

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

NATÁLIA MURADAS VALÉRIO SOUZA

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE PARALISANTE DE PEÇONHAS E
CROTOXINAS ISOLADAS DE SERPENTES DA SUBESPÉCIE
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS DE DIFERENTES REGIÕES DO
ESTADO DE MINAS GERAIS.**

BELO HORIZONTE - MG
SETEMBRO, 2020.

NATÁLIA MURADAS VALÉRIO SOUZA

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE PARALISANTE DE PEÇONHAS E
CROTOXINAS ISOLADAS DE SERPENTES DA SUBESPÉCIE
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS DE DIFERENTES REGIÕES DO
ESTADO DE MINAS GERAIS.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia (PPGFisFar), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante.

BELO HORIZONTE - MG
SETEMBRO, 2020.

- 043 Souza, Natália Muradas Valério.
Comparação da atividade paralisante de peçonhas e Crotoxinas isoladas de serpentes da subespécie *Crotalus durissus terrificus* de diferentes regiões do estado de Minas Gerais [manuscrito] / Natália Muradas Valério Souza. - 2020.
- 66 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. Peçonhas. 2. Crotoxina. 3. *Crotalus cascavella*. 4. Junção Neuromuscular. 5. Bloqueio Neuromuscular. I. Cavalcante, Walter Luís Garrido. 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 DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 530 DE NATÁLIA MURADAS VALÉRIO SOUZA

"COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE PARALISANTE DE PEÇONHAS E CROTOXINAS ISOLADAS DE SERPENTES DA SUBESPÉCIE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS DE DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DE MINAS GERAIS"

NATÁLIA MURADAS VALÉRIO SOUZA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 25 de setembro de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira, ICB/UFMG

Prof. Dr. Célio José de Castro Júnior, IEP/SCBH

Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Walter Luís Garrido Cavalcante, Professor do Magistério Superior**, em 25/11/2020, às 09:29, 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 25/11/2020, às 16:58, 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 **Célio José de Castro Júnior, Usuário Externo**, em 01/12/2020, às 12:28, 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_area Acesso externo=0, informando o código verificador **0435002** e o código CRC **E0681D31**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me dar força e proteção e por ter guiado todos os meus passos ao longo da minha jornada acadêmica no Mestrado.

A minha **família**, por todo amor e amparo no dia-a-dia!

Aos meus **professores**, pois sem os seus ensinamentos eu jamais teria chegado até aqui!

A esta **universidade**, por me proporcionar o melhor da vida acadêmica!

A todos os meus **amigos e colegas** de Mestrado & Doutorado, pelos momentos compartilhados ao longo deste período!

Ao meu **orientador**, Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante, pelo acompanhamento exercido durante a execução do trabalho. Manifesto aqui minha gratidão eterna por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência!

As minhas **amigas queridas e parceiras de laboratório**, Êmylle Ramos e Fernanda Valadares, e aos **estudantes de iniciação científica**, Thales Gonçalves e Henrique Reis: Obrigada pelas frases de motivação e puxões de orelha. As risadas que vocês compartilharam comigo nessa etapa tão desafiadora, fizeram toda a diferença. Essa dissertação também é de vocês!

A minha **terapeuta** Emanuely Aguiar: Obrigada por todo o suporte e por cada momento de cuidado e reflexão!

A **Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias** e a **Paula Ladeira Ortolani** (Fundação Ezequiel Dias), pela parceria estabelecida ao longo de todo o projeto.

A **cidade de Belo Horizonte**, por me acolher e me proporcionar uma das melhores experiências da vida!

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
Alberto & Fátima. Obrigada por
tornarem possíveis os meus
maiores sonhos.*

“Sempre existiram drogas mais potentes, mais calmantes, mais tranquilizantes, mais alucinógenas do que todas as drogas da farmacopéia antiga e da farmacologia moderna. Essas miracle-drugs, essas drogas-milagre são as palavras”

(Pitigrilli)

RESUMO

Estudos mostram a existência de variações na composição e nos efeitos das peçonhas de diferentes subespécies de serpentes do gênero *Crotalus*, ou até mesmo de uma mesma subespécie. Considerando a letalidade do envenenamento crotálico, o estudo comparativo das atividades biológicas das peçonhas e do seu principal componente tóxico, a Crotoxina (CTX), pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de uma terapia antiofídica mais eficaz, além de avançar no conhecimento do mecanismo de ação destes compostos. Assim, o objetivo do estudo foi comparar por meio de estudos miográficos e morfológicos, a atividade de bloqueio neuromuscular e o aspecto morfológico geral de músculos expostos à peçonhas e CTXs isoladas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais (Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno). As peçonhas e CTXs foram testadas em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Os resultados mostraram que as preparações neuromusculares expostas às peçonhas e CTXs de diferentes regiões apresentaram bloqueio tempo e concentração dependentes em 180 minutos. As diferenças no bloqueio neuromuscular entre as peçonhas ou as CTXS foram observadas na concentração de 1 µg/mL, revelando possíveis variações na composição das peçonhas bem como nas isoformas de CTX. O estudo morfológico revelou a capacidade miotóxica tanto das peçonhas como das CTXs, entretanto, não ocorreu variação entre os grupos. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir a importância da comprovação funcional da variabilidade entre peçonhas e toxinas de uma mesma subespécie, revelando a necessidade de *pools* de peçonhas, provenientes de diferentes regiões, para a produção de antivenenos.

Palavras-chave: Peçonha, Crotoxina, Variabilidade, Atividade Paralisante, Junção Neuromuscular, *Crotalus durissus terrificus*.

ABSTRACT

Several studies show the existence of variations in the composition and effects of venoms from different subspecies of *Crotalus* snakes, or even from the same subspecies. Considering the lethality of crotalic poisoning, the comparative study of the biological activities of venoms and its main toxic component, Crotoxin (CTX), can provide subsidies for the development of a more effective antiophidic therapy, in addition to advancing the knowledge of the mechanism of action of these compounds. Thus, the aim of this study was to compare, through myographic and morphological techniques, the neuromuscular blocking activity and the general morphological aspect of muscles exposed to venoms and CTXs isolated from *Crotalus durissus terrificus* snakes, from different regions of the Minas Gerais state (Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte and Nazareno). Venoms and CTXs were tested in mouse phrenic nerve-diaphragm preparations. The results showed a time and concentration-dependent blockade of neuromuscular preparations exposed to venoms and CTXs in 180 minutes. Differences were observed at the concentration of 1 µg/mL, for both substances, revealing possible variations in venom composition as well as in CTX isoforms. The morphological study revealed the myotoxic capacity of venoms and CTXs, however, despite the differences in relation to the control group, there was no variation between the venom or CTXs groups. From the results obtained, we can conclude the importance of functional proof of the variability between venoms and toxins from the same subspecies, revealing the need for venom pools, from different regions, for the production of antivenoms.

Key Words: Venom, Crotoxin, Variability, Paralyzing Activity, Neuromuscular Junction, *Crotalus durissus terrificus*.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Regiões de origem das peçonhas e CTXs: Carrancas (Vermelho), Patos de Minas (Azul), Nova Ponte (Verde) e Nazareno (Laranja), Minas Gerais – Brasil.....30
- FIGURA 2** - Sistema de Miografia – Protocolo indireto de estimulação.....32
- FIGURA 3** - Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina.....41
- FIGURA 4** - Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina.....42
- FIGURA 5** - Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (10 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina.....43
- FIGURA 6** - Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina.....44
- FIGURA 7** - Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina.....45

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** - Efeito das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 1 µg/mL sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.....34
- GRÁFICO 2** - Efeito das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 5 µg/mL sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.....35
- GRÁFICO 3** - Efeito das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 10 µg/mL sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.....36
- GRÁFICO 4** - Efeito das CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* provenientes de diferentes regiões na concentração de 1 µg/mL, sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.....37
- GRÁFICO 5** - Efeito das CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* provenientes de diferentes regiões na concentração de 5 µg/mL, sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.....38
- GRÁFICO 6** – Indução da mionecrose pelas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos.....46
- GRÁFICO 7** – Indução da mionecrose pelas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos.....47
- GRÁFICO 8** – Indução da mionecrose pelas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (10 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos.....48
- GRÁFICO 9** – Indução da mionecrose pelas CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos.....49

GRÁFICO 10 – Indução da mionecrose pelas CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos.....50

LISTA DE FÓRMULAS

FÓRMULA 1 - Cálculo do Índice de Mionecrose	33
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico

CA - Crotopotina

CB - Crotoxina B

C.d. - *Crotalus durissus*

Cdt - *Crotalus durissus terrificus*

CK - Creatina Kinase

CTX(s) - Crotoxina(s)

E.P.M - Erro Padrão da Média

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

OMS - Organização Mundial da Saúde

PLA₂(s) - Fosfolipase(s) A₂

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	17
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo Geral.....	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Peçonhas e Crotoxinas.....	30
4.2. Solução Nutriente.....	30
4.3. Animais.....	31
4.4. Estudo Miográfico.....	31
4.4.1. Protocolo Indireto de Estimulação.....	31
4.5. Estudo Morfológico.....	32
4.6. Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Estudo Miográfico	34
5.1.1. Efeito paralisante das peçonhas de Cdt (1 µg/mL) em preparações neuromusculares de camundongos.....	34
5.1.2. Efeito paralisante das peçonhas de Cdt (5 µg/mL) em preparações neuromusculares de camundongos.....	35
5.1.3. Efeito paralisante das peçonhas de Cdt (10 µg/mL) em preparações neuromusculares de camundongos.....	36
5.1.4. Efeito paralisante das CTXs (1 µg/mL) em preparações neuromusculares de camundongos.....	37
5.1.5. Efeito paralisante das CTXs (5 µg/mL) em preparações neuromusculares de camundongos.....	38
5.2. Estudo Morfológico	40
5.2.1. Microscopia Óptica.....	40
5.2.2. Índice de Mionecrose.....	46
5.2.2.1. Indução da mionecrose pelas peçonhas de Cdt em preparações neuromusculares de camundongos.....	46
5.2.2.2. Indução da mionecrose pelas CTXs em preparações neuromusculares de	

camundongos.....;	49
6. DISCUSSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. REVISÃO DE LITERATURA

O envenenamento por picadas de serpentes (acidente ofídico) é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada, recebendo, historicamente, pouca atenção da indústria farmacêutica, das autoridades de saúde pública e dos órgãos de financiamento, apesar de acometer 1.8 a 2.7 milhões de pessoas ao redor do mundo (GUTIÉRREZ et al, 2017). Estes acidentes ocasionam 100.000 mortes e 400.000 amputações a cada ano, sendo a população rural a mais vulnerável ao envenenamento (GUTIÉRREZ et al, 2017). Os acidentes ofídicos ocorrem principalmente em países tropicais, nos períodos quentes e nas épocas chuvosas do ano, coincidindo com a reprodução destes animais e o trabalho no campo (GUTIÉRREZ et al, 2017). A exposição da população Européia e da América do Norte às serpentes é relativamente pequena, o que contribui para a baixa repercussão dos casos de envenenamento (GUTIÉRREZ et al, 2017).

Existem no mundo aproximadamente 3 mil espécies de serpentes, sendo que 10 a 14% são consideradas peçonhentas (PINHO & PEREIRA, 2001). O Brasil é o país que apresenta uma das mais ricas faunas de serpentes do planeta, com cerca de 366 espécies catalogadas (BERNANDE, 2011). Destas, 55 são peçonhentas (BERNARDE, 2011). Entre os países da América do Sul, o Brasil se destaca pela elevada incidência de acidentes ofídicos, sendo estes geograficamente dispersos e registrados em todas as Regiões e Estados Brasileiros (LIMA et al, 2009; SARAIVA et al, 2010). Dados do Ministério da Saúde, relativos ao ano de 2019, registram a ocorrência de aproximadamente 30.482 casos de envenenamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A notificação obrigatória dos acidentes ofídicos no Brasil teve início a partir do ano de 1986. Isso permitiu a melhor compreensão da epidemiologia, bem como do estabelecimento de um sistema de troca de soros por informações epidemiológicas entre o Ministério da Saúde e as Secretarias Estaduais de Saúde, com vistas à melhor organização e planejamento das ações de controle (CARDOSO et al, 2009). Atualmente, a produção e a distribuição de soros antiofídicos no país encontram-se estabilizadas, no entanto, ainda há problemas relacionados à

notificação dos acidentes em várias regiões (LEMOS et al, 2009).

A maioria dos acidentes ofídicos registrados no país está relacionada às serpentes do gênero *Bothrops* (87%), seguido pelos gêneros *Crotalus* (9%), *Lachesis* (3%) e *Micrurus* (1%). O acidente crotálico, apesar da menor incidência em relação ao botrópico, é grave, com letalidade em torno de 72% nos casos não tratados e 5% nos casos em que houve soroterapia (PINHO et al, 2000; CARDOSO et al, 2009). A peçonha crotálica é, portanto, considerada a mais tóxica dentre as peçonhas das serpentes brasileiras (PINHO et al, 2000).

As serpentes do gênero *Crotalus* são representadas no Brasil por uma única espécie, a *Crotalus durissus* (C.d.), e cinco subespécies: *C.d. terrificus*, *C.d. collilineatus*, *C.d. cascavella*, *C.d. ruruima* e *C.d. marajoensis*. Estas serpentes são conhecidas popularmente como cascavel, boicininga, maracambóia e maracá (PINHO & PEREIRA, 2001). Caracterizam-se por cabeça triangular, par de fossetas loreais (órgão sensorial termorreceptor), escamas na cabeça, aparelho inoculador de peçonha, olhos pequenos com pupilas em fenda e guizo na porção terminal da cauda (CARDOSO et al, 2009). Distribuem-se de maneira irregular pelo país, determinando as variações no registro de acidentes (SECRETARIA DE SAÚDE, 2020). De forma geral, ocorrem nos cerrados do Brasil central, nas regiões áridas e semiáridas do nordeste, nos campos e áreas abertas do sul, sudeste e norte, não sendo encontradas em regiões litorâneas (BERNARDE, 2011).

As peçonhas das *Crotalus durissus* apresentam atividades biológicas características, como a neurotóxica, que causa paralisia flácida da musculatura esquelética, miotóxica sistêmica, evidenciada pela ocorrência de rabdomiólise, e hemotóxica, relacionada a distúrbios da coagulação (PINHO & PEREIRA, 2001; CARDOSO et al, 2009). Assim, o quadro clínico associado ao envenenamento crotálico inclui tanto manifestações locais de ordem discreta, como dor, eritema, edema e parestesia; quanto manifestações sistêmicas, como mal estar, prostração, sudorese, náuseas, cefaléia, vômitos, boca seca, sonolência, inquietação, variações de pressão arterial, manifestações de ordem neurológica (que surgem nas primeiras 3-6 horas) e muscular (PINHO & PEREIRA, 2001; CARDOSO et al, 2009). No local da picada é possível observar arranhões ou marcas puntiformes únicas ou duplas (PINHO et al, 2000).

Dentre os sinais e sintomas neurológicos, a fácies miastênica se destaca como importante indicador diagnóstico do envenenamento, podendo evoluir para a paralisia do músculo diafragma. Os sintomas musculares, por sua vez, estão relacionados a ocorrência de miotoxicidade, caracterizada pelo aparecimento de intensa mialgia, edema muscular e mioglobínúria, sendo esta última decorrente da instalação de um quadro clínico de rabdomiólise. As manifestações clínicas relacionadas ao sistema hemostático demonstram incoagulabilidade sanguínea e aumento do tempo de coagulação, observado em aproximadamente 40% dos pacientes. Dentre as complicações associadas ao envenenamento, a insuficiência renal aguda é destaque, instalando-se ao longo das primeiras 48 horas após a picada (PINHO & PEREIRA, 2001; CARDOSO et al, 2009).

A variedade de atividades biológicas e de manifestações clínicas, apresentada pelos pacientes expostos ao envenenamento crotálico, revela a importância da identificação bioquímica e farmacológica das frações que compõem a peçonha, sendo fundamentais para a compreensão do quadro patológico e para a melhora da soroterapia. Neste sentido, diversas proteínas foram isoladas e caracterizadas a partir da peçonha da *Crotalus durissus terrificus*, destacando-se a Crotamina, a Giroxina, a Convulxina e a Crotoxina (CARDOSO et al, 2009; DOS SANTOS et al, 2017).

A Crotamina é um polipeptídeo de baixa massa molecular, não-enzimático e básico, identificada como uma miotoxina capaz de induzir espasmos na musculatura esquelética, resultando em paralisia espástica (CUNHA & MARTINS, 2012). A Giroxina, por sua vez, é uma glicoproteína de 33 kDa, não letal e relacionada à quadros de hemotoxicidade e lesão labiríntica (CUNHA & MARTINS, 2012). Estudos de Ferrari e colaboradores (2020), sugerem que a Giroxina pode induzir neurotoxicidade decorrente de uma elevação nos níveis de glutamato, sendo este mecanismo, dependente de cálcio (FERRARI et al, 2020). Já a Convulxina, uma proteína que corresponde à 5% do peso seco da peçonha, promove ativação e agregação plaquetária, além de perda do equilíbrio, convulsões e alterações de ordem visual e gastrointestinal (CUNHA & MARTINS, 2012). Por fim, a Crotoxina (CTX), constitui-se em uma proteína composta por duas subunidades, uma básica, conhecida por Crotoxina B ou CB (14,5 kDa), e uma ácida, a Crotoxina A (CA) ou Crotapotina (9,5 kDa) (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938; FRAENKEL-

CONRAT & SINGER, 1956; RÜBSAMEN et al, 1971; CHANG & LEE, 1977). A CTX é responsável pelos principais efeitos neuromusculares observados no envenenamento (CHOUMET et al, 1996; CAVALCANTE et al, 2015; CAVALCANTE et al, 2017).

Os componentes encontrados nas peçonhas crotálicas podem variar entre diferentes espécies e subespécies, ou até mesmo dentro de uma mesma subespécie, impactando diretamente na pesquisa e no tratamento dos acidentados, como seleção de antivenenos e de espécimes para a sua produção. A variabilidade é atribuída a diversos fatores, incluindo localização geográfica, hábitos alimentares, clima, idade do animal, fatores individuais e diferenças genéticas e ontogenéticas (SANTORO et al, 1999; SARAVIA et al, 2002; DOS SANTOS et al, 2005; FURTADO, 2018; CALVETE et al, 2009).

Estudos bioquímicos e farmacológicos demonstram variações na composição e nas atividades biológicas das peçonhas crotálicas. Neste sentido, SANTORO e Colaboradores (1999) relataram variações entre as peçonhas de três subespécies de *Crotalus durissus* (*C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*), provenientes, respectivamente, das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Apesar de serem da mesma espécie, a peçonha da *C.d. cascavella* foi diferente das outras em relação às suas atividades edematogênicas e fosfolipásicas e, também, quanto ao seu conteúdo inorgânico, presença de Crotamina e perfil eletroforético. As variações foram sutis entre as demais subespécies, sendo estas atribuídas a fatores genéticos e/ou ambientais das serpentes (SANTORO et al, 1999).

Posteriormente, Boldrini-França e colaboradores (2010), através de estudos proteômicos, compararam a composição das peçonhas da *C.d. cascavella* e da *C.d. collilineatus*. O estudo revelou a presença de desintegrinas, fosfolipases A2 (PLA₂), serinoproteases, proteínas secretórias ricas em cisteína, fatores de crescimento vascular endotelial, L-aminoácido oxidases, metaloproteinases e outros componentes. As diferenças observadas nas peçonhas foram atribuídas a quantidade de PLA₂ miotóxica, 4,6% do total de proteínas na *C.d. collilineatus* e 18,1% na *C.d. cascavella*, e à presença de Crotamina apenas nas amostras de *C.d. collilineatus*, representando 20,8% do total de proteínas (BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010). Além disso, foi constatada variação na composição das peçonhas dos

espécimes de *C.d. collilineatus*, com ausência de Crotamina em uma das amostras, indicando indivíduos crotamina-positivos e crotamina-negativos (BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010). A menor proporção de PLA₂ nas peçonhas das *C.d. collilineatus* foi atribuída a uma especialização adaptativa, que ocorreu durante a colonização de novos nichos ecológicos, sendo a localização geográfica, bem como os hábitos alimentares, utilizados para explicar tais diferenças (BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010).

No que diz respeito às variações observadas dentro de uma mesma subespécie, DOS SANTOS e colaboradores (2005) avaliaram as atividades coagulante, hemorrágica, edematogênica, miotóxica e fosfolipásica de peçonhas de diferentes amostras de *C.d. ruruima*, provenientes do mesmo local geográfico (estado brasileiro de Roraima). Foram observadas diferenças tanto na coloração como nas atividades biológicas, além de ausência de Crotamina em todas as peçonhas analisadas. Os achados confirmam a variabilidade intrapopulacional em *C.d. ruruima*, podendo explicar a diversidade de sintomas observados em pacientes picados por essa subespécie (DOS SANTOS et al, 2005).

Outro aspecto interessante, é a variação existente entre peçonhas de serpentes jovens e adultas de uma mesma subespécie (SARAVIA et al, 2002; CALVETE et al, 2009). LOMONTE e colaboradores (1983) mostraram que as peçonhas de *C.d. durissus* recém-nascidas eram desprovidas de atividades hemorrágicas e edematogênicas, ao contrário de espécimes adultos. Por outro lado, as peçonhas de recém-nascidos eram mais letais, com maior atividade hemolítica indireta, além de menor atividade proteolítica. Posteriormente, FURTADO e colaboradores (2003) compararam o conteúdo de proteínas, a letalidade e as atividades proteolítica, miotóxica, hemorrágica e fosfolipásica da peçonha de uma serpente *C.d. terrificus* mãe, em relação às seus 15 recém-nascidos. Os resultados mostraram que, embora o conteúdo proteico fosse semelhante, as peçonhas das serpentes jovens exibiam atividades enzimáticas, miotóxicas e coagulantes mais elevadas que às da mãe. Além disso, o estudo mostrou relação direta entre a quantidade de PLA_{2s} na peçonha e o grau de miotoxicidade observado (FURTADO et al, 2003). Portanto, fatores ontogenéticos também influenciam na variedade da composição e das atividades biológicas observadas nas peçonhas ofídicas (LOMONTE et al, 1983; SARAVIA et al, 2002; FURTADO et al, 2003; CALVETE et

al, 2009).

Apesar das diferenças bioquímicas e das atividades tóxicas comentadas anteriormente, ainda são escassos estudos que comparem os efeitos de peçonhas, provenientes de diferentes subespécies de *Crotalus durissus*, na junção neuromuscular, o principal local de ação dessas peçonhas. Um destes estudos foi realizado por CAVALCANTE e colaboradores (2015), onde diferenças nos efeitos paralisantes entre as peçonhas de *C.d. ruruima* e *C.d. cumanensis* foram observados. Assim, a peçonha da *C.d. cumanensis* mostrou exercer tanto efeitos neurotóxicos como miotóxicos, enquanto a da *C.d. ruruima*, apenas neurotóxicos. A neurotoxicidade existente foi atribuída a presença da CTX e a atividade miotóxica à participação de outros componentes, como a Crotamina. Este trabalho mostrou a importância da comprovação funcional da variabilidade entre as peçonhas e, em adição, a necessidade do uso de um *pool* de peçonhas para a produção de antivenenos, para garantir a neutralização do número máximo de toxinas de uma determinada espécie (CAVALCANTE et al, 2015). Em adição, como a CTX representa 65 a 68% do peso seco total em algumas subespécies de *Crotalus durissus* (DOS SANTOS, 2014) e é responsável pelos principais efeitos tóxicos do envenenamento, o estudo desse componente de forma isolada é fundamental.

A CTX foi a primeira toxina isolada de uma peçonha animal, proveniente da serpente *C.d. terrificus* (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938). Sua estrutura foi descrita em 1956 por Fraenkel-Conrat & Singer; trata-se de uma proteína composta por duas subunidades, uma ácida denominada de CA e outra básica conhecida como CB (FRAENKEL-CONRAT & SINGER, 1956; RÜBSAMEN et al, 1971). As subunidades atuam em sinergismo, visto que a CA é uma chaperona, auxiliando a ligação da CB nos sítios alvo das terminações nervosas e do músculo esquelético, prevenindo ligações inespecíficas, e potencializando as ações neurotóxicas e miotóxicas do complexo (RÜBSAMEN et al, 1971; CHOUMET et al, 1996; CARDOSO et al, 2009; CAVALCANTE et al, 2017).

O mecanismo de ação da CTX ainda é pouco conhecido e desperta grande interesse da comunidade científica, pois, além das atividades tóxicas descritas, como a neurotóxica e a miotóxica, apresenta atividades com potencial valor terapêutico, como imunomodulatória, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e analgésica (SAMPAIO et al, 2010). O principal local de ação desta toxina é a junção

neuromuscular, afetando tanto regiões pré como pós-sinápticas (VITAL BRAZIL, 1966; VITAL BRAZIL et al, 1966; VITAL BRAZIL & EXCELL, 1971; VITAL BRAZIL, 1972; CHANG & LEE, 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; BON et al, 1979; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979; RODRIGUES-SIMIONI et al, 1990; DELOT & BON, 1993; CAVALCANTE et al, 2017). Os primeiros estudos farmacológicos, realizados por Vital Brazil e colaboradores (VITAL BRAZIL et al, 1966), mostraram que a CTX promove bloqueio neuromuscular semelhante aos curares, em cães, gatos, coelhos, cobaias e macacos. Em adição, foi observada diminuição da resposta do músculo diafragma de ratos desnervados à acetilcolina, sugerindo uma ação pós-sináptica da CTX (VITAL BRAZIL, 1966; VITAL BRAZIL, 1972). Posteriormente, BON e colaboradores (1979) estudaram os efeitos pós-sinápticos da CTX em eletroplacas isoladas de *Electrophorus electricus* (peixe elétrico da bacia amazônica) e em vesículas ricas em receptores nicotínicos, provenientes de *Torpedo marmorata* (raia elétrica). O estudo mostrou a interação da CTX com as membranas pós-sinápticas, estabilizando o receptor nicotínico no estado dessensibilizado (BON et al, 1979).

As atividades pré-sinápticas da CTX na junção neuromuscular foram demonstradas a partir de estudos eletrofisiológicos (VITAL BRAZIL & EXCELL, 1971; CHANG & LEE, 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1977; RODRIGUES-SIMIONI et al, 1990). A CTX, de forma semelhante a beta-bungarotoxina, promove diminuição da liberação do mediador químico (ACh) na fenda sináptica (CHANG & LEE, 1977). O efeito desta toxina sobre a liberação evocada do neurotransmissor é trifásico, caracterizado por diminuição inicial na liberação, seguida por uma fase transitória de facilitação e posterior bloqueio, onde ocorre ausência completa da transmissão neuromuscular (VITAL BRAZIL, 1972; CHANG & LEE, 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979). Em adição, foram descritas alterações na liberação espontânea, com aumento inicial na frequência de potenciais de placa motora terminal em miniatura (PPTMs), associado a potenciais “gigantes” ocasionais e posterior depressão (VITAL BRAZIL & EXCELL, 1971; CHANG & LEE, 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979). Estudos eletrofisiológicos realizados com a CB demonstraram que esta apresenta perfil semelhante ao complexo CTX, sobre a liberação evocada e espontânea do neurotransmissor. No entanto, o efeito

neurotóxico da CB é menos expressivo, sendo isto resultante de uma perda na especificidade de sua ligação ao sítio alvo, em virtude da ausência da CA (HAWGOOD & SMITH, 1977; HAWGOOD & SANTANA DE SA, 1979; CHANG & LEE, 1977). Os estudos também mostraram que a atividade fosfolipásica é fundamental para o bloqueio neuromuscular (BON et al, 1979; HAWGOOD & SMITH, 1977; MARLAS & BON, 1982; HAWGOOD & SMITH, 1989; HAWGOOD & BON, 1991), sugerindo o ataque enzimático dos fosfolipídios de membrana da terminação nervosa motora (HAWGOOD & SMITH, 1977; CHANG & LEE, 1977).

Em 2017, foram utilizadas outras abordagens experimentais para verificar a ação direta da CTX na junção neuromuscular (CAVALCANTE et al, 2017). Experimentos de video-microscopia em tempo real, que utilizam sondas fluorescentes para monitorar a reciclagem das vesículas na transmissão, mostraram que a CTX e sua subunidade PLA₂, a CB, promovem efeitos bifásicos na exocitose evocada do neurotransmissor, com facilitação inicial transitória seguida de decaimento sustentado. Em adição, estudos radioquímicos revelaram que a CTX e a CB reduzem em 60% e 69%, respectivamente, a liberação evocada de acetilcolina marcada com trítio, mas apenas a CTX diminui a amplitude das contrações musculares em experimentos miográficos realizados em condições semelhantes. Portanto, os resultados mostraram a importância da CB para os efeitos pré-sinápticos da CTX e, também, que estes não são suficientes para explicar a paralisia muscular, ocorrendo uma ação inibidora pós-sináptica em conjunto (CAVALCANTE et al, 2017).

Recentemente, foi proposto a amplificação das atividades tóxicas da CTX nas regiões pré- e pós-sinápticas, devido a ativação de mecanismos endógenos de vias de sinalização celular (BICKLER, 2020). Estes mecanismos, por sua vez, seriam desencadeados pela presença de ácido araquidônico (AA) nos terminais sinápticos. O AA é o principal produto da atividade catalítica de PLA_{2s} endógenas e de PLA_{2s} provenientes de serpentes, como a CTX (BICKLER, 2020). A geração de AA pelas fosfolipases ofídicas mobiliza a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, desencadeando aumento da liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (SRIBAR et al, 2014; BICKLER, 2020). A crescente concentração de Ca²⁺ nos compartimentos pré e pós-sinápticos seria, por sua vez, amplificada por outros mecanismos, tais como a entrada de Ca²⁺ por canais voltagem dependentes

(SRIBAR et al, 2014; BICKLER, 2020).

Achados científicos mostram que o AA é capaz de interagir tanto com proteínas do complexo SNARE quanto inibir o transportador de recaptação de colina, o que contribuiria para o esgotamento da acetilcolina nos terminais pré-sinápticos (BOKSA et al, 1988; BICKLER et al, 2020). Por outro lado, o AA demonstrou ativar a proteína kinase C (PKC) pós-sinápticamente, a qual fosforilaria os receptores nicotínicos da placa motora terminal (SCHAECHTER et al, 1993; BICKLER, 2020). A partir desta fosforilação, os receptores teriam sua atividade inicialmente aumentada, com posterior dessensibilização (VULFIUS et al, 2017; BICKLER, 2020). Um segundo estágio na inativação de receptores nicotínicos, seria decorrente de uma internalização, provocada pelo aumento da atividade de fosfatases sensíveis ao cálcio na região da membrana pós-sináptica (ST JONH & GORDON, 2001; BICKLER, 2020). Tal internalização, desencadearia alterações de origem funcional e morfológica na região da junção neuromuscular (CHIBALIN et al, 2018; BICKLER, 2020).

Pesquisas têm demonstrado que a CTX pode apresentar diferentes isoformas de CA e CB, e que a combinação destas isoformas promove atividades biológicas distintas (FAURE & BON, 1987; FAURE & BON, 1988; FAURE et al, 1991; FAURE et al, 1993; FAURE et al, 1994, FAURE et al, 2011). A partir da identificação da primeira estrutura cristalográfica da CTX, FAURE e colaboradores (2011) mostraram que a estabilidade existente entre as diferentes isoformas de CA e CB poderia ser responsável pela existência de variações em sua toxicidade. Assim, uma lenta dissociação entre as subunidades, resultaria em baixa atividade enzimática e rápido bloqueio da transmissão neuromuscular (FAURE et al, 1993). CAVALCANTE e colaboradores (2015) também confirmaram por meio de estudos miográficos, que estas variações bioquímicas podem implicar em alterações de funcionalidade. Assim, foi demonstrado que CTXs de diferentes subespécies de serpentes do gênero *Crotalus durissus* apresentam variação no tempo para o bloqueio da transmissão neuromuscular (FAURE et al, 1993; CAVALCANTE, 2015).

Posteriormente, a partir do conhecimento acerca da estrutura bioquímica da CTX, FERNANDES e colaboradores (2017) propuseram, através de estudos biofísicos, um novo mecanismo de ação para a toxina, no qual a região N-terminal da subunidade CB seria a primeira a entrar em contato com o alvo biológico. Após esta ligação, a subunidade CA se dissociaria da CTX, tornando acessíveis ao alvo,

tanto o sítio catalítico da CB, como sua região C-terminal, possibilitando a ocorrência de atividades biológicas (FERNANDES et al, 2017).

Apesar dos crescentes avanços no conhecimento do mecanismo de ação da CTX, ainda há a necessidade de maior investimento na área, pois a melhor compreensão da relação estrutura-atividade pode proporcionar benefícios à saúde pública e, conseqüentemente, o melhor conhecimento da variabilidade entre as peçonhas. Assim, tendo em vista que peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* apresentam elevada letalidade, o estudo comparativo da atividade biológica destas substâncias e de CTXs isoladas pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de uma terapia antiofídica mais eficaz, além de ampliar o conhecimento do mecanismo de ação desses compostos.

2. JUSTIFICATIVA

O envenenamento por picada de serpentes é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada, acometendo cerca de 1.8 a 2.7 milhões de pessoas ao redor do mundo (GUTIÉRREZ et al, 2017). As diferentes manifestações clínicas associadas ao envenenamento resultam da existência da variabilidade na composição entre as peçonhas, que pode ocorrer interfamílias, intergêneros, interespécies e intraespécies, sendo as variações individuais, resultantes de fatores relacionados à localização geográfica, alterações de habitat, sazonalidade, dieta, idade e dimorfismo sexual (CHIPPAUX et al, 1991).

No Brasil, a peçonha da serpente *Crotalus durissus* tem sido amplamente estudada. Esta espécie apresenta o maior índice de letalidade entre as serpentes peçonhentas brasileiras e é responsável por cerca de 9% de todos os acidentes ofídicos registrados, perdendo apenas para as serpentes do gênero *Bothrops*, que apresentam distribuição ampla no país e cerca de 30 espécies (PINHO & PEREIRA, 2001; CARDOSO et al, 2009; DOS SANTOS et al, 2014; FURTADO, 2018).

A existência de variações em peçonhas crotálicas foi demonstrada em diferentes estudos (SCHENBERG, 1959; LOMONTE et al, 1983; DOS SANTOS et al, 1993; SANTORO et al, 1999; FRANCISCHETTI et al, 2000; SARAVIA et al, 2002; FURTADO et al, 2003; DOS SANTOS et al, 2005; CALVETE et al, 2009; BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010; CAVALCANTE et al, 2015; DOS SANTOS et al, 2017; CARVALHO et al, 2019). Pesquisas envolvendo seu principal componente tóxico, a CTX, também mostraram que esta exibe variações, tanto em relação às suas atividades biológicas quanto à sua estrutura molecular (FAURE et al, 1993; CAVALCANTE et al, 2015). Além disso, diferentes propriedades terapêuticas têm sido atribuídas à esta toxina, tais como imunomodulatória, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana e analgésica (SAMPAIO et al, 2010).

No entanto, apesar dos crescentes avanços no estudo de peçonhas e toxinas ofídicas, ainda não há estudos comparando os efeitos neurotóxicos e miotóxicos *in vitro* de peçonhas e CTXs de uma mesma subespécie de *Crotalus durissus* de diferentes regiões geográficas. Nesse contexto, o presente estudo comparou, através de técnicas miográficas e morfológicas, os efeitos neuromusculares de peçonhas e CTXs isoladas de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus terrificus*

provenientes de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno (estado de Minas Gerais). Tendo em vista que serpentes do gênero *Crotalus* apresentam elevada letalidade, o estudo comparativo da atividade biológica de suas peçonhas e CTXs, pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de uma terapia antiofídica mais eficaz, além de avançar no conhecimento do mecanismo de ação destes compostos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar as atividades paralisantes e miotóxicas de peçonhas e CTXs isoladas de *Crotalus durissus terrificus* provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, através de técnicas miográficas e morfológicas em preparações neuromusculares de camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar o bloqueio neuromuscular induzido por diferentes peçonhas e CTXs de *Crotalus durissus terrificus* em preparações nervo frênico – músculo diafragma de camundongos;
- Avaliar o aspecto morfológico geral e o índice de mionecrose do tecido muscular exposto as diferentes peçonhas e CTXs, por meio de estudos morfológicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Peçonhas e Crotoxinas

Os *pools* de peçonhas e CTXs isoladas de serpentes da subespécie *Crotalus durissus terrificus* foram fornecidos pela Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias, pesquisadora da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Os mesmos foram provenientes de quatro diferentes regiões do estado de Minas Gerais, sendo estas: Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno (**FIGURA 1**). Cada *pool* foi preparado a partir da mistura das peçonhas e CTXs de 9 a 18 serpentes, sendo disponibilizados na forma liofilizada, e diluídos posteriormente em solução nutriente Ringer para a realização dos experimentos. As peçonhas eram de coloração branca e crotamina-negativas.

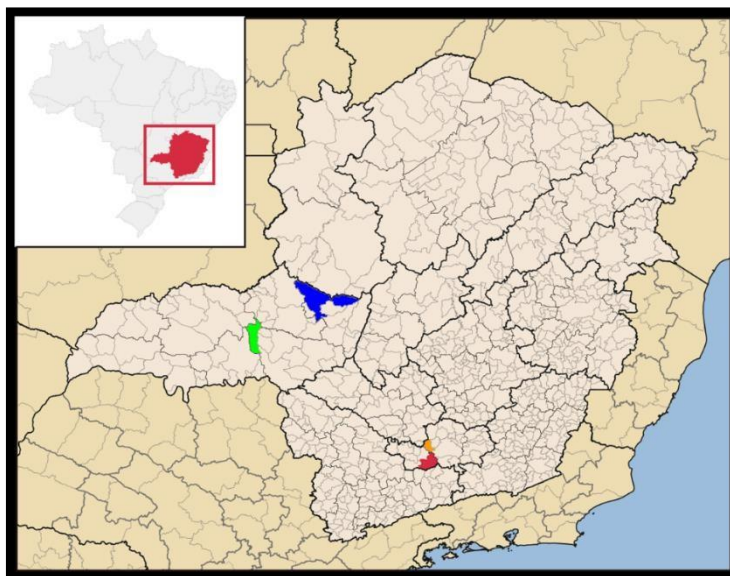


Figura 1: Regiões de origem das peçonhas e CTXs: Carrancas (Vermelho), Patos de Minas (Azul), Nova Ponte (Verde) e Nazareno (Laranja), Minas Gerais – Brasil. **Fonte:** WIKIMEDIA COMMONS. Disponível em: <Image:MinasGerais MesoMicroMunicip.svg> Acesso em 12 de Agosto de 2020 **(Adaptado).**

4.2. Solução Nutriente

Solução fisiológica Ringer contendo: NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 2 mM; NaHCO₃ 15 mM; Na₂HPO₄ 1 mM; CaCl₂ 2 mM; C₆H₁₂O₆ 11 mM.

4.3. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (fêmeas, adultas, pesando entre 20 - 25 g) fornecidos pela FUNED. Estes animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *Ad Libitum*, controle de temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 h/12 h). Todos os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética Local (CEUA 17/2017) e os estudos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular e Toxinologia (LFJT), localizado no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.4. Estudo Miográfico

A atividade das peçonhas e das CTXs sobre o processo de contração muscular foi avaliada através de experimentos miográficos *in vitro*. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e posteriormente exanguinados e submetidos a toracotomia ampla, para o isolamento do nervo frênico-músculo diafragma (BULBRING, 1997). O hemidiafragma (esquerdo ou direito) foi montado em uma cuba para órgãos isolados (contendo 12 mL de solução nutriente Ringer), constantemente aerada com uma mistura gasosa de Carbogênio (95 % O_2 e 5 % CO_2) e mantida a uma temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O nervo frênico foi conectado a um eletrodo de base, enquanto o centro tendíneo do músculo foi posto em contato com um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03), o qual encontrava-se acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50) (**FIGURA 2**). Os registros miográficos foram obtidos por um sistema computacional de aquisição de dados (Gould Sytems, Summit ACQuire e Summit DataViewer).

4.4.1. Protocolo Indireto de Estimulação

As contrações musculares foram evocadas indiretamente. Neste tipo de estimulação, a extremidade livre do nervo frênico é aspirada por um eletrodo de sucção, constituído de platina, acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88) (**FIGURA 2**). Foram deflagrados estímulos de 0,5 milissegundos de duração, 0,2 Hz de frequência e intensidade supramáxima. As preparações foram submetidas a um período de estabilização de 45 minutos, sendo a solução nutriente trocada a cada 15 minutos e as contrações de referência registradas na ausência de qualquer agente.

Após o período da estabilização, uma das substâncias químicas (peçonhas ou CTXs) foi adicionada a preparação, sendo então avaliado o decréscimo percentual das contrações musculares evocadas indiretamente ao longo de 180 minutos. No grupo controle, as contrações foram avaliadas na ausência das referidas substâncias. Os dados obtidos a partir dos registros miográficos foram coletados e os gráficos plotados com o auxílio do Software OriginPro 8.5.

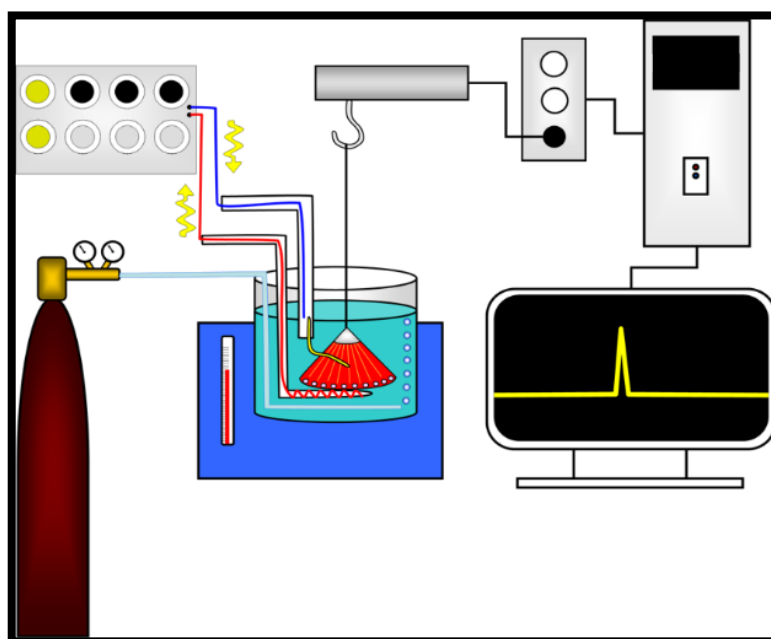


Figura 2: Sistema de Miografia – Protocolo indireto de estimulação. **Fonte:** Acervo Próprio (LFJT).

4.5. Estudo Morfológico

Após o término dos experimentos miográficos, as preparações neuromusculares foram submetidas ao estudo morfológico, para a caracterização da atividade miotóxica das peçonhas e CTXs.

O tecido foi processado para observação ao microscópio óptico, respeitando-se as etapas de fixação (realizada em formaldeído 10%), desidratação (feita em álcool 70%, 80%, 90%, 95%, álcool absoluto e xilol), inclusão em parafina, microtomia, coloração e montagem das lâminas (UFMG, 2018). Os corantes utilizados foram hematoxilina e eosina. As lâminas continham cerca de 8 cortes com 4 μ m cada, os quais foram analisados panoramicamente com a objetiva de 10x. Dentre os 8 cortes,

apenas um foi escolhido para ser fotografado. As imagens foram capturadas considerando 4 diferentes campos do corte histológico, com a utilização da objetiva de 20x. A análise das lâminas foi realizada com o auxílio do microscópio óptico *Axioplan 2 Carl Zeiss* e do software *ImageJ*.

Para a avaliação do aspecto morfológico geral das fibras musculares, foi observada na preparação a disposição morfológica dos núcleos, células e fibras musculares. O tecido foi considerado lesionado quando as células se encontravam com núcleo central, forma arredondada, perda de miofilamentos e cercadas de edema. As células foram contadas individualmente, sendo posteriormente determinado o índice de mionecrose, o qual é calculado a partir da seguinte fórmula (CARREIRO et al, 2018):

$$\text{Índice de Mionecrose} = \frac{\text{Número de células lesadas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Fórmula 1: Cálculo do Índice de Mionecrose. **Fonte:** Carreiro et al, 2018.

A partir dos dados obtidos, foi construído o gráfico considerando-se a média do índice de mionecrose, calculada para cada grupo experimental estudado.

4.6. Análise Estatística

Os resultados experimentais foram agrupados em média e erro padrão da média (E.P.M). As diferenças entre os valores médios foram testadas através de análise estatística baseada nos testes “T Student” e Análise de Variância (ANOVA), complementados com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo Miográfico

5.1.1. Efeito paralisante das peçonhas de *Cdt* (1 µg/mL) em preparações neuromusculares de camundongos.

As peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno, na concentração de 1 µg/mL, promoveram bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (**GRÁFICO 1**). As peçonhas de Carrancas e Nazareno foram diferentes entre si, nos tempos de 15 minutos (91.19 ± 1.14 vs 97.34 ± 0.74 ; $n = 5$), 45 minutos ($84,51 \pm 2,33$ vs $97,88 \pm 2,68$; $n = 5$) e 60 minutos ($72,49 \pm 4,33$ vs $96,43 \pm 5,92$; $n = 5$). O grupo controle não apresentou bloqueio das contrações.

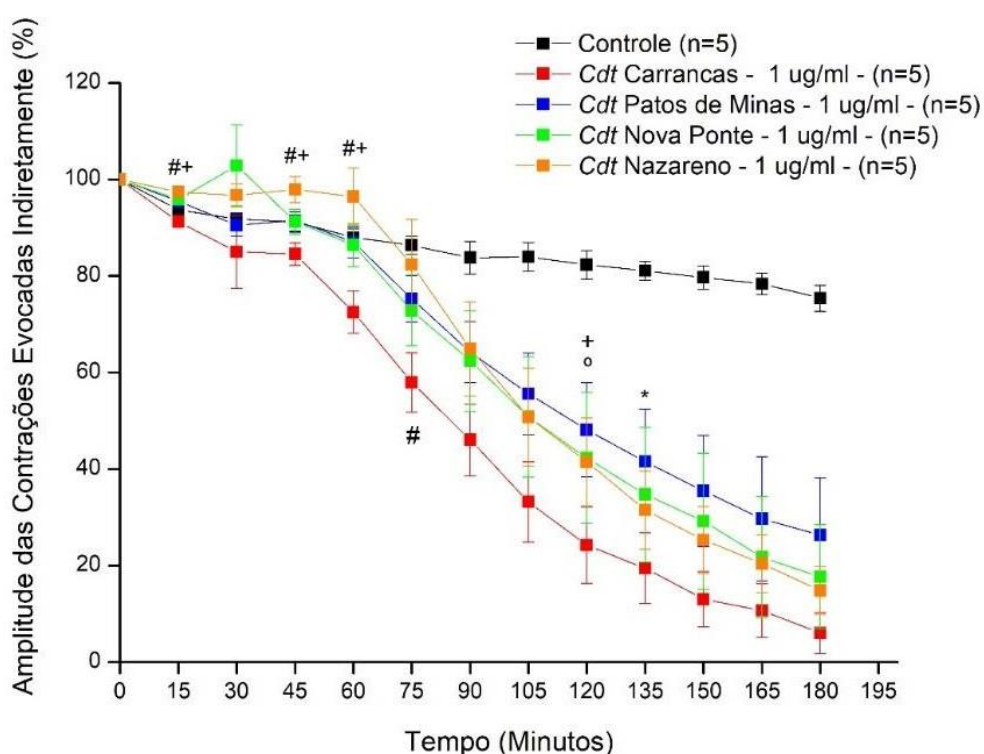


GRÁFICO 1: Efeito das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 1 µg/mL sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A ordenada representa a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em relação à amplitude inicial (valores em porcentagem). A

abscissa indica o tempo em minutos após a adição de cada peçonha ao banho de órgãos isolados. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. #, *, °, + indicam, respectivamente, os pontos a partir dos quais ocorreram diferenças significativas entre as peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno em relação ao controle. #+ indica o ponto em que Carrancas foi diferente de Nazareno ($p < 0,05$).

5.1.2. Efeito paralisante das peçonhas de *Cdt* (5 $\mu\text{g/mL}$) em preparações neuromusculares de camundongos.

As peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, promoveram bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (**GRÁFICO 2**). As peçonhas não apresentaram diferenças entre si, quando comparadas nos diferentes tempos do experimento. O grupo controle não apresentou bloqueio das contrações.

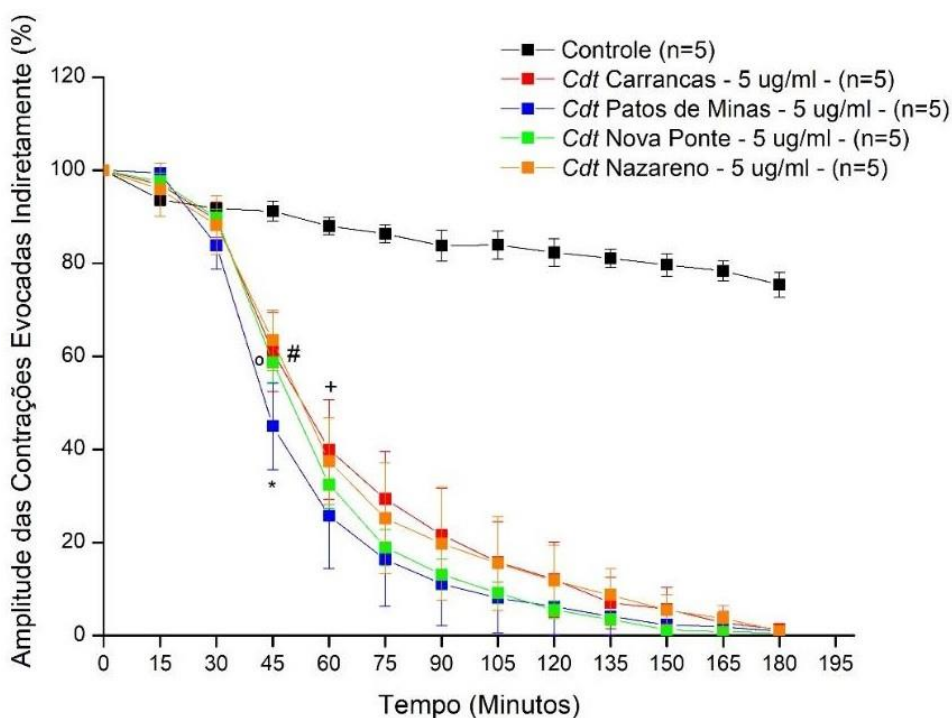


GRÁFICO 2: Efeito das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A ordenada representa a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em relação à amplitude inicial (valores em porcentagem). A abscissa indica o tempo em minutos após a adição de cada peçonha ao banho de órgãos isolados. Os

dados foram agrupados em média \pm E.P.M. #, *, °, + indicam, respectivamente, os pontos a partir dos quais ocorreram diferenças significativas entre as peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.1.3. Efeito paralisante das peçonhas de *Cdt* (10 $\mu\text{g/mL}$) em preparações neuromusculares de camundongos.

As peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, promoveram bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos, quando comparadas ao controle (**GRÁFICO 3**). As peçonhas não apresentaram diferenças entre si, quando comparadas nos diferentes tempos do experimento. O grupo controle não apresentou bloqueio das contrações.

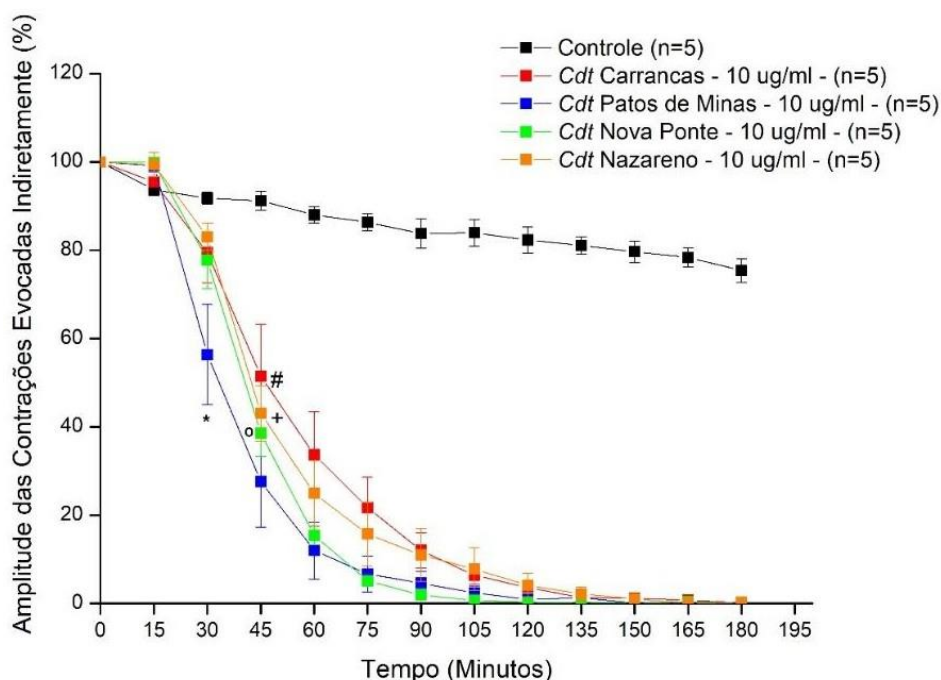


GRÁFICO 3: Efeito das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A ordenada representa a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em relação à amplitude inicial (valores em porcentagem). A abcissa indica o tempo em minutos após a adição de cada peçonha ao banho de órgãos isolados. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. #, *, °, + indicam, respectivamente, os pontos a partir dos quais ocorreram diferenças significativas entre as peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.1.4. Efeito paralisante das CTXs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em preparações neuromusculares de camundongos.

As CTXs das peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno, na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, promoveram bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (**GRÁFICO 4**). As diferenças foram observadas entre Carrancas e Nova Ponte nos tempos de 105 minutos ($56,17 \pm 9,70$; $n = 5$ vs $25,99 \pm 5,84$; $n = 5$), 120 minutos ($46,69 \pm 8,38$; $n = 5$ vs $13,68 \pm 4,18$; $n = 5$), 135 minutos ($32,63 \pm 8,11$; $n = 5$ vs $9,21 \pm 2,86$; $n = 5$) e 150 minutos ($24,85 \pm 7,38$; $n = 5$ vs $3,94 \pm 2,21$; $n = 5$); Carrancas e Patos de Minas em 120 minutos ($46,69 \pm 8,38$; $n = 5$ vs $19,30 \pm 3,16$; $n = 6$); Nova Ponte e Nazareno em 120 minutos ($13,68 \pm 4,18$; $n = 5$ vs $39,56 \pm 8,25$; $n = 5$) e 150 minutos ($3,94 \pm 2,21$; $n = 5$ vs $23,35 \pm 6,18$; $n = 5$) e Patos de Minas e Nazareno em 165 minutos ($0,82 \pm 0,55$; $n = 6$ vs $17,80 \pm 5,06$; $n = 5$). O grupo controle não apresentou bloqueio das contrações.

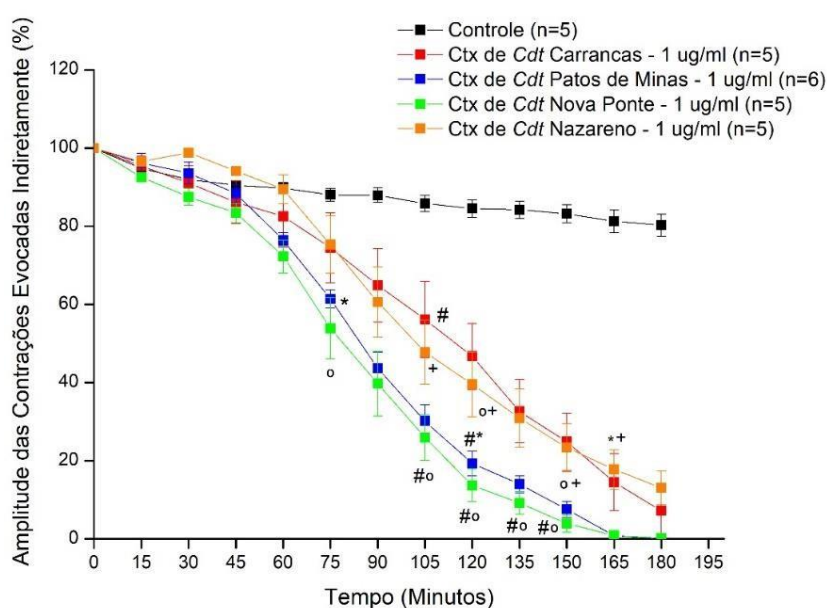


GRÁFICO 4: Efeito das CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* provenientes de diferentes regiões na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A ordenada representa a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em relação à amplitude inicial (valores em porcentagem). A abcissa indica o tempo em minutos após a adição de cada CTX ao

banho de órgãos isolados. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. #, *, °, + indicam, respectivamente, os pontos a partir dos quais ocorreram diferenças significativas entre as CTXs das peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno em relação ao controle ($p < 0,05$). #o indica o ponto em que a CTX de Carrancas difere da CTX de Nova Ponte ($p < 0,05$). #* indica o ponto em que a CTX de Carrancas difere da CTX de Patos de Minas ($p < 0,05$). o+ indica o ponto em que a CTX de Nova Ponte difere da CTX de Nazareno ($p < 0,05$). *+ indica o ponto em que a CTX de Patos de Minas difere da CTX de Nazareno ($p < 0,05$).

5.1.5. Efeito paralisante das CTXs (5 $\mu\text{g/mL}$) em preparações neuromusculares de camundongos.

As CTXs das peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, promoveram bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (**GRÁFICO 5**). Nesta concentração, as CTXs não apresentaram diferenças entre si quando comparadas nos diferentes tempos do experimento. O grupo controle não apresentou bloqueio das contrações.

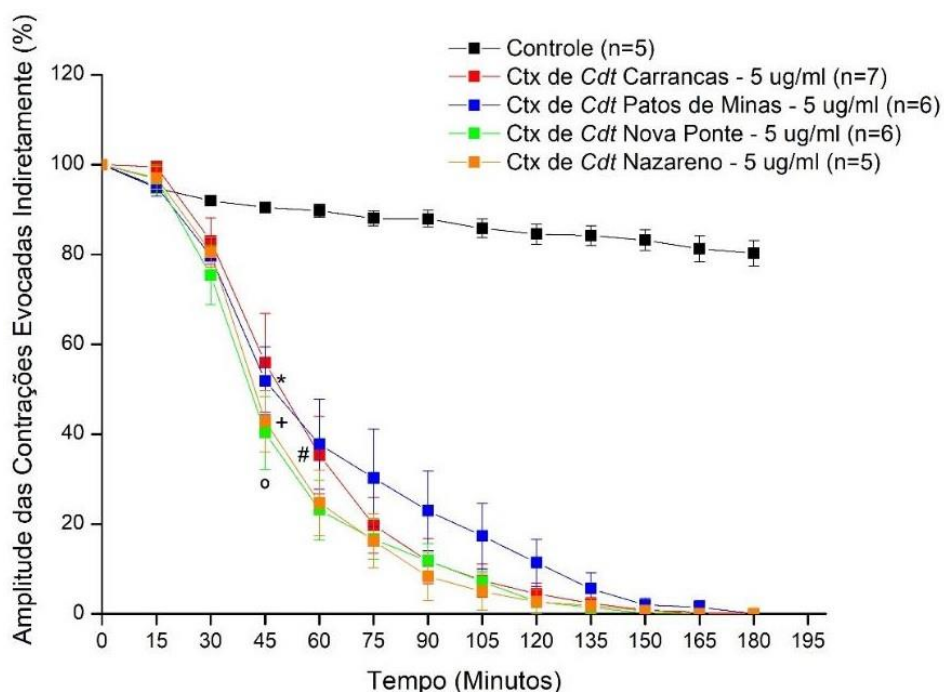


GRÁFICO 5: Efeitos das CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* provenientes de diferentes regiões nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A ordenada

representa a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em relação à amplitude inicial (valores em porcentagem). A abcissa indica o tempo em minutos após a adição de cada CTX ao banho de órgãos isolados. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. #, *, °, + indicam, respectivamente, os pontos a partir dos quais ocorreram diferenças significativas entre as CTXs das peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.2. Estudo Morfológico

5.2.1. Microscopia Óptica

As Figuras de 3 a 7 mostram cortes histológicos dos músculos diafragma de camundongos. Os grupos experimentais controle, representados pela letra A nas figuras de 3 a 7, revelaram músculos com aspecto morfológico normal, fibras poligonais, núcleo periférico, sarcoplasma acidófilo e células delimitadas por uma delicada camada de tecido conjuntivo (endomísio). Os músculos expostos às peçonhas crotálicas por 180 minutos (**FIGURAS 3 a 5**) apresentaram diferenças em relação ao controle nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL para a peçonha da *Cdt* de Patos de Minas (**FIGURAS 3C, 4C e 5C**), 5 e 10 µg/mL, para as peçonhas das *Cdt* de Carrancas (**FIGURAS 4B e 5B**), Nova Ponte (**FIGURAS 4D e 5D**) e Nazareno (**Figuras 4E e 5E**). As alterações morfológicas foram caracterizadas pela presença de células arredondadas, núcleo central, perda de miofilamentos e edema.

Os músculos expostos as CTXs apresentaram alterações morfológicas nas concentrações de 1 e 5 µg/mL para Nova Ponte (**Figura 6D e 7D**) e a partir de 5 µg/mL para Carrancas (**Figura 7B**). As CTXs das peçonhas de Patos de Minas e Nazareno não promoveram alterações morfológicas significativas em relação ao controle.

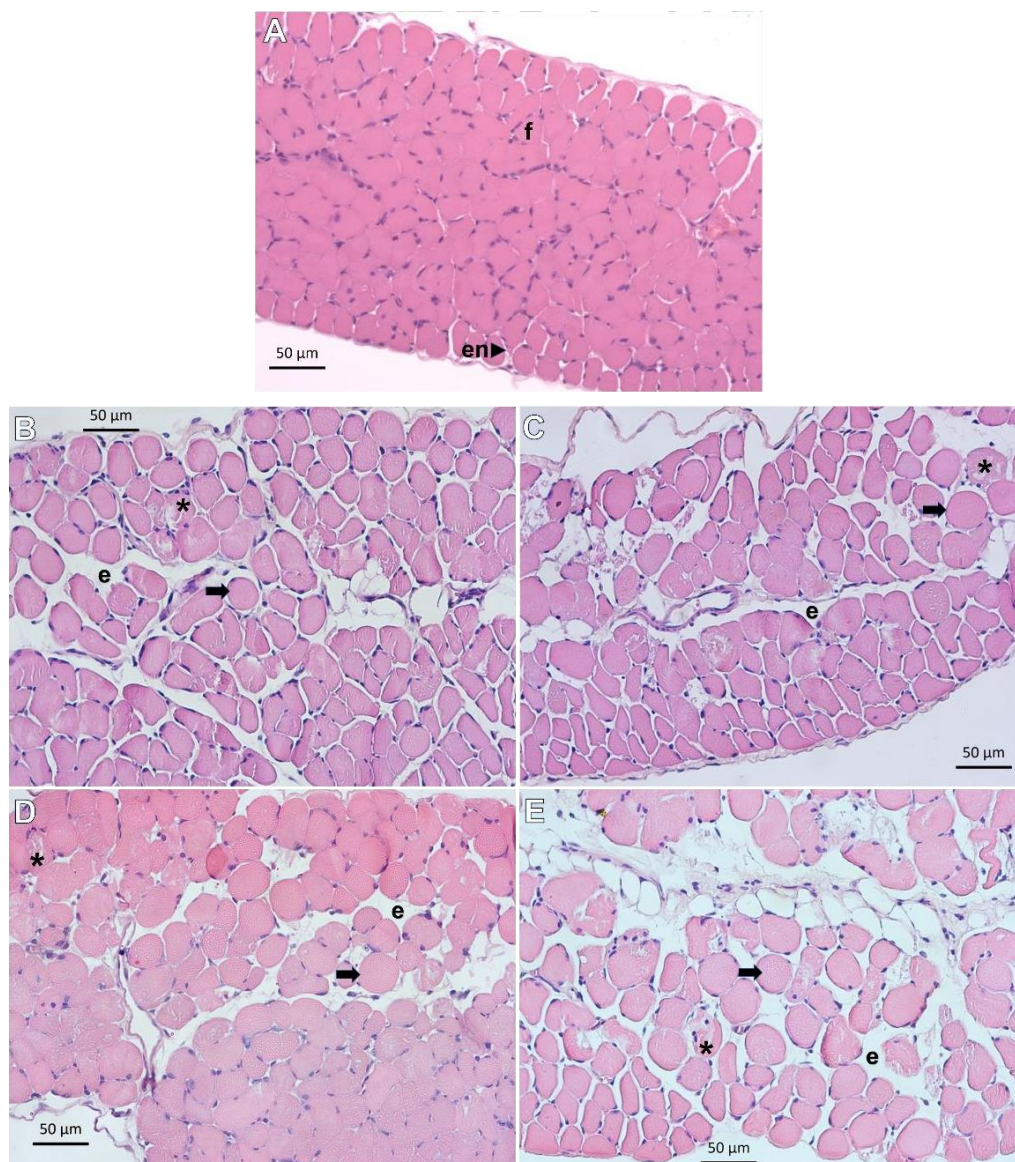


Figura 3: Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina. Detalhes no texto. (A) Controle, (B) Peçonha de Carrancas, (C) Peçonha de Patos de Minas, (D) Peçonha de Nova Ponte, (E) Peçonha de Nazareno. (f) fibras poligonais; (en) endomísio; (e) edema; (seta) fibras arredondadas; (*) perda dos miofilamentos.

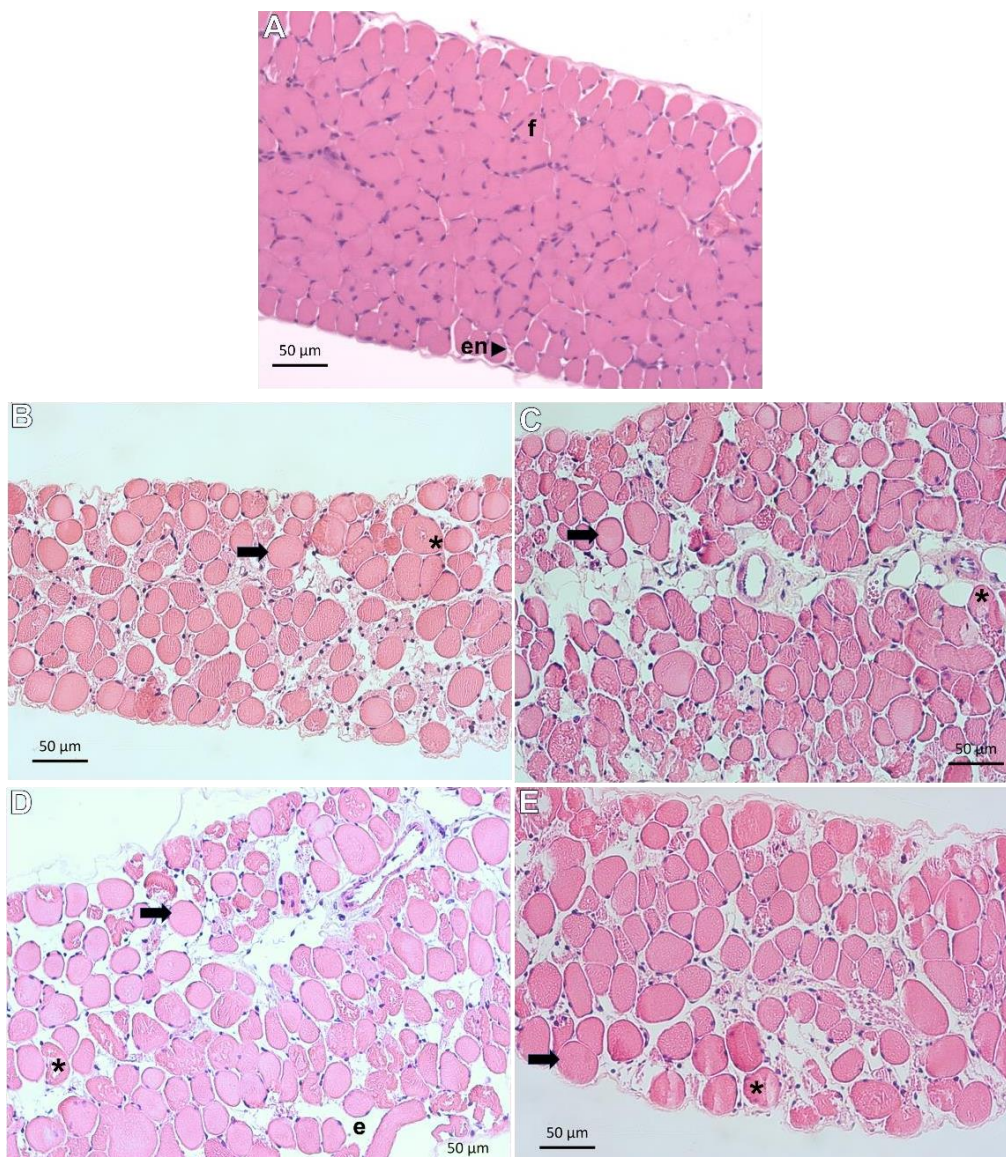


Figura 4: Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina. Detalhes no texto. (A) Controle, (B) Peçonha de Carrancas, (C) Peçonha de Patos de Minas, (D) Peçonha de Nova Ponte, (E) Peçonha de Nazareno. (f) fibras poligonais; (en) endomísio; (e) edema; (seta) fibras arredondadas; (*) perda dos miofilamentos.

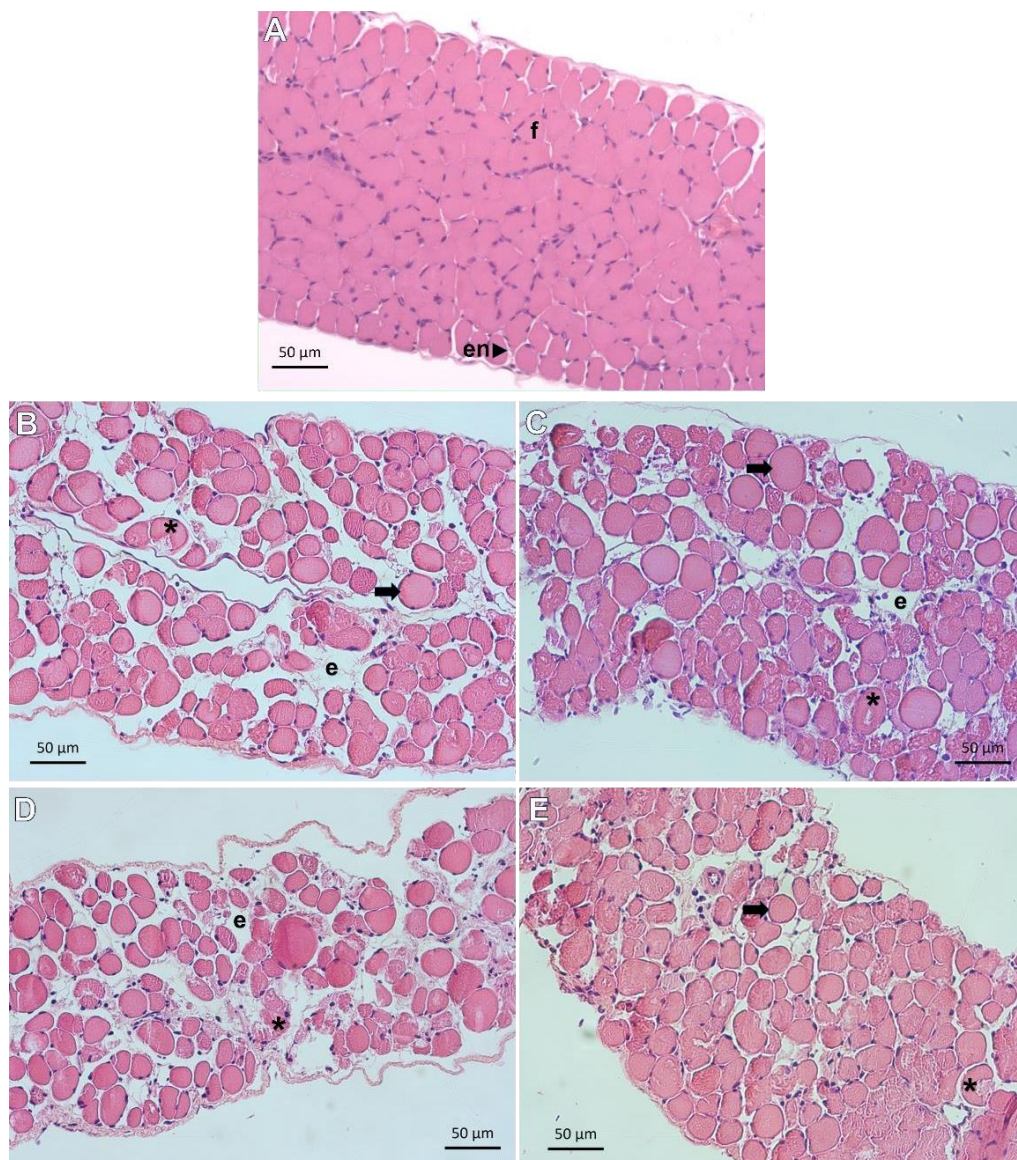


Figura 5: Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (10 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina. Detalhes no texto. (A) Controle, (B) Peçonha de Carrancas, (C) Peçonha de Patos de Minas, (D) Peçonha de Nova Ponte, (E) Peçonha de Nazareno. (f) fibras poligonais; (en) endomísio; (e) edema; (seta) fibras arredondadas; (*) perda dos miofilamentos.

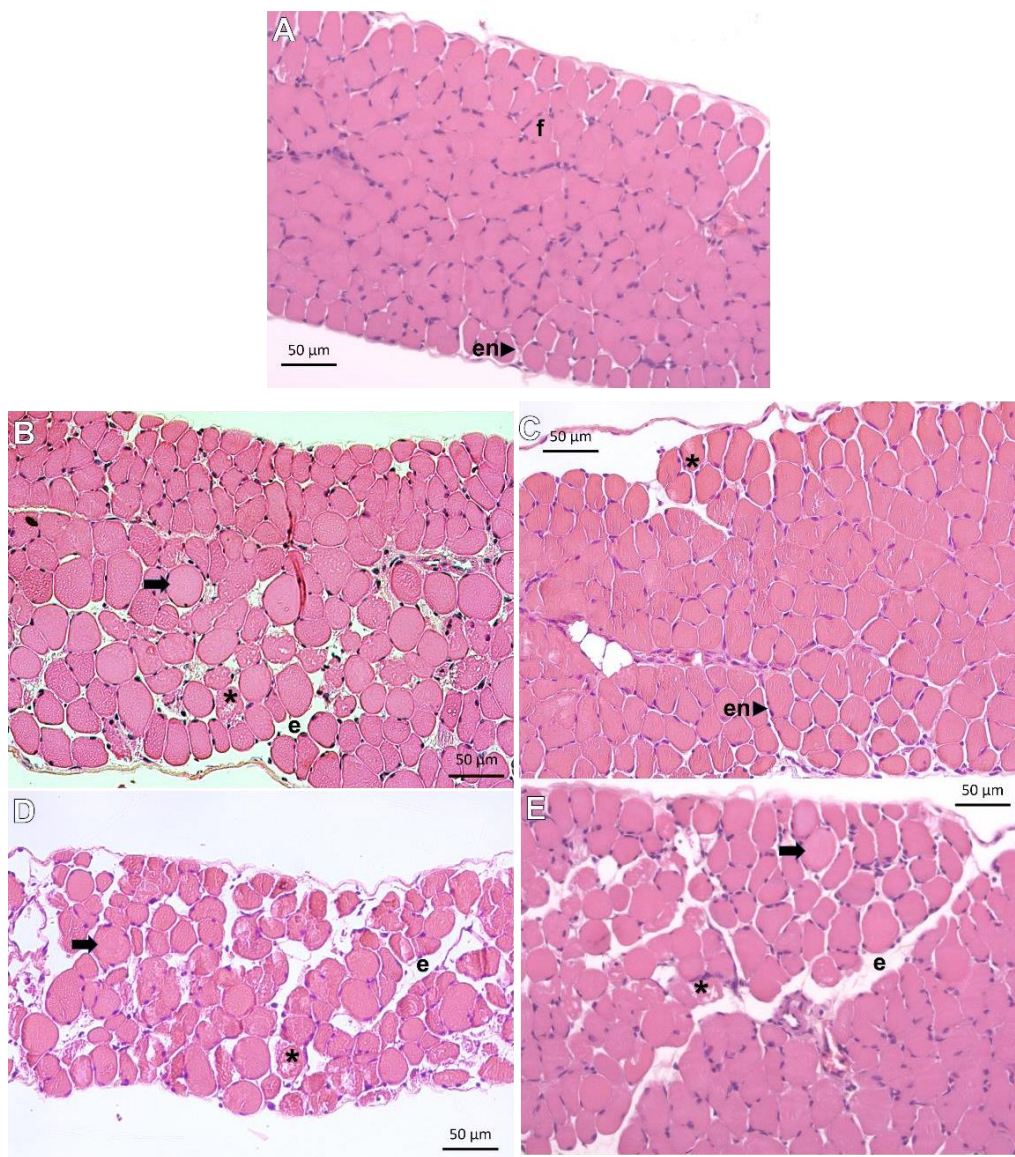


Figura 6: Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina. Detalhes no texto. (A) Controle, (B) CTX de Carrancas, (C) CTX de Patos de Minas, (D) CTX de Nova Ponte, (E) CTX de Nazareno. (f) fibras poligonais; (en) endomísio; (e) edema; (seta) fibras arredondadas; (*) perda dos miofilamentos.

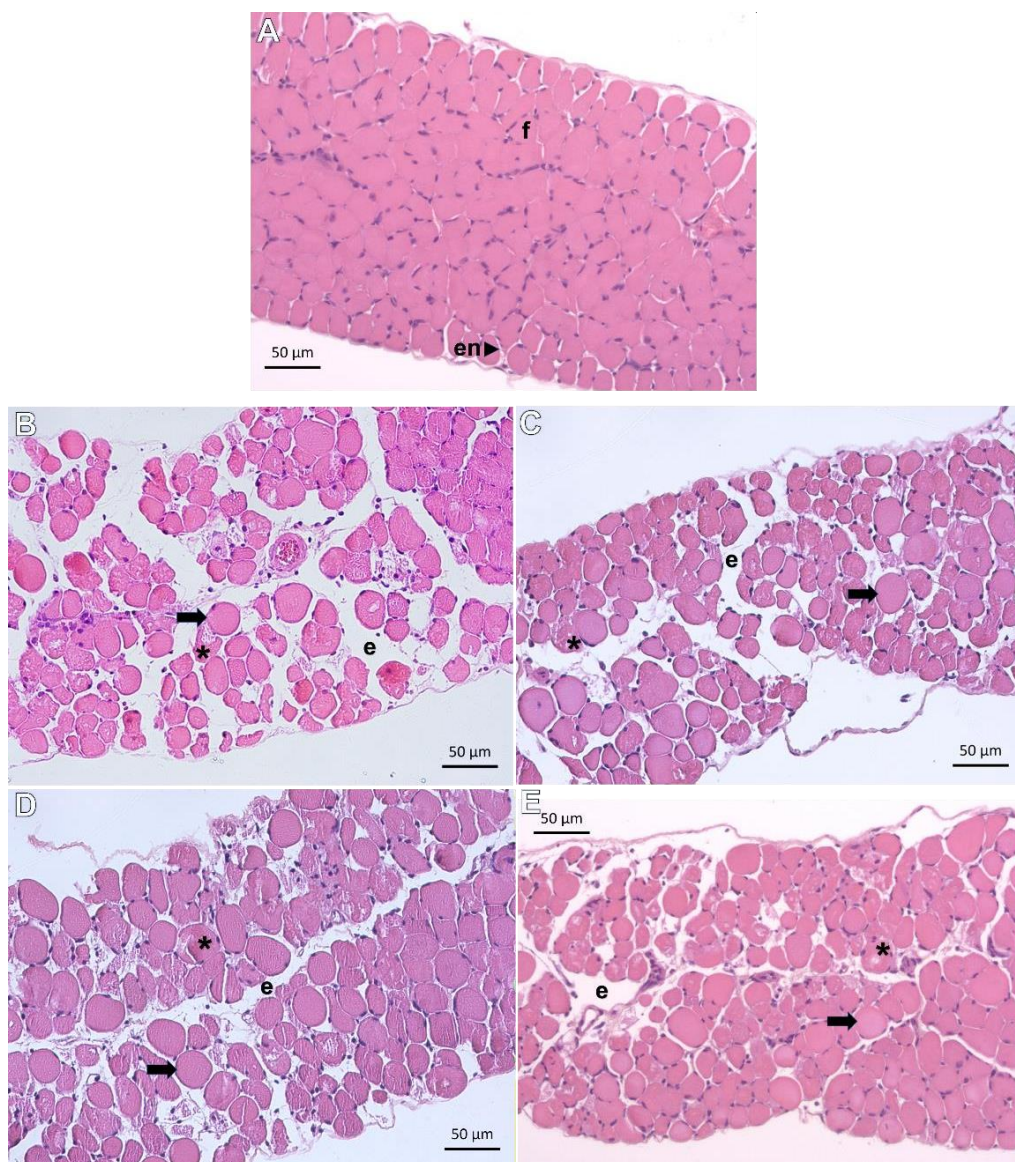


Figura 7: Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos às CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) por 180 minutos – Coloração Hematoxilina/Eosina. Detalhes no texto. (A) Controle, (B) CTX de Carrancas, (C) CTX de Patos de Minas, (D) CTX de Nova Ponte, (E) CTX de Nazareno. (f) fibras poligonais; (en) endomísio; (e) edema; (seta) fibras arredondadas; (*) perda dos miofilamentos.

5.2.2. Índice de Mionecrose

5.2.2.1. Indução da mionecrose pelas peçonhas de *Cdt* em preparações neuromusculares de camundongos.

Na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, apenas a peçonha da *Cdt* de Patos de Minas promoveu aumento significativo do índice de mionecrose em relação ao controle (**GRÁFICO 6**). Os **GRÁFICOS 7** e **8** ilustram o índice de mionecrose de músculos expostos às peçonhas das *Cdt* de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, por 180 minutos. Nestas concentrações os músculos promoveram aumento significativo do índice de mionecrose em relação ao controle, evidenciando lesão nas fibras. Nas concentrações estudadas, as peçonhas não apresentaram diferenças quando comparadas entre si.

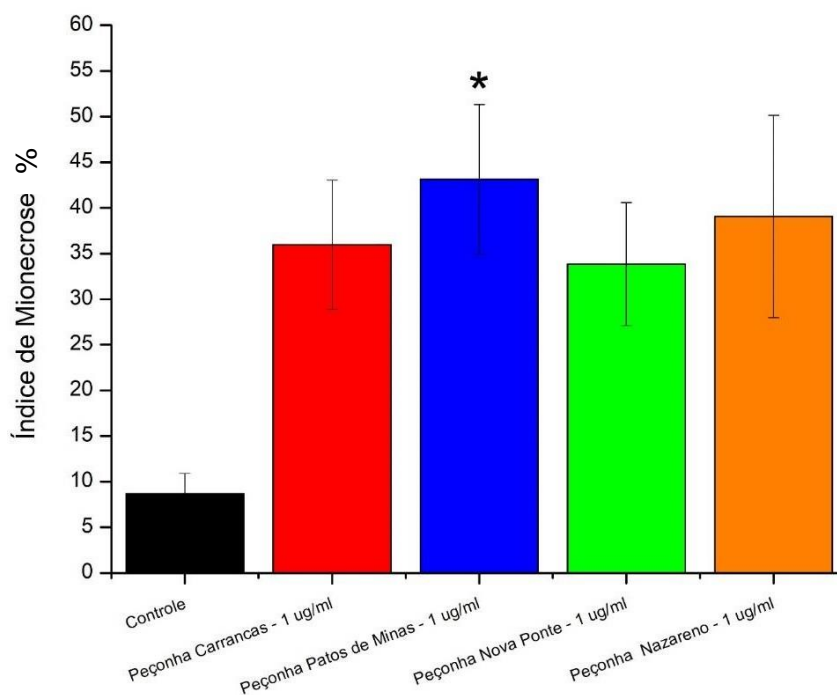


GRÁFICO 6: Indução da mionecrose pelas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 $\mu\text{g/mL}$) em preparações músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. * indica diferença estatística significativa em relação ao controle ($P < 0,05$).

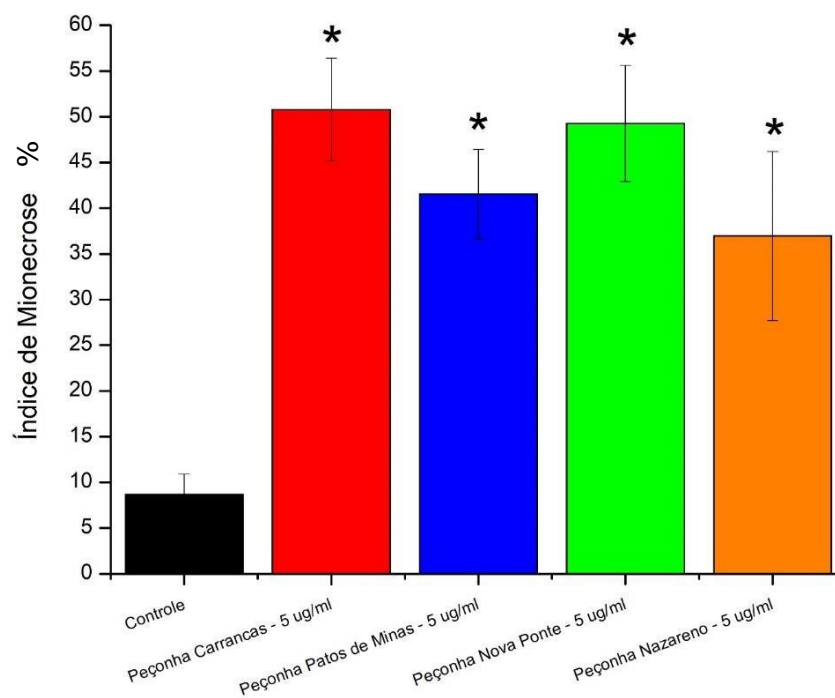


GRÁFICO 7: Indução da mionecrose pelas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média ± E.P.M. * indica diferença estatística significativa em relação ao controle ($P < 0,05$).

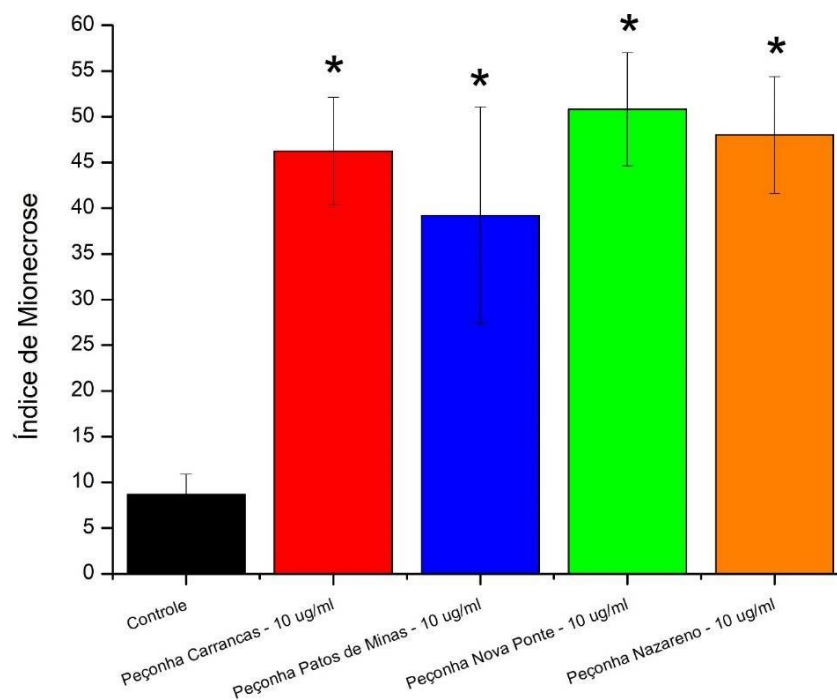


GRÁFICO 8: Indução da mionecrose pelas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (10 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média ± E.P.M. *indica diferença estatística significativa em relação ao controle (P < 0,05).

5.2.2.2. Indução da mionecrose pelas CTXs em preparações neuromusculares de camundongos.

O **GRÁFICO 9** ilustra o índice de mionecrose de músculos expostos às CTXs de diferentes peçonhas de *Cdt* na concentração de 1 µg/mL. Nesta concentração, apenas a CTX de Nova Ponte promoveu aumento significativo neste índice, quando comparada ao controle. Ao elevarmos a concentração para 5 µg/mL, tanto as CTXs de Carrancas como Nova Ponte promoveram alterações significativas em relação ao controle (**GRÁFICO 10**). Nas concentrações estudadas, as CTXs não apresentaram diferenças nos índices de mionecrose quando comparadas entre si.

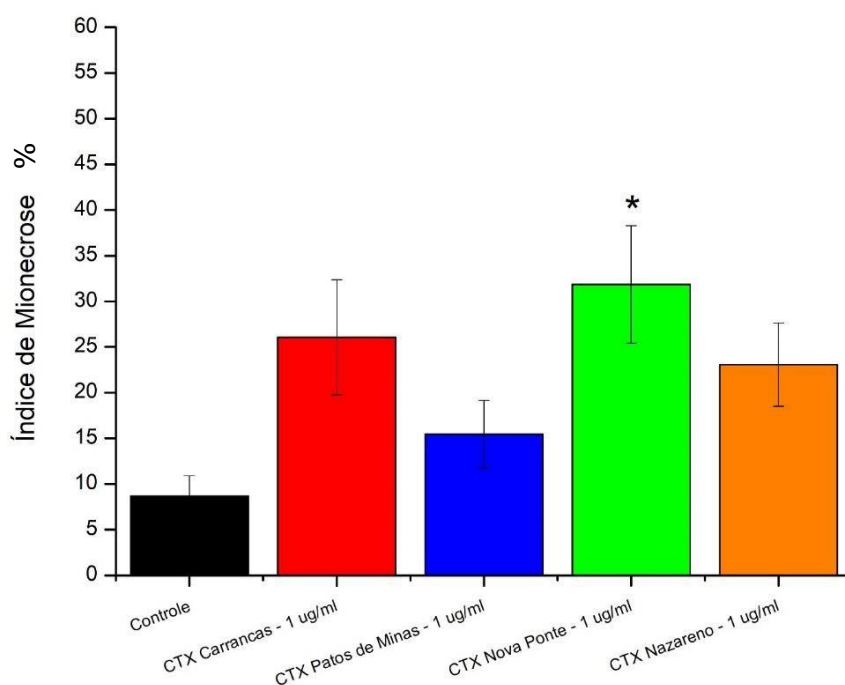


GRÁFICO 9: Indução da mionecrose pelas CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (1 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média ± E.P.M. * indica diferença estatística significativa em relação ao controle (P < 0,05).

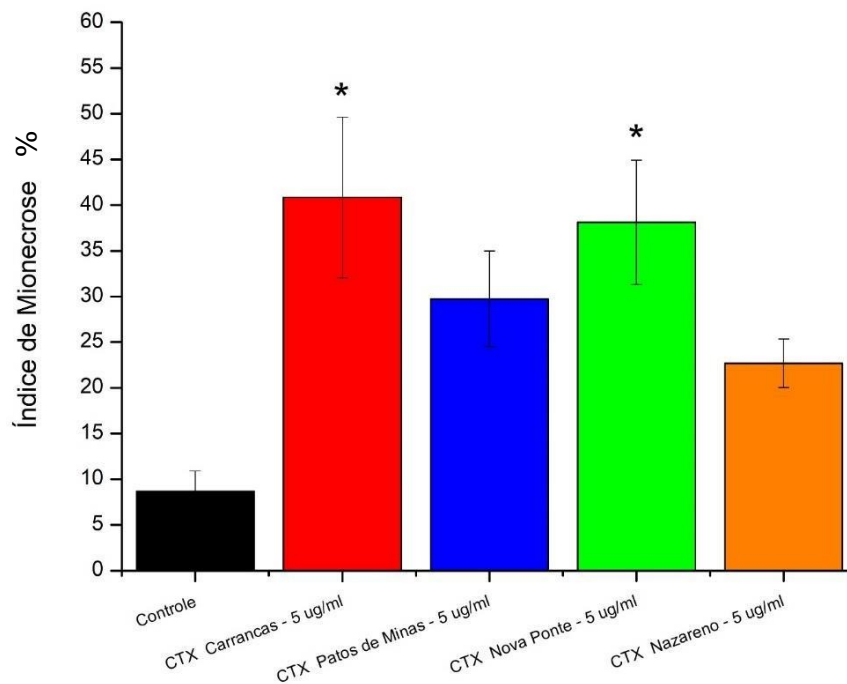


GRÁFICO 10: Indução da mionecrose pelas CTXs de peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (5 µg/mL) em preparações músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média ± E.P.M. * indica diferença estatística significativa em relação ao controle (P < 0,05).

6. DISCUSSÃO

A variabilidade existente nas peçonhas de serpentes pode ter um impacto tanto na pesquisa básica quanto no manejo dos casos de envenenamento, incluindo a seleção de antivenenos e de amostras para a sua produção (CHIPPAUX et al, 1991). As peçonhas das serpentes brasileiras têm sido alvo de uma série de estudos, com parte das pesquisas envolvendo o gênero *Crotalus* e sua subespécie *Crotalus durissus terrificus* (DOS SANTOS et al, 2017). No entanto, apesar dos crescentes avanços, ainda não há dados na literatura que comparem os efeitos biológicos das peçonhas e CTXs de *C.d. terrificus* provenientes de uma mesma região geográfica na junção neuromuscular. Portanto, na etapa inicial deste projeto, comparamos o bloqueio neuromuscular induzido por peçonhas de *C.d. terrificus* provenientes do estado de Minas Gerais (regiões de Carrancas, Patos de Minas, Nova Ponte e Nazareno), em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.

Os resultados iniciais mostraram que as peçonhas das *C.d. terrificus* promovem bloqueio progressivo tempo e concentração dependentes das contrações musculares evocadas indiretamente quando comparadas ao controle. Estes resultados são semelhantes aos demonstrados em estudos anteriores, realizados nas mesmas condições experimentais (BEGHINI et al, 2005; REIS ROSA, 2010; CAVALCANTE et al, 2015, CARVALHO et al, 2019). As concentrações utilizadas no presente estudo foram de 1, 5 e 10 µg/mL. O tempo médio para bloqueio de 50%, 80% e 90% das contrações musculares, foi calculado para cada peçonha e concentração, não sendo estes diferentes quando comparados entre si. Variações entre peçonhas foram observadas apenas na concentração de 1 µg/mL, e em determinados tempos do experimento (15, 45, e 60 minutos). Tais variações ocorreram entre Carrancas e Nazareno podendo estas estar relacionadas à localização geográfica das serpentes. Francischetti e colaboradores (2000) descreveram que peçonhas de espécimes de *Cdt*, provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, variavam em relação ao perfil cromatográfico e às suas atividades proteolíticas, fosfolipásicas e agregantes plaquetárias. Assim, têm-se que Carrancas e Nazareno encontram-se na região sul do estado de Minas Gerais, pertencendo à mesorregião do Campo

das Vertentes. Estes municípios estão situados em uma área de transição entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica, apresentando clima tropical de altitude (TEIXEIRA et al, 2014; MOURA & Z Aidan, 2015; BOTEZELLI et al, 2019). Assim, a ocorrência de pequenas alterações ecológicas nestes ambientes, poderia resultar na variabilidade existente entre as peçonhas (CHIPPAUX et al, 1991; SANTORO et al, 1999; FRANCISCHETTI et al, 2000).

A variação nas atividades biológicas pode decorrer da composição e/ou da proporção de substâncias que compõem as peçonhas. Boldrini-França e colaboradores (2010), ao estudarem peçonhas de *Crotalus durissus* de diferentes regiões do Brasil, observaram variações no proteoma total entre subespécies e, também, em uma mesma subespécie. As variações foram atribuídas, principalmente, às PLA_{2s}. Como o bloqueio neuromuscular induzido pelas peçonhas das *C.d. terrificus* esta diretamente relacionado as atividades tóxicas da CTX, a qual apresenta uma PLA₂ em sua composição, optamos por realizar, posteriormente, o estudo miográfico com as CTXs isoladas de cada peçonha.

As CTXs estudadas induziram bloqueio neuromuscular tempo e concentração dependentes nas concentrações de 1 e 5 µg/mL em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos, sendo resultados semelhantes aos observados em estudos anteriores (BREITHAUPT, 1976; CHANG & LEE, 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; CHANG & SU, 1981; TRIVEDI et al, 1989; FAURE et al, 1993; BEGHINI et al, 2004; BEGHINI et al, 2005; REIS-ROSA et al, 2010; CAVALCANTE et al, 2015). O tempo médio para bloqueio de 50%, 80% e 90% das contrações musculares foi calculado para cada CTX e concentração, não sendo estes diferentes quando comparados entre si. No entanto, variações foram observadas na concentração de 1 µg/mL entre Carrancas e Nova Ponte, nos tempos de 105, 120, 135 e 150 minutos; Carrancas e Patos de Minas, em 120 minutos; entre Nova Ponte e Nazareno em 120 minutos e 150 minutos, e entre Patos de Minas e Nazareno em 165 minutos. Estas diferenças podem estar relacionadas a presença de isoformas da CTX. Estudos bioquímicos revelam a existência de quatro variantes de CA (CA₁, CA₂, CA₃ e CA₄) e quatro de CB (CB_{a2}, CB_b, CB_c e CB_d), que diferem entre si conforme os resíduos de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica (FAURE & BON, 1988; FAURE et al, 1991). As isoformas de CA são resultantes de modificações pós-traducionais no

precursor pro-CA, enquanto as de CB, da tradução de diferentes RNAs mensageiros (BOUCHIER et al, 1991; FAURE et al, 1991; FAURE et al, 1994; FAURE et al, 2011). A associação dessas isoformas possibilita a formação de múltiplos complexos de CTX em uma mesma peçonha de *C.d. terrificus* (FAURE & BON, 1987). Faure e colaboradores (1993) mostraram que os complexos diferem no tempo para o bloqueio neuromuscular. Os autores revelaram a existência de duas classes de complexos: classe I (contendo CB_b, CB_c e CB_d associada a CA), altamente tóxico e enzimaticamente menos ativo, e classe II (contendo CB_{a2} associada a CA), menos tóxico e enzimaticamente mais ativo. As duas classes são capazes de promover bloqueio das respostas contráteis de preparações neuromusculares evocadas indiretamente. No entanto, o bloqueio induzido pelos complexos da classe I é rápido, enquanto o da classe II exige tempo de 2 a 4 vezes maior para atingir a mesma resposta. Dentre as variantes estudadas, o complexo CA₂CB_b foi o que apresentou o menor tempo para o bloqueio de 50% das contrações musculares (FAURE et al, 1993).

A partir de estudos cristalográficos e estruturais teóricos, Marchi-Salvador e colaboradores (2008) mostraram que a subunidade CB pode se organizar na forma tetramérica, através da união de dois heterodímeros constituídos de CB₁ (idêntica a CB_c) e CB₂ (idêntica a CB_{a2}) (MARCHI-SALVADOR et al, 2008; FAURE et al, 2011). Esta conformação poderia potencializar a atividade neurotóxica da CB, devido à criação de novos sítios de ligação, aumentando a afinidade do complexo pelas membranas pré-sinápticas (MARCHI-SALVADOR et al, 2008). Em 2011, FAURE e colaboradores, ao elucidarem pela primeira vez a estrutura cristalográfica da CTX, a partir da CA₂CB_b, demonstraram a importância de resíduos-chave diretamente envolvidos na toxicidade e estabilidade do complexo. Estes resíduos estariam localizados nas regiões de interação entre as subunidades, como os Triptofanos 31 e 70 da subunidade CB que interage com os Aspartatos 89 e 99 da subunidade CA, respectivamente. A interação promove a estabilidade do complexo CA₂CB_b, sendo determinante para a ação sinérgica das subunidades. Assim, uma forte associação entre CA e CB resulta em lenta dissociação das mesmas, baixa atividade enzimática e rápido bloqueio da transmissão neuromuscular, configurando alta letalidade (FAURE et al, 1993; FAURE, 2011). Em 2015, estudos miográficos, comparando CTXs de duas

subespécies de *Crotalus durissus* (*C.d. cumanensis* e *C.d. ruruima*), mostraram diferenças nos perfis de bloqueio neuromuscular. Tais alterações estariam associadas à composição das isoformas CA e CB das CTXs de cada peçonha (CAVALCANTE et al, 2015). Portanto, as variações no bloqueio neuromuscular observadas com as CTXs do presente estudo podem estar relacionadas à presença de diferentes complexos de CTX nas peçonhas. Entretanto, estudos bioquímicos adicionais são necessários para caracterizar as isoformas presentes em cada *pool* de toxina estudado.

Na segunda etapa deste projeto, as preparações submetidas aos experimentos miográficos foram utilizadas para a realização do estudo morfológico. Inicialmente, foram analisados os músculos expostos às peçonhas crotálicas. Na concentração de 1 µg/mL, apenas Patos de Minas promoveu alterações morfológicas significativas em relação ao controle. Entretanto, ao compararmos os músculos expostos às peçonhas entre si, não foram observadas diferenças, mostrando que, apesar do bloqueio neuromuscular ser efetivo após 180 minutos, o dano muscular ainda é baixo nesta concentração. Ao elevarmos as concentrações para 5 e 10 µg/mL, todas as peçonhas promoveram alterações morfológicas significativas em relação ao controle, apresentando fibras lesadas e aumento no índice de mionecrose. Mas, novamente, as peçonhas não apresentaram diferença entre si. É importante destacar que os músculos foram analisados em um tempo fixo, ou seja, após 180 minutos de exposição às peçonhas, portanto, não conseguimos observar variações ao longo do período.

Estudos prévios revelaram que o efeito miotóxico das peçonhas crotálicas decorre de lesão das fibras musculares (OSHIMA-FRANCO et al, 1999; REIS ROSA et al, 2010; CAVALCANTE et al, 2015, CAVALCANTE et al, 2019). Oshima-Franco e colaboradores (1999), ao estudarem os efeitos de peçonhas de *C.d. terrificus* em preparações isoladas de ratos, relataram bloqueio neuromuscular e mionecrose no músculo extensor longo dos dedos. A miotoxicidade foi caracterizada pela liberação de creatina quinase (CK) e por alterações nos padrões morfológicos das fibras musculares. Reis Rosa e colaboradores (2010) descreveram efeito semelhante ao avaliarem a peçonha de *C.d. terrificus* em preparações frênico-diafragma de camundongos, mostrando alterações morfológicas como edema, perda do perfil poligonal das miofibrilas, ruptura do sarcolema, núcleo disperso e células fantasmas (REIS ROSA et al, 2010). Em

2015, Cavalcante e colaboradores (2015), ao realizarem estudos miográficos diretos, mostraram bloqueio das preparações músculo diafragma de camundongos induzido por peçonhas de *C.d. cumanensis*. Como o músculo foi estimulado de forma direta, sem a contribuição do processo de neurotransmissão, a paralisia foi atribuída a miotoxicidade da peçonha. Posteriormente, Carvalho e colaboradores (2019) observaram resposta semelhante com peçonhas de *C.d. terrificus*, além da elevação dos níveis de CK (CARVALHO et al, 2019).

O dano muscular induzido pelas peçonhas crotálicas, conhecido como efeito miotóxico, está relacionado a presença de diferentes substâncias, destacando-se a Crotamina e a CTX (SANTORO et al, 1999; FRANCISCHETTI et al, 2000; FURTADO et al, 2003; CALVETE et al, 2009; BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010; GUTIÉRREZ et al, 2017). Peçonhas de *C.d. terrificus* crotamina-positivas promovem elevada facilitação inicial e posterior bloqueio das contrações musculares em preparações neuromusculares de camundongos (CAVALCANTE et al, 2019; CARVALHO et al, 2019). A Crotamina é uma miotoxina que se liga aos canais de Na^+ sensíveis à voltagem no sarcolema do músculo esquelético, promovendo influxo de íons Na^+ , que leva a despolarização, contração e mionecrose (CHANG & TSENG, 1978; PELLEGRINI FILHO et al, 1978; TU & MORITA, 1983; OGUIURA et al, 2005; PONCE-SOTO et al, 2010). A elevada facilitação não foi observada no presente estudo, pois os *pools* de peçonhas fornecidos pela FUNED eram crotamina-negativos (dados não mostrados). A variação de crotamina nas peçonhas é relatada em diferentes subespécies de *Crotalus durissus* ou até mesmo dentro de uma mesma subespécie (SCHENBERG, 1959; SANTORO et al, 1999; FRANCISCHETTI et al, 2000; CALVETE et al, 2009; BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010). Schenberg (1959) constatou que peçonhas de espécimes de *C.d.terrificus* coletadas ao leste do estado de São Paulo e adjacentes à região de Minas Gerais eram predominantemente crotamina- negativas. Posteriormente, Francischetti e colaboradores (2000), ao analisarem peçonhas de espécimes de *C.d.terrificus*, provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, também demonstraram a ausência deste composto. Como as peçonhas utilizadas no presente estudo são crotamina-negativas, a mionecrose observada decorre, principalmente, dos efeitos da CTX. Portanto, foram analisados neste projeto, os

músculos expostos a CTX por 180 minutos.

Na concentração de 1 µg/mL, apenas as CTXs de Nova Ponte promoveram alterações morfológicas significativas em relação ao controle. Aumentando a concentração para 5 µg/mL, as alterações foram evidentes para as CTXs de Carrancas e Nova Ponte. Contudo, ao compararmos as alterações promovidas pelas CTXs entre si, não observamos diferenças estatísticas em ambas as concentrações. A ausência de variações entre as CTXs pode ser explicada pelas concentrações e técnicas utilizadas. Estudos mostram que elevadas concentrações de CTX promovem bloqueio irreversível das contrações musculares evocadas diretamente (BREIHAUPT, 1976; HAWGOOD & SMITH, 1977; CHANG & SU, 1981; OSHIMA-FRANCO 1999; CAVALCANTE, 2015). Este bloqueio está relacionado ao dano das fibras musculares, ocasionado pela hidrólise do sarcolema induzido pela PLA2 presente no complexo CTX (GOPALAKRISHNACONE & HAWGOOD, 1984). A despolarização da membrana plasmática foi descrita como o primeiro indicador de dano celular, sendo rapidamente seguida por hipercontração de miofilamentos, rompimento da membrana, liberação de CK e, por fim, mionecrose (MELO et al, 2004). Alterações morfológicas das fibras também foram identificadas, sendo estas associadas ao acúmulo de Ca²⁺ no interior da célula (GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD, 1984). Assim como para as peçonhas, é importante destacar que os músculos expostos as CTXs foram analisados em um tempo fixo, após 180 minutos de exposição, portanto, não conseguimos observar variações no final deste período. Além disso, a CTX é o principal componente tóxico das peçonhas das *C.d. terrificus* e seu efeito miotóxico é menos marcante que o neurotóxico, o que justificaria os resultados obtidos tanto para as peçonhas como para as toxinas (BREIHAUPT, 1976; HAWGOOD & SMITH, 1977; CHANG & SU, 1981; CAVALCANTE, 2015; CARVALHO et al, 2019). Portanto, para experimentos futuros, serão utilizadas técnicas miográficas de contração direta que possibilitam a comparação do efeito miotóxico induzido pelas CTXs ao longo do tempo.

Em vista dos dados obtidos em nossa pesquisa, podemos concluir que as variações encontradas entre as peçonhas podem estar relacionadas às diferenças no ambiente ecológico das serpentes, promovendo variação no conteúdo proteico. Já às relacionadas às CTXs, podem ser explicadas com base na existência de diferentes isoformas de CA e CB. Dessa forma, o presente estudo mostra a

importância da comprovação da variabilidade entre peçonhas ofídicas de uma mesma subespécie e, em adição, a necessidade da escolha adequada de espécimes para a produção do soro antiofídico, visando a neutralização do número máximo de componentes tóxicos das peçonhas de uma determinada serpente. Tal observação vai de encontro com o estudo de Boldrini-França e colaboradores (2010), que ressaltou a necessidade da elaboração de *pools* para produção de soro a partir da análise de antivenenos brasileiros contra peçonhas de subespécies de *Crotalus durissus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEGHINI, D.G.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RANDAZZO-MOURAC, P.; RODRIGUES-SIMEONI, L.; NOVELLO, J.C.; HYSLOPC, S.; MARANGONIA, S. **Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom.** *Toxicon*. 2005. 46: 604–611.
- BEGHINI, D.G.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; MARANGONI, S. **Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation.** *Toxicon*. 2004. 43: 255-261.
- BERNARDE, P.S. **Changes in the Brazilian poisonous snake classification and their implications in the medical literature.** *Gaz Méd da Bahia*. 2011. 81(1): 55-63.
- BICKLER, P.E. **Amplification of snake Venom toxicity by endogenous signaling pathways.** *Toxins (Basel)*. 2020. 22;12(2):68.
- BOKSA, P.; MYKITA, S.; COLLIER, B. **Arachidonic acid inhibits choline uptake and depletes acetylcholine content in rat cerebral cortical synaptosomes.** *J. Neurochem*. 1988. 50:1309–1318.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M.M.S.; RODRIGUES, R, S.; TORRE, de la P.; PÉREZ, A. SOARES, A.M.; ZINGALI, R.B.; NOGUEIRA, R.A.; RODRIGUES, V.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. **Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus subspecies* from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management.** *J of Proteo*. 2010. 73(9): 1758-1776.
- BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRNAKEL-CONRAT, H. **Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits.** *Eur. J. Biochem*. 1979.99:471-481.
- BOUCHIER, C.; BOULAIN, J-C.; BON, C.; MÉNEZ, A. **Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor.** *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. 1088: 401-408.

- BOTEZELLI, L.; SOUZA, A.M.; FILETTO, F.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. de.; A, DOUGLAS. **Percepção e comportamento dos visitantes do município de Carrancas - MG em relação aos seus atrativos naturais.** Disponível em: <<http://livrozilla.com/doc/681316/percep%C3%A7%C3%A3o-e-comportamento-dos-visitantes-do-munic%C3%ADpio-de>> Acesso em 29 de Junho de 2020.
- BREITHAUPT, H. **Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A2 and the crotoxin complex.** *Toxicon*. 1976. 14: 221-233.
- BÜLBRING, E. **Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat.** *Brit j pharmacol*. 1997. 120(1): 3-26.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; CID, P.; TORRE, P. de La.; FLORES-DÍAZ, M.; DOS SANTOS, M.C.; BORGES, A.; BREMO, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J.M. **Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus Simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adapte paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America.** *J Proteome Res*. 2010. 9(1): 528-44.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2a ed, 2009.
- 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: 17 de Agosto de 2018.
- CARVALHO, L.H. de.; TEIXEIRA, L. F.; ZAQUEO, K.D.; BASTOS, J.F.; NERY, N.M.; SETÚBAL, S.S.; PONTES, A.S.; BUTZKE, D.; CAVALCANTE, W.; GALLACCI, M.; FERNANDES, C.F.; CELEDÔNIO, S.; RODRIGO, G.; SOARES, A.M.; ZULIANI, J.P. **Local and systemic effects caused by *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, and *Crotalus durissus cascavella* snake venoms in swiss mice.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2019. Vol. 52.
- CAVALCANTE, W.L.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; GALLANCCI, M. **Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*.** *Toxicon*. 2015. 96:46-49.

- CAVALCANTE, W.L.G.; NORONHA-MATOS, J.B.; TIMÓTEO, M.A.; FONTES, M.R.M.; GALLACCI, M.; CORREIA-DE-SÁ, P. **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.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017. 334: 8-17.
- CHANG, C.C. & LEE, J.D. **Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like beta-bungarotoxin.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1977. 296(2):159-168.
- CHANG, C.C & SU, M.J. **A study on the interaction of crotoxin with phospholipase a2, notexin and other presynaptic neurotoxins.** *Br. J. Pharmacol.* 1981. 73, 495-503.
- CHANG, C.C.; TSENG, K.H. **Effect of crotoxin, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle.** *Br. J. Pharmacol.* 1978. 63: 551–559.
- CHIBALIN, A.V.; BENZIANE, B.; ZAKYRJANOVA, G.F.; KRAVTSOVA, V.V.; KRIVOI, I.I. **Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension.** *J. Cell Physiol.* 2018. 233:6329–6336.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation.** *Toxicon.* 1991. 29(11):1279-1303.
- CHOUMET, C.; BOUCHIER, C.; DÉLOT, E.; FAURE, G.; SALIOU, B.; BON, C. **Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A2 from the venom of a South American rattlesnake.** *Adv Exp Med Biol.* 1996. 391:197-202.
- CUNHA, E.M. & MARTINS, O.A. **Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão.** *Rev Ele de Educ e Ciên.* 2012. 2(2): 21-26.
- DELOT, E. & BON, C. **Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes.** *Bioch.* 1993. 32(40):10708-10713.
- DOS SANTOS, M. C.; FERREIRA, L. C. L.; DA SILVA, W. D.; FURTADO, M. D. F. D. **Caracterización de las actividades biológicas de los venenos ‘amarillo’ y ‘blanco’ de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*.** *Toxicon.* 1993. 31(11):1459-1469.

- DOS SANTOS, M.C. **Crotoxina e Crotoxina-Símile isoladas de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* e suas múltiplas atividades biológicas.** *Scien Amaz.* 2014. 3(1):102-115.
- DOS SANTOS, M.C.; ASSIS, E.B.; MOREIRA, T.D.; PINHEIRO, J.; FORTES-DIAS, C.L. **Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region.** *Toxicon.* 2005. 46(8):958-961.
- DOS SANTOS, M.C.S.; DOS SANTOS, I.G.C.; FORTES-DIAS, C.L. **Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima*.** *Scien Amaz.* 2017. 6(1): 42-53.
- FAURE, G. & BON, C. **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.* 1988. 27(2):730–738.
- FAURE, G. & BON, C. **Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*.** *Toxicon.* 1987. 25: 229-234.
- FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MOREGIER, B.; VUILTHORGNE, M.; BON, C. **The origin of diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*.** *Eur. J. Biochem.* 1994. 223 (1):161-164.
- FAURE, G.; GUILLAUME, J.L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. **Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications.** *Biochemistry.* 1991. 30:8074-8083.
- FAURE, G.; HARVEY, A.L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADVANYI, F.; BON, C. **Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action.** *Eur J Biochem.* 1993. 214(2):491-496.
- FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F.A. **Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin.** *J of Mol Biol.* 2011. 412(2): 176-191.

- FERNANDES, C.H.A.; PAZIN, W.M.; DREYER, T.R.; BICEV, R.N.; CAVALCANTE, W.L.G.; FORTES-DIAS, C.L.; ITO, A.S.; OLIVEIRA, C.L.P.; FERNANDEZ, R.M.; FONTES, M.R.M. **Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism.** *Sci Rep.* 2017. 7: 43885.
- FERRARI, C.Z.; RIBEIRO, R.; LIMA, A.M.; CAVALCANTE, W.L.G.; VIEIRA, L.B. **Gyroxin, a toxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, induces a calcium dependent increase in glutamate release in mice brain cortical synaptosomes.** *Neuropeptides.* 2020. 83: 102081.
- FRAENKEL-CONRAT H. & SINGER B. **Fractionation and composition of crotoxin.** *Arch Biochem Biophys.* 1956. 60(1): 64-73.
- FRANCISCHETTI, I.M.; GOMBAROVITS, M.E.; VALENZUELA, J.G.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. **Intraespecific variations in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*).** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000. 127(10): 23-36.
- FURTADO, M. F. D.; SANTOS, M. C.; KAMIGUTI, A. S. **Age-related biological activity of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom.** *J of Venom Animals and Toxins Inclu Trop Diseases.* 2003. 9(2): 186-201.
- FURTADO, M.F.D. **Aspectos sistemáticos e biológicos que atuam na diversidade da composição de venenos em serpentes peçonhentas brasileiras.** Disponível em: <<http://sbherpetologia.org.br/wp-content/uploads/2016/10/11-Venenos-Serpentes-mar%C3%A7o.pdf>> Acesso em: 29 de Dezembro de 2018.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. & B. J. HAWGOOD. **Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction.** *Toxicon.* 1984. 22: 791–804.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J.; HABIB, A.G.; HARRISON, R.A.; WILLIAMS, D.J.; WARRELL, D.A. **Snakebite Envenoming.** *Nat Rev Dis Primers.* 2017. 14(3): 17063.
- HAWGOOD, B. J. & SMITH, J. **The presynaptic action of crotoxin at the murine neuromuscular junction.** *Physiological Society.* 1977. 336–352.
- HAWGOOD, B. 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. Pharmac.* 1977. 61: 597-606.
- HAWGOOD, B.J. & SANTANA DE SA, S. **Changes in spontaneous and evoked**

- release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience*. 1979. 4(2):293-303.
- HAWGOOD, B.J. & SMITH, I.C. The importance of phospholipase A2 in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials at the frog neuromuscular junction. *Toxicon*. 1989. 27(2): 272-276.
- LEMOS, J. C.; ALMEIDA, T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA, A.A.; SIMÕES, M.O.S. **Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba.** *Ver Bras Epidemiol*. 2009. 12(1):50-59.
- LIMA, A.C.S.F.; CAMPOS, C.E.C.; RIBEIRO, J.R. **Epidemiological profile of snake poisoning accidents in the State of Amapá.** *Rev da Soc Bras de Med Trop*. 2009. 3(42): 329-335.
- LOMONTE, B.; GENÉ J.A.; GUTIERREZ, J.M., CERDAS, L. **Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de exemplares adultos y recién nacidos.** *Toxicon*. 1983. 21:379-84.
- MARCHI-SALVADOR, D.P.; CORRÊA, L.C.; MAGRO, A.J.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. **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.** *Prot: Struc, Funct, and Bioinfo*. 2008. 72(3):883-891.
- MARLAS, G. & BON, C. **Relationship between the Pharmacological Action of Crotoxin and Its Phospholipase Activity.** *Eur. J. Biochem*. 1982. 125:157-165.
- MEBS, D. & OWNBY, CL. **Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities.** *Pharmacol Ther*. 1990. 48(2):223-36.
- MELO, P. A.; BURNS, C. F.; BLANKEMEYER, J. T.; OWNBY, C. L. **Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle.** *Toxicon*. 2004. 43:111–119.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>> Acesso em: 29 de Junho de 2020.

- OGUIURA, N.; BONI-MITAK, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. **New view on crotoamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom.** *Toxicon*. 2005. 46(18):363–70.
- OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. **Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin.** *Toxicon*. 1999. 37:1341-57.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. **Ofidismo.** *Rev Assoc Med Bras*. 2001. 47(1): 24-29.
- PINHO, F.O.; VIDAL, E.C.; BURDMANN, E.A. **Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico.** *J Bras Nefrol*. 2000. 22(3):162-168.
- PELLEGRINI FILHO, A.; VITAL-BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; LAURE, C.J. **Toxins: Animal, Plants and Microbial.** *Pergamon Press, Oxford*. 1978. 375–382.
- PONCE-SOTO, L.A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. **Structural and pharmacological characterization of the crotoamine isoforms III-4 (MYX4_CROCu) and III-7 (MYX7_CROCu) isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* venom.** *Toxicon*. 2010. 55:1443-1452.
- REIS ROSA, L.; SILVA, G.A.A.; FILHO, K.A.; SILVA, M.G.; COGO, J.C.; GROPPPO, F.C.; OSHIMA-FRANCO, Y. **The inhibitory effect of *Camellia sinensis* extracts against the neuromuscular blockade of *Crotalus durissus terrificus* venom.** *J Venom Res*. 2010. 1: 1–7.
- RODRIGUES-SIMIONE, L.; HAWGOOD, B.J.; SMITH, I.C. **Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions.** *Toxicon*. 1990. 28(12):1479-1489.
- RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, H. **Biochemistry and Pharmacology of the Crotoxin Complex.** *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak*. 1971. 270: 274 - 288.
- SAMPAIO, S.C.; HYSLOP, S.; FONTES, M.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P.; CURY, Y. **Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin.** *Toxicon*. 2010. 55(6):1045-1060.
- SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; GOLÇALVES, L.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. **Comparison of the biological activities in venoms from**

- three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 1999. 122(1):61-73.
- SARAIVA, M.G.; OLIVEIRA, D. de S.; FILHO, G.M.C.F.; COUTINHO, L.A.S. de A.; GUERREIRO, J.V. **Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos no estado da Paraíba, Brasil, 2005 a 2010.** *Epidemiol e Serv de Saúde.* 2010. 21 (3):449-456.
- SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LÓPEZ, J.C.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. **Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implication.** *Rev. Biol. Trop.* 2002. 50(1): 337-346.
- SCHAECHTER, J.D & BENOWITZ, L.I. **Activation of protein kinase C by arachidonic acid selectively enhances the phosphorylation of GAP-43 in nerve terminal membranes.** *J. Neurosci.* 1993. 13:4361–4371.
- SCHENBERG, S. **Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies.** *Science.* 1959. 129:1361 – 1363.
- SECRETARIA DE SAÚDE. **(Ofídios) Acidente Crotálico.** Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=395>>. Acesso em: 29 de Dezembro de 2019.
- SLOTTA, C.H.; FRAENKEL-CONRAT, M. **Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel.** *Mem. Inst. Butantan.* 1938. 12:505-513.
- SRIBAR J., OBERCKAL J., KRIZAJ I. **Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A (2): An update.** *Toxicon.* 2014. 89: 9–16.
- ST JOHN, P.A.; GORDON, H. **Agonists cause endocytosis of nicotinic acetylcholine receptors on cultured myotubes.** *J. Neurobiol.* 2001. 49:212–223.
- TEIXEIRA, M,D.; DINIZ, J.M.F.D.S.; JUNIOR, F.W.A.J.; FARIA, R.G.F.; PEREIRA, A.A.; SILVA, L.F.M. da.; REIS, A.A. dos.; BRANQUINHO, J.P.S. **Análise da influência de áreas de preservação permanente em cursos d'água como corredores ecológicos no município de Nazareno M.G.** Disponível em: <meioambienteocos.com.br> Acesso em: 29/06/2020.
- TRIVEDI, S.; KAISER, I.I.; TANAKA, M.; SIMPSON, L.L. **Pharmacologic experiments on the interaction between crotoxin and the mammalian**

- neuromuscular junction.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989. 251:490-496.
- TU, A.T.; MORITA, M. **Attachment of rattlesnake venom myotoxin a tosarcoplasmic reticulum: peroxidase conjugated method.** *Br. J. Exp. Pathol.* 1983. 64 (6): 633–637.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. **Técnicas Histológicas.** Disponível em: <<http://depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/histologicabasica.htm>>. Acesso em: 17 de Agosto de 2018.
- VITAL BRAZIL, O. **Neurotoxins from the South American rattlesnake venom.** *J. Formosan Med. Assoc.* 1972. 71: 394-400.
- VITAL BRAZIL, O. **Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action.** *Mem. Inst. Butantan.* 1966. 33: 981-992.
- 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.* 1971. 212 (2): 34-35.
- VITAL BRAZIL, O.; FRANCESCHI, J.P.; WAISBICH, E. **Pharmacology of Crystalline Crotoxin. I. Toxicity.** *Mem. Inst. Butantan.* 1966.33 (3): 973-980.
- VULFIUS, C.A.; KASHEVEROV, I.E.; KRYUKOVA, E.V.; SPIROVA, E.N.; SHELUKHINA, I.V.; STARKOV, V.G.; ANDREEVA, T.V.; FAURE, G.; ZOURIDAKIS, M., TSETLIN, V.I. **Pancreatic and snake venom presynaptically active phospholipases A2 inhibit nicotinic acetylcholine receptors.** *PLOS ONE.* 2017. 12 (10): e0186206.
- WIKIMEDIA COMMONS. **File:MinasGerais MesoMicroMunicip.svg.** 2020. Disponível em: <Image:MinasGerais MesoMicroMunicip.svg> Acesso em: 12 de Agosto de 2020.
- ZAIDAN, R.T. & MOURA, A.B.A.P. de. **Analysis multitemporal and possible impacts of the expansion of forestry eucalyptus in municipality Carrancas - MG, a study for the years 2005, 2008, 2013 and 2015.** Disponível em: <file:///C:/Users/natal/AppData/Local/Temp/11730-Texto%20do%20artigo-49666-1-10-20170116-1.pdf> Acesso em: 29 de Junho de 2020.