

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

ÊMYLLE KAROLINE RAMOS PINTO

**Caracterização funcional e estrutural de toxinas provenientes da
peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e influência do
varespladib**

BELO HORIZONTE

2023

ÊMYLLE KAROLINE RAMOS PINTO

**Caracterização funcional e estrutural de toxinas provenientes da
peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e influência do
varespladib**

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

Orientador: Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante

Coorientador: Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador

BELO HORIZONTE

2023

043

Pinto, Êmylle Karoline Ramos.

Caracterização funcional e estrutural de toxinas provenientes da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e influência do varespladib [manuscrito] / Êmylle Karoline Ramos Pinto. – 2023.

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

Orientador: Walter Luís Garrido Cavalcante. Coorientador: Guilherme Henrique Marchi Salvador.

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

1. Farmacologia. 2. Serpentes. 3. Envenenamento. 4. Fosfolipases A2. 5. Miotoxicidade. I. Cavalcante, Walter Luís Garrido. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



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

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 377 DE EMYLLE KAROLINE RAMOS PINTO

**"Caracterização funcional e estrutural de toxinas proveniente da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*
e influência do varespladib"**

EMYLLE KAROLINE RAMOS PINTO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **16 de novembro de 2023**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Célio José de Castro Júnior - IEP/Santa Casa BH

Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes - IBB/UNESP

Prof. Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador - Coorientador - IBB/UNESP

Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante - Orientador - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Matheus Proença Simão Magalhães Gomes - Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais

Belo Horizonte, 16 de novembro de 2023



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Roberto de Mattos Fontes, Usuário Externo**, em 21/11/2023, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walter Luis Garrido Cavalcante, Professor do Magistério Superior**, em 21/11/2023, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciene Bruno Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 22/11/2023, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Proença Simão Magalhães Gomes, Usuário Externo**, em 22/11/2023, às 23:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Henrique Marchi Salvador, Usuário Externo**, em 29/01/2024, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Célio José de Castro Junior, Usuário Externo**, em 02/02/2024, às 01:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2824388** e o código CRC **112A2ACC**.

Dedico este trabalho à Maria Angélica, Joana e a Rolemberg (*in memoriam*) que sempre acreditaram que a educação transforma o ser humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por abrir caminhos, ser auxílio, conforto e proteção; por me permitir alcançar mais um objetivo de vida. Sei que foi Tu que me sustentastes.

À minha mãe Joana, à minha avó Angélica, aos meus irmãos Ruaney e Maria Eduarda, à minha prima-irmã Amanda, à minha tia Aluana e meus tios Sean e Joana: vocês foram extremamente importantes nessa caminhada. Mesmo distantes, me fortaleceram a todo momento e sempre acreditaram no meu potencial. Agradeço também ao meu tio-pai Berg (*in memoriam*) que com seu amor mostrou que os estudos poderiam me levar a lugares inimagináveis.

Agradeço eternamente à minha psicóloga Emanuely Aguiar por todo o apoio psicológico que começou no mestrado e se estendeu até o doutorado. Seus ensinamentos sobre autoconhecimento, a experiência de ser uma mulher negra na ciência e a realização de pesquisa em um país que muitas vezes não valoriza seus pesquisadores universitários foram fundamentais para que eu alcançasse esta etapa que em algum momento parecia distante: a conclusão do doutorado.

Ao meu companheiro Hernani, obrigada pelo apoio e paciência. Sei que conviver com uma pessoa durante a finalização de um doutorado conciliado com um trabalho de 40h não é fácil. Obrigada por me mostrar que o amor é formado por ações, diálogos, escuta e pelo ato de segurar a mão do outro e ajudá-lo a seguir adiante quando acreditamos que não temos mais forças, tudo isso aliado a ótimas risadas e refeições deliciosas, preparadas por você, é claro.

Meu profundo agradecimento ao Prof. Dr. Walter Cavalcante, meu orientador, que há sete anos gentilmente me acolheu em seu laboratório, oferecendo assistência na bancada, acreditando em meu comprometimento, dedicação e contribuindo para o desenvolvimento do pensamento crítico essencial para esta profissão.

Gostaria de expressar minha gratidão ao Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular e Toxinologia (LFJT), no qual estive envolvida ao longo desses seis anos. Durante esse período, passaram estudantes de mestrado e iniciação científica pelo laboratório, e eles me mostraram o quanto ter uma equipe colaborativa torna a jornada da pós-graduação mais suave e enriquecedora. Thales obrigada pelas fotografias das lâminas!

Ao meu coorientador Guilherme Salvador minha gratidão, que, ao longo do último ano, demonstrou uma paciência admirável ao adaptar-se aos meus horários limitados por conta do trabalho. Sua didática me ajudou a entender docking e dinâmica molecular com mais facilidade.

Aos meus amigos minha eterna gratidão! Vocês que sempre torceram verdadeiramente por mim, longe ou perto, que acompanharam a minha caminhada, acolheram cada choro, risada. Em especial gostaria de citar: Clarinha, Paty, Jeh, Ticia, Jai, Atana, Naty, Maira, Sarinha, Ingrid, Julia, Juh, Loris, Lary, Elis, Thaes, Gena, Felipe, Ana P, Érika, Danni, Klissia, Karine, Kennedy e Lucas, obrigada por me lembrar em cada momento difícil que eu podia contar com vcs.

Aos atuais colegas de trabalho e chefes da Farmácia de Minas, pela compreensão demonstrada em diversos momentos que precisei conciliar minhas responsabilidades na UFMG com o trabalho. Essa colaboração foi fundamental ao longo dessa trajetória!

Agradeço aos pesquisadores colaboradores deste trabalho, Dra. Consuelo Fortes-Dias, Msc. Paula Ortolani que sem dúvida contribuíram para o acontecimento desse trabalho.

Agradeço aos colegas do programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, que forneceram camundongos de teste, pesaram o medicamento em suas balanças de precisão, pelo bate papo nos corredores dos pós e por compartilhar o quão árduo foi fazer pesquisa em um governo que sucateou nossa profissão e tirou todo possível investimento do nosso trabalho. Fomos/somos resistência!

Agradeço aos funcionários do programa Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia e a todos os professores e pesquisadores desse programa.

Agradeço também aos Professores Doutores que fizeram parte da minha banca de Qualificação.

Agradeço às agências de fomento Capes, Fapemig e CNPq.

E agradeço parte do povo brasileiro que na última eleição tornou novamente possível fazer pesquisa no país elegendo um presidente (Lula) que se preocupa e investe em pesquisa. Colegas e futuros colegas vocês terão quatro anos de paz com investimentos e bolsas de pesquisa disponíveis!

“A academia não é o paraíso. Mas o aprendizado é um lugar onde o paraíso pode ser criado” (bell hooks)

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, há aproximadamente 5,4 milhões de picadas por serpentes a cada ano, resultando em 2,7 milhões de envenenamentos e 100.000 mortes. No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* apresentam relevância clínica devido à frequência e à gravidade dos acidentes que ocasionam. Entre as serpentes botrópicas, destaca-se a espécie *Bothrops jararacussu*, cuja peçonha é amplamente estudada e que contém elevada quantidade de fosfolipases A₂ e toxinas relacionadas, tais como a bothropstoxina I e II (BthTX-I e II). Essas toxinas são responsáveis pelos efeitos miotóxicos observados após o envenenamento. Recentemente, o varespladip (LY315920), um inibidor sintético de fosfolipase A₂, tem se mostrado um candidato promissor para neutralizar toxinas de serpentes. Portanto, o presente estudo avaliou a capacidade do varespladib de inibir a ação da BthTX-I através de estudos miográficos e morfológicos, utilizando preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. As preparações foram expostas à BthTX-I, ao varespladib ou ao produto da pré-incubação de BthTX-I/varespladib. Os resultados do presente estudo indicam que o varespladib é capaz de neutralizar os efeitos paralisantes e miotóxicos da BthTX-I. Além disso, foram realizados estudos de bioinformática (*docking* e dinâmica molecular) e os resultados indicam que o varespladib, além de interagir com a BthTX-I, também estabelece interações com a BthTX-II. Essas interações foram observadas tanto no estado monomérico da BthTX-II, em pH neutro, quanto no estado dimérico, pH ácido. Consequentemente, essa evidência sugere que o varespladib é capaz de inibir os efeitos tóxicos da BthTX-II.

Palavras-chave: BthTX-I; BthTX-II; varespladib.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, there are approximately 5.4 million snake bites each year, resulting in 2.7 million poisonings and 100.000 deaths. In Brazil, the genus *Bothrops* snakes are clinically relevant due to the frequency and severity of the accidents. Among the *Bothrops* snakes, the *Bothrops jararacussu* species stands out, whose venom is extensively studied and contains a high quantity of phospholipases A₂ and related toxins, such as bothropstoxin I and II (BthTX-I and II). These toxins are responsible for the myotoxic effects observed after envenomation. Recently, varespladib (LY315920), a synthetic phospholipase A₂ inhibitor, has shown promise as a candidate for neutralizing snake toxins. Therefore, the present study assessed the varespladib's ability to inhibit the BthTX-I toxicity through myographic and morphological studies using phrenic nerve-diaphragm muscle preparations from mice. The preparations were exposed to BthTX-I, varespladib, or the product of the pre-incubation of BthTX-I/varespladib. The results of this study indicate that varespladib can neutralize the paralytic and myotoxic effects of BthTX-I. Furthermore, the bioinformatics results (docking and molecular dynamics) suggest that varespladib, in addition to interacting with BthTX-I, may also establish interactions with BthTX-II. These interactions were observed both in the monomeric state of BthTX-II at neutral pH and in the dimeric state at acidic pH. Consequently, this evidence suggests a potential capacity for varespladib to inhibit the toxic effects of BthTX-II.

Keywords: BthTX-I; BthTX-II; varespladib.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Notificações de acidentes por região no Brasil registrados no Sistema de Informação de Agravo de Notificações (SINAN) em 2021	18
Figura 2 Características de um monômero de fosfolipase A2 secretada do grupo II	21
Figura 3- Estrutura do varespladib em 2D	24
Figura 4 - Microscopia óptica dos músculos diafragma de camundongos expostos a BthTX-I, varespladib ou ao produto da pré-incubação da toxina com o varespladib	Erro!
Indicador não definido.3	
Figura 5 - Representação em <i>cartoon</i> dos ensaios de docking molecular usando BthTX-I e varespladib	35
Figura 6 - Simulação da dinâmica molecular entre os complexos BthTX-I/varespladib	36
Figura 7 - Representação em <i>cartoon</i> do complexo <i>m</i> BthTX-II/varespladib obtida por <i>docking</i>	37
Figura 8 - - Representação em <i>cartoon</i> do detalhamento da interação entre o varespladib e a <i>m</i> BthTX-II	38
Figura 9 - Simulação da dinâmica molecular entre os complexos <i>m</i> BthTX-II/varespladib	39
Figura 10- Representação em <i>cartoon</i> do complexo <i>d</i> BthTX-II/varespladib obtida por <i>docking</i>	40
Figura 11 - Representação em <i>cartoon</i> do detalhamento da interação entre o varespladib e a <i>d</i> BthTX-II em cada monômero	41
Figura 12 – Simulação da dinâmica molecular entre os complexos <i>d</i> BthTX-II/varespladib para cada monômero	42
Figura 13 - RMSD da molécula de varespladib com cada um dos monômeros de <i>d</i> BthTX-II	43
Figura 14 - Etapas de alterações estruturais das PLA ₂ homólogas botrópicas envolvidas na desestabilização de membranas	51
Figura 15 - Diferentes formas de inibição de toxinas PLA ₂ -Lys49 por inibidores descritos na literatura	52
Figura 16 - Disposição dos sítios MDoS e MDiS para a estrutura <i>d</i> BthTX-II	55
Figura 17 - Representação em <i>cartoon</i> dos resíduos putativos MDoS e MDiS da <i>d</i> BthTX-II	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito paralisante da BthTX-I em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	31
Gráfico 2- Efeitos da BthTX-I, varespladib, e do produto da pré-incubação BthTX-I + varespladib em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	32
Gráfico 3 - Índice de Mionecrose dos músculos expostos a BthTX-I, varespladib ou ao produto da pré-incubação da toxina com o varespladib	34

ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

Asp – Aspartato

ATP – Adenosina trifosfato

BaspTX-II – Miotoxina II derivada da *B. asper*

BthTX-I – Bothropstoxina – I

BthTX-II – Bothropstoxina – II

Ca²⁺ – Cálcio

CS – Célula satélite

DMSO – Dimetilsulfóxido

ECA – Enzima conversora da angiotensina

EM – Energia de minimização

DTNs – Doenças tropicais negligenciadas

Fab – Fragmentos de imunoglobulina

Gly – Glicina

GROMACS – Máquina Groningen para simulação química

HE – Hematoxilina eosina

His – Histidina

IgG – Imunoglobulina G

IM – Índice de mionecrose

JNM – Junção Neuromuscular

K⁺ – Potássio

Kd – Constante de dissociação

kDa – Quilodaltons

kcal – Quilocaloria

kJ – Quilojoule

MDiS – Sítio hidrofóbico de ruptura na membrana

MDoS – Sítio de ancoragem na membrana

MjTX-I – Miotoxina-I derivada da *B. moonji*

MjTX-II – Miotoxina-II derivada da *B. moonji*

μM – Micromolar

Na^+ – Sódio

nAChR – Receptores nicotínicos de acetilcolina

nm – Nanomolar

Ns – Nanosegundo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PLA₂ – Fosfolipases A₂

PLA_{2s} – Fosfolipases A₂ secretadas

PrTX-III – Piratoxina III

RMSD – Raiz quadrada do erro-médio (Root mean square deviation)

Tyr – Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
<i>1.1 Relevância do estudo das peçonhas ofídicas</i>	<i>16</i>
<i>1.2 Epidemiologia</i>	<i>17</i>
<i>1.3 Envenenamento Bothrópico</i>	<i>18</i>
<i>1.4 Tratamento</i>	<i>19</i>
<i>1.5 Fosfolipase A₂ (PLA₂)</i>	<i>20</i>
<i>1.6 Inibidores de PLA₂</i>	<i>23</i>
2. Erro! Indicador não definido.6	
<i>2.1 266</i>	
3. Erro! Indicador não definido.7	
<i>3.1 277</i>	
<i>3.2 Toxinas e Inibidores</i>	<i>27</i>
<i>3.3 Solução Nutriente</i>	<i>27</i>
<i>3.4 Estudo Funcional (Técnica Miográfica)</i>	<i>27</i>
<i>3.4.1 Registro Das Contrações Indiretas</i>	<i>28</i>
<i>3.4.2 Protocolo Experimental</i>	<i>28</i>
<i>3.5 Estudo Morfológico</i>	<i>28</i>
<i>3.6 Análise Estatística</i>	<i>29</i>

<i>3.7 Docking e Simulações de Dinâmica Molecular</i>	29
---	----

4. Erro! Indicador não definido.1

4.1 311

<i>4.1.1 Influência da BthTX-I sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos</i>	31
--	----

<i>4.1.2 Influência do varespladib sob o efeito paralisante da BthTX-I em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos</i>	32
--	----

4.2 Estudo morfológico 33

<i>4.2.1 Influência do varespladib sobre o efeito miotóxico da BthTX-I em preparações músculo diafragma de camundongos.</i>	33
---	----

4.3 Docking e simulações de dinâmica molecular 35

4.3.1. BthTX-I e varespladib 35

4.3.2. BthTX-II e varespladib 37

5. Erro! Indicador não definido.4

6. Erro! Indicador não definido.7

7. Erro! Indicador não definido.8

8. 666

<i>8.1 Artigos Publicados</i>	66
-------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do estudo das peçonhas ofídicas

Peçonhas ofídicas despertam o interesse de toxicologistas há anos, pois possuem moléculas importantes na elucidação de processos fisiológicos e farmacológicos (Rosenfeld, 1971; Kaiser *et al*, 1990; Lomonte *et al*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2017; Lomonte, 2023). Como exemplos, a compreensão de estruturas da membrana celular, as funções das proteínas envolvidas na sinalização e transmissão sináptica, bem como a identificação e caracterização do receptor nicotínico e de subtipos específicos de canais iônicos (Clark *et al.*, 2019). Além disso, tais investigações auxiliam o desenvolvimento da terapia antiofídica.

As peçonhas de serpentes mostraram seu papel como agente terapêutico através de estudos com peptídeos potencializadores de bradicinina, isolados da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. Estes peptídeos possibilitaram a descoberta do primeiro inibidor oral da enzima conversora da angiotensina (ECA), o captopril (Cushman; Odetti, 1991; Ferreira, 1998), levando a evolução do tratamento de pacientes com hipertensão e insuficiência cardíaca. Além disso, um marco nos estudos dos receptores nicotínicos (nAChR) foi o isolamento da α -bungarotoxina da peçonha da *Bungarus multicinctus* pelos farmacologistas Chang e Lee (1963). Devido à elevada afinidade pelo receptor, foram observadas as capacidades da toxina como ligante e marcador de nAChR do tipo muscular, além de auxiliar na purificação do receptor, possibilitando a clonagem (Dutertre *et al.*, 2017).

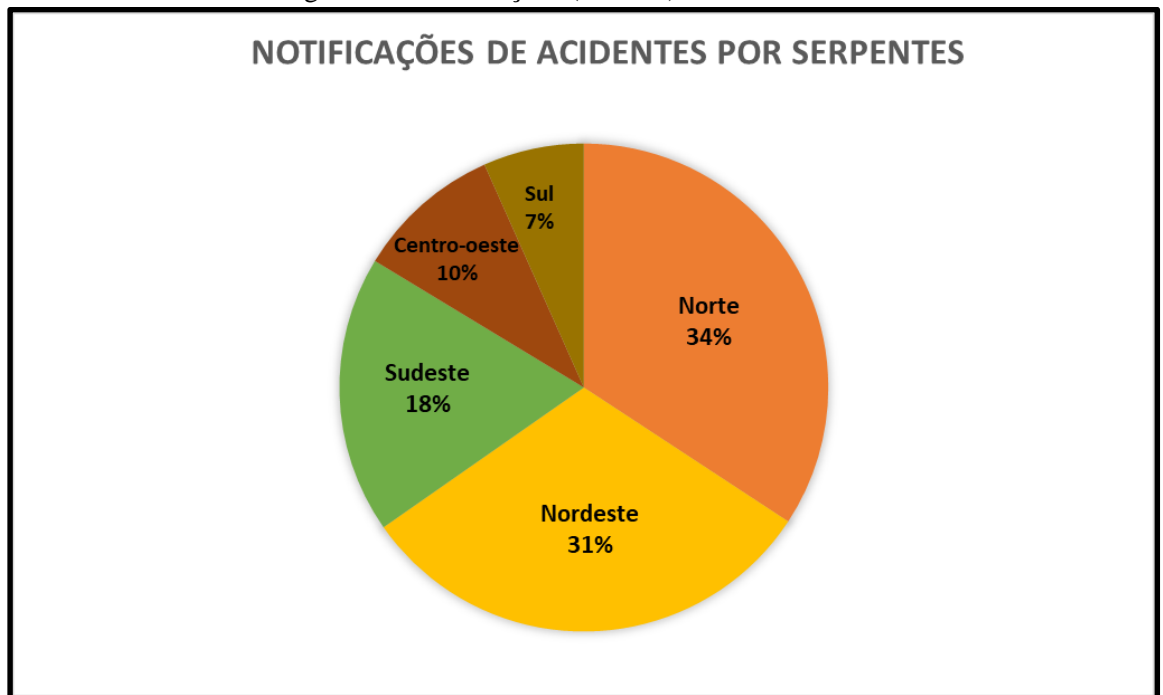
O papel das toxinas no campo das ciências, juntamente com o contínuo desenvolvimento de metodologias “-ômicas” (transcriptômica, proteômica), voltadas para a caracterização qualitativa e quantitativa dessas substâncias, permitiu a descoberta e a descrição de toxinas com propriedades específicas. Isso evidencia que tais toxinas constituem ferramentas úteis na identificação de novos alvos para a ciência e medicina celular (Gutiérrez *et al.*, 2017; Clark *et al.*, 2019). Além disto, como a junção neuromuscular é o principal alvo de peçonhas e toxinas ofídicas, devido às propriedades neurotóxicas e miotóxicas, o estudo dessas substâncias no âmbito da farmacologia da junção neuromuscular constitui ferramenta importante para auxiliar no avanço da terapêutica dos envenenamentos causados por serpentes.

1.2 Epidemiologia

No ano de 2013, os acidentes ofídicos foram removidos da lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019). Entretanto, em 2017, retornaram devido a elevada prevalência e agravamento clínico que ocasionam em países tropicais e/ou em desenvolvimento (Chippaux, 2017). A OMS priorizou cerca de 20 doenças e grupos de doenças que têm em comum o impacto nas comunidades pobres (OMS, 2019). No mundo, aproximadamente 4,5 a 5,4 milhões de pessoas sofrem picadas de serpentes e, destas, 1,8 a 2,7 milhões evoluem para incapacitações clínicas e 81 a 138 mil morrem devido às complicações (OMS, 2023). Em razão disso, a OMS estipulou como meta a redução pela metade do número de mortes e agravos provocados pelo envenenamento ofídico até o ano 2030. Para tal, algumas estratégias foram propostas, como a prevenção dos acidentes através da conscientização da população, fortalecimento dos sistemas de saúde, aumento de parcerias e provisão de tratamento seguro e eficaz (OMS, 2019).

No Brasil, em 2021, foram registrados 30.400 casos e 148 mortes (Brasil, 2023). As regiões norte e nordeste do país apresentaram o maior número de notificações (**Figura 1**; Brasil, 2023). Os acidentes ofídicos ocorrem principalmente no período quente, entre setembro e março, e estão relacionados ao aumento da atividade do trabalhador rural no campo. A faixa etária mais acometida varia de 15 a 49 anos, prevalecendo o sexo masculino e o acometimento dos membros inferiores (de Oliveira *et al.*, 2009). As serpentes de importância médica do Brasil são as do gênero *Bothrops*, responsáveis por 87% das notificações, seguidas pelas dos gêneros *Crotalus* (8%), sendo raros os acidentes causados por *Lachesis* e *Micrurus* (Pinho; Pereira, 2001; de Oliveira *et al.*, 2009; Brasil, 2021).

Figura 1- Notificações de acidentes por região no Brasil registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN) em 2021



Referência: Brasil, 2023. Disponível em:
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>

1.3 Envenenamento Botrópico

O gênero *Bothrops* abrange mais de 60 espécies distribuídas do norte do México até o sul da Argentina. O Brasil contém mais de 36 espécies, sendo a espécie *Bothrops jararacussu* a maior serpente do gênero, capaz de produzir e inocular grande quantidade de peçonha e causar acidentes graves (Melgarejo, 2009). As serpentes botrópicas habitam ambientes úmidos (matas e áreas cultivadas), assim como regiões propícias à proliferação de roedores, zonas rurais e os arredores de centros urbanos. Têm hábitos noturnos e são consideradas as serpentes mais agressivas encontradas no Brasil (Melgarejo, 2009).

O envenenamento botrópico é caracterizado por sintomas locais, sendo as manifestações clínicas rápidas e intensas como edema de tonalidade violácea, devido a sangramento subcutâneo, dor na região da picada ou membro acometido, linfadenomegalia, equimoses, bolhas, inflamação local, necrose e síndrome compartimental (França; Málaque, 2009). Em alguns casos são observados efeitos sistêmicos, como alterações cardiovasculares, hemorragias e choque hipovolêmico (Rosenfeld, 1971; França; Málaque, 2009). O acidente pode evoluir para perda tecidual permanente e até amputação do membro afetado, devido a isquemia do tecido muscular causada por fatores hemorrágicos ou miotoxinas que afetam diretamente o

músculo (Mebs; Owby, 1990; dos Santos *et al.*, 1992; Gutiérrez; Lomonte, 1995; Gutiérrez; Owby, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2017).

As miotoxinas são amplamente encontradas nas peçonhas botrópicas, sendo até 30% do total de proteínas nas serpentes *Bothrops jararacussu* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988). Estas toxinas são responsáveis pelas lesões musculares locais observadas nos acidentados (Lomonte *et al.*, 2003). Além disso, em preparações neuromusculares isoladas, a peçonha da *B. jararacussu* exibe atividade paralisante, caracterizada pelo bloqueio neuromuscular, que resulta primordialmente dos efeitos de dano muscular promovido pelas miotoxinas (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983).

1.4 Tratamento

As ações tóxicas das peçonhas ofídicas podem atingir órgãos e sistemas, de modo direto, mediante liberação de substâncias farmacologicamente ativas, ou indireto, por alterações de processos endógenos em resposta ao envenenamento (Azevedo-Marques *et al.*, 2009; Bickler, 2020). A variabilidade das peçonhas das serpentes decorre de diversos fatores, destacando-se: ontogenéticos, geográficos, dieta, idade e dimorfismo sexual (França; Málaque, 2009; Galizio *et al.*, 2018). As manifestações clínicas do envenenamento decorrem de distúrbios fisiológicos e bioquímicos nas vítimas, destacando-se sintomas neurotóxicos, miotóxicos e hematotóxicos (MS, 2023).

Há um século, a administração parenteral de antivenenos é o único tratamento eficaz para reverter os efeitos letais provocados pelo envenenamento por animais peçonhentos (Gutiérrez *et al.*, 2017; OMS, 2023). Em 1984, Albert Calmette foi o primeiro cientista a utilizar essa terapia em pessoas envenenadas por serpentes (Calmette, 1984). Porém, a descoberta da especificidade do soro antiofídico coube a Vital Brazil, pois a eficácia estava relacionada à especificidade para o gênero da serpente que causava o acidente (Wen, 2009).

Atualmente, o antiveneno é formado por imunoglobulinas provenientes de cavalos que foram expostos a peçonhas de uma ou várias espécies de serpentes, seguida pela coleta do sangue hiperimune e subsequente purificação das imunoglobulinas (Wen, 2009). Dependendo da metodologia de fracionamento empregada, o constituinte ativo pode ser moléculas inteiras de IgG ou fragmentos de imunoglobulina F(ab)₂ e Fab, precipitadas através de ácido caprílico, seguidas da digestão com enzimas pepsina ou papaína, respectivamente (Wen, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2010). Apesar dos antivenenos serem produzidos em vários países, em alguns,

principalmente aqueles de menor desenvolvimento socioeconômico, há a carência desse recurso terapêutico (Gutiérrez *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2017; Bermúdez-Méndez *et al.*, 2018). O processo de fabricação do antiveneno é caro e trabalhoso, necessita de manutenção constante de animais em cativeiro, tanto cavalos como serpentes. As serpentes são manipuladas para a obtenção das peçonhas e os cavalos recebem este material no sangue, podendo ocorrer a morte destes animais no processo. Além destes fatores, há a exigência de uma cadeia de frios para o armazenamento e o transporte dos antivenenos (Gutiérrez *et al.*, 2017; Bermúdez-Méndez *et al.*, 2018).

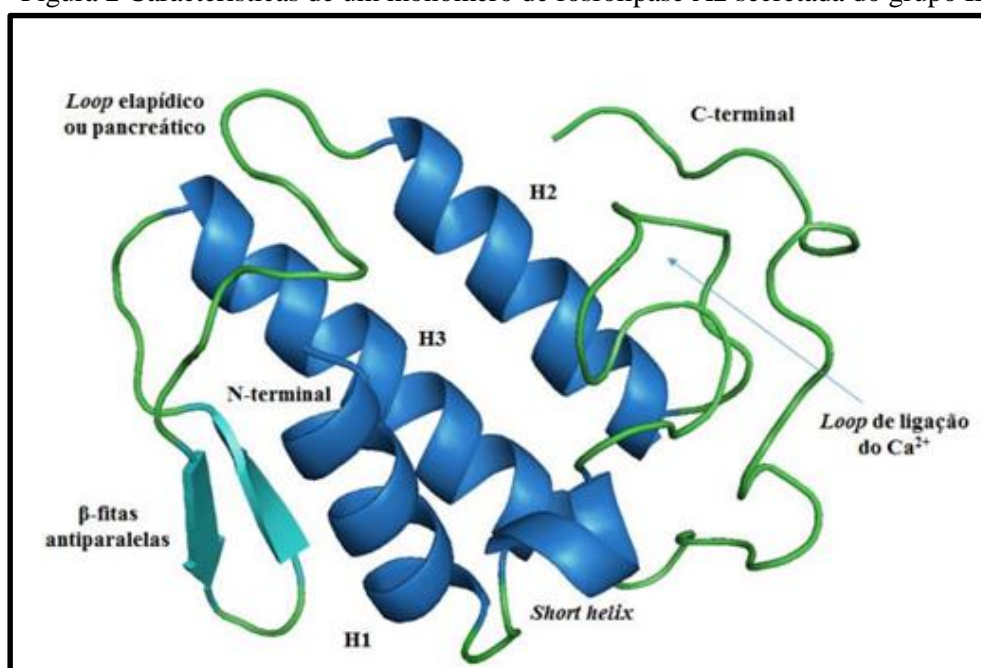
Outro aspecto importante é a limitada eficácia dos soros antiofídicos em neutralizar o dano tecidual provocado por peçonhas ricas em fosfolipases A₂ (PLA₂) miotóxicas. Isso impulsiona a demanda por tratamentos complementares a soroterapia, destacando a investigação de pequenas moléculas capazes de neutralizar miotoxinas (Melo *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 2015; Lewin *et al.*, 2016; Salvador *et al.*, 2019; Lomonte, 2023; Salvador *et al.*, 2023). Portanto, novas estratégias de imunização e tratamentos complementares são requeridas para melhorar a eficácia, segurança e acessibilidade aos antivenenos (Bermúdez-Méndez *et al.*, 2018).

1.5 Fosfolipase A₂ (PLA₂)

As PLA₂ (EC 3.1.1.4) são enzimas que hidrolisam glicerofosfolipídeos na posição sn-2 da ligação acil, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos (Dennis *et al.*, 2011). Os tamanhos das moléculas variam de 14 a 18 kDa e, usualmente, apresentam 5 a 8 pontes de dissulfeto, dependência do íon Ca²⁺ e uma díade catalítica formada pelos aminoácidos His-Asp, importante para o mecanismo de ação da enzima (Murakami *et al.*, 2015; Burke e Dennis, 2009a). São divididas em grupos de acordo com o mecanismo catalítico e características funcionais e estruturais (Kini, 1997; Burke e Dennis, 2009a; Burke e Dennis, 2009b). As fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂s) são encontradas em dois grupos: grupo IB, constituído pela sPLA₂ pancreática humana e os grupos IA e II, representados pelas PLA₂s de peçonhas ofídicas (Burke e Dennis 2009b). As proteínas ofídicas apresentam tamanho variável, com aproximadamente 14 kDa e ligações de dissulfeto na molécula (Dennis *et al.*, 2011). Podem ser encontradas nas formas de monômero, dímero, trímero ou hexâmero, e combinadas com subunidades enzimáticas ou não enzimáticas (Bickler, 2020). As PLA₂s ofídicas do grupo I são encontradas em peçonhas de serpentes da família *Elapidae* (do Velho Mundo), enquanto as do grupo II na

família *Viperidae*, que engloba o gênero *Bothrops* (Lomonte; Križaj, 2021). As PLA₂s s ofídicas do grupo I apresentam como característica estrutural duas longas α -hélices (H2 e H3) antiparalelas, mantidas por ligações dissulfeto (Arni; Ward, 1996; Ward *et al.*, 1998). Estruturas conservadas são observadas nas proteínas dos grupos I e II (**figura 2**), como α -hélice da região N-terminal, hélice curta (*short helix*), loop de ligação de Ca²⁺, loop pancreático ou elapídico (apenas nas proteínas do grupo I), β -fitas antiparalelas (*β -sheet* ou *β -wing*) e extensão C-Terminal, sendo todas essas orientações variáveis (Murakami; Arni, 2003; Magro *et al.*, 2009).

Figura 2 Características de um monômero de fosfolipase A2 secretada do grupo II



Referência: Cardoso, 2016.

No grupo II podemos encontrar as PLA₂s miotóxicas, que são subdivididas em dois subtipos: (I) as miotoxinas com resíduo de ácido aspártico conservado na posição 49 e são cataliticamente ativas, denominadas de PLA₂s-Asp49 (Kaiser *et al.*, 1990; Arni; Ward, 1996) e (II) as PLA₂s com substituição do resíduo de aspartato por outros aminoácidos, como a lisina, e são cataliticamente inativas, sendo denominadas de PLA₂-Lys49 ou PLA₂ homólogas ou “PLA₂-like” (Rufini *et al.*, 1992; Gutiérrez; Lomonte, 1995; Ownby 1998).

A primeira PLA₂-Lys49 foi identificada em 1984 a partir da peçonha da serpente *Agkistrodon p. piscivorus* (Mocassim d’água), a qual continha uma substituição do resíduo de aspartato na posição 49 por lisina (Maraganore *et al.*, 1984; Maraganore; Henrikson, 1986). Posteriormente, um número crescente de proteínas semelhantes foi descrito em peçonhas viperídicas. Até o momento, mais de 80 proteínas desse tipo foram descritas, indicando que

constituem um subgrupo amplo, embora não estejam presentes em todas as peçonhas de viperídeos (Lomonte *et al.*, 2023). Dentre as toxinas PLA₂-Lys49 descobertas, uma das mais estudadas é a Bothropstoxina-I da *Bothrops jararacussu* (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

Estudos iniciais relataram que as PLA₂-Lys49 possuíam atividade enzimática reduzida (Maraganore *et al.*, 1984; Maraganore; Henrikson, 1986); no entanto, a ausência dessa atividade só foi determinada a partir de técnicas de mutagênese sítio dirigida utilizando proteínas recombinantes, que revelaram a incapacidade das PLA₂s-Lys49 de catalisar a hidrólise de fosfolipídios (Ward *et al.*, 2002; Petan *et al.*, 2007). A partir de análises de estruturas cristalográficas de diferentes PLA₂-Lys49 (ver Ward *et al.*, 1998) foi possível observar que essas proteínas funcionam por meio de um mecanismo independente de Ca²⁺, devido a impedimentos estéricos causados pelo átomo N ζ do resíduo de lisina na posição 49, que ocupa a mesma posição que o íon Ca²⁺ em proteínas PLA₂s-Asp49 catalíticas, impedindo assim a coordenação desse cofator (Ward *et al.*, 1998), além de outros fatores estruturais, como a modificação do *loop* de ligação do íon cálcio (Fernandes *et al.*, 2010).

Apesar de serem cataliticamente inativas, as PLA₂s-Lys49 promovem miotoxicidade *in vivo* e outras atividades tóxicas como edema, hiperalgesia e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Lomonte *et al.*, 2003). Estudos *ex vivo* demonstram que as PLA₂s-Lys49 de peçonhas botrópicas induzem bloqueio das contrações musculares quando os músculos são estimulados de forma direta ou indireta (estímulos deflagrados nos nervos) em preparações neuromusculares de anfíbios, aves e mamíferos (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Oshima-Franco *et al.*, 2002; Cavalcante *et al.*, 2007; Cavalcante; Gallacci, 2010). Tais achados sugerem que os efeitos miotóxicos e paralisantes *ex vivo* decorrem, principalmente, da desestabilização da membrana da fibra muscular (Cavalcante; Gallacci, 2010).

É importante destacar que as PLA₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* podem ser subdivididas em duas subclasses distintas: (1) miotoxinas Asp49, que exibem atividade catalítica moderada; e (2) miotoxinas Lys49, que não possuem atividade catalítica detectável em substratos artificiais (Gutiérrez e Lomonte, 1997; Ownby *et al.*, 1999). Na peçonha da *Bothrops jararacussu* foram isoladas a BthTX-I, discutida anteriormente, e a BthTX-II que revelou uma atividade catalítica relativamente baixa quando comparada a uma PLA₂s ácida e não miotóxica da mesma peçonha (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Andrião-Escarso *et al.*, 2002). Além disso, a determinação da estrutura primária revelou que a BthTX-II era uma miotoxina Asp49 (Gutiérrez *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1998).

Quanto a ação de mionecrose das toxinas botrópicas, ela pode ser causada pela ação direta de miotoxinas ou por PLA₂s miotóxicas na membrana plasmática das células musculares, induzindo a desorganização dos componentes fosfolipídicos, entrada de íons cálcio e saída de moléculas intracelulares, como a creatina quinase, resultando em contração do sarcômero e comprometimento das mitocôndrias (Gutiérrez *et al.*, 1991). Essas alterações, em conjunto, podem levar à morte celular. No entanto, o mecanismo pelo qual essas miotoxinas atuam nos músculos ainda não é completamente compreendido. Um estudo sobre a patogênese da mionecrose em camundongos induzida por BthTX-II sugere que essa toxina afeta as fibras musculares esqueléticas, principalmente pela alteração na membrana plasmática (Gutiérrez *et al.*, 1991). Recentemente, estudos de bioinformática conduzidos por Borges e colaboradores (2021) trouxe novidades quanto a estrutura da BthTX-II, caracterizando duas variantes de BthTX-II (a e b), diferindo em 7 resíduos. A estrutura cristalográfica de BthTX-IIa revela um estado Tensionado, com seu loop de ligação de cálcio distorcido oculto na interface do dímero. Por outro lado, a nova estrutura de BthTX-IIb é um monômero em estado Relaxado, com um ácido graxo no canal hidrofóbico. Em solução, ambas as variantes são monoméricas em condições fisiológicas neutras e predominantemente diméricas em um ambiente ácido, mantendo a atividade catalítica em ambos os cenários. Além disto, foi proposto dois mecanismos miotóxicos para a BthTX-II. Um envolve um mecanismo catalítico associado à montagem monomérica, enquanto o outro exibe atividade independente de cálcio relacionada à sua região C-terminal, adotando uma conformação dimérica semelhante a proteínas do tipo PLA₂ (Borges *et al.*, 2021).

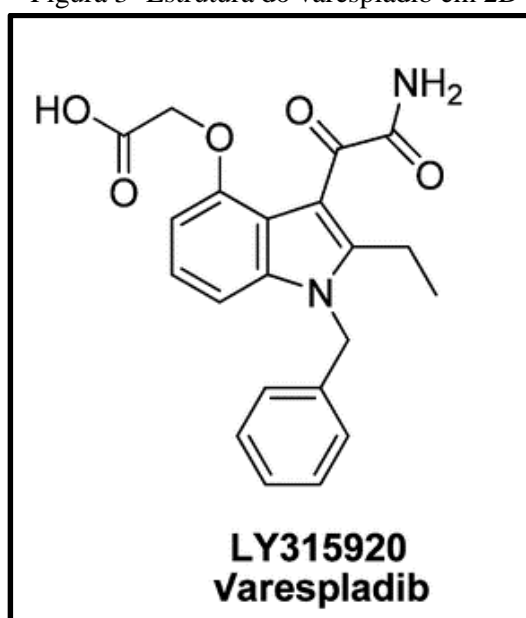
Sendo assim, com o intuito de avançar na elucidação do mecanismo de ação dessas toxinas e seus sítios de interação, diversas abordagens têm sido utilizadas, incluindo técnicas de mutagênese sítio-dirigida (Ward *et al.*, 2002), utilização de peptídeos sintéticos (Lomonte *et al.*, 2010) ou interações das toxinas com substâncias inibidoras (Cavalcante *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2015; Lewin *et al.*, 2016; Salvador *et al.*, 2019; Salvador *et al.*, 2023). Esta última abordagem mostra-se promissora, pois desempenha papel fundamental na busca por tratamentos complementares à soroterapia.

1.6 Inibidores de PLA₂

Estudos envolvendo inibidores altamente específicos de PLA₂ têm demonstrado resultados promissores, com destaque para compostos sintéticos como o varespladib

(LY315920) (Lewin *et al.*, 2016). Inicialmente, a concepção dessa molécula ocorreu como parte de um programa criado pelo Laboratório de Pesquisa Lilly, da indústria Farmacêutica Eli Lilly, com o objetivo de identificar inibidores de PLA₂ humanas e, posteriormente, investigar a relação estrutura-atividade desses compostos em processos fisiopatológicos (Dillard *et al.*, 1996). Dentre os compostos selecionados, destacou-se o ácido 2 - [3- (2-amino-1, 2- dioxoetil) -2-etil-1- (fenilmetil) -1H - indol-4-il] oxi] acético, conhecido como varespladib ou LY315920 (**figura 3**), o qual é um inibidor 6500 vezes mais potente do que o composto líder (ácido 5-metoxi-2-metil-1- (fenilmetil) -1H - indol-3-acético) (Draheim *et al.*, 1996).

Figura 3- Estrutura do varespladib em 2D



Referência: Dennis *et al.*, 2011.

O varespladib apresenta como mecanismo de ação a capacidade de inibir PLA_{2s} humanas através de interações com o sítio catalítico das enzimas (Draheim *et al.*, 1996). Em razão disso, estudos foram iniciados testando o varespladib ou o seu pró-fármaco, metilvarespladib, contra doenças com componente inflamatório, como sepse, artrite, doenças cardiovasculares (Clinical Trials, 2020). Boa parte desses estudos passaram da Fase I, mas fracassaram na Fase II ou III, levando à descontinuação do fármaco (Xiao *et al.*, 2018; Clinical Trials, 2020; Oliveira *et al.*, 2020). Porém, devido ao seu mecanismo de ação, Lewin e colaboradores (2016) testaram o varespladib contra peçonhas ofídicas que apresentavam elevada quantidade de PLA_{2s}. O estudo mostrou que o composto era capaz de inibir em experimentos *in vitro*, vinte e oito peçonhas de serpentes de importância médica e prolongava

in vivo o tempo de vida dos animais envenenados (Lewin *et al.*, 20016). Recentemente, foi demonstrado que o varespladib é capaz de se ligar a PLA₂s provenientes de serpentes botrópicas e reduzir a miotoxicidade (Salvador *et al.*, 2019, 2021 e 2022).

Com o intuito de avançar no conhecimento dos possíveis mecanismos envolvidos na desestabilização de membrana promovidos por PLA₂s-Lys49, a hipótese desse estudo foi que o varespladib (LY315920) atue como inibidor das ações tóxicas da Bothropstoxina-I (BthTX-I), uma miotoxina PLA₂s-Lys49 proveniente da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e responsável pelas principais características tóxicas do envenenamento.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Avançar na compreensão do potencial inibidor do varespladib em relação a paralisia muscular e a miotoxicidade induzida por PLA₂s homólogas em preparações neuromusculares de camundongos e no conhecimento da relação estrutura/atividade de toxinas botrópicas.

2.2 *Objetivos Específicos*

Avaliar a amplitude das contrações musculares em função do tempo na presença da BthTX-I, ou do varespladib, ou do produto da pré-incubação da BthTX-I com o varespladib através de técnicas miográficas *ex vivo*.

Avaliar, através das técnicas morfológicas, a integridade do tecido muscular após a exposição à BthTX-I ou ao varespladib ou ao produto da pré-incubação da BthTX-I com o varespladib.

Avaliar as regiões de interação entre a BthTX-I e o varespladib através de *docking* molecular e seu comportamento por meio de simulações de dinâmica molecular.

Avaliar as regiões de interação entre a BthTX-II (bothropstoxina II) e o varespladib através de *docking* molecular e seu comportamento por meio de simulações de dinâmica molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos (8 semanas), linhagem Swiss (20-30 g), mantidos em ambiente controlado (temperatura 24 ± 2 °C), com livre acesso a água e ração e respeitando o ciclo circadiano (12 h claro/12 h escuro). Os estudos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular e Toxinologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética local (CEUA 17/2017 e CEUA 25/2021).

3.2 Toxinas e Inibidores

A BthTX-I, proveniente da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, foi fornecida pela Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias, pesquisadora da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

O varespladib (Sinônimos: **LY315920**; **LY-315920**; ácido 2 - [[3- (2-amino-1, 2-dioxoetil) -2-etil-1- (fenilmetil) -1H - indol-4-il] oxi] acético; **A-001**) foi comprado da Sigma-Aldrich®, a qual garante 98% de pureza da substância. O fármaco foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando uma quantidade máxima de 50 µL.

3.3 Solução Nutriente

A solução nutriente utilizada foi o Ringer com a seguinte composição (mM): NaCl 135; KCl 5; MgCl₂ 2; NaHCO₃ 15; Na₂HPO₄ 1; CaCl₂ 2; e glicose 11.

3.4 Estudo Funcional (Técnica Miográfica)

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, decapitados e exsanguinados. Em seguida, os animais foram submetidos à toracotomia ampla para extração da preparação nervo frênico-músculo diafragma (Bulbring, 1997). A preparação foi conservada em solução nutriente Ringer constantemente aerada com mistura gasosa com 95% de Oxigênio e 5% de Dióxido de Carbono (Carbogênio). O hemi-diafragma esquerdo foi cortado em forma de triângulo e montado verticalmente em uma cuba para órgãos isolados, contendo 12 ml de

solução nutriente, carbogenada e mantida à temperatura de 35 ± 2 °C. O bordo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro em forma de “L” e o centro tendíneo do músculo conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03) acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50). A tensão de base das preparações foi de 5 gramas. Os registros foram gravados e analisados em um computador através dos programas *Summit ACQuire* e *Summit DataViewer* (Gould Systems), respectivamente.

3.4.1 Registro Das Contrações Indiretas

Para evocar as contrações indiretas, a extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo “de sucção”. Um outro eletrodo, acoplado ao suporte de vidro em forma de “L”, serviu como eletrodo de referência. As contrações foram evocadas indiretamente por um estimulador elétrico (Grass, S88) através de pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 milissegundos, frequência de 0,2 Hz e intensidade supramáxima.

3.4.2 Protocolo Experimental

As preparações foram submetidas a um período de estabilização de 45 minutos, durante o qual o líquido nutriente da cuba foi trocado a cada 15 minutos. Ao final deste período, foram registrados 15 minutos de contrações na ausência da toxina ou do possível inibidor (contrações controle). Posteriormente, uma das substâncias químicas (BthTX-I; varespladib; ou produto da pré-incubação da BthTX-I com varespladib por 15 minutos) foi adicionada ao banho e avaliado o decréscimo percentual da amplitude das contrações musculares durante 180 minutos. Para os experimentos de inibição, foram utilizadas as proporções de 1:1 ou 1:10 (massa da toxina/massa do inibidor), tendo sempre como referência a massa da BthTX-I de 164,7 µg em 12 ml da cuba, expressa em molaridade (1 µM). Logo, nos experimentos de 1:1 e 1:10 (massa da toxina/ massa do inibidor) foram utilizados 164,7 µg e 1647 µg de varespladib em 12 mL da cuba que equivalem, respectivamente, a 36 µM e 361 µM.

3.5 Estudo Morfológico

Após a realização do estudo funcional, o músculo diafragma foi fixado em formaldeído 10%, submetido a desidratações em álcool 100% e posterior inclusão em parafina.

Subsequentemente, cortes transversais de 3 μm de espessura foram obtidos em micrótomo e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (coloração HE), para a avaliação morfológica do músculo diafragma. Em microscópio óptico, foi observado o aspecto morfológico geral das fibras musculares, como a disposição dos núcleos, formato das fibras e o endomísio. As preparações também foram submetidas à análise quantitativa. Em cada músculo foram analisados três campos microscópicos diferentes para determinação do índice de mionecrose, que é a razão entre o número de células lesadas pelo número total de células multiplicado por 100 (Carneiro et al., 2018; Dmor, 2019). As imagens das lâminas foram obtidas através de um microscópio óptico e analisadas no programa Image J.

3.6 Análise Estatística

Os resultados experimentais foram agrupados em média e erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre esses valores médios foram testadas pela análise estatística “T Student” (comparação de duas amostras) e Análise de Variância (ANOVA; comparação de mais de duas amostras), sendo esta última complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O nível de significância estabelecido foi de $P < 0,05$.

3.7 Docking e Simulações de Dinâmica Molecular

A estrutura tridimensional do varespladib foi obtida utilizando o método de desenho da molécula (*ligand reader modeling*) através da ferramenta *online CHARMM-GUI* (<https://www.charmm-gui.org/>) (Jo et al., 2008). As moléculas de BthTX-I e BthTX-II foram obtidas a partir da estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I (PDB: 3IQ3) (Fernandes et al., 2010) e da BthTX-II (PDB: 7RJZ e 7RJI) (Borges et al., 2021) e foram submetidas a um processo de acoplamento denominado "proteína rígida-ligante flexível" usando o sistema *Autodock VINA* do software *PyRx v.0.9.5*. A metodologia de “*docking* livre”, sem restrições para a escolha do local de ligação, gerou vinte modelos diferentes contendo a molécula receptora e o ligante. Dois principais critérios foram utilizados para a escolha dos melhores modelos dos complexos, (I) maior valor de energia de ligação, calculado através do valor teórico de K_d utilizando a equação: $\Delta G = R.T.\ln(K_d)$, onde ΔG é a energia livre de Gibbs obtida nas simulações de *docking molecular*, R é a constante dos gases ideais e T é a temperatura em Kelvin (298,15 K) e, (II) visualização/importância biológica do sítio em que ocorreu a ligação.

Em condições de pH neutro e em ambientes fisiológicos, a BthTX-II pode adotar uma conformação monomérica com a alça de ligação ao cálcio ordenada e com atividade catalítica semelhante às PLA₂ ácidas encontradas nas peçonhas de serpentes. Em pH ácido, essa toxina se apresenta com uma montagem dimérica, se assemelhando às PLA₂ homólogas (Borges *et al.*, 2021). Devido a essas diferenças estruturais relacionadas a função da BthTX-II, foram utilizadas suas estruturas tanto em sua forma monomérica (*mBthTX-II*) quanto dimérica (*dBthTX-II*). O arquivo contendo as coordenadas da *mBthTX-II* e da *dBthTX-II* em uma caixa d' água cúbica (10 Å de distância entre os átomos mais distantes da proteína e a borda da caixa) foram gerados no servidor *CHARMM-GUI* (Jo et al., 2008) e submetidos a simulação no software *GROMACS* (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) v.2021 (Abraham, 2015) aplicando-se um campo de força do tipo *CHARMM36m* (Huang e MacKerell, 2013). Inicialmente, foi realizada uma minimização de energia (*EM – energy minimization*) com o emprego de um algoritmo do tipo *steepest descent* até o sistema atingir uma energia menor que 100 kJ/mol/nm. Após este passo, foram realizadas duas simulações de 1 ns de duração cada do tipo NVT e NPT (considerando-se a temperatura e pressão, respectivamente) seguidas de uma simulação sem restrições de 100 ns de duração. Os resultados obtidos foram analisados por meio de ferramentas presentes no software *GROMACS* v.2021.

4. RESULTADOS

4.1 Estudos Funcionais

4.1.1 Influência da BthTX-I sobre as contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos

Inicialmente, avaliou-se a amplitude das contrações musculares em função do tempo em músculos expostos à BthTX-I (1 μ M) por 180 minutos. Nessa concentração, a toxina foi capaz de promover o bloqueio progressivo tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (**gráfico 1**).

Gráfico 1 - Efeito paralisante da BthTX-I em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de camundongos

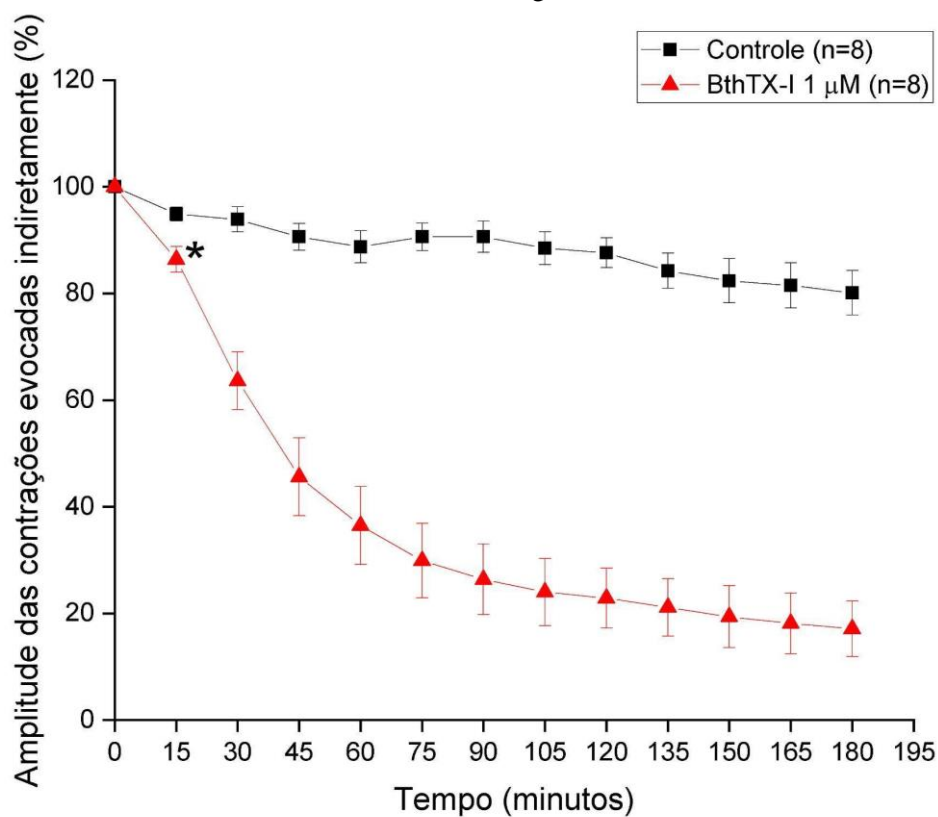


Gráfico 1: Efeito paralisante da BthTX-I (1 μ M) em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A abscissa indica o tempo (em minutos) após a adição da toxina ou na situação controle (sem a presença da toxina). As ordenadas representam a porcentagem da amplitude da contração muscular ao longo do tempo em relação a inicial (tempo 0). Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. (n= 8). * indica o ponto a partir do qual o grupo BthTX-I é diferente do controle (P < 0.05).

4.1.2 *Influência do varespladib sob o efeito paralisante da BthTX-I em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos.*

O varespladib preveniu de forma significativa a paralisia induzida pela BthTX-I na proporção de 1:10 (massa:massa; 1 μM BthTX-I e 361 μM varespladib). Já na proporção 1:1 (massa:massa; 1 μM BthTX-I e 36 μM varespladib), o varespladib não foi capaz de prevenir o bloqueio neuromuscular em 180 minutos (**gráfico 2**). Isoladamente, o varespladib em sua maior proporção (361 μM) não promoveu alterações no perfil das contrações musculares (**gráfico 2**).

Gráfico 2- Efeitos da BthTX-I, varespladib, e do produto da pré-incubação BthTX-I + varespladib em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos

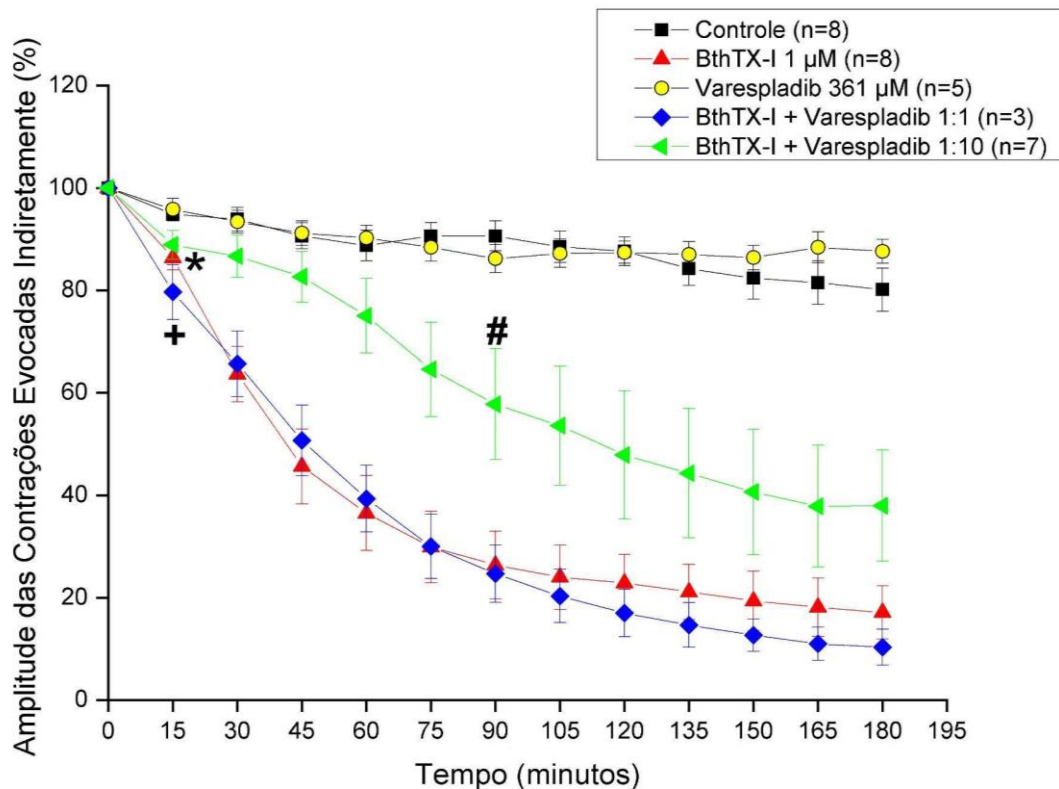


Gráfico 2: Efeitos da BthTX-I (1 μM), do varespladib (361 μM) e do produto da pré-incubação BthTX-I + varespladib (1:1 e 1:10; massa:massa) em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. A abscissa indica o tempo (em minutos) após a exposição das preparações aos compostos ou na situação controle. A ordenada representa a porcentagem da amplitude da contração muscular ao longo do tempo em relação a inicial (tempo 0). Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. (n= 3-8). * indica o ponto em que o grupo BthTX-I apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($P < 0.05$). + e # indicam o ponto em que os grupos BthTX-I + varespladib 1:1 e 1:10 foram diferentes do grupo Controle, respectivamente.

4.2 Estudo morfológico

4.2.1 Influência do varespladib sobre o efeito miotóxico da BthTX-I em preparações músculo diafragma de camundongos.

O grupo controle, ausência da administração de qualquer substância, exibiu fibras com formato poligonal delimitadas por tecido conjuntivo (endomísio) e núcleo periférico. O grupo exposto à BthTX-I (1 μ M) apresentou células arredondadas, lisadas, áreas desprovidas de miofibrilas, e edema entre as células (**figura 4**). Já os grupos varespladib e BthTX-I + varespladib 1:10 apresentaram aspecto morfológico geral semelhante ao grupo controle (**figura 4**).

Figura 1 - Microscopia óptica dos músculos diafragma de camundongos expostos a BthTX-I, varespladib ou ao produto da pré-incubação da toxina com o varespladib

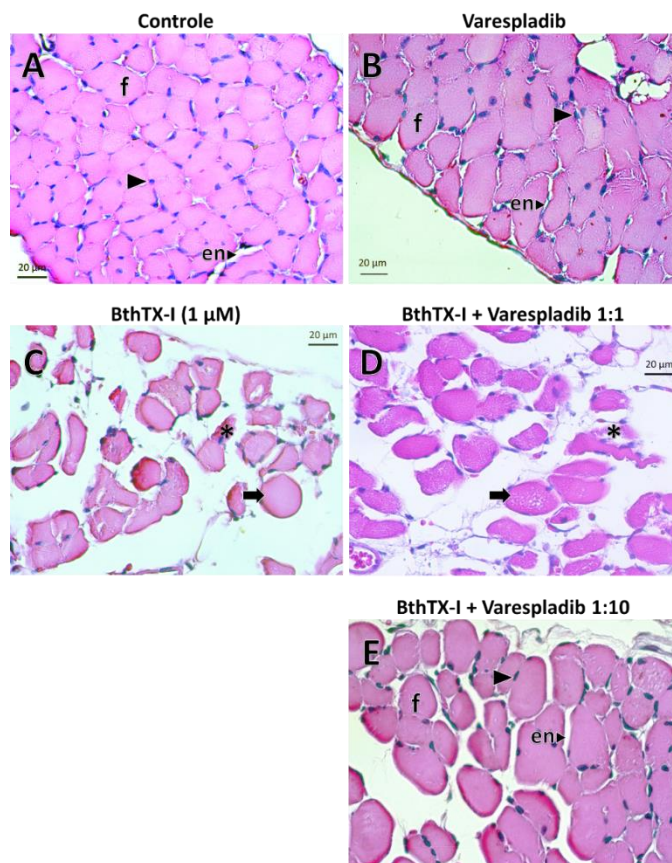


Figura 4: Microscopia óptica de músculos diafragma de camundongos submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE). Músculos do grupo controle (A) e do varespladib 361 μ M (B) com fibras de aparência normal. As fibras musculares apresentaram aspecto poligonal (f), endomísio (en) e núcleo periférico (cabeça de seta). Músculos expostos a BthTX-I 1 μ M (C) apresentaram lesões, evidenciadas por fibras arredondadas (seta) e áreas de citoplasma aparentemente desprovidas de miofibrilas (*). Músculos expostos ao produto da pré-incubação BthTX-I + varespladib (1:1) (D) apresentam aspecto semelhante ao grupo BthTX-I (C). No entanto, os músculos expostos ao produto da pré-incubação BthTX-I + varespladib (1:10) (E) apresentaram fibras musculares semelhantes ao grupo controle (A). Barra = 20 μ m.

As preparações expostas à BthTX-I e ao produto da pré-incubação BthTX-I + varespladib (1:1) tiveram aumento significativo do Índice de Mionecrose (IM) quando comparadas ao grupo controle. Já os grupos varespladib (361 μM) e BthTX-I + varespladib (1:10) não sofreram diferenças significativas em relação ao controle (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 - Índice de Mionecrose dos músculos expostos a BthTX-I, varespladib ou ao produto da pré-incubação da toxina com o varespladib

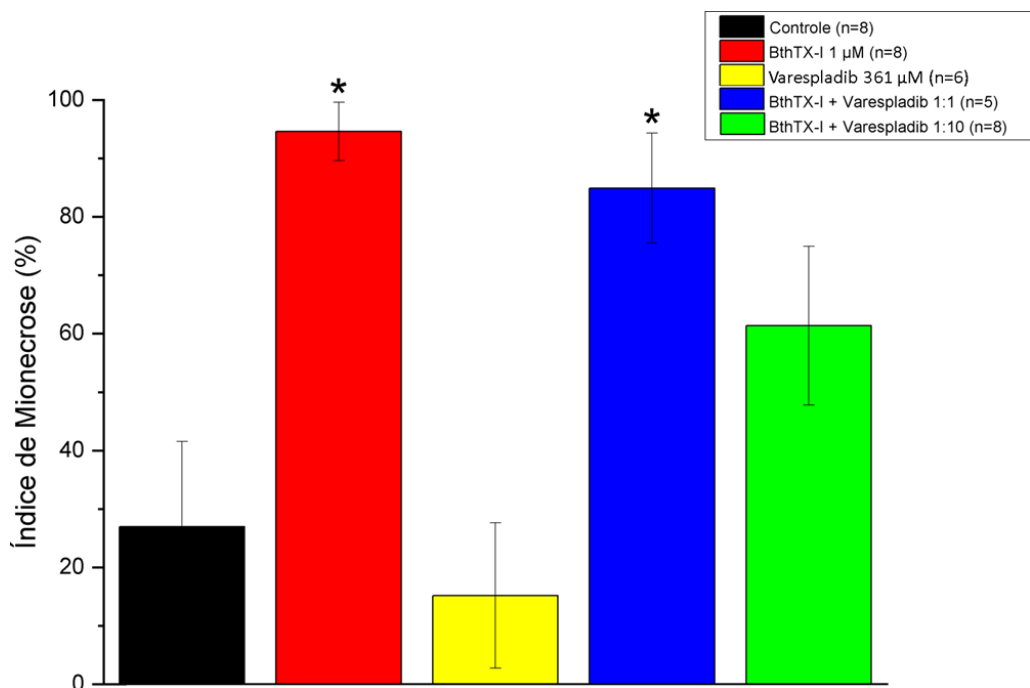


Gráfico 3: Índice de Mionecrose dos músculos expostos a BthTX-I, varespladib ou ao produto da pré-incubação BthTX-I com o varespladib (1:1 e 1:10). O eixo Y representa a porcentagem de fibras lesionadas em relação a todas as fibras musculares. Os dados foram agrupados em média \pm E.P.M. do índice de mionecrose. (*) indica diferença significativa em relação ao Controle *versus* dos grupos BthTX-I 1 μM e BthTX-I + Varespladib (1:1) ($P < 0,05$).

4.3 Docking e simulações de dinâmica molecular

4.3.1. BthTX-I e varespladib

Os ensaios de *docking* molecular exibiram soluções favoráveis com alta afinidade para três moléculas de varespladib interagindo com a BthTX-I, nas regiões His48 e Lys49, em ambos os monômeros, e ainda a terceira molécula do inibidor interagindo com os resíduos MDiS do monômero B (**figura 5**).

Figura 5 - Representação em *cartoon* dos ensaios de docking molecular usando BthTX-I e varespladib

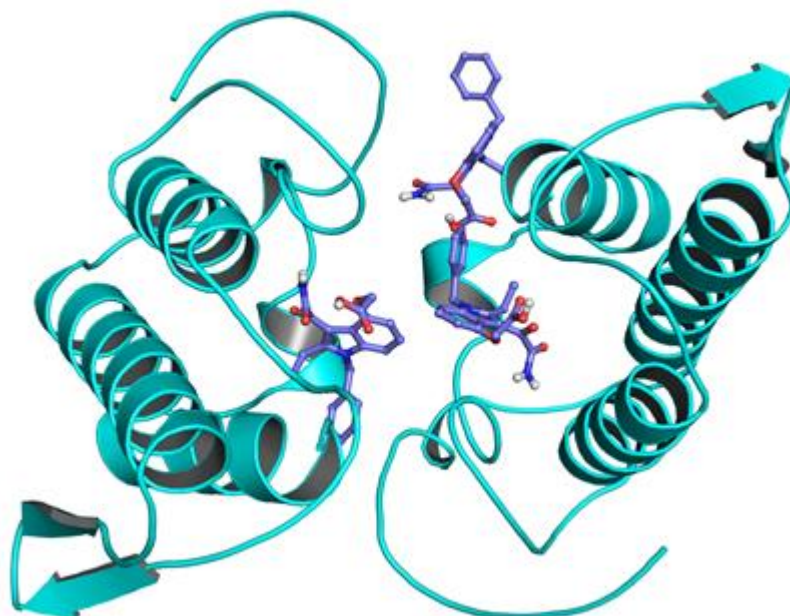


Figura 5: Complexo obtido a partir dos ensaios de *docking* molecular usando BthTX-I e varespladib (ciano/azul escuro), que mostra a presença dos inibidores nas regiões His48 e Lys49 em ambos monômeros e com resíduos MDiS.

Os resultados obtidos na simulação da dinâmica molecular revelaram que a interação entre três moléculas de varespladib ocorreu com valores calculados respectivos de $K_d = 5,3 \mu\text{M}$ (monômero A), $K_d = 3,8 \mu\text{M}$ (monômero B), e $K_d = 17,2 \mu\text{M}$ (MDiS), como pode ser observado na **figura 6**.

Figura 6 - Simulação da dinâmica molecular entre os complexos BthTX-I/varespladib

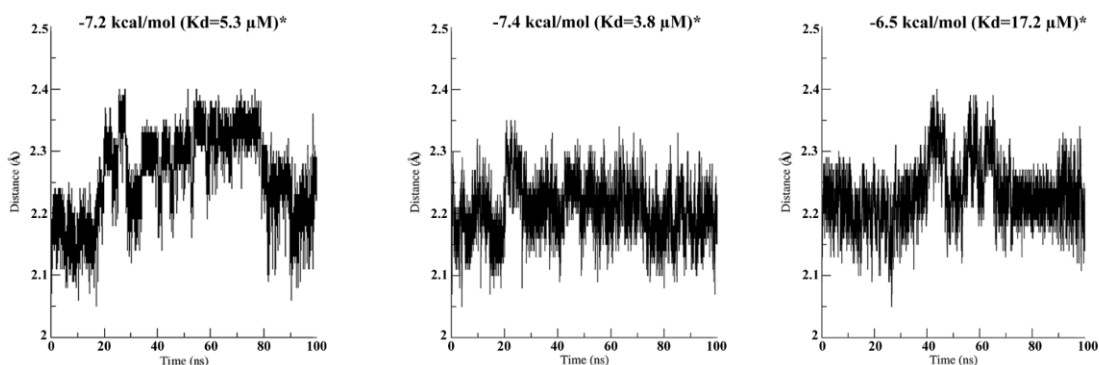


Figura 6: Representação da variação da distância do centro de massa das moléculas de varespladib e do centro de massa dos resíduos do sítio de ligação durante 100 ns de dinâmica molecular. O eixo Y representa a distância expressa em Å, o eixo X é o tempo em ns e as linhas representam a variação da distância de interação do inibidor ao monômero A, B e do MDiS.

Portanto, é interessante ressaltar que as moléculas de varespladib interagem com resíduos considerados primordiais para a atividade miotóxica desta classe de proteínas, incluindo His48 e Lys49 em ambos os monômeros e a terceira molécula do inibidor interagindo com resíduos da região C-terminal e resíduos do MDiS.

4.3.2. *BthTX-II e varespladib*

Para avançar no conhecimento da capacidade do Varespladib em interagir com PLA2 provenientes da peçonha da *Bothrops jararacussu*, também realizamos estudos de docking e dinâmica molecular desse composto com a BthTX-II. Em condições com pH neutro, em que a BthTX-II se apresenta em sua forma monomérica (*mBthTX-II*), os resultados dos ensaios de *docking* molecular exibiram uma interação entre uma molécula de varespladib com a *mBthTX-II* (pH= 7,5) com energia de -8,4 kcal/mol estimando o valor de $K_d = 0,69 \mu\text{M}$. Desta forma, esses dados sugerem alta afinidade entre os compostos, que estão representados na **figura 7**.

Figura 7 - Representação em *cartoon* do complexo *mBthTX-II/varespladib* obtida por *docking*

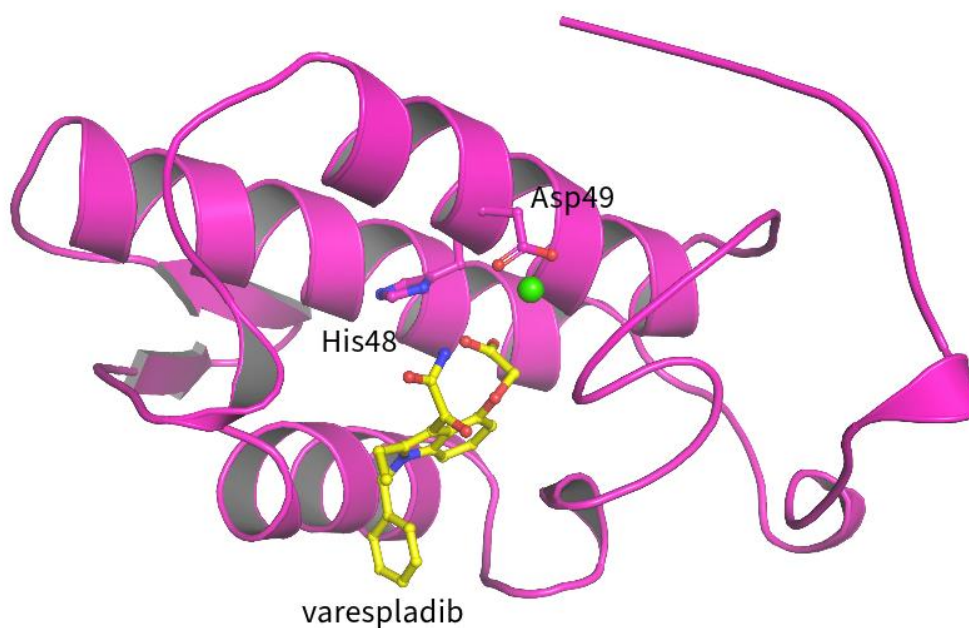


Figura 7: Complexo obtido a partir dos ensaios de *docking* molecular usando *mBthTX-II* e varespladib (magenta/amarelo). Pode-se observar a interação da molécula com o aminoácido His48 e próximo ao aminoácido Asp49, em verde está representado o íon Ca^{2+} .

As interações entre o varespladib e a *mBthTX-II* ocorreram com resíduos que participam no processo de catálise exercido pela enzima e pela coordenação do íon cálcio (His48 e Asp49) (**figura 8**) (Borges *et al.*, 2022).

Figura 8 - - Representação em *cartoon* do detalhamento da interação entre o varespladib e a *mBthTX-II*

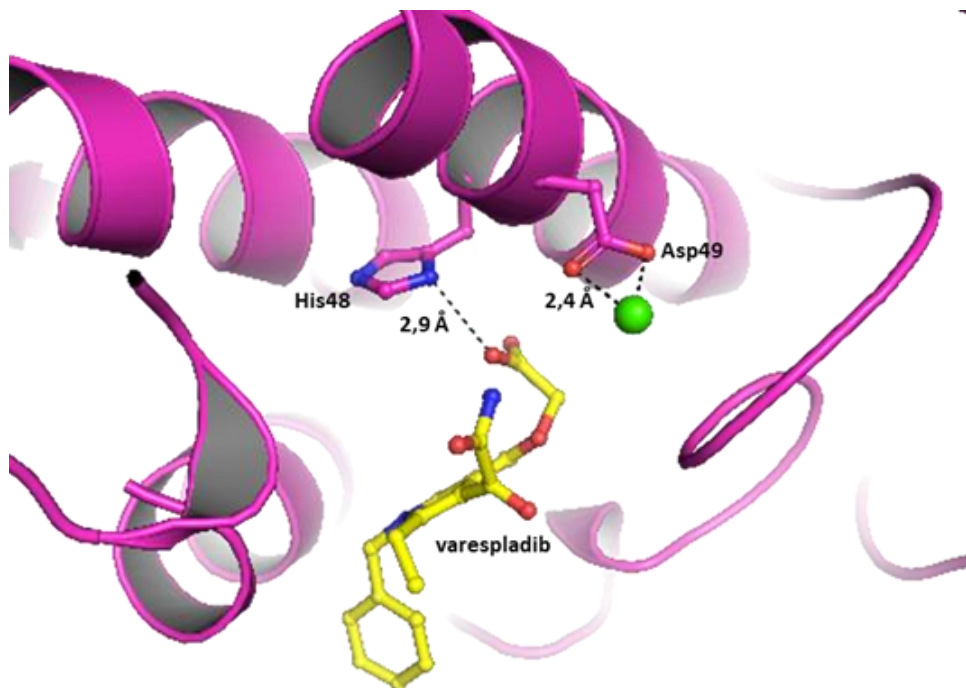


Figura 8: Região aproximada que mostra detalhes da interação entre o varespladib (amarelo) e a estrutura *mBthTX-II* (magenta). O tracejado mostra a ligação de hidrogênio entre o varespladib e o aminoácido His48 (2,9 Å) e as interações do íon Ca²⁺ (esfera verde) com o resíduo Asp49 (2,4 Å).

Em relação aos resultados obtidos na simulação da dinâmica molecular foi constatado que a representação da variação da distância do centro de massa da molécula de varespladib e do centro de massa dos resíduos do sítio de ligação da *mBthTX-II* se manteve estável durante 100 ns de dinâmica molecular (**figura 9A**). Entretanto, apesar de haver um breve deslocamento da molécula de varespladib 50 ns de simulação, as interações se mantiveram ao longo dos 100 ns de simulação de dinâmica molecular, representado pelos baixos valores de RMSD, visto que a movimentação da molécula sintética foi menor que 1 Å de distância (**figura 9B**).

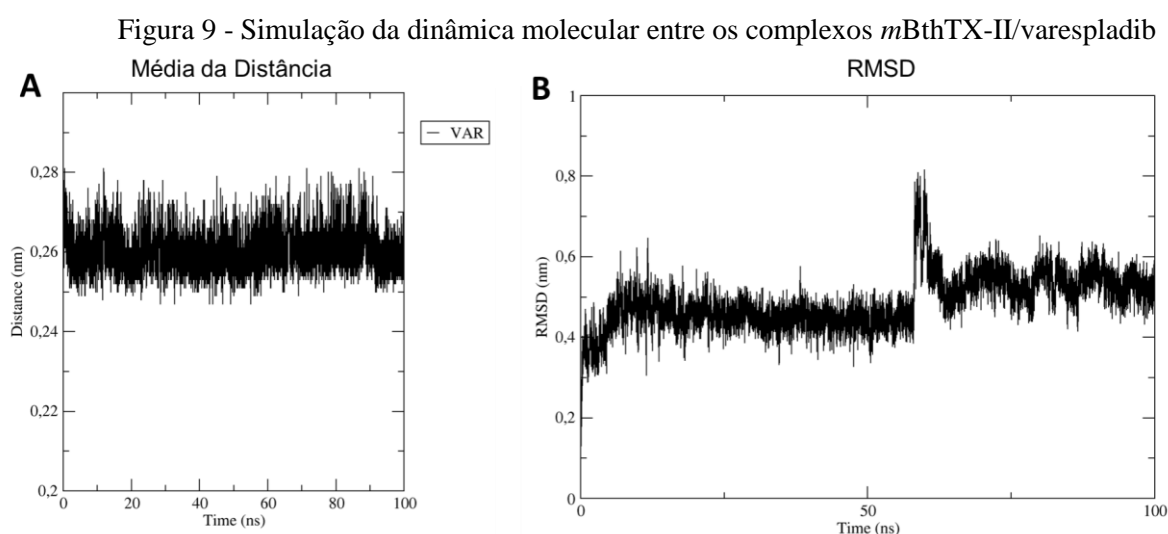


Figura 9: A) Representação da variação da distância do centro de massa da molécula de varespladib e do centro de massa dos resíduos do sítio de ligação da *mBthTX-II* durante 100 ns de dinâmica molecular. B) Variação dos valores de RMSD da molécula de varespladib durante 100 ns de simulações de dinâmica molecular.

Em condições com pH ácido, em que a BthTX-II se apresenta em sua forma dimérica (*dBthTX-II*), os resultados dos ensaios de *docking* molecular exibiram uma interação entre duas moléculas de varespladib com a *dBthTX-II* (pH= 5,2) com energia de -7,5 kcal/mol e um valor estimado de $K_d = 3,17\mu\text{M}$ para o dímero A (cinza claro), e energia de -7,4 kcal/mol estimando-se $K_d = 3,76\mu\text{M}$ para o dímero B (cinza escuro), representados na **figura 10**. Portanto, assim como observado nos experimentos anteriores envolvendo a *mBthTX-II*, esses dados também sugerem alta afinidade entre os compostos.

Figura 10- Representação em *cartoon* do complexo *dBthTX-II*/varespladib obtida por *docking*

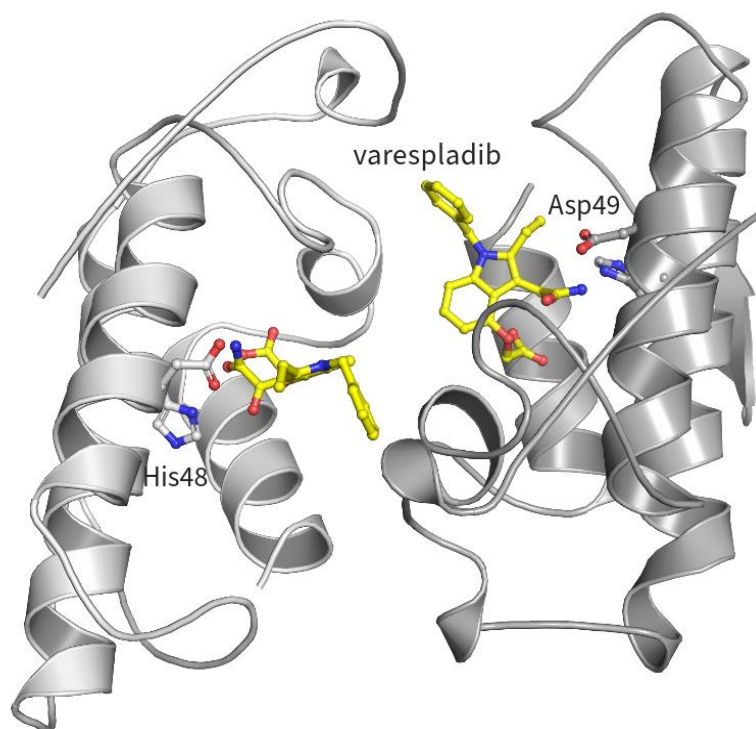


Figura 10: Complexo obtido a partir dos ensaios de *docking* molecular usando BthTX-II dimérica (monômero A representado pela cor cinza claro e o monômero B cinza escuro) e varespladib (amarelo). Pode-se observar a presença do inibidor nas regiões próximas à His48 e ao Asp49 em cada monômero.

Foi observado interações entre uma molécula de varespladib para cada monômero da BthTX-II, com resíduos His48 e Asp49 (**figura 11**). Deve-se salientar que as moléculas de varespladib interagiram com resíduos considerados importantes para a atividade catalítica desta classe de proteínas e não nos resíduos propostos para a atividade miotóxica (Salvador et al., 2017).

Figura 11 - Representação em *cartoon* do detalhamento da interação entre o varespladib e a dBthTX-II em cada monômero

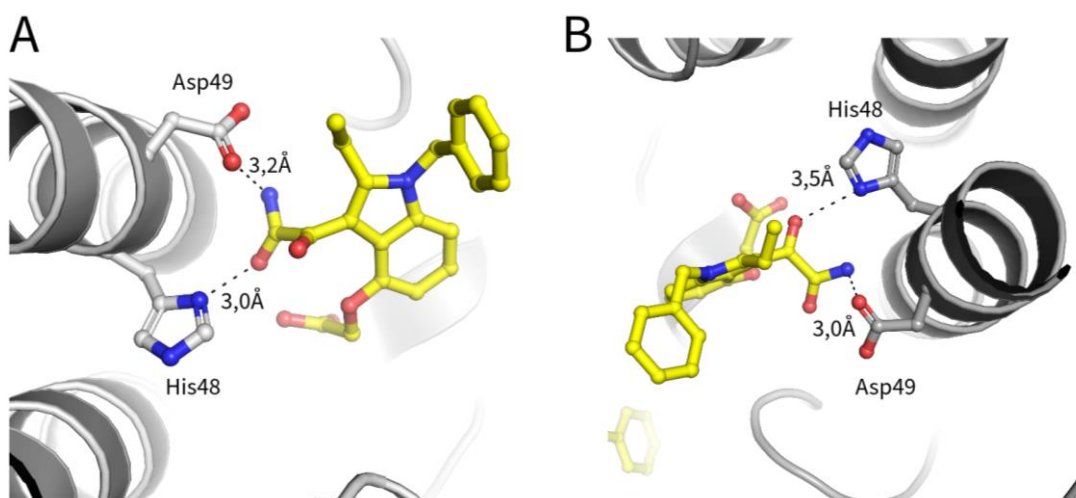


Figura 11: Detalhes da interação entre as moléculas de varespladib (amarelo) e a BthTX-II (cinza) obtido a partir dos ensaios de *docking* molecular. Em **A** distância entre o inibidor (varespladib) e a região His48 (3,0 Å) e a região Asp49 (3,2 Å) do monômero A; e em **B** entre o inibidor e a região His48 (3,5 Å) e a região Asp49 (3,0 Å) do monômero B.

Para verificar a estabilidade dessa interação, conduzimos simulações de dinâmica molecular utilizando o complexo obtido a partir de *docking* molecular (**figura 12**). Após 100 ns de simulação do complexo, as ligações entre o varespladib e a *dBthTX-II*, tanto com o monômero A (**figura 12A**) quanto para o monômero B (**figura 12B**) permanecem estáveis, como sugerido pela distância entre o centro de massa do inibidor e o centro de massa dos resíduos nos sítios de ligação.

Figura 12 – Simulação da dinâmica molecular entre os complexos *dBthTX-II*/varespladib para cada monômero

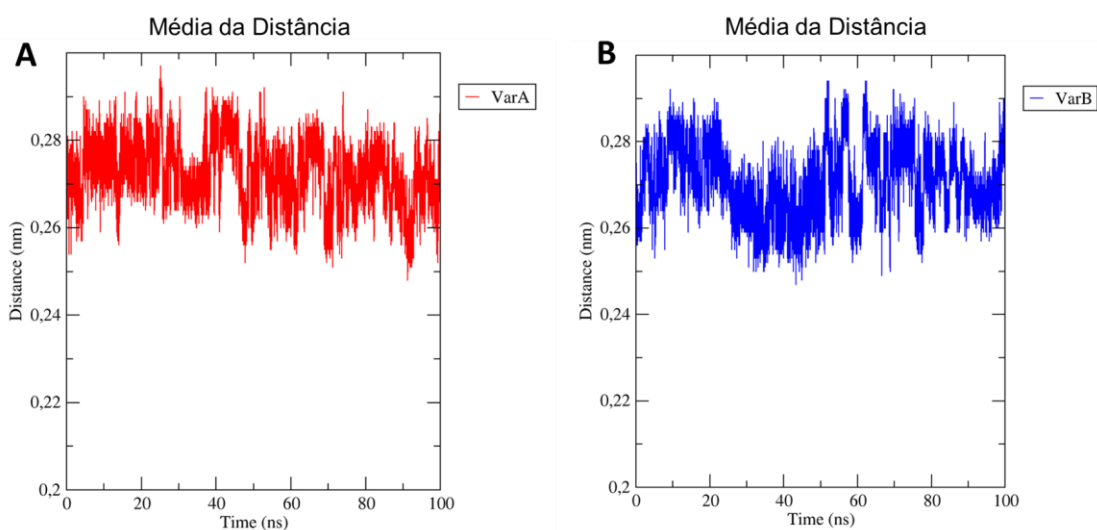


Figura 12: A) Representação da variação da distância do centro de massa da molécula de varespladib e do centro de massa dos resíduos do sítio de ligação da *mBthTX-II* no monômero A durante 100 ns de dinâmica molecular; B) Representação da variação da distância do centro de massa da molécula de varespladib e do centro de massa dos resíduos do sítio de ligação da *mBthTX-II* no monômero B durante 100 ns de dinâmica molecular.

O complexo *d*BthTX-II/varespladib se manteve estável durante 100 ns de dinâmica molecular (**figura 13**). Entretanto, houve um breve deslocamento das moléculas de varespladib ligadas em ambos monômeros nos nano segundos iniciais da simulação, porém estas interações se mantiveram estáveis a partir do tempo aproximado de 30 ns até o final da simulação, visto que valores de RMSD foram menores que 1,5 Å de distância (**figura 13**).

Figura 13 - RMSD da molécula de varespladib com cada um dos monômeros de *d*BthTX-II

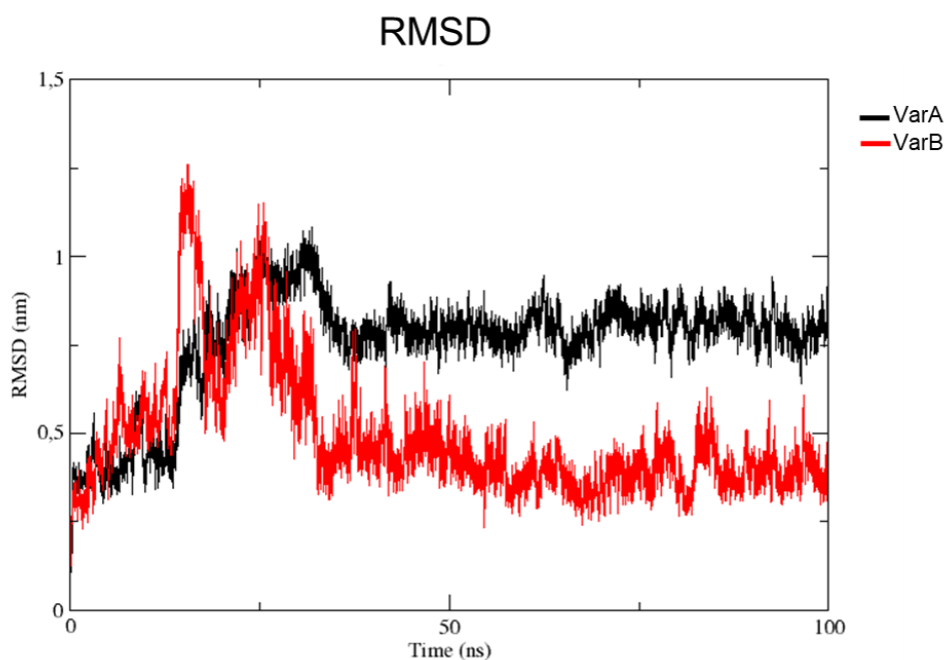


Figura 13: Variação dos valores de RMSD da molécula de varespladib durante 100 ns de simulações de dinâmica molecular.

5. DISCUSSÃO

As fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes exibem uma notável diversidade de atividades biológicas, influenciadas pela evolução adaptativa para desempenharem papéis específicos em diferentes contextos ecológicos. Estas moléculas são componentes úteis para a predação e defesa, pois catalisam a hidrólise de fosfolipídios nas membranas celulares das presas, levando a danos teciduais e, frequentemente, à paralisia ou morte das vítimas. Além disso, exibem atividades pró-inflamatórias que amplificam a resposta imune do hospedeiro. Dentre as PLA₂s ofídicas, destacam-se às proteínas homólogas, como as PLA₂-Lys49, que apresentam variações estruturais e, apesar de carecerem de atividade enzimática, induzem mionecrose de forma independente da hidrólise direta de fosfolipídios (Lomonte, 2023).

As PLA₂-Lys49 possuem como alvo principal a membrana da fibra muscular esquelética (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Oshima-Franco *et al.*, 2002; Cavalcante *et al.*, 2007; Cavalcante; Gallacci, 2010). Portanto, técnicas miográficas com preparações neuromusculares são fundamentais para a investigação dessas proteínas e da busca por possíveis inibidores. Neste sentido, o presente projeto avaliou a capacidade do varespladib de inibir as atividades paralisantes e miotóxicas da BthTX-I, uma PLA₂ homóloga encontrada na peçonha da serpente *B. jararacussu*. Em adição, estudos de *docking* molecular com a BthTX-I e II revelaram elevada afinidade entre o varespladib e a região catalítica das toxinas, mostrando ser uma molécula com capacidade de reduzir os efeitos tóxicos promovidos por miotoxinas botrópicas.

Na primeira parte do projeto, foi caracterizada a paralisia induzida pela BthTX-I em preparações neuromusculares de camundongos, revelando os efeitos típicos de bloqueio neuromuscular tempo-dependente da toxina (Oshima-Franco *et al.*, 2001; de Oliveira *et al.*, 2003; Gallacci *et al.*, 2006; Cavalcante *et al.*, 2005; Cavalcante *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2018). O primeiro estudo que caracterizou as atividades paralisantes *in vitro* da BthTX-I foi descrito por Rodrigues-Simioni e colaboradores em 1983. Os pesquisadores utilizaram preparações neuromusculares de rãs expostas à fração IV da peçonha total da *B. jararacussu*, posteriormente denominada de Bothropstoxina-I ou BthTX-I (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988). A partir de técnicas eletrofisiológicas, observou-se que a toxina despolariza as preparações neuromusculares, resultando em aumento inicial da frequência dos potenciais de placa motora terminal em miniatura. Esses efeitos foram atribuídos a um desequilíbrio iônico leve e transitório no terminal nervoso, decorrente da ação extrajuncional da fração estudada (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983). Posteriormente, ao avaliar preparações neuromusculares de

aves e mamíferos expostas a BthTX-I, Heluany e colaboradores (1992) descreveram uma despolarização inicial com contração muscular, seguido de espasmos e bloqueio em preparações evocadas de forma direta ou indireta. Em adição, os autores mostraram que a BthTX-I não afetava a contração tetânica ou a facilitação pós-tetânica nas preparações nervo frênico músculo diafragma de camundongos evocadas indiretamente. Nas preparações musculares de pintainhos, a despolarização induzida pela BthTX-I não foi impedida pela d-tubocurarina ou tetrodotoxina (Heluany *et al.*, 1992). Portanto, considerando essas observações em conjunto, os efeitos miotóxicos e paralisantes *ex vivo* da BthTX-I são consequência da desestabilização da membrana das fibras musculares (Heluany *et al.*, 1992; Gallacci; Cavalcante, 2010).

A instabilidade da membrana muscular induzida pelas PLA₂ homólogas desempenha um papel crucial nas manifestações de paralisia observadas *ex vivo* (Cavalcante; Gallacci, 2010). A desorganização da membrana culmina na perda da regulação sobre a permeabilidade de íons e macromoléculas (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Gutiérrez; Lomonte, 1995; Ownby 1998), manifestando-se por meio da despolarização celular ocasionada pelos ajustes dos gradientes dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Montecucco *et al.*, 2008; Cavalcante; Gallacci, 2010). Além disso, a perturbação da integridade da membrana propicia a entrada de íons Ca²⁺ extracelulares nas fibras musculares (Gutiérrez; Ownby, 2003; Villalobos *et al.*, 2007), bem como a liberação de Ca²⁺ a partir de reservas intracelulares (Johnson; Ownby, 1994). O aumento da concentração de Ca²⁺ no sarcoplasma gera uma série de eventos, incluindo a ativação da contração muscular (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983), hipercontração dos miofilamentos, danos mitocondriais e ativação de proteases e fosfolipases dependentes de Ca²⁺ (Gutiérrez; Lomonte, 1995; Ownby 1998) que ampliam o processo de lesão muscular (Gutiérrez; Ownby, 2003; Montecucco *et al.*, 2008). Por fim, o ATP liberado da membrana celular danificada é difundido para áreas distantes do local da lesão inicial e ativa receptores purinérgicos P2X nas fibras musculares. Isso resulta em aumento da condutância para os íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ (Burnstock, 2007; Di Virgilio, 2007; Abbracchio *et al.*, 2009; Cintra-Francischinelli *et al.*, 2008). Dessa forma, o fluxo desses íons induz a despolarização, contribuindo para a amplificação do processo de lesão muscular em regiões distantes do ponto de interação da toxina com a membrana celular (Cavalcante; Gallacci, 2010).

Quanto ao processo de transmissão neuromuscular, há o envolvimento de uma sucessão de eventos eletroquímicos que culmina na contração do músculo (Cavalcante; Gallacci, 2010).

A despolarização do nervo motor, originada pelo potencial de ação, resulta na abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem na terminação nervosa, permitindo a entrada desse íon no interior do neurônio. O influxo de Ca^{2+} no citoplasma ativa proteínas que promovem a exocitose das vesículas contendo o neurotransmissor acetilcolina que, ao ser liberado, difunde-se pela fenda sináptica e interage com os receptores nicotínicos da placa motora terminal da fibra muscular. Essa interação resulta na despolarização da região, processo conhecido como potencial de placa terminal. Tal potencial é transmitido para as regiões circunvizinhas à placa motora, onde ocorre a ativação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem, desencadeando, assim, o potencial de ação (Bowman; Rand, 1980). Por conseguinte, ocorre a liberação dos íons Ca^{2+} oriundos do retículo sarcoplasmático, instaurando-se o processo de contração muscular (Bowman; Rand, 1980; Cavalcante; Gallacci, 2010). Nesse contexto, a ampliação dos danos em regiões distantes da junção neuromuscular contribui para o surgimento da paralisia do músculo. No entanto, outros fatores podem influenciar o bloqueio neuromuscular *in vitro* provocado pela toxina. A entrada contínua de íons Na^+ no sarcoplasma ocasiona uma despolarização persistente na fibra muscular, resultando na inativação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem (Cavalcante; Gallacci, 2010). Como consequência, áreas de inexcitabilidade podem surgir no sarcolema, levando à incapacidade de gerar e propagar os potenciais de ação necessários para a contração da fibra muscular (Cavalcante; Gallacci, 2010). Adicionalmente, a saída de íons K^+ das fibras lesionadas causa despolarização parcial na extremidade do nervo motor, reduzindo a liberação de acetilcolina, uma vez que os potenciais de ação gerados têm menor magnitude (Bowman; Rand, 1980; Cavalcante; Gallacci, 2010; Correia de Sá *et al.*, 2013). Esse decréscimo na liberação do neurotransmissor também pode ser associado ao excesso de ATP liberado pelas fibras danificadas (Correia de Sá *et al.*, 2013). Em resumo, a ação das PLA₂s na terminação nervosa e nas fibras musculares pode reduzir a margem de segurança da transmissão neuromuscular, contribuindo para o desenvolvimento da paralisia muscular *in vitro* (Cavalcante; Gallacci, 2010; Correia de Sá *et al.*, 2013). Portanto, a incapacidade da fibra muscular em responder à despolarização prolongada, resultante das alterações na permeabilidade da membrana celular, é apontada como a principal causa da paralisia muscular induzida por PLA₂ miotóxicas. Ainda que o estudo morfológico do presente estudo evidencie os danos musculares provocados pela BthTX-I, corroborando com a literatura, abordagens miográficas destacam os estágios iniciais desse efeito tóxico (de Oliveira *et al.*, 2003; Cavalcante *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2011a; Cardoso *et al.*, 2018).

Na segunda etapa deste projeto, foram realizados estudos miográficos e morfológicos com o intuito de avaliar a capacidade do varespladib de neutralizar a paralisia e a miotoxicidade induzida pela BthTX-I. Os resultados mostraram que, isoladamente, o varespladib não afeta a amplitude das contrações musculares e nem a integridade das fibras, mesmo em concentrações elevadas. A pré-incubação do composto com a BthTX-I preveniu parcialmente o bloqueio neuromuscular induzido pela toxina e, após 180 minutos de exposição ao produto da pré-incubação BthTX-I + varespladib (1:10; massa:massa), observou-se redução da miotoxicidade nas preparações. Estudos prévios, realizados com as mesmas técnicas do presente estudo, mostraram que o varespladib é capaz de inibir por completo o bloqueio neuromuscular de peçonhas e toxinas ofídicas. No entanto, as peçonhas utilizadas eram compostas predominantemente por PLA₂s-Asp49 (Oliveira *et al.*, 2020; Maciel *et al.*, 2021).

Oliveira e colaboradores (2020) revelaram que o varespladib inibe o bloqueio neuromuscular induzido pela peçonha da serpente *Oxyuranus scutellatus*, que contém uma potente neurotoxina PLA₂ pré-sináptica, conhecida como taipoxina. O composto sintético preveniu o bloqueio neuromuscular quando pré-incubado com a peçonha e, também, quando adicionado trinta minutos após a administração da peçonha na cuba (Oliveira *et al.*, 2020). Posteriormente, Maciel e colaboradores (2021) demonstraram que o varespladib também previne o bloqueio neuromuscular e a miotoxicidade induzidos pela Crotoxina (CTX), que é o principal componente tóxico da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, bem como o efeito paralisante da subunidade básica da toxina (CB), uma PLA₂-Asp49 (Slotta; Fraenkel-Conrat, 1938; Hendon; Fraenkel-Conrat, 1971; Breithaupt *et al.*, 1974; Bon *et al.*, 1989). É importante destacar que o varespladib foi concebido para interagir com as PLA₂s catalíticas, através da interação direcionada ao íon cálcio presente no sítio ativo da enzima, resultando em uma inibição praticamente estequiométrica (Draheim *et al.*, 1996). Portanto, o composto demonstrou atividade inibitória eficaz nos estudos com PLA₂s-Asp49. Entretanto, a eficácia foi reduzida quando testado com peçonhas contendo PLA₂-Lys49, como as peçonhas de serpentes asiáticas (*Deinagkistrodon acutus*, *Agkistrodon halys*, *Bungarus multicinctus* e *Naja atra*), devido a uma afinidade de ligação mais fraca entre o varespladib e as PLA₂s-Lys49 (Wang *et al.*, 2018). Gutiérrez e colaboradores (2020) também identificaram essa diminuição na eficácia ao investigar a ação do varespladib contra a peçonha de *Notechis scutatus*, uma serpente da família Elapidae que também apresenta PLA₂s-Lys49. Nesse contexto, foi observado que não ocorreu inibição da letalidade para esse tipo específico de peçonha. Em conjunto, os estudos realizados com o varespladib e toxinas PLA₂-Lys49 corroboram com os resultados funcionais

do presente estudo, mostrando que o composto inibe parcialmente a paralisia muscular induzida pela BthTX-I, uma PLA₂-Lys49.

A terceira etapa desse projeto consistiu em experimentos de *docking* e dinâmica molecular envolvendo a BthTX-I e a molécula do varespladib. Os experimentos de *docking* molecular revelaram a formação de complexos estáveis entre o varespladib e a BthTX-I em regiões de relevância biológica, como os aminoácidos His48 e Lys49 (que compõem o canal hidrofóbico), presentes em ambos os monômeros da toxina, e os resíduos MDiS (“sítio hidrofóbico de desestabilização/rompimento à membrana”) do monômero B. Salvador e colaboradores (2023), através de estudos cristalográficos, analisaram as interações entre o varespladib e a PrTX-I, uma PLA₂-Lys49 derivada da peçonha da *Bothrops pirajai* (Mancuso *et al.*, 1995). Nos complexos formados entre PrTX-I e varespladib, observou-se a presença de uma molécula de inibidor no canal hidrofóbico de cada monômero da toxina, além de uma terceira molécula de inibidor situada entre os monômeros da PrTX-I/varespladib, interagindo com resíduos que compõem o MDiS do monômero A. Notavelmente, a presença deste terceiro inibidor não havia sido identificada em estudos prévios envolvendo outras toxinas PLA₂s-Lys49, tais como a MjTX-I e II da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (Salvador *et al.*, 2019; 2021). A presença do inibidor adicional é sugerida pela substituição Leu32Gly e inserção de um aminoácido adicional na região C-terminal da MjTX-II, o que estende o loop C-terminal e bloqueia o acesso físico ao terceiro inibidor. Em contraste, a PrTX-I apresenta uma conformação favorável para a interação com o inibidor devido à disposição oposta das cadeias laterais de His120 e Lys122, que estão próximas da Leu121 e Phe125. Como a BthTX-I compartilha semelhança de 99,17% na sequência de aminoácidos com a PrTX-I, com apenas duas posições Asn67Asp e Asp132Pro (PrTX-I/BthTX-I, respectivamente), foi proposta a hipótese de que a interação entre o varespladib e a BthTX-I seja semelhante àquela observada com a PrTX-I (Salvador *et al.*, 2023).

Apesar de ter sido objeto de estudo por várias décadas, permanecem lacunas significativas no entendimento do mecanismo de ação exato das toxinas PLA₂s-Lys49 (Lomonte, 2023). Entretanto, várias teorias têm sido propostas e algumas delas têm sido objeto de discussão. Com a finalidade de compreender os efeitos da BthTX-I no músculo esquelético e identificar as estruturas envolvidas no “sítio tóxico”, visto que a mutação do aspartato por lisina na posição 49 e os efeitos miotóxicos decorrem de um mecanismo não catalítico, compostos polianiônicos, como a heparina, foram empregados para elucidar a relação estrutura-

função das toxinas homólogas (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Heluany *et al.*, 1992; Cintra *et al.*, 1993; Lomonte *et al.*, 1994). A primeira região molecular envolvida na ação tóxica das PLA₂s-Lys49 foi identificada através da interação da heparina com a porção C-terminal de uma miotoxina proveniente da peçonha da *Bothrops asper*, a BaspTX-II (Lomonte *et al.*, 1994). A análise do sítio de ligação da heparina com a BaspTX-II revelou a participação de resíduos de aminoácido na região 115-129, que é rica em lisina e próxima da porção C-terminal da toxina. Além disso, o peptídeo sintético da região 115-129 da miotoxina II foi capaz de induzir lesões celulares, mimetizando o efeito da toxina. Dessa forma, os autores concluíram que a região C-terminal (115-129) da miotoxina II seria responsável pela atividade miotóxica dessa proteína (Lomonte *et al.*, 1994). No período de descoberta da miotoxicidade promovida pela região C-terminal das PLA₂-Lys49, estruturas em cristais das miotoxinas não estavam disponíveis (Lomonte, 2023). No ano de 1995, a primeira estrutura cristalina da miotoxina II da *B. asper* foi obtida, revelando uma associação homodimérica não covalente na toxina (Arni *et al.*, 1995). Posteriormente, da Silva-Giotto e colaboradores (1998) propuseram que a perturbação da integridade do sarcolema decorria de alterações nas conformações “aberta” e “fechada” do dímero da toxina durante a interação, ocasionando a desorganização da membrana lipídica e subsequente perda de sua integridade.

Em 2003, Lomonte e colaboradores propuseram um modelo teórico visando explicar os mecanismos pelos quais as PLA₂ homólogas induzem danos musculares. Nesse modelo, conjecturou-se que as regiões C- e N-terminais, carregadas positivamente, estabelecem interações eletrostáticas fracas com áreas carregadas negativamente na membrana celular (Lomonte *et al.* 2003). Subsequentemente, essas interações eletrostáticas seriam reforçadas por resíduos aromáticos e hidrofóbicos presentes na região C-terminal da toxina, levando, assim, ao dano muscular (Lomonte *et al.*, 2003).

No estudo conduzido por Santos e colaboradores (2009), foi apresentada uma proposta de mecanismo miotóxico que se baseia na conformação alternativa do dímero nas PLA₂-Lys49. Nesse contexto, os sítios miotóxicos, que estão presentes em ambos os monômeros, são especificamente formados pelos resíduos catiônicos Lys20, Lys115 e Arg118, os quais se alinham sequencialmente nesta configuração proteica (dos Santos *et al.*, 2009). Em seguida, constatou-se que esses resíduos básicos desempenham a função de interagir com o grupo fosfatidil presente na camada lipídica da membrana plasmática (Fernandes *et al.*, 2013). Nesse mesmo trabalho foi observado uma mudança na conformação das miotoxinas devido à presença

de uma molécula hidrofóbica, como ácidos graxos, nos canais hidrofóbicos, promovendo a orientação dos resíduos que compõem o “sítio de ligação à membrana” (*Membrane docking site* - MDoS), otimizando sua interação com o sarcolema. Além disso, identificaram dois resíduos hidrofóbicos (Leu121 e Phe125), altamente conservados em 98% das PLA₂ homólogas botrópicas, que estão expostos ao solvente e que ficam alinhados após interação com uma molécula no canal hidrofóbico. Em consequência às características de hidrofobicidade e permeabilidade desses resíduos, propôs-se que ambos estariam envolvidos na desestabilização e rompimento da membrana, sendo denominados como “sítio hidrofóbico de desestabilização/rompimento à membrana” (*Membrane disruption site* - MDiS) (Fernandes *et al.*, 2013, 2014).

Baseado nessas proposições, Borges e colaboradores (2017) revelaram novas características estruturais relacionadas às mudanças oligoméricas entre os estados inativos e ativos de proteínas semelhantes à PLA₂. A partir de uma análise estrutural detalhada da região MDiS, foi identificadas conformações distintas da MDiS nos estados inativos e ativos, cuja diferença pode ser quantificada pela distância entre os resíduos Lys121 e Phe125, sugerindo uma transição entre ambos os estados. Essa transição pode ocorrer a partir da entrada de moléculas hidrofóbicas no túnel 1 do monômero canônico, resultando na reorientação do dímero e em uma mudança estrutural dos monômeros de uma forma assimétrica para uma forma simétrica (Borges *et al.*, 2017). Deste modo, empregando o dímero alternativo como a conformação farmacologicamente ativa, foram adicionadas novas informações ao mecanismo de miotoxicidade proposto por Fernandes e colaboradores (2014) (**figura 14**), sugerindo as seguintes etapas (Fernandes *et al.*, 2013; 2014; Borges *et al.*, 2017): I) entrada do ácido graxo no canal hidrofóbico da molécula; II) reorientação do dímero adotando a forma ativa (inversão da posição dos resíduos Tir119 e His120); III) o canal hidrofóbico inacessível e vago é aberto pela reorientação do dímero e uma molécula hidrofóbica/ácido graxo é ligada, estabilizando o estado ativo da toxina; IV) ancoragem proteína-membrana através do MDoS; V) sítio MDiS induz a desorganização da membrana; VI) influxo descontrolado de íons e consequente morte celular.

Figura 14 - Etapas de alterações estruturais das PLA₂ homólogas botrópicas envolvidas na desestabilização de membranas

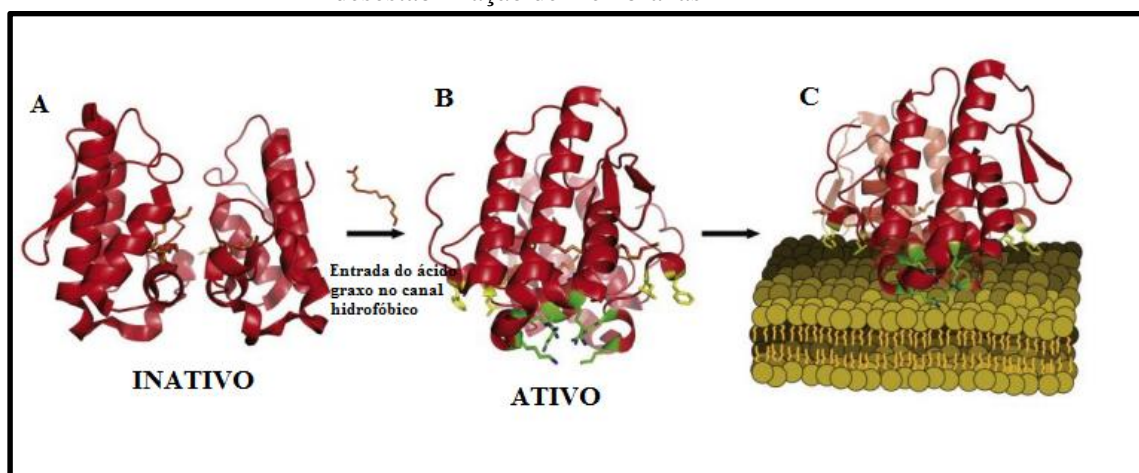


Figura 14: (A) Toxina em estado “inativo”. (B) Ativação alostérica induzida pela interação com o ácido graxo no canal hidrofóbico, expondo e alinhando os resíduos do MDoS (em verde) e MDiS (em amarelo). (C) Interação com a membrana através dos resíduos do MDoS e inserção na matriz lipídica realizada pelos resíduos MDiS. Referência: adaptado de Fernandes *et al.*, 2014.

Frente ao mecanismo miotóxico proposto, com a finalidade de compreender as interações entre inibidores e as PLA₂-Lys49, é relevante destacar que moléculas com propriedades inibitórias estabelecem interações específicas com as PLA₂s homólogas encontradas nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. Em algumas dessas interações, são observadas modificações estruturais significativas nas toxinas (Fernandes *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2020; Salvador *et al.*, 2023). A análise da interação entre o varespladib e a MjTX-II revelou alterações conformacionais na estrutura quaternária da toxina quando comparado com as estruturas ativadas, indicadas por valores elevados de RMSD (Salvador *et al.*, 2019). Entretanto, a interação do varespladib com a MjTX-I não ocasiona alterações estruturais significativas na toxina (Salvador *et al.*, 2021). Portanto, a análise das estruturas cristalinas da MjTX-I, MjTX-II e PrTX-I, bem como o complexo BthTX-I/varespladib, sugere que as moléculas de varespladib estabelecem interações em sítios análogos dentro dos canais hidrofóbicos das toxinas. Isso inclui as cadeias laterais de aminoácidos His48 e Lys49 (**Figura 7**). Como descrito anteriormente, o mecanismo miotóxico sugerido para as PLA₂-Lys49 é iniciado pela interação de moléculas de ácido graxo (ativador) com estes resíduos induzindo movimentos estruturais nas subunidades da toxina (Fernandes *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2020). Isso posiciona os resíduos da região MDoS para interação com a membrana alvo, resultando na subsequente ruptura pela região MDiS que, por sua vez, culmina na morte celular (Borges *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2020). A análise de dados funcionais e estruturais,

baseando-se no atual mecanismo miotóxico das toxinas do tipo PLA₂-Lys49, foram propostos três diferentes mecanismos de inibição para essas proteínas (**Figura 15**): *I*) Inibidores que se ligam ao interior do canal hidrofóbico ou à sua entrada, bloqueando o acesso das moléculas de ácido graxo; *II*) Inibidores que interagem com resíduos específicos das regiões MDoS ou MDiS (Fernandes *et al.*, 2015), impedindo a interação da proteína com a membrana; *III*) Inibidores que induzem a oligomerização da toxina (Salvador *et al.*, 2015), o que pode resultar na combinação dos dois processos anteriores.

Figura 15 - Diferentes formas de inibição de toxinas PLA₂-Lys49 por inibidores descritos na literatura

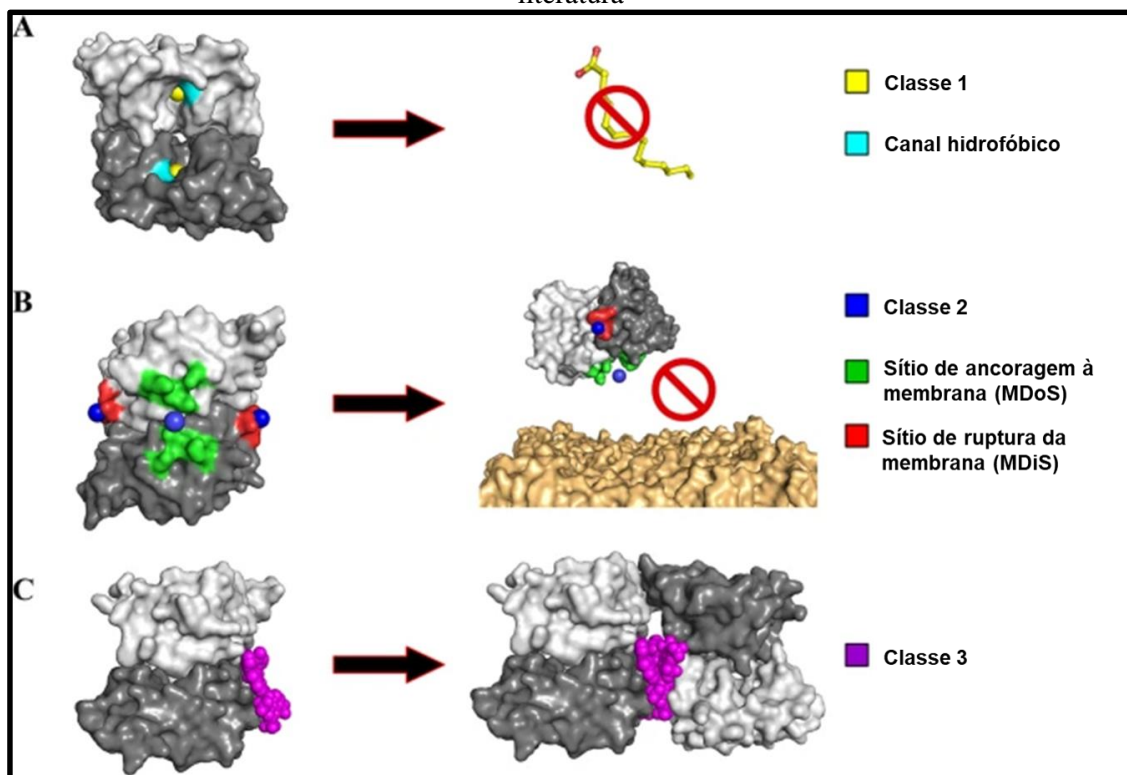


Figura 15: o monômero A é mostrado em cinza claro, enquanto o monômero B é representado em cinza escuro: (A) Inibidores da Classe 1 (amarelo), que impedem a ligação de ácidos graxos (bastões amarelos - ativador) ao canal hidrofóbico (ciano) da toxina; (B) Inibidores da Classe 2 (azul), que se ligam às regiões funcionais MDoS (verde) e MDiS (vermelho) e impedem a interação da toxina com a membrana (laranja); (C) Inibidores da Classe 3 (magenta), que induzem a oligomerização da proteína. Referência: adaptado de Salvador *et al.*, 2019.

Exemplificando a primeira classe de inibidores, destacam-se o brometo *p*-bromofenacil e o ácido rosmarínico, que inibem todos ou uma fração substancial dos efeitos miotóxicos, paralisantes e edematogênicos de diferentes toxinas (dos Santos *et al.*, 2011a; Soares; Giglio, 2003; Ticli *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2019). O ácido cafeico e o ácido aristolóquico ilustram o segundo tipo de inibidor, apresentando uma inibição parcial da atividade miotóxica da PrTX-I (Fernandes *et al.*, 2015). Já a suramina, representa o terceiro tipo de inibidor, devido a sua

notável versatilidade, esse composto é capaz de se ligar em diferentes regiões, inibindo as proteínas do tipo PLA₂ nas duas categorias mencionadas anteriormente (de Oliveira *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2015). Vale destacar que, tanto no complexo BthTX-I/varespladib, quanto no complexo PrTX-I/varespladib, o varespladib interage com os resíduos His48 e Asp49 dos monômeros A e B, além da presença de uma terceira molécula de varespladib interagindo com os resíduos na região MDiS do monômero A na PrTX-I, bem como na BthTX-I (Salvador *et al.*, 2023). Em virtude dos resultados analisados, o varespladib foi classificado nas classes 1 e 2 de inibidores de PLA₂, devido à sua capacidade simultânea de prevenir a ligação do ácido graxo por duas moléculas (classe 1) e também de bloquear o MDiS com uma terceira molécula (classe 2), resultando na inibição da interação desse sítio com a membrana (Salvador *et al.*, 2023).

Com o intuito de avançar no conhecimento da relação do mecanismo de inibição do varespladib com PLA_s, na quarta etapa do projeto foram realizados estudos de *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular com a bothropstoxina-II (BthTX-II) e o varespladib. Na peçonha da *B. jararacussu* é possível isolar e caracterizadas duas miotoxinas básicas, a BthTX-I (discutida anteriormente) e a BthTX-II (Honsi-Brandeburgo *et al.*, 1988; Andrião-Escarso *et al.*, 2002). A análise da estrutura primária da BthTX-II revelou um aminoácido Asp na posição 49 (Pereira *et al.*, 1998), apesar da baixa atividade catalítica (Honsi-Brandeburgo *et al.*, 1988; Andrião-Escarso *et al.*, 2002). Entretanto, novos dados sugerem que esta proteína pode exercer a miotoxicidade por meio de catálise e/ou por sítios miotóxicos (Borges *et al.*, 2021). Dados estruturais mostraram que a BthTX-II em solução é encontrada na forma se apresentam como monoméricas em condições fisiológicas neutras e principalmente dímeras em um ambiente ácido, sendo ativas em ambas as situações (Borges *et al.*, 2021). À vista disso, foi proposto dois mecanismos tóxicos para a BthTX-II (Borges *et al.*, 2021): i) um catalítico associado a montagem monomérica, com a alça de ligação de cálcio na forma canônica (íon cálcio permite que a toxina clive os fosfolípidios) e, ii) atividade miotóxica independente do cálcio, relacionado a região C-terminal, adotando uma conformação dimérica (mecanismo miotóxico semelhante ao de PLA₂-Lys49).

Os resultados de *docking* e dinâmica molecular revelaram que o varespladib se liga de forma eficiente a BthTX-II em sua montagem monomérica (*mBthTX-II*), afetando a região catalítica da toxina, interagindo com os resíduos His48 e Asp49 que compõem a rede catalítica (Renetseder *et al.*, 1985). O íon cálcio serve como ponto de ancoragem para o substrato durante

a catálise, coordenando-se com a cabeça do fosfolipídio, os oxigênios dos resíduos 28, 30 e 32 da cadeia principal, bem como os oxigênios da cadeia lateral de Asp49. A cadeia lateral do aminoácido His48 realiza a extração de um próton de uma molécula de água, desencadeando a hidrólise na ligação éster localizada na posição *sn-2* (Verheij *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 1990). Portanto, considerando que o resíduo His48 faz parte da rede catalítica da *mBthTX-II* e que o íon cálcio coordena a atividade de hidrólise dos fosfolipídios da membrana, auxiliando na lesão da estrutura (Rigden *et al.*, 2003; Corrêa *et al.*, 2008; dos Santos *et al.*, 2011b; Salvador *et al.*, 2017), sugerimos que o deslocamento do íon cálcio induzido pelo varespladib durante as simulações de dinâmica molecular, juntamente com interação estável do ligante com a proteína, demonstrada pelos baixos valores de RMSD (**figura 9B**), evidencia a capacidade efetiva do varespladib de inibir a miotoxicidade da *mBthTX-II*.

Já na forma dimérica da *BthTX-II* (*dBthTX-II*), observamos interações entre uma molécula de varespladib para cada monômero da *dBthTX-II*, nos resíduos His48 e Asp49 (**figura 10**). Essas interações permaneceram estáveis ao longo da simulação, com valores de RMSD menores que 1,5 Å de distância (**figura 13**). Como proposto anteriormente na literatura por Borges e colaboradores (2020), a *dBthTX-II* não apresenta atividade catalítica devido a uma modificação estrutural na região catalítica em comparação com a sua estrutura monomérica. Neste caso, Salvador e colaboradores (2017) propuseram que a estrutura dimérica das PLA_2 -Asp49 apresenta sítios responsáveis pela ligação à membrana alvo (Lys7, Arg16, Arg72 e Lys115) e sítios que causam o rompimento da membrana (Leu10 e Leu17). Assim, com base na análise dos dados obtidos por simulações de dinâmica molecular, sugerimos que a presença das moléculas de varespladib pode impedir o correto funcionamento correto dos sítios miotóxicos anteriormente propostos para as PLA_2 -Asp49 básicas (Salvador *et al.*, 2017), conforme ilustrado na **figura 16**. Foi possível observar que após os 100 ns de simulação, a estrutura dimérica não se manteve estável ao longo da simulação quando comparado com a estrutura inicial (RMSD = 15,63 Å) (**figura 17**).

Figura 16 - Disposição dos sítios MDoS e MDiS para a estrutura *dBthTX-II*

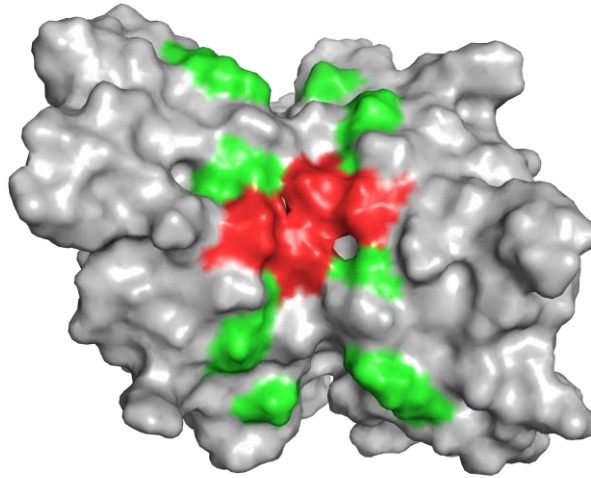


Figura 16: Representação da superfície da *dBthTX-II* onde estão representados os propostos sítios responsáveis atividade miotóxica, sendo o sítio de ligação à membrana (MDoS - verde) e o sítio de ruptura da membrana (MDiS - vermelho). Autoria própria.

Com base nos dados da literatura (Salvador *et al.*, 2017), a análise da estrutura da *dBthTX-II* nos permite sugerir que as regiões identificadas na **Figura 17A** constituem um "cluster miotóxico". Esse cluster é composto por um sítio de ancoragem na membrana (resíduos Glu7, Lys16, Arg72 e Ala115) e um sítio de ruptura da membrana (resíduos Leu10 e Leu17).

Figura 17 - Representação em *cartoon* dos resíduos putativos MDoS e MDiS da *dBthTX-II*

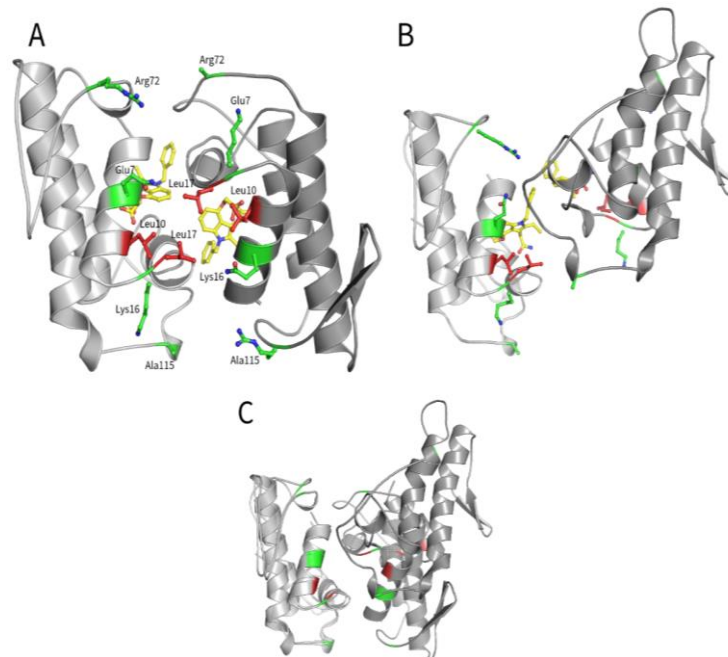


Figura 17: A) os resíduos básicos da região MDoS são mostrados em verde (Glu7, Lys16, Arg72 e Ala115 dos monômeros A e B). Os resíduos hidrofóbicos do sítio putativo de ruptura da membrana

(MDiS) são mostrados em vermelho (Leu10 e Leu17 dos monômeros A e B). As moléculas de varespladib estão representadas em *sticks* amarelos; B) Estrutura do complexo *d*BthTX-II/varespladib após 100 ns de simulação; C) resultado da modificação dos sítios MDoS e MDiS, induzido pelo varespladib, levando a perda da função da *d*BthTX-II. Autoria própria.

Portanto, com base nos dados apresentados neste estudo, é possível sugerir que a molécula de varespladib demonstra potencial para inibir as atividades biológicas de toxinas presentes na peçonha da serpente *B. jararacussu*. Este potencial inibitório ocorre de forma independente da condição fisiológica (estado conformacional ou pH). A molécula de varespladib é capaz de interagir com as toxinas BthTX-I e BthTX-II, inibindo seus efeitos tóxicos, sendo por mecanismos catalíticos e/ou miotóxicos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o varespladib atua como inibidor de PLA₂s tóxicas, abrangendo as moléculas cataliticamente inativas, as PLA₂-Lys49, quanto as cataliticamente ativas. Além disso, é uma ferramenta importante para a investigação da relação estrutura-atividade das toxinas PLA₂-Lys49. Esses achados são relevantes devido ao impacto significativo em termos de morbidade e mortalidade associado aos acidentes causados por serpentes que contêm concentrações elevadas dessas proteínas em sua peçonha. Tais descobertas fornecem informações para o desenvolvimento de tratamentos complementares à soroterapia em casos de envenenamento por serpentes.

7. REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P. *et al.* Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.
- ABRAHAM, M. J. *et al.* GROMACS: simulações moleculares de alto desempenho por meio de paralelismo multinível de laptops a supercomputadores. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19-25, 2015.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. *et al.* Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom. **Biochemical pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 723-732, 2002.
- ARNI, R. K. *et al.* Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 51, n. 3, p. 311-317, 1995.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2—a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M. *et al.* Acidente crotálico. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2009. p.108-115.
- BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E. *et al.* Innovative immunization strategies for antivenom development. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 452, 2018.
- BICKLER, P. E. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 68, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS (Departamento de Informática do SUS). ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - BRASIL. 2023. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 18 de Junho de 2023.
- BREITHAUPT, H., Rüksamen, K., Habermann, H. Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex. **Eur. J. Biochem**, v.49, p. 333-335. jun. 1974.
- BON, C. *et al.* Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989.
- BORGES, R. J. *et al.* Functional and structural studies of a Phospholipase A2-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3199-3209, 2017.
- BORGES, Rafael J. *et al.* BthTX-II from bothrops jararacussu venom has variants with different oligomeric assemblies: an example of snake venom phospholipases A2 versatility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 255-266, 2021.
- BOWMAN, W. C.; RAND, M. J. Striated muscle and neuromuscular transmission. **Textbook of pharmacology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980. p.17.1-17.56.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009a.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S237-S242, 2009b.

BURNSTOCK, G Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological reviews**, 2007.

BUSSI, G., DONADIO, D., PARINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **J. Chem. Phys.** V.126 (1), p. 014101, 2007.

CALMETTE, A. Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. Ann. **Inst. Pasteur**, v.8, p.275-291, 1894.

CARDOSO, F. F. *et al.* Structural basis of phospholipase A2-like myotoxin inhibition by chicoric acid, a novel potent inhibitor of ophidian toxins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2728-2737, 2018.

CARDOSO, F. F. *et al.* Neutralization of a bothropic PLA2-like protein by caftaric acid, a novel potent inhibitor of ophidian myotoxicity. **Biochimie**, v. 170, p. 163-172, 2020.

CAVALCANTE, W.L.G. *et al.* Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. **Chemico-biological interactions**, v. 151, n. 2, p. 95-100, 2005.

CAVALCANTE, W. L. G. *et al.* Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490-497, 2007.

CHANG, C. C.; LEE, C. Y. "ISOLATION OF NEUROTOXINS FROM THE VENOM OF BUNGARUS MULTICINCTUS AND THEIR MODES OF NEUROMUSCULAR BLOCKING ACTION." **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 144, p. 241-57, 1963.

CHIPPAUX, J.P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 23, 2017.

CINTRA, A. C. O. *et al.* Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **Journal of protein chemistry**, v. 12, p. 57-64, 1993.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. *et al.* Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 14140-14145, 2010.

CLARK, G. C. *et al.* Friends or foes? Emerging impacts of biological toxins. **Trends in biochemical sciences**, v. 44, n. 4, p. 365-379, 2019.

CLINICAL TRIALS. NIH - U. S. National Library of Medicine. Clinical trials.gov. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Varespladib&cntry=&state=&city=&dist=> Acesso em: 22 de julho de 2023.

CORRÊA, L.C. *et al.* Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 4, p. 591-599, 2008.

CORREIA-DE-SÁ, P. *et al.* Bothropstoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: radiochemical and real-time video-microscopy studies. **Toxicon**, v. 61, p. 16-25, 2013.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589-592, 1991.

- DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J.. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. **Methods In Molecular Biology**, p. 243-250, 2014. DUTERTRE, S.; NICKE, A.; TSETLIN, V. I. Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 196-223, 2017.
- DENNIS, E.A. *et al.* Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.
- DILLARD, R.D. *et al.* Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2. 1. Indole-3-acetamides. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 26, p. 5119-5136, 1996.
- DRAHEIM, S.E. *et al.* Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2. 3. Indole-3-glyoxamides. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 26, p. 5159-5175, 1996.
- DUTERTRE, S.; NICKE, A.; TSETLIN, V. I. Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 196-223, 2017.
- FERNANDES, C.A.H. *et al.* Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA2s. **Journal of Structural Biology**, v. 171, n. 1, p. 31-43, 2010.
- FERNANDES, C.A.H. *et al.* Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A2-like from Bothrops brazili venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 12, p. 2772-2781, 2013.
- FERNANDES, C.A.H. *et al.* A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2265-2276, 2014.
- FERNANDES, C.A.H. *et al.* Structural basis for the inhibition of a phospholipase A2-like toxin by caffeic and aristolochic acids. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133370, 2015.
- FERREIRA, S. H. Do fator potenciação da bradicinina (BPF) aos inibidores da ECA. **Rev. bras. hipertens**, p. 6-8, 1998.
- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S.P. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2009.
- GALLACCI, M. *et al.* Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, n. 3, p. 239-245, 2006.
- GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. G. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 81-95, 2010.
- GALIZIO, N. C. *et al.* Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught Bothrops jararaca snakes. **Journal of proteomics**, v. 186, p. 56-70, 2018.
- GOMES, A. A. S. *et al.* The allosteric activation mechanism of a phospholipase A2-like toxin from Bothrops jararacussu venom: a dynamic description. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16252, 2020.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.
- GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223-1235, 2010.
- GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017.
- GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Varespladib (LY315920) and methyl varespladib (LY333013) abrogate or delay lethality induced by presynaptically acting neurotoxic snake venoms. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 131, 2020.
- HELUANY, N. F. *et al.* Effects induced by bothropstoxin, a component from Bothrops jararacussu snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1203-1210, 1992.
- HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560-1563, 1971.
- HESS, B. *et al.* LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **J. Comput. Chem**, v.18, p. 1463-1472, 1997.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. *et al.* Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v.26, p.615-627, 1988.
- HOOVER, W.G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. **Phys Rev A Gen Phys**, v. 31, p. 1695-1697, 1985.
- HUANG J, MACKERELL A.D. Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. **J Comput Chem**. v. 34 (25), p. 2135-2145, 2013.
- JOHNSON, E. K.; OWNBY, C. L. The role of extracellular ions in the pathogenesis of myonecrosis induced by a myotoxin isolated from Broad-Banded copperhead (*Agkistrodon contortrix laticinctus*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 107, n. 3, p. 359-366, 1994.
- JO, S. *et al.* CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. **J. Comput. Chem**, v. 29, p. 1859-1865, 2008.
- KAISER, I.I., *et al.* The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.278, p.319-325, 1990.
- KINI, R. M. **Snake venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism**. 1 edição. West Sussex, England: Wiley, p. 1-28, 1997.
- LEWIN, M. R. *et al.* Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. **Toxins**, v. 8, n. 9, p. 248, 2016.
- LEWIN, M. R. *et al.* Varespladib in the treatment of snakebite envenoming: Development history and preclinical evidence supporting advancement to clinical trials in patients bitten by venomous snakes. **Toxins**, v. 14, n. 11, p. 783, 2022.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 725-733, 1989.

LOMONTE, B. *et al.* Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochemical pharmacology**, v. 47, n. 9, p. 1509-1518, 1994.

LOMONTE, B. *et al.* An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, p.885-901, 2003.

LOMONTE, B. *et al.* Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 28, p. 3224-3230, 2010.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 520-530, 2012.

LOMONTE, B.; KRIZAJ, I. Snake venom phospholipase A₂ toxins. In: **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press, p. 389-412, 2021.

LOMONTE, B. Lys49 myotoxins, secreted phospholipase A₂-like proteins of viperid venoms: A comprehensive review. **Toxicon**, v. 224, 107024, 2023.

MACIEL, F. V. *et al.* Varespladib (LY315920) prevents neuromuscular blockage and myotoxicity induced by crotoxin on mouse neuromuscular preparations. **Toxicon**, v. 202, p. 40-45, 2021.

MAGRO, A. J. *et al.* Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venoms. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 852-859, 2009.

MANCUSO, L. C. *et al.* Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v. 33, n. 5, p. 615-626, 1995.

MARAGANORE, J. M. *et al.* A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 22, p. 13839-13843, 1984.

MARAGANORE, J. M.; HEINRIKSON, R. L. The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 11, p. 4797-4804, 1986.

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

MELO, P. A. *et al.* Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 285-291, 1993.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas no Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. Acidentes por animais peçonhentos: Acidentes ofídicos. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/acidentes-ofidicos>. Acesso em: 02 de Julho de 2023.

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

MURAKAMI, M. T. *et al.* Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **Journal of molecular biology**, v. 350, n. 3, p. 416-426, 2005.

- MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A2s. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 903-913, 2003.
- MURAKAMI, M. *et al.* A new era of secreted phospholipase A2. **Journal of lipid research**, v. 56, n. 7, p. 1248-1261, 2015.
- DE OLIVEIRA, M. *et al.* Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 373-379, 2003.
- DE OLIVEIRA, R.C. *et al.* Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.*. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, p.6-21, 2009.
- OLIVEIRA, I.C.F. *et al.* Varespladib (LY315920) inhibits neuromuscular blockade induced by Oxyuranus scutellatus venom in a nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 187, p. 101-104, 2020.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control. WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.*, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515641>. Acesso em: 18 de Junho de 2023.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. Snakebite Envenoming. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) *et al.*, 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab_1. Acesso em: 18 de Junho de 2023.
- OSHIMA-FRANCO, Y. *et al.* Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from Bothrops jararacussu (jararacucu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**, p.1477, 2001.
- OSHIMA-FRANCO, Y. *et al.* Rabbit antivenom efficacy against myotoxic and neurotoxic activities of Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin-I. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 226-243, 2002.
- OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 17, n. 2, p. 213-238, 1998.
- PARRINELO, M., RAHMAN, A.. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. **J. Appl. Phys**, v. 52, p. 7182-7190, 1981.
- PEREIRA, M. F. *et al.* The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from Bothrops jararacussu (Jararacucu) venom with low phospholipase A 2 activity. **Journal of protein chemistry**, v. 17, p. 381-386, 1998.
- PETAN, T. *et al.* Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A2 homologue decreases its Ca²⁺-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry**, v. 46, n. 44, p. 12795-12809, 2007.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. **Ofidismo**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 47, p. 24-29, 2001.
- RENETSEDER, R. *et al.* A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and Crotalus atrox venom. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 21, p. 11627-11634, 1985.
- RIGDEN, D. J. *et al.* The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from Bothrops pirajai reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 59, n. 2, p. 255-262, 2003.

- RODRIGUES-SIMIONI, L. *et al.* The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v.10, p.475-489, 1983.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. **Venomous animals and their venoms**, v. 2, p. 345-384, 1971.
- RUFINI, S. *et al.* Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, v. 31, n. 49, p. 12424-12430, 1992.
- SALVADOR, G.H.M. *et al.* Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A2-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, n. 10, p. 2066-2078, 2015.
- SALVADOR, G.H.M. *et al.* Crystal structure of a phospholipase A2 from Bothrops asper venom: Insights into a new putative “myotoxic cluster”. **Biochimie**, v. 133, p. 95-102, 2017.
- SALVADOR, G.H.M. *et al.* Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from Bothrops moojeni suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10317, 2018.
- SALVADOR, G.H.M. *et al.* Structural basis for phospholipase A2-like toxin inhibition by the synthetic compound Varespladib (LY315920). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17203, 2019.
- SALVADOR, G.H.M. *et al.* The synthetic varespladib molecule is a multi-functional inhibitor for PLA2 and PLA2-like ophidic toxins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 7, p. 129913, 2021.
- SALVADOR, G.H.M. *et al.* Structural basis of the myotoxic inhibition of the Bothrops pirajai PrTX-I by the synthetic varespladib. **Biochimie**, v. 207, p. 1-10, 2023.
- DOS SANTOS, M. C. *et al.* A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de Bothrops jararacussu. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 77-83, 1992.
- DOS SANTOS, J. I. *et al.* Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A2 from Bothrops genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology**, v. 167, n. 2, p. 106-116, 2009.
- DOS SANTOS, J. I. *et al.* Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA2 inhibition. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28521, 2011a.
- DOS SANTOS, Juliana I. *et al.* Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A2 class. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 1, p. 61-78, 2011b.
- SCOTT, D. L. *et al.* Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541-1546, 1990.
- DA SILVA GIOTTO, M. T. *et al.* Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 30, n. 4, p. 442-454, 1998.
- SLOTTA, C. H.; FRAENKEL-CONRAT, M. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v.12, p.505-513, 1938
- SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

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

VERHEIJ, H. M. *et al.* Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 743-750, 1980.

VILLALOBOS, J. C. *et al.* Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1382-1389, 2007.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 9, p. 465-472, 2007.

XIAO, H. *et al.* Inactivation of venom PLA2 alleviates myonecrosis and facilitates muscle regeneration in envenomed mice: A time course observation. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1911, 2018.

WANG, Y. *et al.* Exploration of the inhibitory potential of varespladib for snakebite envenomation. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 391, 2018.

WARD, R.J. *et al.* At the interface: crystal structures of phospholipases A2. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1623-1633, 1998.

WARD, R.J. *et al.* Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v. 362, n. 1, p. 89-96, 2002.

WEN, F.H. Soroterapia. CARDOSO, J.L.C. *et al.*. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, p.432-441, 2009.

8. ANEXOS

8.1 Artigos Puclcados

- **Pinto ÊKR**, Souza NMV, Maciel FV, de Abreu TAG, Reis HFF, Ortolani PL, Fortes-Dias CL, Cavalcante WLG. Crotalus Neutralizin Factor (CNF) inhibits the toxic effects of Crotoxin at mouse neuromuscular preparations. *Toxicon*. 2021 Feb; 191:48-53. doi: [10.1016/j.toxicon.2020.12.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.016)
- Maciel FV, **Ramos Pinto ÊK**, Valério Souza NM, Gonçalves de Abreu TA, Ortolani PL, Fortes-Dias CL, Garrido Cavalcante WL. Varespladib (LY315920) prevents neuromuscular blockage and myotoxicity induced by crotoxin on mouse neuromuscular. *Toxicon*. 2021 Oct 30; 202:40-45. doi: [10.1016/j.toxicon.2021.09.009](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.09.009)
- Camargo WL, Kushmerick C, **Pinto E**, Souza N, Cavalcante W, Souza-Neto FP, Guatimosim S, Prado M, Guatimosim C, Naves LA. Homeostatic plasticity induced by increased acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neurobiol Aging*. 2022 Feb; 110:13-26. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2021.10.010](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.10.010)
- Salvador GHM, **Pinto ÊKR**, Ortolani PL, Fortes-Dias CL, Cavalcante WLG, Soares AM, Lomonte B, Lewin MR, Fontes MRM. Structural basis of the myotoxic inhibition of the *Bothrops pirajai* PrTXI by the synthetic varespladib. *Biochimie*. 2023 Apr;207:1-10. doi: [10.1016/j.biochi.2022.11.006](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.11.006)