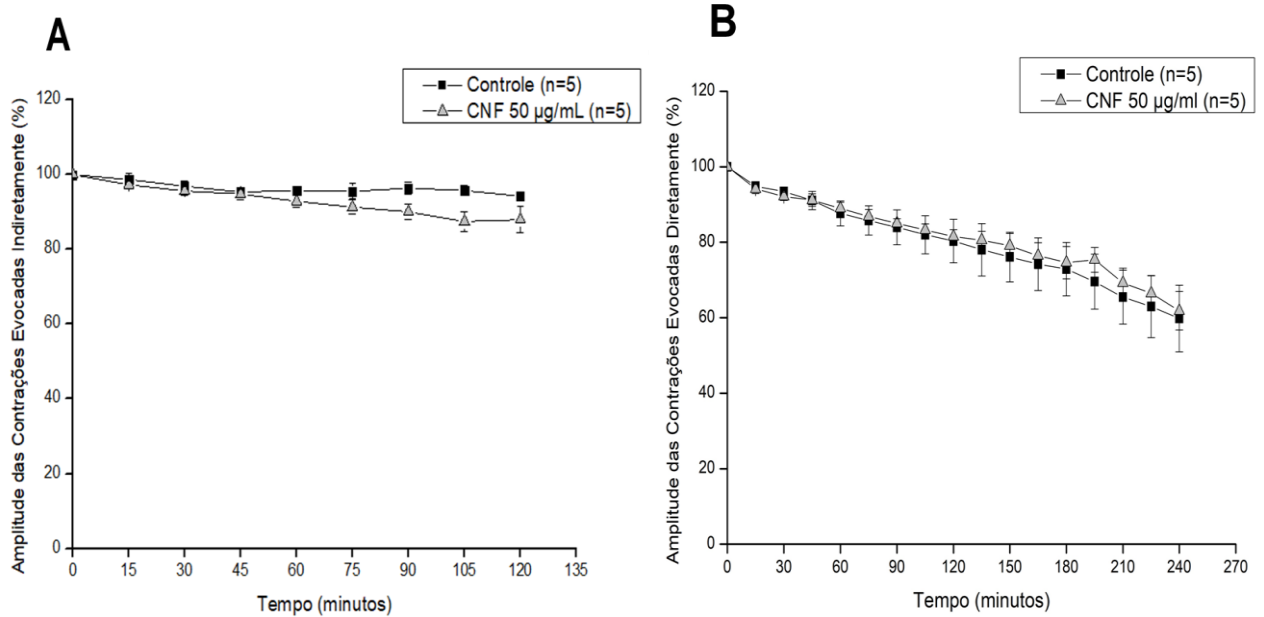


Gráfico 2 – Efeito do CNF (50 $\mu\text{g/mL}$) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente (A) e diretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$).

5.1.3 Influência do CNF sobre o efeito paralisante da CTX em preparações frênico-diafragma de camundongos

Para avaliar a capacidade do CNF em neutralizar os efeitos da CTX nas preparações musculares evocadas de forma indireta e direta foi realizado a pré-incubação por 15 minutos da CTX com o CNF e, em seguida, adicionado à preparação. Observou-se que o produto da pré-incubação preveniu de forma significativa a paralisia induzida por esta toxina nas preparações submetidas a contrações musculares evocadas indiretamente (**Gráfico 3 A**) e diretamente (**Gráfico 3 B**). Nestes experimentos foram avaliadas concentrações crescentes de CNF (5, 20 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pré-incubadas com CTX 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Gráfico 3 A**). Em relação às contrações musculares evocadas diretamente, o CNF na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi capaz de prevenir parcialmente o bloqueio induzido pela CTX 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Gráfico 3 B**).

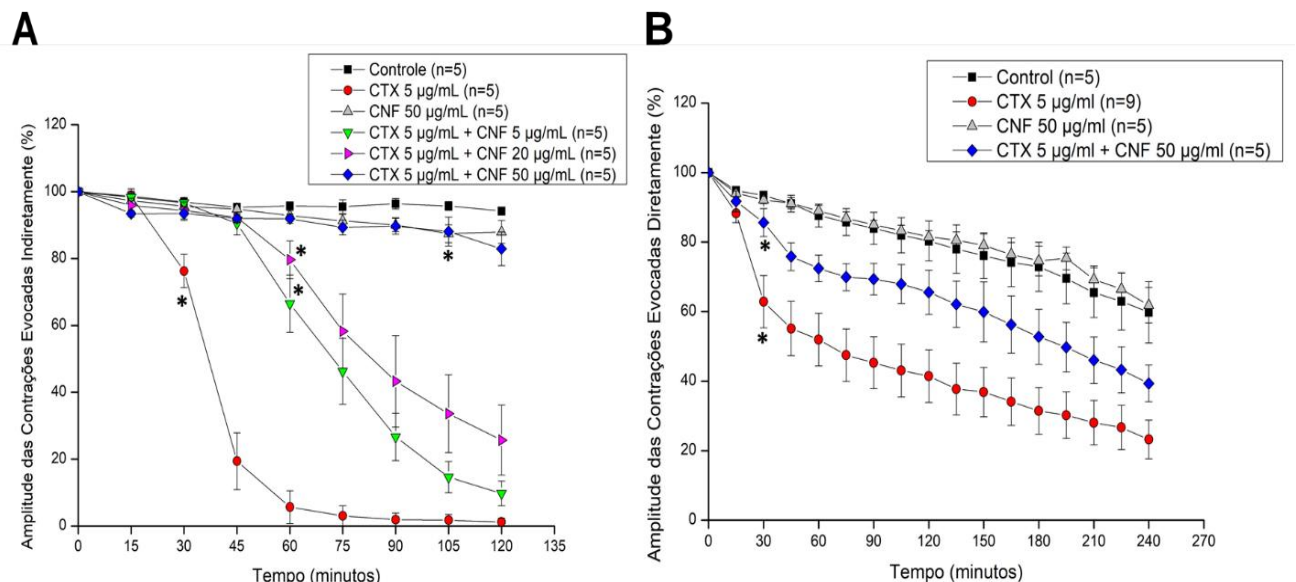


Gráfico 3 – Efeito da CTX (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e do produto de sua pré-incubação com o CNF em concentrações crescentes (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente (A) e diretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM. * indica o tempo a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle.

5.1.4 Influência do CNF sobre o efeito paralisante da CB em preparações frênico-diafragma de camundongos

Para avaliar a ação da subunidade CB sobre as preparações musculares evocadas de forma indireta utilizou-se a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Observou-se que nesta concentração a CB promoveu bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (**Gráfico 4 A**). Porém, o CNF, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, não foi capaz de neutralizar os efeitos paralisantes do CB (**Gráfico 4 B**).

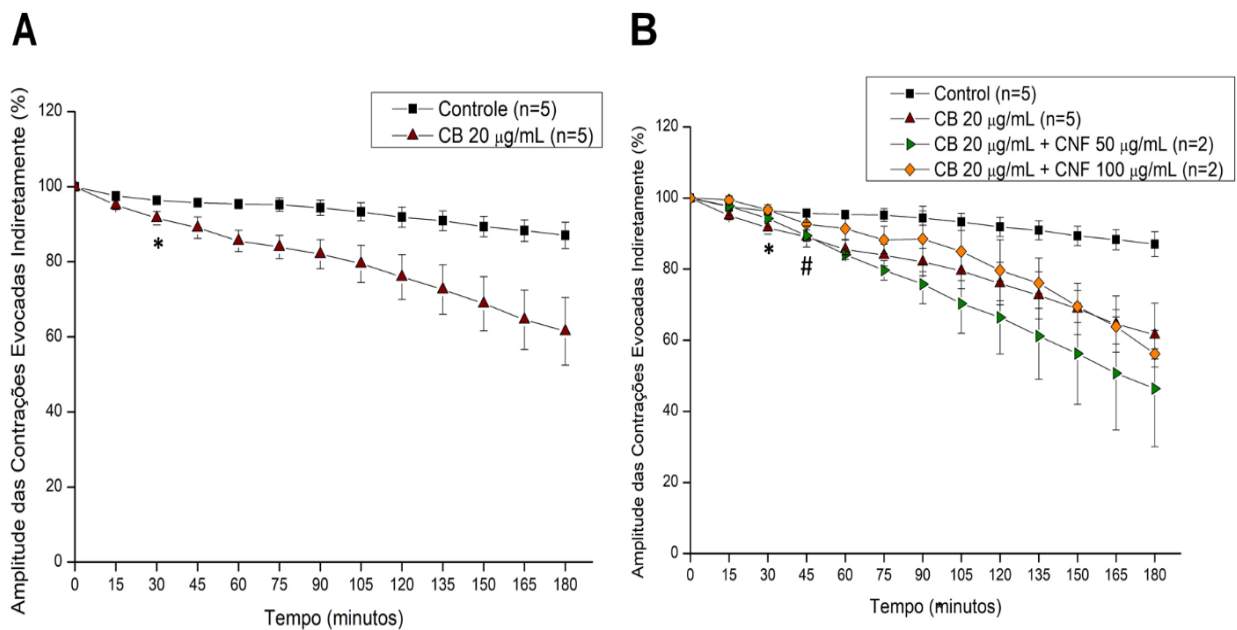


Gráfico 4 – Efeito da CB (20 $\mu\text{g/mL}$) e do produto de sua pré-incubação com concentrações crescentes de CNF (50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). * grupo CB (20 $\mu\text{g/mL}$) + CNF (50 $\mu\text{g/mL}$) e # grupo CB (20 $\mu\text{g/mL}$) + CNF (100 $\mu\text{g/mL}$) indicam o tempo a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle.

5.2 Estudo Morfológico

5.2.1. Aspecto Morfológico Geral das Fibras Musculares

Para avaliar as células do músculo hemidiafragma exposto a CTX, ao CNF ou ao produto da pré-incubação da CTX com o CNF, foi realizado o estudo morfológico através da observação das fibras musculares por microscopia óptica conforme ilustra a **Figura 4**. Os grupos experimentais controle (**Figura 4 A**) e CNF 50 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 4 B**) apresentaram fibras com formato poligonal, núcleo periférico e sarcoplasma acidófilo. As fibras musculares estavam claramente delimitadas por uma delicada camada de tecido conjuntivo (endomísio), e organizadas em fascículos também delimitados por tecido conjuntivo (perimísio). Na **Figura 4 C** temos os músculos expostos a CTX (5 $\mu\text{g/mL}$) que apresentaram diferentes graus de danos musculares após 240 minutos de contato com a preparação. As alterações mais evidentes foram edema entre as fibras, núcleo disperso com áreas do citoplasma desprovidas de miofibrilas e fibras arredondadas. Os músculos submetidos à ação da mistura da CTX (5 $\mu\text{g/mL}$) com o CNF (50 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram aspecto morfológico geral semelhante ao controle (**Figura 4 D**).

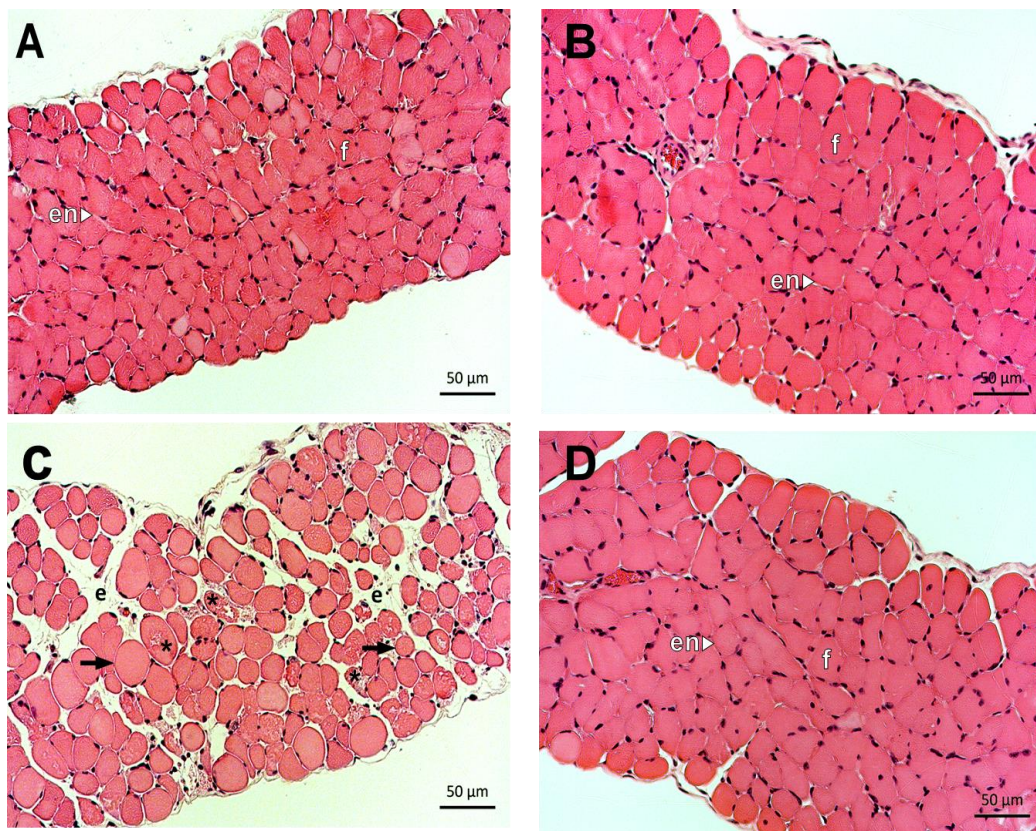


Figura 4 – Microscopia óptica do músculo diafragma de camundongos submetidos à coloração HE. Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B) CNF, (C) CTX, (D) CTX + CNF; (f) fibras poligonais; (en) endomísio; (e) edema; (seta) fibras arredondadas; (*) perda dos miofilamentos.

5.2.2. Índice de Mionecrose

O **Gráfico 5** ilustra o índice de mionecrose, evidenciando que os músculos expostos a CTX (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram aumento deste índice quando comparados ao controle. No entanto, os músculos expostos ao CNF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) isolado ou ao produto da pré-incubação da CTX (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com o CNF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não sofreram alterações, apresentando índices de mionecrose semelhantes ao controle.

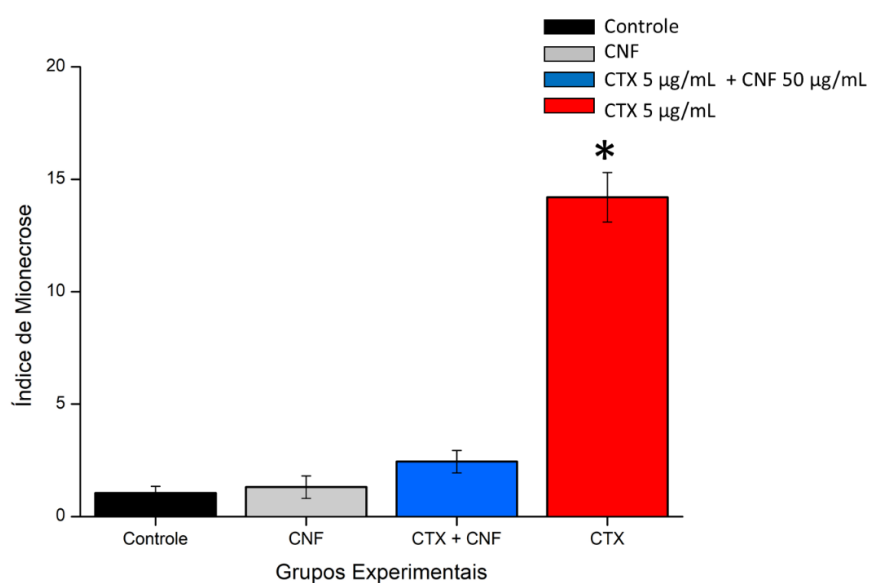


Gráfico 5 – Índice de mionecrose avaliado a partir do efeito do CNF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a miotoxicidade induzida pela CTX (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM de 4 experimentos. *indica diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

No Brasil, os compostos provenientes de serpentes são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas. A CTX, principal componente da peçonha das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, apesar das atividades tóxicas descritas há vários anos, como neurotóxica e miotóxica, recentemente vem apresentando atividades com potencial valor terapêutico, como imunomodulatória, antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e analgésica (SAMPAIO et al., 2010; SHIMIZU et al., 2017; PIMENTA et al., 2019). Entretanto, os mecanismos envolvidos nestas atividades ainda são pouco conhecidos. O CNF é outro composto importante, trata-se de um PLI da classe γ , isolado do soro das serpentes *C.d. terrificus*, capaz de neutralizar a CTX *in vivo*, sendo uma ferramenta útil para o avanço no conhecimento da relação estrutura-atividade desta toxina, bem como, para auxiliar na soroterapia (FORTES-DIAS et al., 1994; FORTES-DIAS et al., 1999; FORTES-DIAS et al., 2014; CAMPOS et al., 2016). Apesar dos esforços para desvendar as possíveis interações e a capacidade inibitória do CNF, ainda não foram realizados estudos funcionais para comprovar sua ação sobre a CTX em seu principal local de ação, a JNM. Neste sentido, o presente estudo descreve pela primeira vez a capacidade do CNF de inibir a paralisia neuromuscular e a miotoxicidade induzida pela CTX em preparações nervo-frênico músculo diafragma de camundongos.

Na etapa inicial deste projeto, foram realizados estudos miográficos com a CTX e sua subunidade básica, a CB, para verificar suas ações sobre as preparações neuromusculares de camundongos. Os resultados mostraram que estas substâncias promovem bloqueio tempo dependente das contrações musculares evocadas tanto indiretamente como diretamente. Entretanto, a CB levou mais tempo para induzir o bloqueio e a intensidade foi menor. Esta diferença decorre da ausência da subunidade CA quando a CB é administrada isoladamente. A CA, encontrada no complexo CTX, atua como um carreador que auxilia a ligação da CB com sítios específicos da membrana pré-sináptica do nervo motor e, provavelmente, das membranas das fibras dos músculos esqueléticos, potencializando as ações neurotóxica e miotóxica do complexo (BON et al., 1979, DELOT; BON, 1993). Portanto, apesar da subunidade CB exibir atividade tóxica, o complexo CTX (CA.CB) é mais eficiente, revelando que os resultados miográficos do presente estudo estão de acordo com a literatura (CHANG; LEE, 1977; TRIVEDI et al., 1989) e confirmam a qualidade dos compostos isolados.

Outro detalhe importante é o bloqueio mais rápido e intenso da CTX sobre os experimentos indiretos quando comparado aos diretos. As contrações musculares induzidas a partir de estímulos elétricos no nervo, ou seja, estímulos indiretos, dependem da integridade do

processo de neurotransmissão, bem como, da membrana da fibra muscular. Já contrações musculares evocadas através de estímulos elétricos diretos no músculo, dependem exclusivamente da integridade das fibras musculares. Portanto, qualquer alteração na região da JNM, seja por bloqueio pré- ou pós-sináptico, bem como, por lesão da membrana na região da placa motora terminal, compromete o processo de neurotransmissão. Apesar dessas possibilidades estarem envolvidas na ação da CTX, a interferência na região pré-sináptica é fundamental para o bloqueio neuromuscular, conforme demonstrado por estudos eletrofisiológicos, radioquímicos e de vídeo-microscopia em tempo real (VITAL BRAZIL; EXCELL, 1971; VITAL BRAZIL, 1972; CHANG; LEE, 1977; HAWGOOD; SMITH, 1977b; HABERMANN; BREITHAUPT, 1978; HAWGOOD; SANTANA DE SÁ, 1979; RODRIGUES-SIMIONI, HAWGOOD; SMITH, 1990; CAVALCANTE et al., 2017). Em conjunto, os nossos resultados e os estudos anteriores demonstram a importância dos efeitos neurotóxicos da CTX para a indução da paralisia muscular, justificando as diferenças encontradas nos estudos miográficos indiretos em relação aos diretos. Estas atividades também foram descritas para a CB isolada, entretanto, de forma menos marcante, reforçando a importância da atividade fosfolipásica para o bloqueio neuromuscular (MARLAS; BON, 1982; HAWGOOD; SMITH, 1989; HAWGOOD; BON, 1991).

Além dos efeitos pré-sinápticos, a neurotoxicidade induzida pela CTX também está envolvida com ações pós-sinápticas, possivelmente por dessensibilização dos receptores nicotínicos (VITAL BRAZIL et al., 1966; BON et al., 1989). Portanto, apesar das ações pré- e pós-sináptica da CTX e da CB terem sido extensivamente estudadas, o mecanismo de ação e os resíduos de aminoácidos envolvidos nestas ações ainda não foram totalmente elucidados (FERNANDES et al., 2017).

Os primeiros estudos que propuseram o mecanismo de ação tóxico da CTX sugerem ação na membrana plasmática, sem internalização, originando uma série de eventos que resultam no bloqueio neuromuscular (BON et al., 1979; BON et al., 1989; DELOT; BON 1993). Apesar desta proposta ainda ser parcialmente aceita, estudos recentes propõem que as toxinas ofídicas de ação pré-sináptica se ligam a alvos na membrana da terminação nervosa, possibilitando a entrada da toxina no lúmen da vesícula, no momento em que esta libera o seu conteúdo. Uma vez no interior das vesículas, a toxina interage com os ácidos graxos e lisofosfolídeos do folheto interno da membrana, promovendo alterações que podem desencadear a exocitose vesicular, inclusive em locais que não estão voltados para a célula muscular, promovendo assim a descarga de neurotransmissores. Também é sugerido que a

hidrólise dos fosfolipídios é dependente de cálcio e a ligação da toxina à receptores de membrana pode estar envolvida na neurotoxicidade (MONTECUCCO; ROSSETTO, 2000; MONTECUCCO; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008; FERNANDES et al., 2017). Tzeng e colaboradores (1995) mostraram que a atividade catalítica por si só não explica a neurotoxicidade da CTX, indicando outras regiões envolvidas nesse mecanismo de neurotoxicidade, como a presença do resíduo Tyr 21 (presente em outras PLA₂s tóxicas) e a região C-terminal, evidenciando assim a importância do estudo das regiões responsáveis pela atividade tóxica das toxinas.

Apesar da CTX ter sido isolada em 1938, por Slotta e Fraenkel-Conrat, as estruturas cristalográficas da CB e do complexo CTX foram desvendadas posteriormente (MARCHI-SALVADOR et al., 2007; FAURE et al., 2011; SALVADOR et al., 2019). A partir destes achados, novas possibilidades surgiram para explicar o papel das subunidades CA e CB no mecanismo de ação da CTX e, também, para o desenvolvimento de inibidores baseados na relação estrutura-atividade. Neste sentido, o estudo da interação do CNF com a CTX é de grande importância para o avanço no conhecimento do mecanismo de ação desta toxina, além de fornecer um composto com potencial valor terapêutico em casos de envenenamentos por serpentes do gênero *Crotalus* ou até mesmo de outras espécies (estudos futuros).

Na segunda etapa deste projeto, foram realizados experimentos miográficos para verificar a capacidade do CNF de neutralizar as atividades tóxicas da CTX e, posteriormente, da CB. Nossos resultados mostraram pela primeira vez que o CNF é capaz de inibir as atividades paralisantes do complexo CTX em preparações neuromusculares evocadas indiretamente e diretamente, apesar da neutralização ter sido menos intensa nesta última. Estudos prévios mostram que a atividade enzimática da CTX está envolvida na ação bloqueadora neuromuscular (DELOT; BON 1993; CAVALCANTE et al., 2007; DOLEY; KINI, 2009) e que o CNF é capaz de neutralizar as atividades fosfolipásicas e as ações letais do veneno da *C.d.terrificus* e, também, de outros viperídeos (FORTES-DIAS et al., 1994; FORTES-DIAS et al., 1999; FORTES-DIAS et al., 2014; CAMPOS et al., 2016). Dessa forma, a capacidade do CNF de neutralizar a CTX pode estar relacionada com sua ligação a subunidade CB. Atualmente, o mecanismo de neutralização proposto para o CNF sobre a CTX descreve que a CA é deslocada pelo inibidor, que se liga fortemente a CB, formando um complexo estável CNF.CB desprovido de qualquer atividade fosfolipásica. O CNF se comporta como um acceptor solúvel da CB, prejudicando assim a ligação dessa subunidade ao seu alvo biológico, como a região pré-sináptica da JNM (FORTES-DIAS et al., 1994; SANTOS et al., 2005; FORTES-DIAS et al.,

2014). Além disso, o CNF demonstrou ser capaz de deslocar parte da toxina já ligada no seu sítio ativo (SANTOS et al., 2005; FORTES-DIAS et al., 2009). Apesar do receptor para CTX não ter sido esclarecido, esta proposta poderia explicar as diferenças observadas nos estudos miográficos, onde as preparações evocadas indiretamente e expostas a mistura CTX e CNF não foram bloqueadas, mas as preparações evocadas diretamente, apresentaram uma proteção parcial pelo CNF.

Os experimentos realizados com a subunidade CB e o CNF mostraram que as concentrações de CNF utilizadas não foram capazes de neutralizar a atividade tóxica da CB. O número de experimentos foi pequeno, pois a quantidade de CNF necessária para completar o número experimental era inviável. Apesar da CB apresentar efeitos tóxicos semelhantes a CTX e sua atividade fosfolipásica ser essencial para o bloqueio neuromuscular (MARLAS; BON, 1982; HAWGOOD; SMITH, 1989; HAWGOOD; BON, 1991), os efeitos tóxicos desta subunidade são menores, exigindo concentrações maiores para induzir respostas parecidas com o complexo CTX (HAWGOOD; SANTANA DE SÁ; 1979; CAVALCANTE et al., 2017). A baixa neurotoxicidade da CB está relacionada a perda de sua especificidade pelo sítio de ligação na membrana pré-sináptica, devido à ausência da subunidade carreadora CA (HAWGOOD; SMITH, 1977b; CHANG et al., 1977). Diante disto, as concentrações de CNF utilizadas nesse estudo não foram suficientes para promover uma inibição significativa da toxicidade da CB, provavelmente devido a sua ligação a sítios não específicos na membrana. Deve-se considerar que o CNF compete com a CA pelo possível alvo da CTX na membrana pré-sináptica da junção neuromuscular, comportando-se como um receptor solúvel, prejudicando a ligação da CB no seu possível alvo biológico da região pré-sináptica. Logo, a neurotoxicidade da CTX pode estar relacionada com sua ligação a sítios específicos que estão indisponíveis ou de difícil acesso quando a CB é administrada de forma isolada (KRIZAJ et al., 1997; SANTOS et al., 2005; FORTES-DIAS et al., 2009).

Na etapa final deste projeto foi realizado o estudo morfológico, para verificar a miotoxicidade induzida pela CTX no músculo diafragma de camundongos e, também, a capacidade do CNF em inibir este efeito. Inicialmente observamos os efeitos da CTX, esta induziu alterações das fibras musculares e aumento significativo do índice de mionecrose, corroborando assim com estudos prévios (GOPALAKRISHNAKONE; HAWGOOD, 1984; CAVALCANTE et al., 2007; ROSA et al., 2010). Estes resultados reforçaram os obtidos no estudo miográfico, indicando que a paralisia das preparações estimuladas diretamente decorre do efeito da CTX sobre as células musculares. Melo e colaboradores (2004) relataram que a

aplicação de CTX em células musculares promove despolarização da membrana plasmática e hipercontração das fibras nos minutos iniciais, além de impossibilitar a repolarização das células após 30 minutos. O dano celular torna-se irreversível em 10 minutos, com ruptura da membrana plasmática, hipercontração dos miofilamentos, bem como, aumento da taxa de liberação de creatina quinase; características que justificam a impossibilidade de repolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, paralisia da fibra.

Neste trabalho foi observado a ação protetora do CNF ao ser pré-incubado com a CTX nas preparações do músculo diafragma de camundongos, pois não foi visto qualquer alteração morfológica nesta preparação. As fibras musculares apresentaram aspecto e número de células lesadas semelhantes ao controle. Essa ação do CNF também foi demonstrada em outros estudos que avaliaram o efeito do CNF *in vivo* em camundongos, verificando que este PLI γ foi capaz de neutralizar a toxicidade da peçonha total da *C.d. terrificus* ou da toxina isolada (CTX) em camundongos (FORTES-DIAS et al., 1991; FORTES-DIAS et al., 1994). Ao investigarem os efeitos do CNF na interação entre CTX e receptor alvo em sinaptossomas de ratos, Santos e colaboradores (2005) constataram que o CNF além de impedir a ligação da subunidade CB ao sinaptossoma, quando ambos são colocados em contato com o tecido, também foi capaz de deslocar o CB já ligado ao tecido, corroborando com os dados morfológicos aqui mostrados. Além disso, Lizano e colaboradores (2000) ao isolarem do soro da serpente *Cerrophidion godmani* o CgMIP-I, uma PLI γ com 90% de identidade sequencial ao CNF, observaram sua capacidade de impedir a liberação de creatina quinase do músculo gastrocnêmio de camundongos quando expostos a miotoxina I da peçonha dessa serpente. Estes achados são interessantes pois a miotoxina I apresenta sequência análoga a subunidade B da CTX, reforçando os nossos resultados. Dessa forma, o presente estudo demonstra que o CNF é capaz de impedir os efeitos miotóxicos da CTX, indicando um potencial papel protetor sobre as células musculares.

7 CONCLUSÕES

O CNF é capaz de neutralizar as atividades neurotóxicas e miotóxicas da CTX *in vitro*, apresentando potencial terapêutico em casos de envenenamentos crotálicos. Além disso, o estudo futuro da interação molecular entre CNF e CTX possibilitará o avanço no conhecimento do mecanismo de ação dessas duas substâncias. O CNF, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de neutralizar a atividade paralisante da CB isolada, possivelmente devido às concentrações utilizadas em nosso estudo, sendo necessário a realização de outros experimentos que permitam a utilização de menores quantidades de CNF.

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-CONRAT 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 A₂ 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. 156464-156471, 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 PLA₂-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 A₂: 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. Cristopher. 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 A₂Amodytoxin 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?sinanet/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 Laquético. 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.