

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

**INFLUÊNCIA DO VARESPLADIB (LY315920) SOBRE O EFEITO PARALISANTE
DA CROTOXINA EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE
CAMUNDONGOS.**

FERNANDA VALADARES MACIEL

BELO HORIZONTE

2020

FERNANDA VALADARES MACIEL

**INFLUÊNCIA DO VARESPLADIB (LY315920) SOBRE O EFEITO PARALISANTE
DA CROTOXINA EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE
CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada como requisito obrigatório para aprovação no mestrado em Fisiologia e Farmacologia, ênfase em Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Daniella Bonaventura

BELO HORIZONTE

Outubro/2020

043 Maciel, Fernanda Valadares.
Influência do varespladib (Iy315920) sobre o efeito paralisante da crotoxina em preparações neuromusculares de camundongos [manuscrito] / Fernanda Valadares Maciel. - 2020.

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura.

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

1. Peçonhas. 2. Crotoxina. 3. *Crotalus cascavella*. 4. Junção Neuromuscular. I. Bonaventura, Daniella. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



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

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 531 DE FERNANDA VALADARES MACIEL

**"Influência do Varespladib (Iy315920) Sobre o Efeito Paralisante da
Crotoxina em Preparações Neuromusculares de Camundongos"**

FERNANDA VALADARES MACIEL

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **04 de novembro de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Belo Horizonte, 04 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius de Toledo Ribas, Professor do Magistério Superior**, em 04/11/2020, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 04/11/2020, às 20:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciene Bruno Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 05/11/2020, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0320865 e o código CRC 0677E9DF.

AGRADECIMENTOS

À professora PhD. Daniella Bonaventura pelos ensinamentos e sua especial dedicação a esse trabalho.

Ao professor PhD. Walter Luis Garrido Cavalcante que com sua dedicação e competência contribui para meu crescimento científico e intelectual.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular e Toxinologia pelos ensinamentos e parcerias.

À Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias e a Paula Ladeira Ortolani, ambas da Fundação Ezequiel Dias, por colaborarem com o projeto.

Ao Programa de Pós Graduação de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciência Biológicas pela oportunidade de realização da pesquisa e minha formação científica.

À Universidade Federal de Minas Gerais por ter disponibilizado as ferramentas que permitiram a realização desse trabalho.

RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde ocorre aproximadamente 5,4 milhões de picadas por serpentes a cada ano, com 2,7 milhões de envenenamentos que levam a 100.000 mortes. No Brasil, uma das serpentes de maior importância médica é a *Crotalus durissus terrificus*, que ocasiona óbitos em 1,1% dos casos de envenenamento. A peçonha dessa serpente apresenta altas concentrações de fosfolipase A₂, sendo essa o componente básico (CB) da Crotoxina (CTX). Essa toxina é responsável pela neurotoxicidade e miotoxicidade no acidente crotálico. Recentemente o Varespladip (LY315920), um inibidor de fosfolipase A₂ sintético, tem sido estudado para neutralizar toxinas de serpentes. Portanto, para avaliar o potencial inibidor do Varespladib contra a Crotoxina, foram realizados experimentos miográficos e morfológicos, utilizando preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongo *in vitro*. As preparações foram expostas à CTX, a CB, ao Varespladib ou ao produto da pré-incubação de CTX-Varespladib ou CB-Varespladib. Os resultados do presente estudo demonstraram que o Varespladib é capaz de neutralizar os efeitos paralisantes e miotóxico da CTX e os efeitos paralisantes da CB em preparações neuromusculares de camundongos.

Palavras chaves: Crotoxina, CB, Varespladib, *Crotalus durissus terrificus*, Junção Neuromuscular.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, approximately 5.4 million snake bites occur each year, with 2.7 million poisonings that lead to 100,000 deaths. In Brazil, one of the snakes of greatest medical importance is *Crotalus durissus terrificus*, which causes deaths in 1.1% of poisoning cases. The crotalic venom has high concentrations of phospholipase A2, one of which is the basic component (CB) of Crotoxin (CTX). This toxin is responsible for neurotoxicity and myotoxicity in crotalic accidents. Recently, Varespladip (LY315920), a synthetic phospholipase A2 inhibitor, has been studied to neutralize snake toxins. Therefore, to evaluate the inhibitor potential of Varespladib against Crotoxin, myographic and morphological experiments were performed, using mouse phrenic nerve-diaphragm muscle preparations *in vitro*. The preparations were exposed to CTX, CB, Varespladib or the pre-incubated product of CTX-Varespladib and CB-Varespladib. The results of the present study demonstrated that Varespladib is able to neutralize the paralyzing and myotoxic effects of CTX and the paralyzing effects of CB in mice neuromuscular preparations.

Keywords: Crotoxin, CB, Varespladib, *Crotalus durissus terrificus*, Neuromuscular Junction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo computacional para a molécula de Crotoxina.....	10
Figura 2: Modelo cristalográfico da estrutura quaternária de CB.	11
Figura 3: Estrutura do inibidor PLA2 varespladib.....	14
Figura 4: Efeitos da CTX 5 µg/mL, do Varespladib 5 µg/mL e do produto da pré-incubação CTX-Varespladib (1:1; 1:0,5; 1:0,25 massa:massa) em músculo diafragma.	29
Figura 5: Efeitos da CB 20 µg/mL, do Varespladib 20 µg/mL e do produto da pré-incubação CB-Varespladib (1:1; 1:0,25 massa:massa) em músculos diafragmas.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
NaHCO ₃	Carbonato de Sódio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
KCl	Cloreto de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
Ck	Creatinina quinase
<i>C.d. cascavella</i>	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
<i>C.d. collilineatus</i>	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>
<i>C.d. cumanensis</i>	<i>Crotalus durissus cumanensis</i>
<i>C.d. marajoensis</i>	<i>Crotalus durissus marajoensis</i>
<i>C.d. ruruima</i>	<i>Crotalus durissus ruruima</i>
<i>C.d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CTX	Crotoxina
CA	Crotoxina ácida ou Crotapotina
CB	Crotoxina básica
DMSO	Dimetilsulfeto
E.P.M.	Erro padrão da média
hnps-PLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretada humana não pancreática
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio
PLA	Fosfolipase A
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLA ₂ s	Fosfolipase A ₂ secretada
PLI	Inibidor de fosfolipase A ₂
PKC	Proteína quinase C
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
Hz	Hertz
µg/mL	Micrograma por mililitro
Mm	Micrometro
mM	Micromolar
mL	Mililitro
Min	Minutos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Envenenamento por <i>Crotalus durissus terrificus</i>	8
1.2 Crotoxina	9
1.3 Fosfolipase A ₂	11
1.4 Inibidores de sPLA ₂ ofídicas	12
1.4.1 Varespladib.....	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Animais	19
4.2 Solução e Gás Nutriente	19
4.3 Toxinas e Inibidor.....	19
4.5 Estudos Miográficos	20
4.6 Estudos Morfológicos	21
4.7 Análise Estatística.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Estudo funcional.....	22
5.1.1 Influência da CTX e da CB sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.	22
5.1.2 Influência do Varespladib sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.	23
5.1.3 Influência do Varespladib sobre o efeito paralisante da CTX em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.	24
5.1.4 Influência do Varespladib sobre o efeito paralisante da CB em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.	26
5.2 Estudo morfológico	28
5.2.1 Influência do Varespladib sobre o efeito mionecrosante da CTX em músculo diafragma de camundongos.	28

5.2.2 Influência do Varespladib sobre possíveis efeitos miotóxicos da CB em músculos diafragmas de camundongos.	31
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	41

1. INTRODUÇÃO

As serpentes peçonhentas de interesse em saúde pública no Brasil são representadas por dois gêneros da Família Elapidae, o *Micrurus* e o *Leptomicrurus*, e três gêneros da Família Viparidae, o *Bothrops*, o *Crotalus* e o *Lachesis* (MS, 2020). O gênero *Crotalus* possui no Brasil apenas uma espécie, a *Crotalus durissus*, e seis subespécies: *C.d. terrificus*, *C.d. cumanensis*, *C.d. collilineatus*, *C.d. cascavella*, *C.d. ruruima* e *C.d. marajoensis*. As serpentes do gênero *Crotalus* são encontradas nas regiões áridas e semiáridas do Nordeste, campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte (MELGAREJO et al., 2009).

1.1 Envenenamento por *Crotalus durissus terrificus*

A *Crotalus durissus terrificus* é popularmente conhecida por cascavel e possui como característica a presença de um guizo que emite um ruído na ponta da cauda (MS, 2020). O envenenamento por *Crotalus* é denominado acidente crotálico e a gravidade decorre das atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante da peçonha (AZEVEDO-MARQUES et al., 2009).

A neurotoxicidade é evidenciada nas primeiras horas do envenenamento, sendo caracterizada por ptose palpebral, diplopia e flacidez da musculatura da face, conhecida como “fáceis neurotóxico”. Em alguns casos também ocorre dificuldade na deglutição e alterações do olfato e do paladar (ROSENFELD, 1971). Há relatos de insuficiência respiratória aguda decorrente da paralisia da musculatura intercostal e/ou diafragmática (ROSENFELD, 1971). A atividade miotóxica da peçonha é manifestada através de dores musculares e, em casos graves, escurecimento da urina devido à rabdomiólise, que pode levar a insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 2009). A atividade coagulante induz aumento do tempo de coagulação sanguínea, manifestado por sangramento no local da picada e em lesões na boca (gengivorragia) (AZEVEDO-MARQUES et al., 2009).

A diversidade de sintomas durante o envenenamento crotálico deve-se a complexa mistura de substâncias na peçonha. No geral, a composição principal de peçonhas ofídicas é de proteínas, apresentando também uma fração não proteica representada por peptídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e

componentes inorgânicos (DEVI, 1971). A proporção desses componentes é variável nas peçonhas das diferentes espécies e, também, dentro de uma mesma espécie, como ocorre nas subespécies de serpentes *Crotalus durissus* no Brasil (FRANCISCHETTI et al., 2000; BOLDRINI-FRANÇA, 2010; CAVALCANTE et al., 2015).

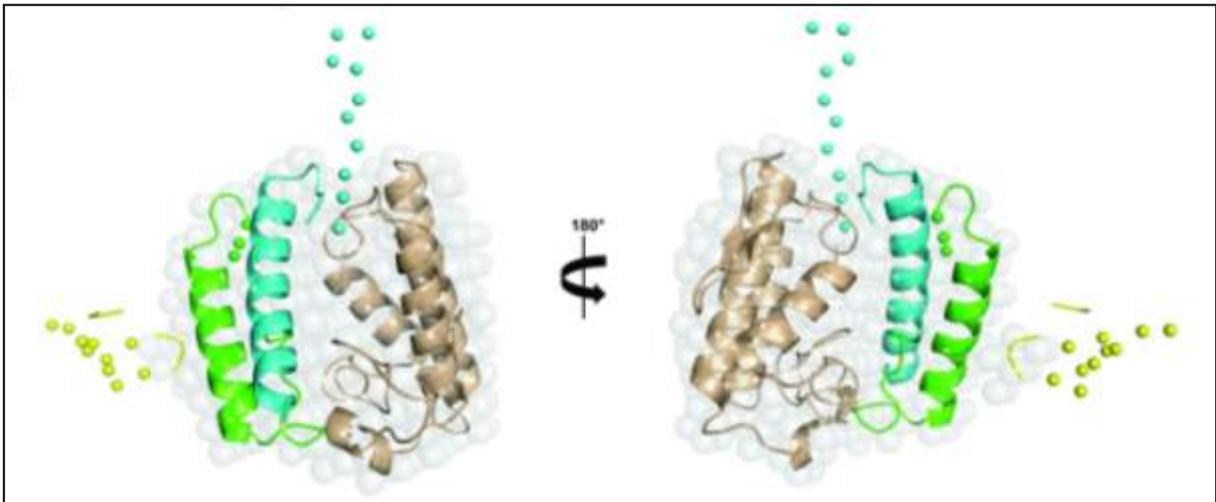
A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* possui quatro principais toxinas, a convulxina, a giroxina, a crotamina e a crotoxina. Porém, por ser uma peçonha altamente variável, a crotamina pode estar presente (positivo) ou ausente (negativo). (Lourenço et al., 2013). A convulxina é uma proteína potente em ativar plaquetas sanguíneas e ainda promove perda de equilíbrio (CUNHA e MARTINS, 2012). A giroxina é responsável pela ação coagulante da peçonha. Ela é uma glicoproteína similar à trombina que transforma fibrinogênio em fibrina (Kini, 2006). A crotamina é um polipeptídeo que atua em canais de sódio nas fibras musculares. Ela despolariza o sarcolema provocando fibrilação muscular (Ogiura et al., 2005). A crotoxina é o principal componente da peçonha crotálica (SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, 1938).

1.2 Crotoxina

As manifestações clínicas relatadas durante o envenenamento crotálico estão relacionadas à presença da Crotoxina (CTX), uma proteína que representa 50 a 75% do peso seco total da peçonha (SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, 1938) e que atua principalmente na junção neuromuscular (VITAL BRAZIL, 1966; VITAL BRAZIL et al, 1966; VITAL BRAZIL e EXCELL, 1971; VITAL BRAZIL, 1972; CHANG e LEE, 1977; HAWGOOD e SMITH, 1977; BON et al, 1979; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979; DELOT & BON, 1993; CAVALCANTE et al, 20175). A CTX possui uma massa molecular de 23 KDa e é composta por duas subunidades ligadas não covalentemente: a CB, um monômero básico com atividade fosfolipásica e a crotapotina ou CA um monômero ácido atóxico sem atividade enzimática. Ambas subunidades são importantes para atividade da CTX (SLOTTA e FRANKEL-CONRAT, 1938; HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971; BREITHAUPT et al., 1974; BON et al., 1989) (Figura 1). A CA é composta por 3 cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, a cadeia A com 40 resíduos de aminoácidos, a B com

35 resíduos de aminoácidos e a C com 14 resíduos de aminoácidos. Já a CB é composta por 122 resíduos de aminoácidos. (HENDON e FRAEKELCONRAT, 1971; AIRD et al., 1986; BREITHAUPT et al., 1974; AIRD et al., 1985; AIRD et al., 1990; CHEN et al., 2004).

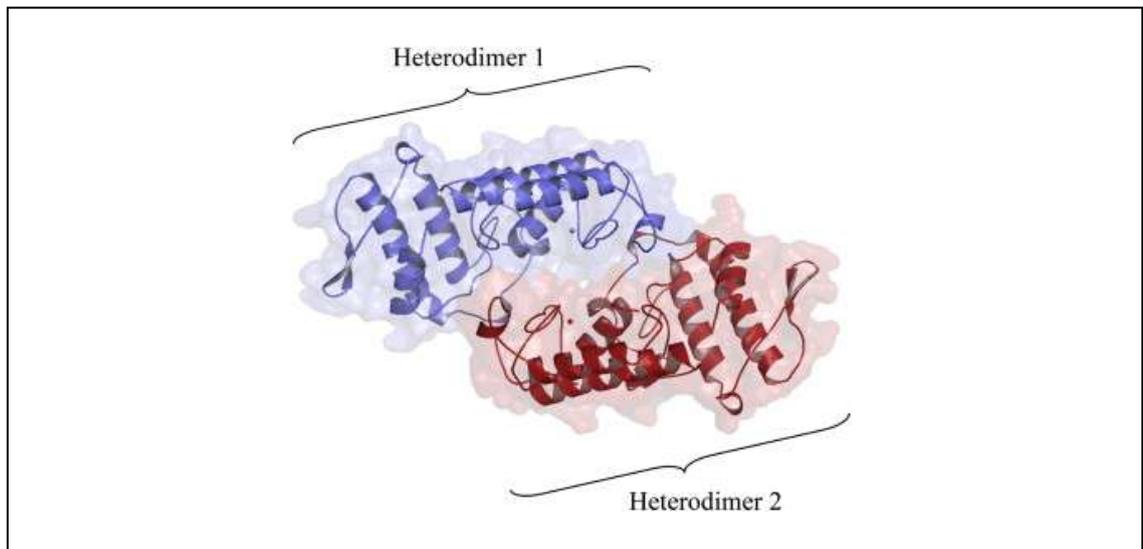
Figura 1: Modelo computacional para a molécula de Crotoxina.



Modelo computacional da CTX (“ball-and-sticks”) proveniente de técnicas cristalográficas sobreposto ao seu modelo de cadeia fictícia (bolinhas transparentes) técnica de SAXS, com rotação 180°. As cadeias α , β , γ da CA são mostradas em verde, azul e amarelo, respectivamente. A CB é mostrada em marrom. Os loops de CA são modelados como esferas sólidas. Fonte: Fernandes, C. H. A., 2017.

Na peçonha de uma única serpente foram encontrados 4 isoformas diferentes de CA (CA₁, CA₂, CA₃ e CA₄) e 4 isoformas diferentes de CB (CBa2, CBb, CBc e CBD). Essas podem se associar formando até 16 isoformas de CTX (Soares, 2001; Faure et al., 1994; Faure e Bon, 1987), que apresentam potências diferentes (Faure et al., 1993). A CB dissociada da CA pode formar um complexo entre duas isoformas, constituindo um heterodímero, CB1.CB2, em que a CB1 é a CBc e o CB2 é a CBa2 (Marchi-Salvador et al., 2008; Faure et al., 2011). Estudos de bioinformática sugerem que os dímeros podem se associar em uma estrutura tetramérica (figura 2) (Faure et al., 1993; Marchi-Salvador et al., 2007; Marchi-Salvador et al., 2008), essencial para as atividades biológicas da CB quando isolada da CA (Faure e Bon, 1987; Faure e Bon, 1988; Faure et al., 1994; Sampaio et al., 2010).

Figura 2: Modelo cristalográfico da estrutura quaternária de CB.



A estrutura completa da CB consiste em dois heterodímeros compostos por um par de isoformas diferentes. Fonte: Sampaio, 2010.

A CTX contém uma PLA₂ secretada (PLA_{2s}) (EC 3.1.1.4) conhecida como CB, uma enzima dependente de cálcio, que hidrolisa glicerofosfolípidos na posição sn-2 da ligação acil, liberando lisofosfolípidos e ácidos graxos (DENNIS, 2015).

1.3 Fosfolipase A₂

As fosfolipases A₂ compreende um número de proteínas muito diferentes que podem ser divididas em cinco tipos principais, as PLA₂ secretadas (PLA_{2s}), as PLA₂ citosólicas (cPLA₂), as PLA₂ independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), as PLA₂ fatores ativadores de plaquetas acetil-hidrolases (PAF-AH) e as PLA₂ lisossomais (LPLA₂). (KINI, 1997; BURKE e DENNIS, 2009a; BURKE e DENNIS, 2009b). A atribuição de uma PLA₂ a um determinado grupo baseia-se no mecanismo catalítico e em suas características funcionais e estruturais (KINI, 1997; BURKE e DENNIS, 2009a; BURKE e DENNIS, 2009b).

As PLA_{2s} são um grupo de pequenas proteínas de 14 a 18 KDa, que usualmente possuem de 5 a 8 pontes dissulfetos. Este grupo utiliza a histidina no seu sítio ativo e requer níveis de μM de Ca⁺² para catálise. Nas proximidades da

histidina catalítica há um aspartato conservado, que formam díades Histidina/Aspartato, importante para o mecanismo de ação da enzima (BURKE e DENNIS, 2009a; BURKE e DENNIS, 2009b). As PLA₂s catalisam a hidrólise, abstraindo um próton de uma molécula de água e fazendo um ataque nucleofílico ao carbono *sn*-2. A molécula de água é ativada pela presença da díade histidina/aspartato de forma dependente de cálcio (BURKE e DENNIS, 2009)

As PLA₂s foram divididas em grupos. O grupo IB constituído pela principal enzima digestiva dos mamíferos, a PLA₂s pancreática. O grupo IA e o grupo II são representados por PLA₂s de venenos de serpentes. O IA possui PLA₂s de peçonha de serpentes da família Elapidae, enquanto o grupo II é constituído por PLA₂s de peçonha de serpentes da família Viparidae. O grupo II ainda é subdividido em dois subgrupos, o IIA e IIB. O IIA são PLA₂s Asp49, as quais possuem um aspartato na posição 49, sendo cataliticamente ativa. O subgrupo IIB é formado pelas PLA₂s Lys49, a qual possui uma lisina na posição 49, perdendo a atividade catalítica (GUTIERREZ e LOMONTE,1995; BURKE e DENNIS,2009). A CB da crotoxina pertence ao grupo IIA.

Em mamíferos, as PLA₂s estão relacionadas com doenças inflamatórias, além de participarem de processos fisiológicos como sinalização celular, metabolismo de membranas e catabolismo de lipídeos (SCHALOSKE e DENNIS 2006; BURKE e DENNIS, 2009). Nas peçonhas ofídicas, as PLA₂s estão envolvidas na captura e digestão da presa (VALENTIN e LAMBEAU, 2000), bem como, nos sintomas observados durante o envenenamento, entre eles: neurotóxico, cardiotoxico, miotóxico, indutor ou inibidor da agregação plaquetária, hemolítico, anticoagulante, convulsivante e hipotensor (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; OWNBY, 1998; OWNBY et al., 1999; KINI, 2003).

Diante de tantos problemas provocados por PLA₂s de serpentes, a busca por inibidores sintéticos ou naturais das PLA₂s de peçonhas ofídicas tem despertado grande interesse da comunidade científica.

1.4 Inibidores de sPLA₂ ofídicas

Os inibidores de PLA₂s ofídicas são substâncias capazes de neutralizar a atividade de PLA₂s presente em peçonha de serpentes. Eles são úteis para o

desenvolvimento de tratamentos complementares a soroterapia. É importante salientar que a soroterapia é o único tratamento eficaz contra o envenenamento ofídico, mas apresenta limitações como ausência de um soro antiofídico universal; processo oneroso e pouco produtivo; dificuldade de acesso do acidentado ao tratamento, pois a maioria dos acidentes ocorre em zonas afastadas de hospitais; necessidade de uma equipe especializada para o tratamento; e não ser capaz de neutralizar alguns efeitos tóxicos das peçonhas causados por componentes pouco imunogênicos (SILVA et al.; 1989; FRY, 2018). Além da importância na neutralização de PLA₂s ofídicas, a busca por inibidores pode ser útil para o avanço no conhecimento do mecanismo de ação e da relação estrutura/atividade das PLA₂s e, conseqüentemente, dos processos fisiopatológicos nos quais estão envolvidas, bem como, na síntese de novos fármacos de interesse médico (SOARES et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007).

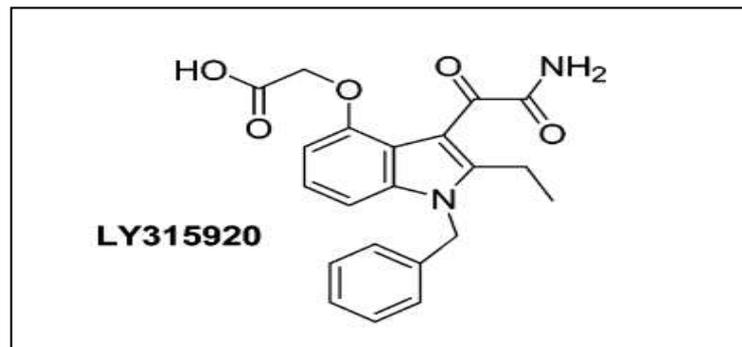
Os inibidores de fosfolipase A₂ (PLI) de peçonhas ofídicas ganharam destaque na década 90, quando foram isoladas do sangue de serpentes substâncias capazes de neutralizar PLA₂ (CAMPOS et al., 2016). Essas substâncias são na sua maioria glicoproteínas oligoméricas classificadas de acordo com suas estruturas como PLI α , PLI β , PLI γ (CAMPOS et al., 2016). Outros PLI naturais também são encontrados, como o ácido rosmarínico, isolado de planta (TICLI *et al*, 2005). Os PLI também podem ser sintéticos, como o varespladib que foi desenvolvido em laboratório e tem sido estudado desde 2016 como um PLI ofídico (Lewin *et al*, 2016).

1.4.1 Varespladib

Em 1996, um programa foi realizado pelo Laboratório de Pesquisa Lilly, da indústria Farmacêutica Eli Lilly, para encontrar possíveis inibidores de PLA₂ humanas e investigar a relação estrutura-atividade desses compostos em processos fisiopatológicos (DILLARD et al., 1996a). O estudo levou a descoberta do ácido 5-metoxi-2-metil-1-(fenilmetil)-1H-indol-3-acético, identificado como um dos primeiros inibidores viáveis. A partir desse composto foi sintetizado um grande número de substâncias com intuito de melhorar a ligação com a enzima e aumentar a potência (DILLARD et al., 1996a; DILLARD et al., 1996b; DRAHEIM et al, 1996). Dentre os compostos que foram obtidos, encontra-se o ácido 2-[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético, conhecido como Varespladib

ou LY315920 (figura 3), o qual é um inibidor 6500 vezes mais potente do que o composto líder (ácido 5-metoxi-2-metil-1-(fenilmetil)-1H-indol-3-acético). O varespladib alcançou a inibição quase estequiométrica de hnpS-PLA₂ por meio de interações de ligação otimizadas no sítio catalítico da enzima (DRAHEIM et al, 1996).

Figura 3: Estrutura do inibidor PLA₂ varespladib.



Fonte: SANZ, 2017.

Devido à combinação de características químicas, físicas e farmacológicas, o varespladib foi escolhido para a avaliação clínica como um inibidor de hnpS-PLA₂ (DRAHEIM et al, 1996). Vários estudos foram conduzidos testando o varespladib ou o seu pró-fármaco, metil-varespladib, contra doenças com componente inflamatório, como sepse, artrite, doenças cardiovasculares (Clinical trials, 2020). A maioria desses estudos evoluíram da Fase I, mas fracassaram em Fase II ou III (XIAO et al., 2018; CLINICAL TRIALS, 2020; OLIVEIRA, *et al*, 2020).

Recentemente, vem ocorrendo uma reposição do varespladib, no qual tem sido estudado para o tratamento do envenenamento por serpentes. Essa reposição se deu por Lewin e colaboradores que em 2016 fizeram uma triagem com mais de 4000 entidades químicas, dentre elas inibidores de fosfolipase, inibidores de serinoproteases e inibidores de metaloproteinasas. Dentre todos os compostos, o varespladib foi o que apresentou maior potencial de inibição. A partir deste dado Lewin e seu grupo de pesquisa testaram o Varespladib e seu pró-fármaco biodisponível oralmente, metil-varespladib, em peçonhas ofídicas que continham elevada quantidade de PLA₂s. O estudo mostrou que o composto era capaz de inibir *in vitro* 28 peçonhas de serpentes de importância médica, incluindo o da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Ainda, prolongava o tempo de vida de animais nos quais

eram administradas as peçonhas ofídicas e posteriormente o inibidor. A partir destes achados, estudos posteriores mostraram a capacidade do Varespladib de neutralizar PLA₂s ofídicas isoladas através de experimentos *in vivo* e *in vitro* (WANG et al., 2018; XIAO et al., 2018, BRYAM-QUIRÓS et al., 2019).

O varespladib, por ser uma molécula pequena sintetizada em laboratório, pode vir a ser um fármaco de baixo custo de produção, quando comparado com o soro antiveneno, e, por possuir um pró-fármaco com biodisponibilidade oral e rápida absorção, torna-se um medicamento de pronto uso, não necessitando de equipe especializada para administração. Além disso, por não precisar de uma cadeia de frios para transporte, apresenta fácil distribuição (Lewin et al.,2016., Wang et al.,2018). Assim, além da eficácia, possui características para se tornar um medicamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do Varespladib (LY315920) em inibir o bloqueio neuromuscular provocado pela a CTX, isolada da peçonha da *Crotalus durissus terrificus*, na junção neuromuscular de camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar *in vitro*, pela técnica de miografia, o perfil da amplitude das contrações musculares na presença da CTX, da CB, do Varespladib e dos produtos da pré-incubação da CTX ou CB com varespladib.

Avaliar por meio da técnica morfológica a integridade do tecido muscular após a exposição à CTX, à CB, ao Varespladib e aos produtos da pré-incubação da CTX ou CB com varespladib.

3. JUSTIFICATIVA

O envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública principalmente nos países tropicais e apresenta desafios significativos para o tratamento médico. Estima-se que ocorra aproximadamente 5,4 milhões de picadas por serpentes a cada ano, com 2,7 milhões de envenenamentos que levam a 100.000 mortes. O número de amputações e outras incapacidades permanentes são quatro vezes maiores que o número de mortes em todo mundo (MS, 2020 e WHO, 2020). Por isto, em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) acrescentou o envenenamento por picada de serpentes em sua lista prioritária de doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2020). No Brasil, no ano de 2019, foram notificados 30.482 casos e 147 mortes em decorrência de acidentes ofídicos, sendo as serpentes da família Viperidae as responsáveis pelo maior número de acidentes. O gênero *Crotalus* se destaca nessa família, pois exhibe a maior letalidade dentre todas as serpentes brasileiras, com óbitos reportados em cerca de 1,1% dos casos (DATASUS, 2020; MS, 2020; MELGAREJO et al., 2009).

O único tratamento eficaz contra o envenenamento ofídico até o momento é a soroterapia passiva. Entretanto, esta apresenta limitações (FRY, 2018; GUTIÉRREZ et al., 1998; SILVA et al., 1989; XIAO et al., 2018). Assim, a busca por métodos alternativos ou complementares à soroterapia é fundamental. Inibidores de fosfolipases A₂ de mamíferos como o Varespladib (LY315920) estão sendo investigados como opções terapêuticas para o envenenamento por ofídicos, uma vez que a toxicidade das peçonhas das serpentes decorre, em grande parte, da ação de toxinas fosfolipases A₂ (CALVETE, 2011; TASOULIS, 2017). O varespladib pode vir a ser um tratamento de baixo custo e de pronto uso em casos de acidente crotálico, além de ajudar a desvendar as regiões tóxicas e o mecanismo de ação da CTX. Uma maior compreensão sobre a CTX permite o avanço no conhecimento das recentes atividades biológicas descritas para essa proteína, como imunomodulatória, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e analgésica (SAMPAIO et al, 2010), podendo auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos.

Portanto, avaliar a potencialidade antiofídica do Varespladib sobre a atividade paralisante e miotóxica da CTX é importante para auxiliar na soroterapia, bem como avançar no conhecimento da relação estrutura atividade das toxinas ofídicas. O presente trabalho irá testar a hipótese que o varespladib neutraliza a atividade

paralisante e miotóxica provocada pela CTX e sua subunidade básica, a CB, proveniente da peçonha da *Crotalus durissus terrificus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética local (CEUA-UFMG 17/2017). Os estudos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular e Toxinologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (8 semanas), com peso corporal de 20 a 30 g. Esses animais foram obtidos do biotério de criação da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e mantidos em biotério de experimentação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais, neste ambiente, estavam sujeitos a uma temperatura de 24 ± 2 °C, um ciclo de luz de 12 h claro e 12 h escuro e possuíam livre acesso à água e ração.

4.2 Solução e Gás Nutriente

Foi utilizado nos registros miográficos solução nutriente Ringer com a composição de Cloreto de Sódio (NaCl) 135 mM, Cloreto de Potássio (KCl) 5 mM, Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 2 mM, Carbonato de Sódio ($NaHCO_3$) 15 mM, Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4) 1 mM, Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$) 2 mM, Glicose 11 mM. Também foi utilizada mistura gasosa de Oxigênio 95% e Dióxido de Carbono 5% (Carbogênio).

4.3 Toxinas e Inibidor

As frações CTX e CB, isoladas de um *pool* de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, foram fornecidas pela Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias, pesquisadora da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Essas toxinas foram diluídas

em água destilada e a concentração de uso foi de 5 µg/mL para CTX e 20 µg/mL para CB.

O inibidor de sPLA₂, Varespladib (Sinônimos: LY315920; LY-315920; ácido 2 - [[3- (2-amino-1, 2-dioxoetil) -2-etil-1- (fenilmetil) -1H - indol-4-il] oxi] acético; A-001) foi obtido da Sigma-Aldrich[®], a qual garante 98% de pureza da substância. O fármaco foi diluído em dimetilsulfeto (DMSO; 10 nM), utilizando uma quantidade máxima de 3,6 µL, e testado em diferentes concentrações (20 µg/mL; 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; 1,25 µg/mL; 0,5 µg/mL).

4.5 Estudos Miográficos

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, decapitados e exanguinados. Em sequência, eles foram submetidos à toracotomia ampla para extração da preparação nervo frênico-músculo diafragma (BULBRING, 1997). O hemidiafragma esquerdo foi cortado em forma de triângulo, mantendo uma pequena faixa da costela, o bordo costal.

Para registros miográficos “*in vitro*”, a preparação nervo frênico-músculo diafragma foi posicionada verticalmente em um banho de órgãos isolados, contendo 12 mL de solução nutriente Ringer, aerada constantemente com carbogênio e mantida a 35 ± 2 °C. O bordo costal diafragmático foi conectado a um eletrodo de base e o centro tendíneo do músculo foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03), que é acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50). A tensão de base dada no músculo foi de 5 gramas. Por fim, o nervo frênico foi posicionado no eletrodo conectado a um estimulador elétrico (Narco bio-Systems).

As contrações musculares foram evocadas indiretamente por pulsos de intensidade supra-máxima com 0,5 milissegundos de duração e 0,2 Hz de frequência. As preparações foram submetidas a um período de estabilização de 60 minutos, em que a solução nutriente foi trocada nos tempos 0, 15 e 30 minutos. Ao final deste período, foi adicionada ao banho a CTX ou a CB ou o varespladib ou o produto da pré-incubação CTX-varespladib ou CB-varespladib (20 minutos de pré-incubação) e iniciado os registros. A amplitude das contrações musculares foi registrada e analisada em um computador por meio de programas de aquisição de

dados (Gould Systems - *Summit ACQuire* e *Summit DataViewer*). Foi avaliado o decréscimo percentual da amplitude das contrações musculares por 180 minutos.

4.6 Estudos Morfológicos

Após a realização do estudo funcional, o nervo frênico e o bordo costal do hemidiafragma foram removidos. O músculo diafragma foi fixado em formaldeído 10%. Em sequência, lavagens consecutivas foram feitas com água, álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool 95%, álcool 100% (3 vezes), mistura de álcool 100% e xilol, xilol (3 vezes) e parafina (2 vezes). Por fim, o músculo foi imerso em parafina formando blocos para a realização de cortes transversais de 4 µm de espessura com um micrótomo. Os cortes dos músculos foram submetidos à coloração hematoxilina e eosina (coloração HE) para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares. No microscópico óptico foram analisados três campos diferentes do corte. Observou-se a estrutura, disposição e quantidade de fibras musculares lesadas no tecido, com auxílio do sistema de análise de imagens computadorizado (ImageJ). As células foram classificadas como lesionadas quando se apresentavam intumescidas, arredondadas, com irregularidades na coloração, indicando perda de miofilamentos. Também é indício de lesão quando há espaços entre as células, indicando edema. O grau de mionecrose foi determinado calculando o índice de mionecrose, que é definido matematicamente como a razão do número de células lesadas pelo número total de células, multiplicado por 100 (CARREIRO et al, 2019; DMOR, 2019).

4.7 Análise Estatística

Os resultados experimentais foram agrupados em média e erro padrão da média. As diferenças entre esses valores médios foram testadas pela análise de Variância (ANOVA) para a comparação de mais de duas amostras, sendo complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O nível de significância estabelecido foi de $P < 0,05$.

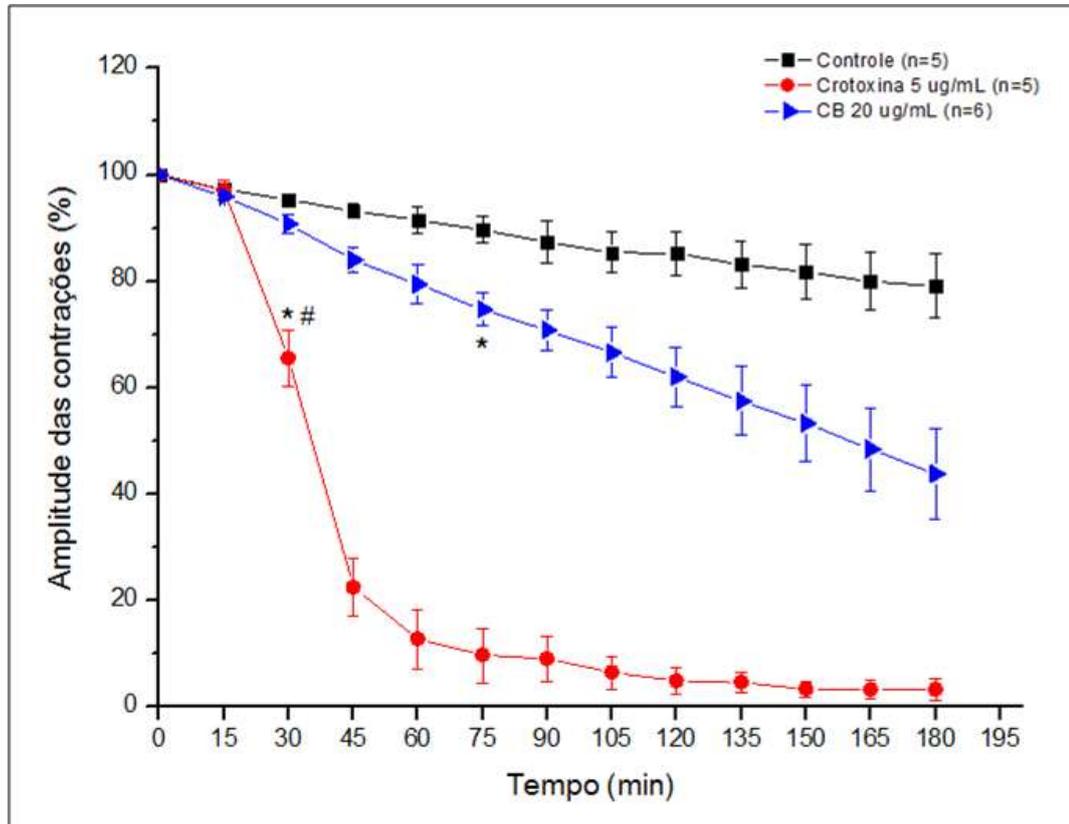
5. RESULTADOS

5.1 Estudo funcional

5.1.1 Influência da CTX e da CB sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.

Inicialmente, avaliou-se a amplitude das contrações musculares em função do tempo em músculos expostos à CTX (5 µg/mL) e CB (20 µg/mL) por 180 minutos. Nessas concentrações, a toxina e sua subunidade CB foram capazes de promover bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (gráfico 1).

Gráfico 1: Efeitos da CTX 5 µg/mL e da CB 20 µg/mL em preparações nervo frênico-músculo diafragma.

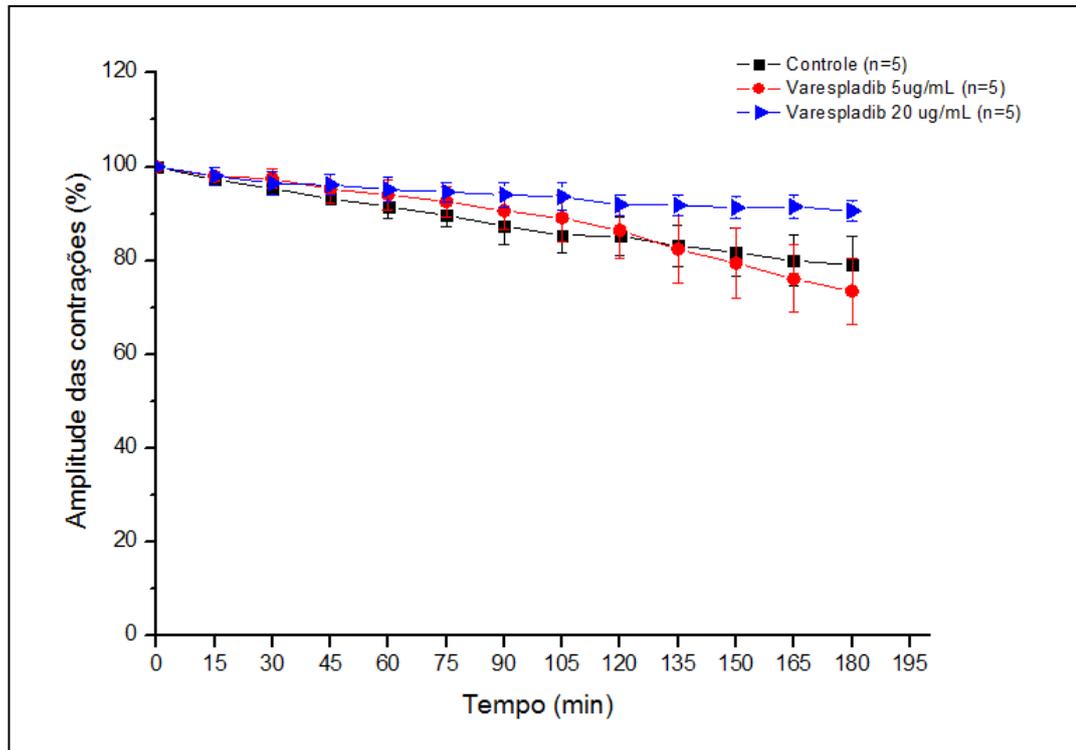


A ordenada representa a porcentagem da amplitude da contração muscular em relação à amplitude de contração inicial. A abscissa indica o tempo após o início de exposição às toxinas (Crotoxina 5 µg/mL e CB 20 µg/mL) no banho de órgãos. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. dos valores das amplitudes de contração nos respectivos momentos. (*) indica o momento em que as diferenças entre o grupo crotoxina e o grupo CB se tornaram significativas em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). (#) indica o momento em que as diferenças entre o grupo crotoxina se tornaram significativas em relação ao grupo CB ($P < 0,05$).

5.1.2 Influência do Varespladib sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.

Avaliou-se o comportamento das preparações neuromusculares expostas ao Varespladib (5 µg/mL e 20 µg/mL) por 180 minutos. Isoladamente, o Varespladib não altera o perfil das contrações evocadas indiretamente nas preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (gráfico 2).

Gráfico 2: Efeito do Varespladib 5 µg/mL e 20 µg/mL em preparações nervo frênico-músculo diafragma.

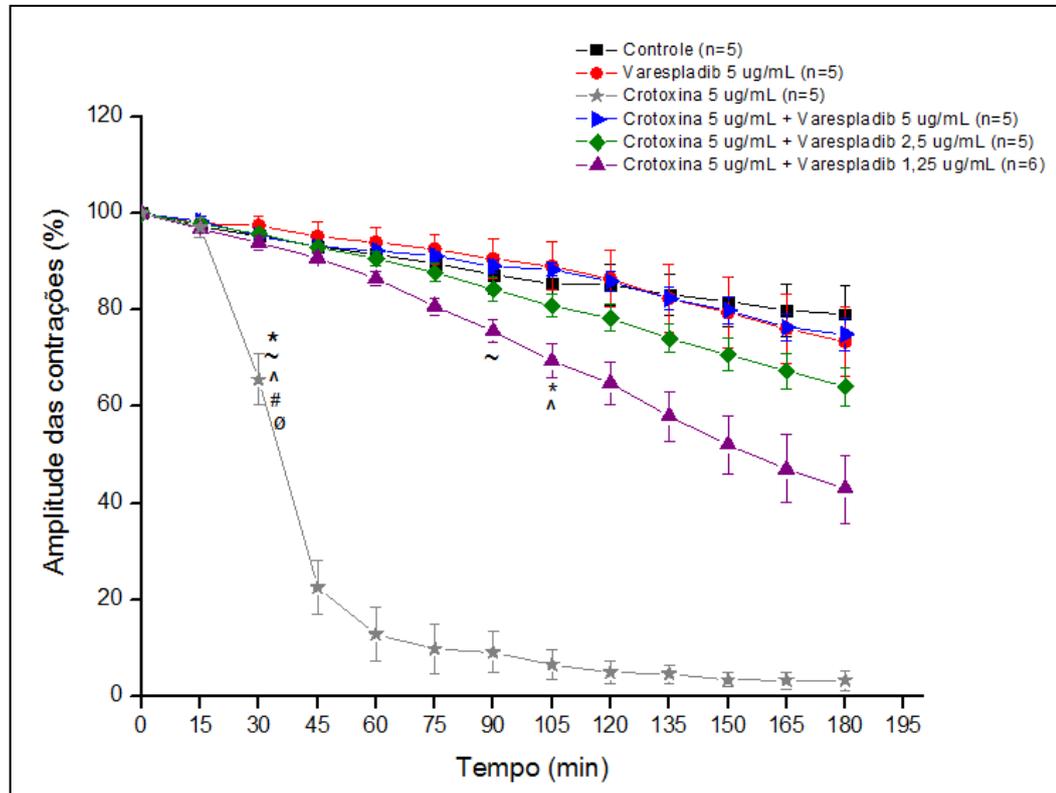


A ordenada representa a porcentagem da amplitude da contração muscular em relação à amplitude de contração inicial. A abscissa indica o tempo após o início de exposição à Varespladib 5 µg/mL e 20 µg/mL no banho de órgãos. Os dados foram agrupados em média ± E.P.M. dos valores das amplitudes de contração nos respectivos momentos. Não houve diferenças entre os grupos Varespladib em relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

5.1.3 Influência do Varespladib sobre o efeito paralisante da CTX em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.

Avaliou-se a capacidade do Varespladib em neutralizar os efeitos tóxicos da CTX 5 µg/mL nas preparações neuromusculares. Para tal, o Varespladib e a CTX foram pré-incubados por 20 minutos em proporções decrescentes - 1:1 massa:massa (5 µg/mL CTX e 5 µg/mL Varespladib); 1:0,5 massa:massa (5 µg/mL CTX e 2,5 µg/mL Varespladib) e 1:0,25 massa:massa (5 µg/mL CTX e 1,25 µg/mL Varespladib). O varespladib preveniu de forma significativa a paralisia induzida pela CTX quando na proporção de 1:1 e 1:0,5 massa:massa. Já na proporção 1:0.25 massa:massa foi capaz de prevenir apenas parcialmente o bloqueio neuromuscular (gráfico 3).

Gráfico 3: Efeitos da crotoxina 5 µg/mL, do varespladib 5 µg/mL e dos produtos da pré-incubação CTX-varespladib (1:1; 1:0,5, 1:0,25 massa:massa) em preparações nervo frênico-músculo diafragma.

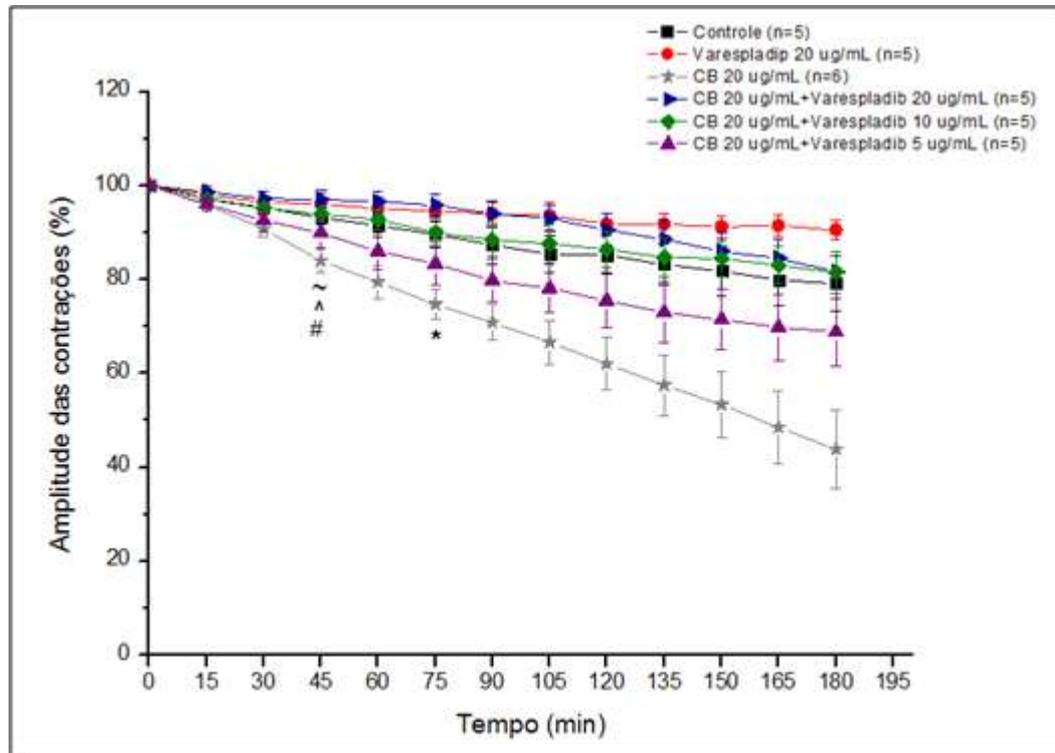


A ordenada representa a porcentagem da amplitude da contração muscular em relação à amplitude de contração inicial. A abscissa indica o tempo após o início de exposição às substâncias isoladamente no banho de órgãos. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. dos valores das amplitudes de contração nos respectivos momentos. (*) indica o momento em que as diferenças entre o grupo CTX e o grupo CTX-varespladib 1:0,25 massa:massa se tornaram significativas em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). (~) indica o momento em que as diferenças entre o grupo CTX e o grupo CTX-varespladib 1:0,25 massa:massa se tornaram significativas em relação ao grupo varespladib ($P < 0,05$). (^) indica o momento em que as diferenças entre o grupo CTX e o grupo CTX-varespladib 1:0,25 massa:massa se tornaram significativas em relação ao grupo CTX-varespladib 1:1 massa:massa ($P < 0,05$). (#) indica o momento em que as diferenças entre o grupo CTX se tornaram significativas em relação ao grupo CTX-varespladib 1:0,5 massa:massa ($P < 0,05$). (ø) indica o momento em que as diferenças entre o grupo CTX se tornaram significativas em relação ao grupo CTX-varespladib 1:0,25 massa:massa ($P < 0,05$).

5.1.4 Influência do Varespladib sobre o efeito paralisante da CB em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.

Avaliou-se a capacidade do Varespladib em neutralizar os efeitos tóxicos da CB 20 µg/mL nas preparações neuromusculares. Para tal, o Varespladib e a CB foram pré-incubados por 20 minutos em proporções decrescentes - 1:1 massa:massa (20 µg/mL CB e 20 µg/mL Varespladib); 1:0,5 massa:massa (20 µg/mL CB e 10 µg/mL Varespladib) e 1:0,25 massa:massa (20 µg/mL CB e 5 µg/mL Varespladib). O Varespladib preveniu de forma significativa a paralisia induzida pela CB em todas as proporções (gráfico 4).

Gráfico 4: Efeitos da CB 20 µg/mL, do Varespladib 20 µg/mL e dos produtos da incubação CB-varespladib (1:1; 1:0,5, 1:0,25 massa:massa) em preparações nervo frênico-músculo diafragma.



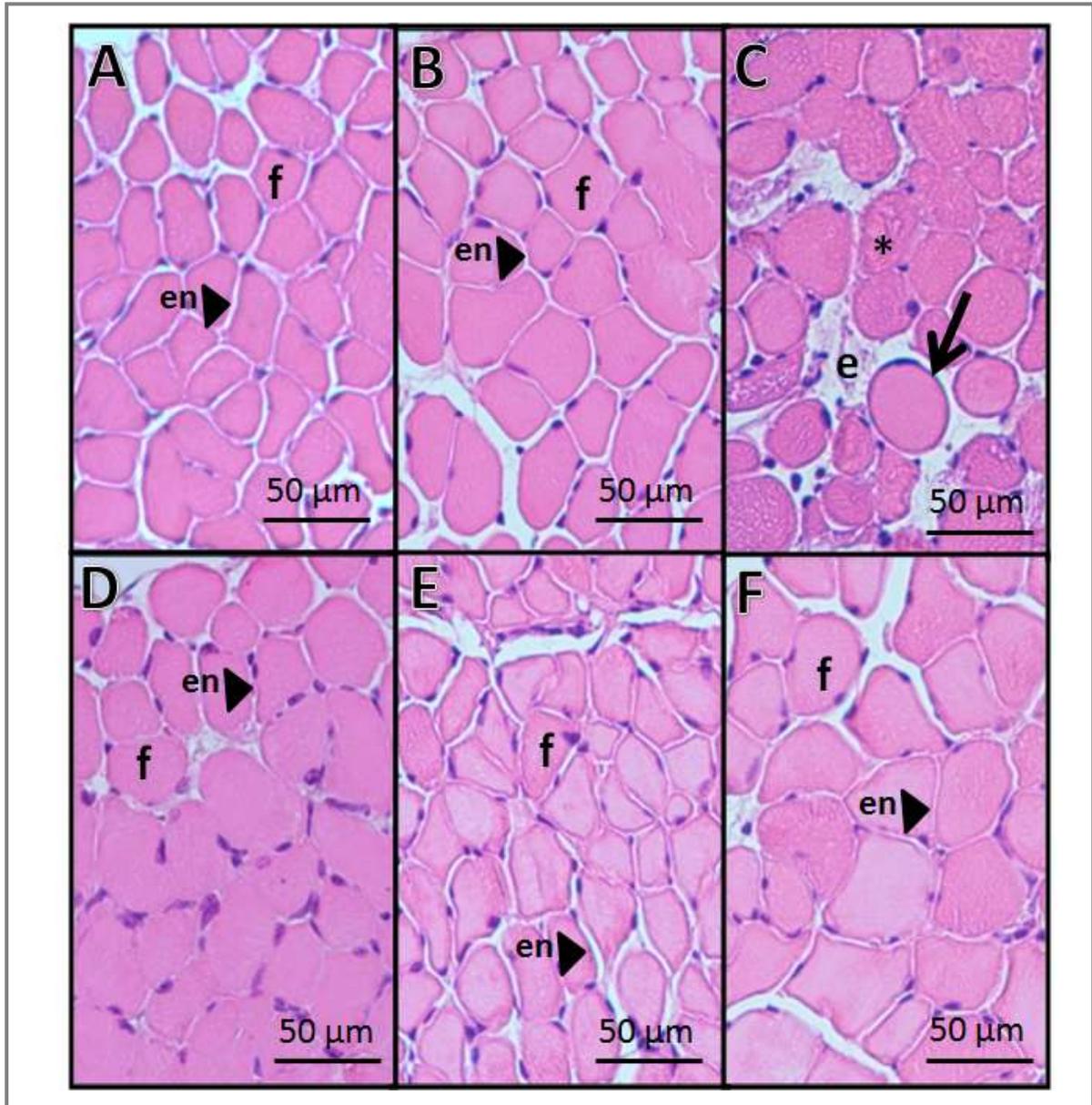
A ordenada representa a porcentagem da amplitude da contração muscular em relação à amplitude de contração inicial. A abscissa indica o tempo após o início de exposição às substâncias isoladamente no banho de órgãos. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. dos valores das amplitudes de contração nos respectivos momentos. (*) indica o momento em que as diferenças do grupo CB se tornaram significativas em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). (-) indica o momento em que as diferenças do grupo CB se tornaram significativas em relação ao grupo varespladib ($P < 0,05$). (^) indica o momento em que as diferenças do grupo CB se tornaram significativas em relação ao grupo CTX-varespladib 1:1 massa:massa ($P < 0,05$). (#) indica o momento em que as diferenças do grupo CB se tornaram significativas em relação ao grupo CTX-varespladib 1:0,5 massa:massa ($P < 0,05$).

5.2 Estudo morfológico

5.2.1 Influência do Varespladib sobre o efeito mionecrosante da CTX em músculo diafragma de camundongos.

Avaliou-se as células musculares dos hemidiafragmas expostos à CTX (5 µg/mL), ao Varespladib (5 µg/mL) ou ao produto pré-incubado de CTX (5 µg/mL) com o Varespladib (5; 2,5 ou 1,25 µg/mL) durante 180 minutos. O grupo que não houve nenhuma exposição a qualquer substância, grupo controle, exibiu fibras com formato poligonal, núcleo periférico, fibras musculares delimitadas por tecido conjuntivo e organizadas em fascículos. O grupo exposto à CTX (5 µg/mL) apresentou células lesionadas, exibindo espaços entre as fibras, com edema, fibras arredondadas, lisadas e com áreas desprovidas de miofibrilas. Já os grupos Varespladib e CTX-Varespladib apresentaram aspecto morfológico geral semelhante ao grupo controle (Figura 4).

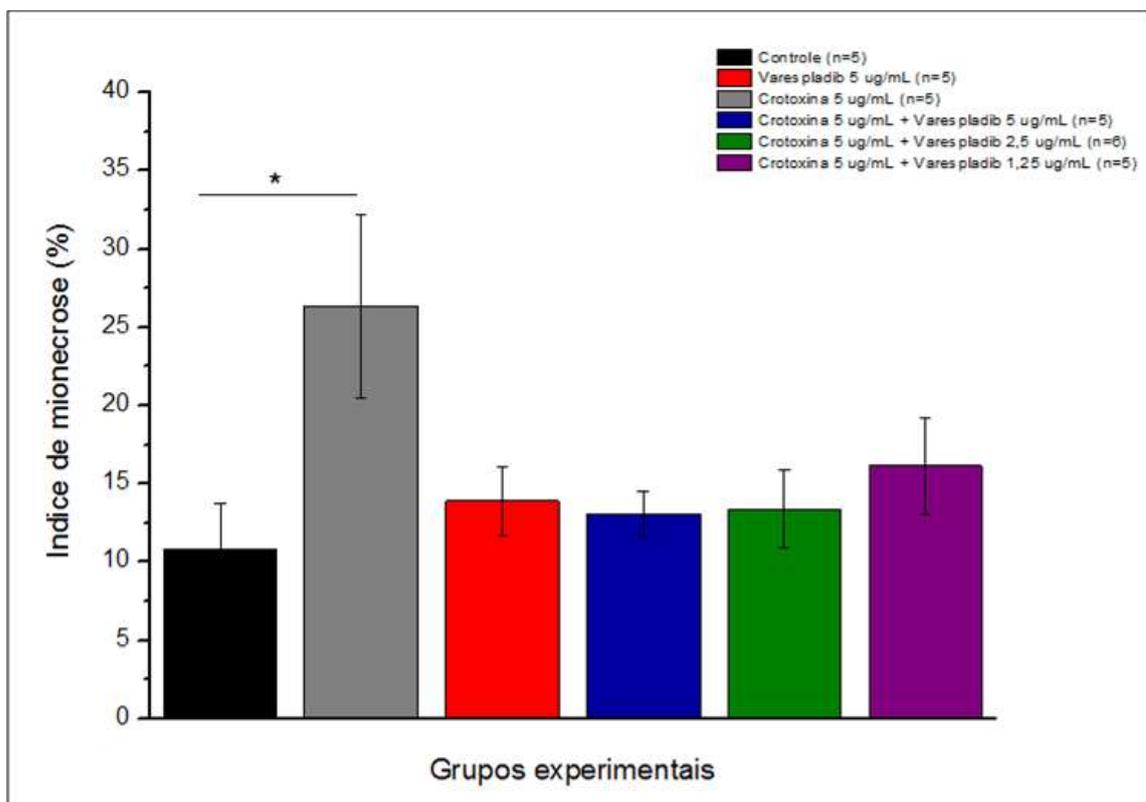
Figura 4: Efeitos da CTX 5 µg/mL, do Varespladib 5 µg/mL e do produto da pré-incubação CTX-Varespladib (1:1; 1:0,5; 1:0,25 massa:massa) em músculo diafragma.



Microscopia óptica dos músculos diafragmas de camundongos submetidos à coloração hematoxilina e eosina. As imagens representam respectivamente os músculos dos grupos controle (A), Varespladib (5 µg/mL) (B), CTX (5 µg/mL) (C) e CTX (5 µg/mL) + Varespladib (5 µg/mL), proporção de 1:1 massa:massa (D), CTX (5 µg/mL) + Varespladib (2,5 µg/mL), proporção de 1:0,5 massa:massa (E) e CTX (5 µg/mL) + Varespladib (1,25 µg/mL), proporção de 1:0,25 massa:massa (F). Os músculos A, B, D, E e F apresentam fibras com aparência normal, evidenciado pelo aspecto poligonal (f) e endomísio bem definido (en). O músculo C apresenta lesões, evidenciadas por fibras arredondadas (seta), desorganização dos miofilamentos actina e miosina (*) e edema (e).

O grau de lesão muscular foi avaliado por meio do cálculo do índice de mionecrose dos hemidiafragmas expostos à CTX (5 µg/mL), ao Varespladib (5 µg/mL) ou ao produto pré-incubado de CTX (5 µg/mL) e Varespladib (5; 2,5 ou 1,25 µg/mL) durante 180 minutos. As preparações expostas à CTX tiveram aumento significativo do índice quando comparadas ao grupo controle. Todos os grupos submetidos a pré-incubação CTX-Varespladib não sofreram diferença significativa em relação ao controle (gráfico 5).

Gráfico 5: Índice de Mionecrose dos músculos expostos a CTX ou ao produto de sua pré-incubação com o Varespladib.

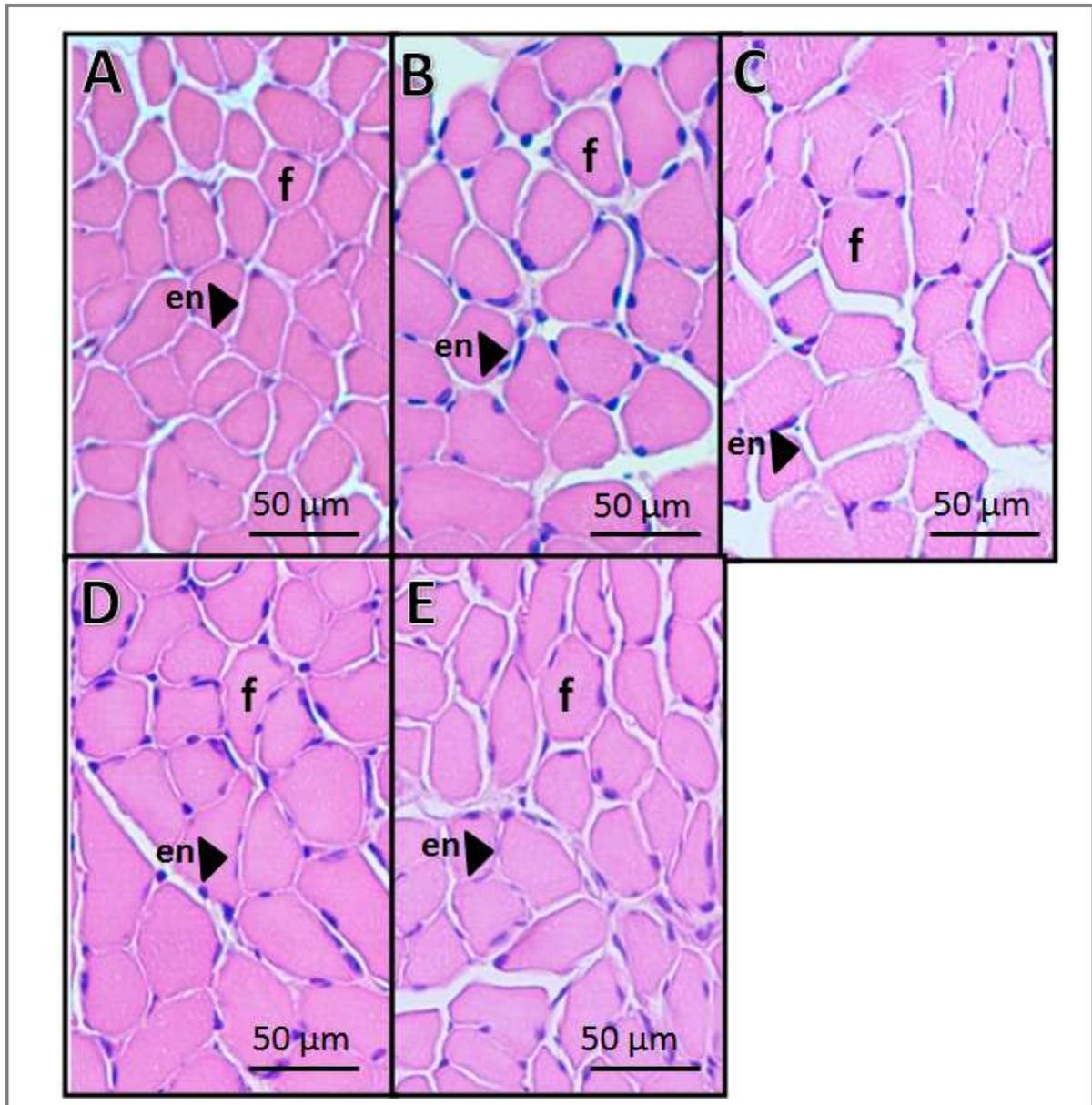


Índice de mionecrose avaliado a partir do efeito da CTX 5 µg/mL, do Varespladib 5 µg/mL e do produto da pré-incubação CTX-Varespladib (1:1; 1:0,5, 1:0,25 massa:massa) sobre músculos diafragmas de camundongos. O eixo Y representa a porcentagem de fibras lesionadas em relação a todas as fibras musculares. Os dados foram agrupados em média ± E.P.M. do índice de mionecrose. (*) indica diferenças significativas entre o grupo CTX em relação ao controle (P <0,05).

5.2.2 Influência do Varespladib sobre possíveis efeitos miotóxicos da CB em músculos diafragmas de camundongos.

As lesões das fibras musculares do hemidiafragma foram avaliadas após a exposição à CB (20 µg/mL), ao Varespladib (20 µg/mL) ou ao produto da pré-incubação CB (20 µg/mL) com o Varespladib (20 e 5 µg/mL) durante 180 minutos. Todos os grupos experimentais apresentaram aspecto morfológico semelhante ao controle, com fibras poligonais, núcleo periférico, delimitadas por tecido conjuntivo e organizadas em fascículos (Figura 5).

Figura 5: Efeitos da CB 20 µg/mL, do Varespladib 20 µg/mL e do produto da pré-incubação CB-Varespladib (1:1; 1:0,25 massa:massa) em músculos diafragmas.

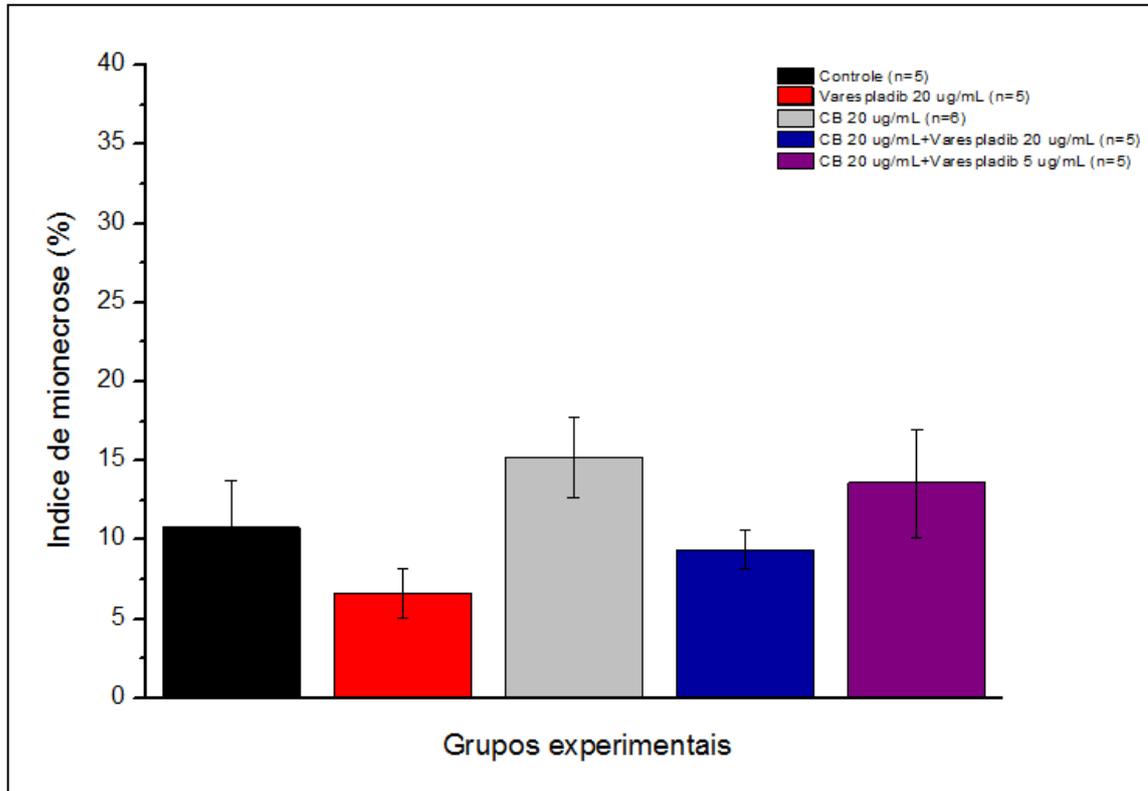


Microscopia óptica dos músculos diafragmas de camundongos submetidos à coloração hematoxilina e eosina. As imagens representam respectivamente os músculos dos grupos controle (A), Varespladib (20 µg/mL) (B), CB (20 µg/mL) (C), CB (20 µg/mL) + Varespladib (20 µg/mL), proporção de 1:1 massa:massa (D), CB (20 µg/mL) + Varespladib (5 µg/mL), proporção de 1:0,25 massa:massa (E). Os grupos experimentais apresentaram aspecto morfológico geral semelhante ao controle, com fibras poligonais (f) e endomísio bem definido (en).

O grau de lesão muscular também foi avaliado, calculando-se o índice de mionecrose dos hemidiafragmas expostos à CB (20 µg/mL), ao Varespladib (20 µg/mL) ou ao produto pré-incubado de CB (20 µg/mL) e Varespladib (20 e 5 µg/mL)

durante 180 minutos. Os grupos experimentais não apresentaram diferenças em relação ao controle (gráfico 6).

Gráfico 6: Índice de Mionecrose dos músculos expostos a CB ou ao produto de sua pré-incubação com o Varespladib.



Índice de mionecrose avaliado a partir do efeito da CB 20 $\mu\text{g/mL}$, do Varespladib 20 $\mu\text{g/mL}$ e do produto da pré-incubação CB-Varespladib (1:1; 1:0.25 massa:massa) sobre músculos diafragmas de camundongos. O eixo Y representa a porcentagem de fibras lesionadas em relação a todas as fibras musculares. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. do índice de mionecrose.

6. DISCUSSÃO

A busca por substâncias capazes de inibir a ação de peçonhas e toxinas ofídicas e que poderiam ser usadas rapidamente após o envenenamento têm se tornado comum (GUTIÉRREZ et al., 2020). Após a descoberta do potencial inibidor do Varespladib sobre peçonhas ofídicas (LEWIN et al., 2016), novas pesquisas foram realizadas para verificar sua capacidade como tratamento complementar em casos de envenenamento por serpentes. O presente estudo demonstra pela primeira vez que o Varespladib é capaz de inibir as atividades paralisantes e miotóxicas da CTX e paralisantes da CB em preparações neuromusculares de camundongos.

Inicialmente, foram realizados estudos miográficos com a CTX e sua subunidade CB para verificar as ações sobre preparações neuromusculares de camundongos. A CTX, na concentração de 5 µg/mL, provoca paralisia muscular irreversível. Isso corrobora com a literatura que nessa concentração já é tóxica para a preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (CAVALCANTE et al., 2017). Cavalcante e colaboradores, em 2017, realizaram um estudo miográfico com nervo frênico-músculo diafragma de camundongos com concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL de CTX e protocolo semelhante ao presente estudo. Os autores demonstraram que os efeitos da CTX na concentração de 5 µg/mL não diferia das concentrações mais elevadas (CAVALCANTE et al., 2017). Assim, em vista de sua potência, a concentração de 5 µg/mL foi a mais apropriada para o nosso estudo.

O presente estudo mostra que a CTX em 30 minutos provoca um decréscimo da amplitude das contrações evocadas indiretamente seguido de uma redução proeminente a partir de 45 minutos. Após uma hora e meia de exposição, a toxina promove bloqueio completo da amplitude das contrações. Em relação à CB, a unidade básica da CTX, uma concentração mais alta (20 µg/mL) é necessária para obter o efeito bloqueador neuromuscular (CAVALCANTE et al., 2017). A CB causa toxicidade na concentração de 20 µg/mL, diminuindo a amplitude das contrações musculares a partir de 75 minutos. Esta subunidade isolada possui uma toxicidade menor do que quando associada à CA (HAWGOOD e SANTANA DE SÁ, 1979; BON et al., 1989). Estudos anteriores demonstram a necessidade de concentrações muito maiores de CB para causar o mesmo efeito da associação CA.CB (RUBSAMEN et al., 1971; BREITHAUPT, 1976b).

A CTX é pesquisada desde a década de 30 e estudos sucessivos nas décadas de 50 a 70 (SAMPAIO et al., 2010) mostraram que esta proteína é constituída de duas subunidades. A subunidade CA atua como um carreador que auxilia a ligação da subunidade CB a sítios específicos da membrana pré-sináptica do nervo motor e, provavelmente, das membranas das fibras dos músculos esqueléticos, potencializando as ações neurotóxicas e miotóxicas do complexo (BON et al., 1979; HAWGOOD e BON, 1991; DÉLOT e BON, 1993). A CA sozinha é atóxica, desprovida de atividade enzimática, mas quando associada à CB, que tem toxicidade fraca, restaura o complexo enzimático e a toxicidade é potencializada. (RÜBSAMEN et al., 1971; HAWGOOD e SMITH 1977). A CB isolada liga-se a um grande número de sítios não específicos de baixa afinidade. Quando complexada com a CA, a CB liga-se apenas a um número limitado de sítios de alta afinidade, ou seja, a CA previne as ligações inespecíficas provocadas pela CB (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; JENG et al., 1978; BON et al., 1979). Os resultados miográficos confirmam que a CB isolada é menos tóxica que o complexo CTX (CA.CB), mostrando a qualidade dos compostos isolados.

O bloqueio tempo dependente das contrações musculares evocadas indiretamente é devido, principalmente, à ação neurotóxica da CTX na junção neuromuscular, com efeito somatório pré e pós-sináptico no nervo motor e, também, a ação miotóxica. O mecanismo de ação da CTX ainda não foi elucidado, mas algumas propostas foram feitas ao longo dos anos de pesquisa. Os primeiros estudos farmacológicos foram conduzidos por Vital Brazil e colaboradores e mostraram que a CTX promove um bloqueio neuromuscular, por meio de uma ação pós-sináptica semelhante aos curares (VITAL BRAZIL et al., 1966; VITAL BRAZIL, 1972). Contudo, vários estudos na década de 70 demonstraram que o principal local de ação da CTX era na região pré-sináptica da junção neuromuscular (VITAL BRAZIL e EXCELL, 1971, HAWGOOD e SMITH, 1977, CHANG e LEE, 1977). Esta conclusão foi apoiada pelo estudo de Gopalakrishnakone e Hawgood no ano de 1984 em que demonstram o aparecimento de sinais clínicos de paralisia muscular associados às alterações morfológicas dos terminais do nervo frênico, afetando vesículas, mitocôndria e o axolema, mas a morfologia da membrana pós-sináptica subjacente e estruturas relacionadas pareciam não afetadas (GOPALAKRISHNAKONE e HAWGOOD, 1984). Bon e colaboradores confirmaram a ação pós-sináptica e mostraram que a CTX age estabilizando o receptor nicotínico

no estado dessensibilizado, quando administrada em baixas concentrações (BON et al, 1979). Ainda na década de 70, pesquisadores verificaram, por meio de estudo eletrofisiológicos, que o bloqueio neuromuscular envolve uma ação trifásica na liberação do neurotransmissor acetilcolina, quando o meio de incubação apresenta baixa concentração de cálcio e alta de magnésio. Ocorre inicialmente uma rápida diminuição da liberação do neurotransmissor, seguido de uma fase transitória de facilitação com o aumento da liberação e, por fim, uma terceira fase de lenta e progressiva diminuição na liberação que eventualmente resulta em bloqueio completo (CHANG e LEE, 1977; CHANG et al., 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1990). Pesquisadores também demonstraram que há um sinergismo entre a subunidade CA e CB e sugeriram que a CA agia como carreadora para direcionar a CB para seu local de ação. Essa atividade de chaperona da CA potencializa a atividade biológica da CB, garantindo a interação do complexo com locais corretos de ligação, denominados de alta afinidade (RÜBSAMEN et al., 1971; HAWGOOD e SMITH, 1977; HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; BON et al., 1979; HAWGOOD e SANTANA DE SÁ, 1979; HENDON e TU, 1979; BON, 1982; BON et al., 1989; DÉLOT e BON, 1993; TZENG et al., 1995; FAURE et al., 2003; MONTECUCCO et al., 2008). Outros estudos propõem o aumento da permeabilidade da membrana aos íons, elevando a concentração de cálcio, causando uma degeneração do terminal nervoso e o bloqueio irreversível da transmissão (MONTECUCCO et al., 2008). A atividade fosfolipásica da CB também foi descoberta como fundamental para o bloqueio neuromuscular, sugerindo o ataque enzimático dos fosfolipídios de membrana da terminação nervosa motora (CHANG & LEE, 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; BON et al, 1979; MARLAS & BON, 1982; HAWGOOD & SMITH, 1989; HAWGOOD & BON, 1991). Em 2017, Cavalcante e colaboradores demonstraram por meio de vídeo-microscopia em tempo real que a CTX e a CB ocasionam efeito bifásico na liberação do neurotransmissor acetilcolina. Ocorre uma facilitação inicial caracterizado pelo aumento da liberação do neurotransmissor seguido por um decaimento sustentado e progressiva diminuição na liberação (CAVALCANTE et al, 2017). Recentemente, Bickler propôs à amplificação das atividades tóxicas da PLA₂ nas regiões pré e pós-sinápticas, com a ativação de mecanismos endógenos de vias de sinalização celular. Inicialmente, no terminal pré-sináptico, a CB cliva fosfolípidos de membrana formando ácido araquidônico (AA). O AA atua nas SNARE facilitando

a fusão da vesícula com a membrana plasmática, resultando em exocitose de acetilcolina. O AA também ativa a proteína quinase C (PKC), que ativa a PLA₂ citosólica e, assim, como a PLA₂ da peçonha, forma o AA. O AA ativa a PKC, que fosforila canais de rianodina no retículo endoplasmático, liberando o cálcio da reserva intracelular para o citosol. O excesso de cálcio provoca a exocitose do neurotransmissor. Além disso, o AA inativa o transportador de recaptção de colina, diminuindo a formação de acetilcolina. Então ocorre inicialmente um aumento da liberação de acetilcolina seguido de uma depleção das vesículas e inibição da produção de acetilcolina. Na região pós-sináptica, a PKC fosforila o receptor nicotínico muscular, abrindo-o e provocando o influxo de Sódio e efluxo de Potássio na região de placa terminal, despolarizando-a e provocando a contração. O aumento de cálcio intracelular pela produção de AA ativa fosfatases que desfosforilam os receptores nicotínicos que são internalizados. Esse conjunto de ações pré e pós-sinápticas provoca a paralisia, característica do envenenamento por *Crotalus* (BICKLER, 2020). Além desses efeitos, a CTX lesa as células musculares alterando a estrutura e a função. Esta toxina provoca inicialmente uma despolarização da membrana plasmática, com hipercontração das fibras musculares, seguido de rompimento da membrana, confirmado pelo aumento na taxa de liberação de creatina quinase (CK), e, por fim, causa necrose muscular. Essa ação miotóxica contribui para a paralisia muscular e o decaimento da amplitude das contrações musculares (MELO, 2004).

Em uma segunda etapa, foram realizados experimentos miográficos em preparações neuromusculares de camundongos para verificar a ação do varespladib sobre as preparações. Para tanto se demonstrou que o varespladib sozinho, na maior concentração utilizada nos experimentos, não provoca diferenças na amplitude das contrações musculares quando comparadas às preparações controle.

Em uma terceira etapa, foram realizados experimentos miográficos para verificar a capacidade do Varespladib de neutralizar as atividades tóxicas da CTX e da CB. Estudos anteriores mostraram a capacidade do Varespladib de inibir a atividade enzimática de PLA₂s de peçonhas ofídicas *in vitro* (Lewin et al., 2016). Em 2020, Gutiérrez e colaboradores demonstraram que o varespladib possuía potencial para inibir a toxicidade da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, pois diminuía manifestações paralíticas de camundongos envenenados por essa serpente (GUTIÉRREZ et al., 2020). Também em 2020, o grupo de pesquisa do

Zinenko demonstrou que o Varespladib protege camundongos, tanto aumentando a sobrevivência quanto adiando o início dos sintomas, em casos de envenenamento por *Vipera berus nikolskii*, serpente que possui peçonha rica em PLA₂ (65% da massa seca da peçonha) (ZINENKO et al, 2020). O presente estudo mostrou que o Varespladib foi capaz de inibir os efeitos paralisantes tanto da CTX e quanto da CB. Estudo similar, utilizando técnicas miográficas (Oliveira et al., 2020), mostrou que o Varespladib é capaz de inibir por completo o bloqueio neuromuscular provocado pela peçonha de *Oxyuranus scutellatus* (OLIVEIRA, et al, 2020).

Na última etapa deste projeto foram realizados estudos morfológicos no músculo diafragma de camundongos, para verificar a capacidade do Varespladib de neutralizar as atividades miotóxicas da CTX e da CB. A CTX provocou alterações estruturais nas fibras musculares e um aumento do índice de mionecrose, conforme já relatado em estudos prévios (HAWGOOD, 1984; CAVALCANTE et al., 2007). As alterações das fibras musculares levaram a uma perda das suas funções, contribuindo para paralisia muscular. O Varespladib, assim como nos estudos miográficos, inibiu a ação da CTX, mostrando fibras musculares com aspecto morfológico e índice de mionecrose semelhantes ao controle. As pequenas lesões observadas advêm da técnica miográfica e não altera a função muscular. Estudos anteriores já demonstraram efeitos inibitórios da miotoxicidade pelo varespladib. Em 2018, Yiding Wang e colaboradores verificaram os efeitos do Varespladib sobre a inibição da mionecrose, da atividade PLA₂, da hemorragia e dos danos às vísceras provocadas por quatro espécies de serpentes chinesas (*Deinagkistrodon acutus*, *Agkistrodon halys*, *Bungarus multicinctus* e *Naja atra*). O Varespladib causou um efeito inibitório tanto nas atividades enzimáticas da PLA₂s *in vitro*, como na mionecrose *in vivo* (WANG, 2018). Também em 2018, o mesmo grupo de pesquisa, mas agora liderado por Xiao, avaliaram o papel protetor do Varespladib na regeneração muscular de camundongos envenenados por *Deinagkistrodon acutus*. Além disso, avaliou os mesmos efeitos do estudo anterior, mas em longo prazo. Os resultados indicaram que o Varespladib atenua a maior parte da mionecrose e hemorragia muscular, além de causar recuperação com menor atrofia e fibrose muscular. O estudo, por fim, sugeriu que o Varespladib pode ser um antídoto eficaz para neutralizar a peçonha de *D. acutus* e permitir resultados de reabilitação mais precoces e melhorados (XIAO, 2018). Já para CB, o aspecto morfológico, assim como o índice de mionecrose não apresentaram diferença significativa em relação

ao controle. Apesar de alguns estudos mostrarem que a CB provoca mionecrose, é sabido que sua toxicidade quando isolada da CA é fraca, pois se liga a diversos sítios inespecíficos de baixa afinidade (GOPALAKRISHNAKONE e HAWGOOD, 1979; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; KOUYOUUMDJIAN et al., 1986; MEBS e OWNBY, 1990). Além disso, o efeito miotóxico é menos pronunciado que o efeito neurotóxico (BREIHAUPT, 1976; HAWGOOD & SMITH, 1977; CAVALCANTE, 2015). Assim, o fato de não observarmos a mionecrose induzida pela CB pode ser explicada por sua baixa toxicidade, necessitando de um tempo de exposição maior para promover o efeito. Portanto, não podemos avaliar a capacidade inibitória do Varespladib no protocolo experimental utilizado. Contudo, um estudo recente mostrou que o Varespladib é capaz de neutralizar as atividades citotóxicas *in vitro* e miotóxica *in vivo* provocados pela CB isolada da peçonha de *Crotalus vegrandis* (BRYAN-QUIRÓS et al., 2019).

O bloqueio neuromuscular, induzido tanto pela CTX quanto pela a CB, foi gradativamente reduzido conforme a concentração de varespladib era aumentada na mistura toxina:varespladib. Porém, a análise morfológica das preparações expostas a essas diferentes misturas revelaram que o varespladib, em todas as concentrações estudadas, foi capaz de neutralizar a miotoxicidade da CTX e que a CB não provocou miotoxicidade. É importante salientar que a CTX e a CB apresentam efeito neurotóxico mais pronunciado que miotóxico (BREIHAUPT, 1976; HAWGOOD e SMITH, 1977; CAVALCANTE, 2015), o que justificaria os resultados observados.

O mecanismo exato de neutralização da CTX e da CB pelo varespladib ainda não é relatado na literatura. Porém, como essa substância foi desenvolvida para se ligar com alta afinidade às PLA₂s humanas, é provável que o composto se ligue ao sítio tóxico da enzima e cause impedimento de ligação aos substratos (SNYDER et al., 1999).

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o Varespladib é uma molécula eficaz em inibir *in vitro* a CTX e a CB da *Crotalus durissus terrificus* e fornece informações que podem ser úteis para o desenvolvimento de tratamentos complementares a soroterapia em casos de acidentes ofídicos. Além disso, o estudo do inibidor pode ser importante para esclarecer o alvo biológico da CTX e da CB, bem como, as regiões tóxicas dessas proteínas.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AIRD, S. D., Yates, J. R. 3rd, Martino, P. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F, Kaiser I. I. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim Biophys Acta**, v. 3; n. 1040(2), p. 217-24, set. 1990.

AIRD, S. D, Kaiser, I. I., Lewis, R.V., Kruggel, W.G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**; v. 249, n. 2, p. 296-300, set. 1986.

AIRD, S. D., Kaiser, I. I., Lewis, R. V., Kruggel, W. G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. **Biochemistry**, v. 3, n. 24(25), p. 7054-8, dez. 1985

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. 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.

BICKLER, Philip E. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 68, 2020.

BON, C. Synergism of the two subunits of crotoxin. **Toxicon**, v. 20, n. 1, p. 105-109, 1982.

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.

BON. C.; CHANGEAUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits. **Eur. Journal Biochem**, v.99, p.471-481, 1979.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758-1776, 2010.

BREITHAUP, H. Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotapotin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 292, n. 3, p. 271-278, mar. 1976b.

BREITHAUP, H., Rübsamen, K., Habermann, H. Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex. **Eur. J. Biochem**, v.49, p. 333-335. jun. 1974.

BRYAN-QUIRÓS, W.; et al. Neutralizing properties of LY315920 toward snake venom group I and II myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 157, p. 1-7, 2019.

- BÜLBRING, Edith. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 1, n. 1, p. 38, 1946.
- BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. S1, p. 3-26, 1997.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A 2 biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009a.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S237-S242, 2009b.
- CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 739-758, 2011.
- 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.
- CARREIRO, R. S.; COGO, J. C.; PRIANTI JR, A. C. G.. Estudo da Miotoxicidade Induzida pelo Veneno de *Bothrops Jararaca*: Análise Quantitativa de Fibras Lesadas. Disponível em: <http://biblioteca.univap.br/dados/INIC/cd/epg/epg2/epg2-10%20ok.pdf>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2019.
- 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, W. L. G.; et al. Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. **Toxicon**, v. 96, p. 46-49, 2015.
- CAVALCANTE, Walter Luís et al. Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A 2 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.

CLINICAL TRIALS. NIH - U. S. National Library of Medicine. Clinical trials.gov.
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Varespladib&cntry=&state=&city=&dist=> Acesso em: 10 de novembro de 2020.

CUNHA, E. M. e MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros Bothrops e Crotalus—Uma Revisão. **Revista Eletrônica de educação e ciência**, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

DATASUS. Doenças e Agravos de Notificação - De 2007 em diante (SINAN).
<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/animais>. Acesso em: 15 de julho de 2020.

DELÓT, E.; BON, C. Model of Interaction of Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin, with Pre-Synaptic Membranes. **Biochemistry**, v.32, p.10708-10713, 1993.

DENNIS, E. A. Introduction to thematic review series: phospholipases: central role in lipid signaling and disease. **Journal of lipid research**, v. 56, n. 7, p. 1245-1247, 2015.

DMOR - Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal De Minas Gerais. Técnicas Histológicas. Disponível em: <http://depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/histologicabasica.htm> . Acesso em: 15 de fevereiro de 2019.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.; DEULOFEN, V. (Eds.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971

DILLARD, R. D. et al. Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2. 1. Indole-3-acetamides. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 26, p. 5119-5136, 1996.

DILLARD, R. D. et al. Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2. 2. Indole-3-acetamides with additional functionality. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 26, p. 5137-5158, 1996.

DRAHEIM, S. E. et al. Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2. 3. Indole-3-glyoxamides. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 26, p. 5159-5175, 1996.

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; BON, Cassian. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.

FAURE, Grazyna et al. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. **European journal of biochemistry**, v. 214, n. 2, p. 491-496, 1993.

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 et al. Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo electric* organ: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 509-517, 2003.

FERNANDES, Carlos AH et al. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Scientific reports*, v. 7, p. 43885, 2017.

FRANCISCHETTI, I.M.; GOMBAROVITS, M.E.; VALENZUELA, J.G.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 2000; 127(1):23-36.

FRY, Bryan. Snakebite: When the human touch becomes a bad touch. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 170, 2018.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 85-98, 1984.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J. Morphological changes in murine nerve, neuromuscular junction and skeletal muscle induced by the crotoxin complex [proceedings]. **The Journal of physiology**, v. 291, p. 5P, 1979.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, Barbara J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 22, n. 5, p. 791-804, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; et al. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1529-1538, 1998.

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

GUTIÉRREZ, José María et al. Varespladib (LY315920) and methyl varespladib (LY333013) abrogate or delay lethality induced by presynaptically acting neurotoxic snake venoms. *Toxins*, v. 12, n. 2, p. 131, 2020.

HAWGOOD, Barbara J. & SMITH, J. W. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotoxin 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.; SMITH, I. Christopher H. 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.

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.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 68, n. 7, p. 1560-1563, 1971.

HENDON, R. A.; TU, Anthony T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, v. 578, n. 1, p. 243-252, 1979.

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

JENG, T. W., Hendon, R. A., Fraenkel-Conrat, H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 75, n. 2, p. 600-604, fev. 1978.

KINI, R.M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.* v. 397, n.3, p.377-387, 2006.

KINI, R. M. Snake venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism. 1 edição. West Sussex, England: Wiley, 1997. 1-28 p.

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

KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, n. 6, p. 575-583, 1986.

LEWIN, M.; et al. Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. **Toxins**, v. 8, n. 9, p. 248, 2016.

LOURENCO Jr, A., CRESTE, C. F. Z., DE BARROS, L. C., DOS SANTOS, L. D., PIMENTA, D. C., BARRAVIERA, B., e FERREIRA Jr, R. S.. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. **Toxicon**, v. 69, p. 75-81, 2013.

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.

MARCHI-SALVADOR, Daniela P. et al. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 72, n. 3, p. 883-891, 2008.

MARCUSSI, S.; et al. Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 8, p. 743-756, 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.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacology & therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. 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.61-62.

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.; 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.

MS – Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos – Serpentes. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes> Acesso em: 15 de julho de 2020.

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, 1971. v.2.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363-370, 2005.

OLIVEIRA, Isadora Caruso Fontana et al. Varespladib (LY315920) inhibits neuromuscular blockade induced by *Oxyuranus scutellatus* venom in a nerve-muscle preparation. **Toxicon**, 2020.

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.

RUBSAMEN, K., Breithaupt, H., Habermann, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol.* v. 270, n. 3, p. 274-288, 1971.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SAMPAIO, Sandra C. et al. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.

SANZ, Roberto et al. Regioselective Synthesis of 4-and 7-alkoxyindoles from 2, 3-dihalophenols: application to the preparation of indole inhibitors of phospholipase A₂. *The Journal of organic chemistry*, v. 72, n. 14, p. 5113-5118, 2007.

SLOTTA, C.H.; FRAENKEL-CONRAT, M. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v.12, p.505-513, 1938

SILVA, W. D.; et al. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. **Mem Inst Butantan**, p. 153-168, 1989.

SNYDER, David W. et al. Pharmacology of LY315920/S-5920,[[3-(Aminooxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1H-indol-4-yl] oxy] acetate, a Potent and Selective Secretory Phospholipase A2Inhibitor: A New Class of Anti-Inflammatory Drugs, SPI. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 288, n. 3, p. 1117-1124, 1999

SOARES, Andreimar M. et al. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 9, p. 877-888, 2001.

SOARES, A. M. et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2625-2641, 2005.

SANZ, Roberto et al. Regioselective Synthesis of 4-and 7-alkoxyindoles from 2, 3-dihalophenols: application to the preparation of indole inhibitors of phospholipase A2. *The Journal of organic chemistry*, v. 72, n. 14, p. 5113-5118, 2007.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 290, 2017.

TICLI, Fábio K. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 318-327, 2005.

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.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1-2, p. 59-70, 2000.

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.

XIAO, H. et al. Inactivation of Venom PLA2 Alleviates Myonecrosis and Facilitates Muscle Regeneration in Envenomed Mice: A Time Course Observation. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1911, 2018.

WANG, Y. et al. Exploration of the Inhibitory Potential of Varespladib for Snakebite Envenomation. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 391, 2018

WHO. Guidelines for Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. WHO Technical Report Series. Out 2008.

https://www.who.int/bloodproducts/snake_anticrotalusvenoms/SnakeAntivenomGuideline.pdf

WHO - World Health Organization. **Snakebite envenoming.**

<https://www.who.int/snakebites/disease/en/> Acesso em: 15 de julho de 2020.

ZINENKO, Oleksandr; TOVSTUKHA, Igor; KORNIYENKO, Yevgen. PLA2 Inhibitor Varespladib as an Alternative to the Antivenom Treatment for Bites from Nikolsky's Viper *Vipera berus nikolskii*. **Toxins**, v. 12, n. 6, p. 356, 2020.