UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA,
EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nathalia Margarida Cantuária

AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES ATIVIDADES TÓXICAS DO VENENO DE *Micrurus spixii,* E A EFICÁCIA DE NEUTRALIZAÇÃO DO SORO ANTIELAPÍDICO, VARESPLADIB E NEOSTIGMINA ATRAVÉS DE ESTUDO *IN VITRO, IN VIVO* E *EX VIVO*

Sorocaba/SP
2024

Nathalia Margarida Cantuária

AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES ATIVIDADES TÓXICAS DO VENENO DE *Micrurus spixii,* E A EFICÁCIA DE NEUTRALIZAÇÃO DO SORO ANTIELAPÍDICO, VARESPLADIB E NEOSTIGMINA ATRAVÉS DE ESTUDO *IN VITRO, IN VIVO* E *EX VIVO*

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Yoko Oshima Franco.

Sorocaba/SP
2024

Ficha Catalográfica

Cantuária, Nathalia Margarida
C234a Avaliação das diferentes atividades tóxicas do veneno de *Micrurus spixii*, e a eficácia de neutralização do soro antielapídico, varespladib e neostigmina através de estudo *in vitro, in vivo* e *ex vivo* / Nathalia Margarida Cantuária. – 2024.
83 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2024.

1. Envenenamento - Tratamento. 2. Cobra venenosa - Veneno. 3. Toxicologia.4. Junção neuromuscular. I. Oshima-Franco, Yoko, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

Nathalia Margarida Cantuária

AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES ATIVIDADES TÓXICAS DO VENENO DE *Micrurus spixii,* E A EFICÁCIA DE NEUTRALIZAÇÃO DO SORO ANTIELAPÍDICO, VARESPLADIB E NEOSTIGMINA ATRAVÉS DE ESTUDO *IN VITRO, IN VIVO* E *EX VIVO*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado: 28/05/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
YOKO OSHIMA FRANCO
Data: 02/06/2024 09:36:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof (a). Dr (a). Yoko Oshima Franco

Universidade de Sorocaba

Documento assinado digitalmente
gov.br
AKILA LARA DE OLIVEIRA
Data: 03/06/2024 19:44:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof (a). Dr (a). Ákila Lara de Oliveira

Universidade Estadual de Campinas

Documento assinado digitalmente
gov.br
CHARISTON ANDRE DAL BELO
Data: 04/06/2024 10:58:56-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof (a). Dr (a). Chárist on André Dal Belo

Universidade Federal de São Paulo

DEDICATÓRIA

À Luciana Aparecida Cardozo Cantuária minha mãe e José Cantuária Filho meu pai, que mesmo diante de todas as dificuldades sempre me incentivaram a estudar, a buscar pelos meus sonhos e a nunca desistir. Com exemplos práticos me ensinaram a lutar e perseverar, a ser honesta, a ter empatia e respeitar o próximo.

Dedico essa conquista a vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, porque sem a presença dele na minha vida nada disso teria sido possível, e que mesmo nos momentos mais difíceis eu sentia sua presença me fortalecendo e mostrando para qual direção seguir.

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda de um grande número de pessoas, desde professores e pesquisadores que contribuíram materialmente, até familiares, amigos e colegas e funcionários da instituição.

Gostaria de agradecer imensamente meus pais, que sempre acreditaram em mim, que me incentivaram e me apoiaram mesmo diante de todas as dificuldades que enfrentamos. Meus pais nunca tiveram uma vida fácil, e sei de todo sacrifício que eles tiveram que fazer para que eu pudesse chegar até aqui, e chegar até esse momento é uma forma de demonstra toda a minha gratidão por todo trabalho e todo esforço que eles fizeram por mim. Nenhum sonho seria possível de ser realizado se não fosse o apoio incondicional do meu pai e da minha mãe, e a eles devo tudo que sou e tudo que tenho.

Gostaria de agradecer em especial minha namorada que está sempre ao meu lado, me apoiando e me incentivando, que me ajudou em diversos momentos durante a execução deste projeto, e se não fosse ela tudo se tornaria muito mais difícil. Também deixo um agradecimento especial à minha família que me incentivou e me apoio durante os anos do mestrado.

Um agradecimento especial a todos os amigos e colegas, sejam eles do meio acadêmico ou não, que sonharam comigo, me apoiaram e me incentivaram a chegar até esse momento, muito obrigada a todos que estiveram comigo nessa caminhada.

Gostaria de agradecer imensamente a Professora Dra. Yoko, que confiou em mim para a execução deste projeto, que abriu as portas para o mundo da pesquisa desde a graduação, que me ensina todos os dias como ser melhor tanto no lado profissional quanto pessoal, que me incentiva a buscar, conhecer e estudar, que ensina com amor e dedicação. Se o mundo da pesquisa tivesse mais pesquisadores como ela, seria um mundo perfeito.

Também deixo aqui um agradecimento especial a aluna Fernanda de iniciação cientifica que acompanhou parte deste projeto, me auxiliando na execução dos protocolos e no transporte dos animais.

Quero agradecer aos colaboradores deste projeto, Prof. Dr. Jose Maria Gutiérrez, Dr. Mathew Lewin, Dr. Stephen Hyslop e Dr. Rafael Floriano, pelo auxílio com ideias, conteúdos, materiais e reagentes. Deixo um agradecimento mais que especial a Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha do Instituto Butantan, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, auxiliou na execução dos protocolos, compartilhou seus conhecimentos, confiou no meu trabalho e meu ajudou nos dias em que estive em São Paulo. Agradeço a Dra. Caroline S. Silva, por me auxiliar na execução dos protocolos, por compartilhar seus conhecimentos e pela amizade construída. Agradeço também ao Prof. Dr. Benedito Prezoto que aceitou me auxiliar em uma etapa do projeto, me recebeu em seu laboratório e compartilhou comigo seus conhecimentos e sempre se colocou à disposição.

As etapas deste projeto foram realizadas em diferentes laboratórios, os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados nos laboratórios de herpetologia e farmacologia do Instituto Butantan enquanto os ensaios em ex vivo foram realizados no laboratório de pesquisa em neurofarmacologia e multidisciplinar (LaPeNM), e gostaria de agradecer a todos os laboratórios que contribuíram para a obtenção dos resultados deste projeto.

Agradeço aos funcionários tanto da UNISO quanto do Instituto Butantan, sem o trabalho de cada um deles, meu trabalho não seria possível, mesmo que indiretamente.

E deixo aqui registado um agradecimento especial a mim mesma, que acreditei nos meus próprios sonhos, que busquei, que lutei e enfrentei todas as dificuldades que a execução deste projeto apresentou. Agradeço a mim mesma por não ter desistido, mesmo pensando em desistir todos os dias, e por ter aproveitado cada momento intensamente.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”

(Marie Curie)

RESUMO

Frente à questão global de saúde pública envolvendo os acidentes ofídicos e alinhado à proposta da Organização Mundial de Saúde em reduzir a 50% até 2030 as consequências nefastas do envenenamento, este trabalho avaliou a eficácia do Varespladib (VPL) como proposta alternativa e, indiretamente reforçar através de evidências experimentais o seu redirecionamento. O VPL é um inibidor de fosfolipases (PLA_2) e tem se mostrado eficaz contra as atividades tóxicas de diferentes venenos ofídicos ricos em PLA_2. Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* são conhecidos por apresentar potente atividade neurotóxica, podendo levar ao óbito por paralisia respiratória grave. Existem duas principais neurotoxinas presentes nesses venenos, com variações nas concentrações e atividades, entre as diversas espécies. A *Micrurus spixii* (*M. spixii*) é uma cobra coral que habita a região amazônica no Brasil, conhecida como coral amazônica. O estado da arte sobre a composição deste veneno é a existência de toxinas que atuam tanto em nível pré- como pós-sináptico. No primeiro, atua através do conteúdo de PLA_2 que inibe a liberação de acetilcolina pelo neurônio motor; no segundo, através da ação sobre receptores nicotínicos, a exemplo das toxinas de três dígitos (3FTxs) ou α-neurotoxinas, o veneno leva à paralisia neuromuscular por esses dois principais mecanismos. Dessa forma estabeleceu-se o racional teórico deste estudo pela associação de Varespladib à Neostigmina (um agente anticolinesterásico), para avaliar a sua eficácia sobre esses dois alvos moleculares. Foram realizados ensaios para caracterização bioquímica do veneno (quantificação de proteínas totais e eletroforese em SDS-PAGE), tromboelastometria *in vitro* para averiguar a atividade anticoagulante sobre plasma humano, ensaios *in vivo* para avaliar as atividades letais e miotóxicas e ensaios *ex vivo* em preparações neuromusculares de ave. Soro antielapídico comercial foi utilizado em todo o estudo como referência. O teor proteico do veneno foi de 1,59 ± 0,09 mg/mL. Duas bandas majoritárias foram encontradas na eletroforese em SDS-PAGE, indicando a presença de PLA_2 e 3FTx. O veneno apresentou potente atividade anticoagulante sobre o plasma humano *in vitro*, assim como apresentou alta atividade miotóxica, e elevada letalidade *in vivo*. Também foi observado o bloqueio neuromuscular em preparações *ex vivo*, além do bloqueio das respostas contraturantes sobre ACh e KCl exógenos. O soro antielapídico foi totalmente eficaz contra a letalidade, mas nas demais atividades a eficácia foi parcial. Os resultados mostraram que o VPL foi mais eficaz nas atividades que dependiam da ação da PLA_2, como nas atividades anticoagulante e miotóxica. Houve um efeito sinérgico entre o VPL e o soro potencializando a eficácia de ambos. O VPL não apresentou eficiência contra a atividade letal do veneno de *M. spixii*, e, apresentou eficácia

parcial contra o bloqueio neuromuscular nos ensaios miográficos. Esses dois resultados interpretados em conjunto indicam que essas atividades dependem exclusiva ou preponderantemente da ação de α-neurotoxinas pós-sinápticas. A Neostigmina não apresentou eficácia no ensaio de letalidade, nas condições utilizadas, e sugere-se que sua indicação seja revista. Os resultados do presente estudo mostram que o VPL pode ser utilizado como uma alternativa complementar à soroterapia.

Palavras-chave: Elapidae; *Micrurus spixii*; Junção Neuromuscular; Varespladib; Neostigmina; Soro Antielapídico.

ABSTRACT

In the view of the global public health issue involving snakebites and in accordance to the World Health Organization's proposal to reduce the harmful consequences of poisoning by 50% until 2030, this work have evaluated the effectiveness of Varespladib (VPL) as an alternative proposal and, indirectly, reinforce its repurposing, through experimental evidences. VPL is a phospholipase (PLA_2) inhibitor and is effective against the toxic activities of different PLA_2-rich snake venoms. The venoms of snakes of the genus *Micrurus* are known to have potent neurotoxic activity, which can lead to death due to severe respiratory paralysis. There are two main neurotoxins present in these venoms, with variations in concentrations and activities between different species. *Micrurus spixii* (*M. spixii*) is a coral snake that inhabits the Amazon region in Brazil, known as the Amazon coral. The state of the art regarding the composition of this poison is the existence of toxins that act at both pre-and post-synaptic levels. In the first, it acts through the PLA_2 content that inhibits the release of acetylcholine by the motor neuron; in the second, through action on nicotinic receptors, such as three-digit toxins (3FTxs) or α-neurotoxins, the venom leads to neuromuscular paralysis through these two main mechanisms. Thus, the theoretical rationale for this study was established by the association of Varespladib with Neostigmine (an anticholinesterase agent), to evaluate its effectiveness on these two molecular targets. Assays were carried out to biochemically characterize the venom (quantification of total proteins and electrophoresis in SDS-PAGE), in vitro rotational thromboelastometry to investigate the anticoagulant activity on human plasma, *in vivo* assays to evaluate the lethal and myotoxic activities and *ex vivo* assays on avian neuromuscular preparations. Commercial antielapidic serum was used throughout the study as a reference. The protein content of the venom was 1,59 ± 0,09 mg/mL. Two major bands were found in SDS-PAGE electrophoresis, indicating the presence of PLA_2 and 3FTx. The venom showed potent anticoagulant activity on human plasma in vitro, as well as high myotoxic activity and high lethality *in vivo*. Neuromuscular blockade was also observed in *ex vivo* preparations, in addition to the blockade of contracture responses to exogenous ACh and KCl. The antielapidic serum was completely effective against lethality, but in other activities it was partially effective. The results showed that VPL was more effective in activities that depended on the action of PLA_2, such as anticoagulant and myotoxic activities. There was a synergistic effect between VPL and antielapidic serum, enhancing the effectiveness of both. The VPL was not effective against the lethal activity of *M. spixii* venom, as well as being partially effective against the neuromuscular blockade in myographic tests. These two results interpreted together indicate that these

activities depend exclusively or preponderantly on the action of postsynaptic α-neurotoxins. Neostigmine was not effective in the lethality test, under the conditions used, and it is suggested that its indication be reviewed. The results of the present study show that VPL can be used as a complementary alternative to serotherapy.

Keywords: Elapidae; *Micrurus spixii*; Neuromuscular Junction; Varespladib; Neostigmine; Antielapidic serum.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. halys	*Agkistrodon halys*
ACh	Acetilcolina
ALT	Alanina aminotransferase
Asp49	Ácido aspártico na posição 49
AST	Aspartato aminotransferase
B. multicinctus	*Bungarus multicinctus*
BC	Biventer cervicis
BSA	Soro Albumina Bovina
$C_6 H_{12}O_6$	Glicose
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CK	Creatina quinase
CO_2	Dióxido de carbono
CT	Tempo de coagulação
$CuSO_4$	Sulfato de cobre
D. acutus	*Deinagkistrodon acutus*
DE	Dose efetiva
DEA	Dose efetiva anticoagulante
g	Grama
h	Hora
H_2O	Água
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
LD50	Dose letal 50%
LDH1	Isoenzima lactato desidrogenase
M. altirostris	*Micrurus altirostris*
M. corallinus	*Micrurus corallinus*
M. euryxanthus,	*Micrurus euryxanthus*
M. frontalis	*Micrurus frontalis*
M. fulvius,	*Micrurus fulvius*

M. lemniscatus	*Micurus lemniscatus*
M. pyrrhocryptus	*Micrurus pyrrhocryptus*
M. spixii	*Micrurus spixii*
M. tener	*Micrurus tener*
mg	Miligrama
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N. atra	*Naja atra*
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NEO	Neostigmina
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NOBA	Ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico
O_2	Oxigênio
ºC	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLA_2	Fosfolipase A_2
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
s	Segundos
TC	Tempo de coagulação
TR	Tempo de recalcificação
U/L	Unidades por litro
VPL	Varespladib
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
3FTxs	Toxina de três dígitos (*three-finger toxins*)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da ultraestrutura da junção neuromuscular 76

Figura 2 - Representação fotográfica da serpente *Micrurus spixii* 20

Figura 3 – Representação da estrutura química do Varespladib (LY315920) 23

Figura 4 - Perfil típico de ensaio tromboelastométrico 29

Figura 5 – Gel de eletroforese em SDS-PAGE do veneno de *M. spixii* 34

Figura 6 - Análise por densitometria do gel de eletroforese em SDS – PAGE 35

Figura 7 – Determinação da dose efetiva anticoagulante do veneno de *M. spixii* 37

Figura 8 – Perfil ITEM de amostras de plasma humano com diferentes tratamentos 38

Figura 9 – Eficácia do soro antielapídico e Varespladib contra a atividade anticoagulante do veneno de *M. spixii* 39

Figura 10 – Níveis plasmáticos de CK no primeiro ensaio piloto 40

Figura 11 – Níveis plasmáticos de CK no grupo controle e grupo veneno 41

Figura 12 – Camundongos dos grupos tratados de 2 a 5 para posterior dosagem de CK 42

Figura 13 – Níveis plasmáticos de CK em todos os grupos avaliados 43

Figura 14 – Análise de sobrevivência Kaplan-Meier 46

Figura 15 - Representação gráfica da preparação BC, sob estímulo indireto 47

Figura 16 – Resposta contrátil do músculo BC (pré-incubação) 49

Figura 17 - Resposta contrátil do musculo BC (pós-incubação) 50

Figura 18 - Resposta contraturante à adição exógena de ACh 52

Figura 19 - Respostas contraturantes à adição exógena de KCl 53

Sumário

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DA LITERATURA 20

2.1 *Micrurus spixii* 20

2.2 Varespladib 22

3 OBJETIVOS 25

3.1 Objetivo Geral 25

3.2 Objetivos Específicos 25

4 METODOLOGIA 26

4.1 Material 26

4.1.1 Veneno, Soro Antielapídico e Plasma Humano Citratado 26

4.1.2 Varespladib, Neostigmina e Atropina 26

4.1.3 Animais 26

4.2 Métodos 27

4.2.1 Quantificação de proteínas totais do veneno 27

4.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 28

4.2.3 Ensaio de tromboelastografia rotacional (ROTEM) 28

4.2.4 Avalição da Atividade miotóxica 31

4.2.5 Neutralização da atividade letal do veneno de *M. spixii* 32

4.2.6 Preparação Biventer cervicis (BC) de pintainho (*ex vivo*) 33

4.2.7 Análise estatística 33

5 RESULTADOS 34

5.1 Caracterização Bioquímica do Veneno 34

5.1.1 Quantificação de Proteína 34

5.1.2 Eletroforese em SDS-PAGE 34

5.2 Caracterizações das atividades biológicas da peçonha 37

5.2.1 Ensaios tromboelastométricos 37

5.2.2 Determinação da atividade miotóxica 39

5.2.3 Neutralização da letalidade/toxicidade do veneno 43

5.2.4 Avaliação da ação neurobloqueadora em BC de pintainho 46

6 DISCUSSÃO 54

7 CONCLUSÃO 64

REFERÊNCIAS 65

APÊNDICE A – PROTOCOLOS MIOGRÁFICOS PREVISTOS 74

ANEXO 1 – ESTRUTURA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR 76

ANEXO 2 - CARTA DE DOAÇÃO DE PLASMA HUMANO 77

ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO CEUA DO INSTITUTO BUTANTAN 78

ANEXO 4 – APROVAÇÃO DO CEUA DA UNISO 79

ANEXO 5 – EMENTA CEUA UNISO 80

ANEXO 6 – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO CONGRESSO VENOMS AND TOXINS 2023 81

ANEXO 7 – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO CONGRESSO SBTx & IST 2023 82

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos compõem a lista de doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), constituem um problema de saúde pública em regiões menos desenvolvidas de países tropicais e subtropicais, além de serem responsáveis por diversos danos às vítimas (Gutiérrez *et al*., 2017; World Health Organization, 2019). Dados da OMS mostram que cerca de 4,5 a 5,4 milhões de pessoas são picadas por serpentes anualmente, e que deste número cerca de 1,8 a 2,7 milhões são casos de envenenamento, resultando em 81.000 a 138.000 óbitos e mais de 400.000 pessoas com algum tipo de sequela (Gutiérrez *et al*., 2017; World Health Organization, 2019).

Os acidentes ofídicos além de ser um grave problema de saúde pública, também são um problema político, social e econômico. O gasto financeiro com as vítimas é altíssimo, tendo em vista que pode haver diversas complicações clínicas no quadro, fazendo com que a vítima utilize por mais tempo os serviços de saúde, e em algumas situações é preciso dar suporte para as famílias em situações de vulnerabilidade social (World Health Organization, 2019; Gutiérrez *et al*., 2017). Devido à complexidade dos acidentes ofídicos, a OMS propôs algumas estratégias para reduzir a mortalidade e a incapacidade causadas pelos envenenamentos ofídicos em 50% até o ano de 2030. Essas estratégias abrangem capacitar e envolver as comunidades proporcionando educação sobre os riscos e incentivando a procurar os serviços de saúde, garantir um tratamento seguro e eficaz, fortalecer os sistemas de saúde e capacitar os profissionais, e aumentar as parcerias, coordenação e recursos (World Health Organization; World Health Organization, 2019).

O Brasil se enquadra nesse cenário mundial, devido a variedade de serpentes peçonhentas que habitam o território nacional e a quantidade de acidentes que acometem pessoas de diversas regiões do país (Brasil, 2019). De acordo com dados obtidos do sistema de informações de agravos de notificação (SINAN), no ano de 2022 ocorreram cerca de 28.701 acidentes ofídicos em todo o território nacional, sendo que as regiões norte e nordeste apresentaram o maior número (10.246 e 8.755 respectivamente), quando comparadas com as regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (Brasil, 2023). Entretanto é importante destacar que esse número pode ser ainda maior, podendo haver divergências de dados por subnotificação ou não notificação dos casos, sendo que em muitos casos a vítima não chega a procurar os serviços de saúde, e quando procura, os profissionais de saúde não estão treinados para o

preenchimento correto dos formulários de notificação compulsória (Araújo; Câmara; Guedes, 2023; Bochner; Fiszon; Machado, 2014).

No Brasil existem 4 gêneros de serpentes peçonhentas de importância médica, pertencentes as famílias Viperidae e Elapidae, sendo eles: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçara, comboia), *Crotalus* (cascavel, boicininga), *Lachesis* (surucucu, surucuru-pico-de-jaca) e *Micrurus* (cobra coral) (Pinho; Pereira, 2001).

A serpente alvo deste estudo, *Micrurus spixii (M. spixii)*, pertence à família Elapidae e ao gênero *Micrurus*. A família Elapidae abrange gêneros de serpentes distribuídos no mundo todo. No "Velho Mundo", que compreende os continentes Africano, Asiático e Europeu, há representantes importantes desta família como as espécies do gênero *Naja*, *Ophiophagus e Dendroaspis.* No "Novo Mundo", que se refere ao continente americano, existem três gêneros sendo eles: *Micruroides, Leptomicrurus e Micrurus* (Campbell; Lamar, 2004).

O gênero *Micrurus* abriga diversas espécies incluindo *M. spixii*; estas espécies estão distribuídas amplamente entre as regiões das Américas, sendo encontradas em diversos países, abrangendo desde a região sudeste dos Estados Unidos até a região norte da Argentina (Campbell; Lamar, 2004; Sanz *et al*., 2019a). Uma característica das serpentes da família Elapidae é que elas possuem glândulas de veneno e dentição proteróglifa (dentes inoculadores de veneno imóveis e curtos que estão localizados na parte anterior da boca e apresentam um sulco por onde o veneno escorre) (Vital Brazil, 1982).

De modo geral o veneno de *Micrurus* é conhecido principalmente por suas propriedades neurotóxicas, podendo agir em alvos pré- ou pós-sinápticos ou em ambos (Gutiérrez *et al*., 2016). A partir de estudos envolvendo diferentes espécies de *Micrurus* constatou-se que o veneno destas serpentes possui várias toxinas, dentre as quais as duas principais são: α-neurotoxinas pós-sinápticas, conhecidas como toxina de três dígitos (*three-finger toxins* (3FTxs)) que se ligam aos receptores nicotínicos colinérgicos, e as β-neurotoxinas pré-sinápticas da família de proteínas fosfolipase A_2 (PLA_2) que atuam diminuindo a liberação da acetilcolina (ACh) (Figura 1, Anexo 1).

A concentração dessas toxinas varia de uma espécie para outra (Lomonte *et al*., 2019; Rossetto; Rigoni; Montecucco, 2004; Sanz *et al*., 2019b). Alguns venenos de *Micrurus* também podem apresentar atividade miotóxica, inflamatória e interferir na coagulação sanguínea (Carbajal-Saucedo *et al*., 2014; Terra *et al*., 2015).

Os efeitos do envenenamento em humanos por *Micrurus* são graves, a vítima pode apresentar dor, parestesia, fraqueza, visão turva, bloqueio da transmissão neuromuscular, flacidez, paralisia e, em casos graves, parada respiratória e evoluir rapidamente ao óbito (Bucaretchi *et al*., 2016; Sanz *et al.*, 2019b; Vergara *et al*., 2014). No Brasil, o tratamento recomendado pelo Ministério da saúde para esses quadros de intoxicações é a administração do soro antielapídico, devendo este ser administrado em ambiente hospitalar e, também, a administração de drogas anticolinesterásicas, como a Neostigmina (NEO), que permite uma reversão mais rápida da sintomatologia respiratória, enquanto o paciente é transferido para locais que possuam recursos de assistência ventilatória mecânica (Brasil, 2001).

O soro antielapídico bivalente é obtido a partir do plasma de equinos hiperimunizados com uma mistura dos venenos das serpentes *Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus* (Instituto Butantan, 2017). No entanto, apesar do soro ser produzido com peçonha de apenas duas espécies, estão descritas mais de 30 espécies diferentes de *Micrurus* no Brasil, e existe uma grande variação na composição desses venenos (Silva Jr *et al*., 2021, p. 391). Segundo um estudo conduzido Tanaka *et al*. (2010) o soro antielapídico produzido e utilizado no país não é capaz de neutralizar as principais atividades tóxicas apresentadas pelos venenos de todas as espécies de *Micrurus.*

Além da baixa especificidade do soro antielapídico frente às atividades tóxicas das diversas espécies de *Micrurus*, o uso exclusivo do soro antielapídico para tratamento de acidentes ofídicos apresenta algumas limitações. Dente as limitações observadas, estão o alto custo para a produção, logística para transporte e armazenamento especial, necessidade de profissionais de saúde capacitados, administração em ambientes hospitalares, e dificuldade de acesso nas regiões e comunidades mais afastadas, pois elas não possuem estrutura ideal para armazenar estes produtos, fazendo com que a população tenha que percorrer longas distâncias até o local mais próximo que disponha do soro antiofídico (Gutiérrez *et al*., 2021; Lewin *et al*., 2016; Williams *et al*., 2019). Devido a esses fatores, existe a necessidade premente de se descobrir e testar novas alternativas que possam otimizar o tratamento de acidentes ofídicos por serpentes Elapídicas no Brasil.

O Varespladib (VPL) é uma substância que se apresenta como uma alternativa complementar ao tratamento dos envenenamentos ofídicos podendo ser redirecionado para esta finalidade (Gutiérrez *et al*., 2020; Koh; Bendre; Kini, 2020). O VPL (LY315920) é uma molécula sintética capaz de inibir a ação das enzimas PLA_2 presentes nos venenos de diversas

espécies de serpentes (Bryan-Quirós *et al*., 2019; De Souza *et al*., 2022; Gutiérrez *et al*., 2021; Lewin *et al*., 2016; Lewin *et al*., 2018a; Lewin *et al*., 2018b; Oliveira *et al*., 2020; Wang *et al*., 2018; Xiao *et al*., 2018; Zinenko; Tovstukha; Korniyenko, 2020). O uso do VPL para tratamento de acidentes ofídicos apresenta algumas vantagens quando comparado aos soros antiofídicos, tais como facilidade na logística, no transporte e no armazenamento, por não necessitar de ambientes com controle de temperatura, maior estabilidade, menor custo de produção, disponibilidade oral e acesso facilitado podendo chegar nas regiões e comunidades mais distantes (Gutiérrez *et al*., 2021). Além disso, como relatado anteriormente, o veneno de *M. spixii* apresenta em sua composição, toxinas PLA_2, justificando o emprego do Varespladib.

Este estudo contribuiu para expandir os conhecimentos acerca da peçonha desta espécie em específico e compreender melhor sua correlação com as demais espécies do gênero. Permitiu compreender os efeitos do VLP contra a ação da peçonha desta espécie, sua relação com a PLA_2, de diferentes espécies e gêneros, e comparar sua eficácia com o tratamento recomendado.

Os resultados deste estudo, em conjunto com os demais dados já publicados sobre o VPL, contribuirão para o redirecionamento desta molécula como uma alternativa complementar no tratamento dos acidentes ofídicos, impactando a saúde pública ao facilitar o acesso ao tratamento e, consequentemente, ao reduzir o número de óbitos e sequelas muitas vezes incapacitantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Micrurus spixii*

Existem poucos estudos envolvendo a biologia dos venenos das serpentes do gênero *Micrurus*, e uma quantidade ainda menor envolvendo a espécie *M. spixii*. Esse fato, ocorre principalmente devido à dificuldade de acesso ao veneno destes animais, fazendo com que algumas questões acerca destes compostos ainda permaneçam sem respostas.

A espécie *M. spixii* (Figura 2) é conhecida popularmente como cobra coral da Amazônia. Esta serpente também pode ser encontrada em outros países da América do Sul, como Colômbia, Peru e Venezuela (Campbell; Lamar, 2004; Cunha; Nascimento, 1982; Terra *et al.*, 2015). Esta espécie apresenta hábitos de vida semi-fossorial (escondendo-se em pequenas galerias e em meio à serrapilheira), sua alimentação consiste basicamente em pequenas serpentes, lagartos e anfisbenídeos (Campbell; Lamar, 2004; Nascimento *et al*., 2016; Sanz *et al.*, 2019b).

Figura 2: Representação fotográfica da serpente *Micrurus spixii*

Fonte: Andre Cardoso, CC POR 2.0, via Wikimedia Commons. **Disponível em:** https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Micrurus_spixii_2.jpg.

Vital Brasil; Fontana; Heluany (1995) demonstraram que o veneno de *M. spixii* causa bloqueio neuromuscular em preparação nervo frênico-diafragma de rato e na preparação biventer cervicis de pintainho. A 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) antagonizou o efeito do

veneno sobre a transmissão neuromuscular em preparação de mamífero, sugerindo que o veneno dessensibiliza os receptores na placa terminal.

O veneno de *M. spixii* apresenta alta atividade fosfolipásica, proteolítica, hialuronidásica e alta atividade letal quando comparado às espécies *M. corallinus*, *M. altirostris*, *M. lemniscatus* e *M. frontalis,* além de ser antagonizado parcialmente pelo soro antiofídico (Tanaka *et al*., 2010).

Valeriano-Zapana *et al*. (2013), em seus estudos com o veneno de *M. spixii* de origem peruana, buscaram identificar e isolar a PLA_2 presente neste veneno, bem como caracterizaram algumas atividades biológicas desta peçonha. A PLA_2 isolada produziu aumento de creatina quinase (CK) em camundongos e apresentou atividade edematogênica em camundongos.

A miotoxicidade da peçonha foi evidenciada pela liberação aumentada de CK no plasma de camundongos intoxicados experimentalmente e, também *in vitro*, por inibir as contrações tanto indiretas como diretas do músculo diafragma (estímulos diretos aplicados no músculo com prévia proteção dos receptores nicotínicos através do antagonista de ACh, brometo de pancurônio), demonstrando atividade sobre as fibras musculares esqueléticas, efeito que contribui para a paralisia muscular. O veneno apresentou atividade edematogênica significativa no modelo animal avaliado. Desse estudo isolou-se a MsPLA2-I, uma nova PLA_2, cujo sequenciamento N- terminal evidenciou a presença de um aminoácido ácido aspártico na posição 49 (Asp49), sendo uma característica de PLA_2 ativa enzimaticamente, e o veneno apresentou alta atividade fosfolipásica (Terra *et al.*, 2015). Também foi evidenciado neste estudo que o veneno de *M. spixii* possui ampla atividade edematogênica quando comparado com outras peçonhas de *Micrurus*.

Uma leitura atenta mostra alguns pontos divergentes entre os achados de Vital Brazil *et al*. (1995) e Terra *et al*. (2015). Terra *et al*. (2015) observaram um efeito apresentado pelo veneno no músculo diafragma de camundongo, sob estímulo direto, enquanto Vital Brazil *et al* (1995), não descreve esse efeito, assim como não descreve a despolarização da membrana muscular. Já o estudo de Yang *et al.* (2017) corrobora os achados de Vital Brazil *et al*. (1995), no qual o veneno foi testado para avaliar a eficácia *in vitro* do soro antielapídico em preparação de biventer cervicis de pintainho contra os venenos de *M. euryxanthus*, *M. fulvius*, *M. pyrrhocryptus* e *M. tener*. Dentre os 5 venenos ensaiados, *M. spixii*, *M. pyrrhocryptus* e *M. tener* induziram bloqueio neuromuscular sendo que todos foram capazes de inibir

significativamente as respostas contraturantes à ACh exógena, carbacol, mas não ao KCl (Yang *et al*., 2017).

Em um estudo recente, o veneno de *M. spixii* apresentou alta atividade fosfolipásica utilizando-se o substrato sintético ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico (NOBA). O veneno também causou um rápido bloqueio total da contração muscular, em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (Couceiro *et al*., 2023).

Assim, algumas questões sobre o real mecanismo de ação deste veneno ainda permanecem não esclarecidas.

2.2 Varespladib

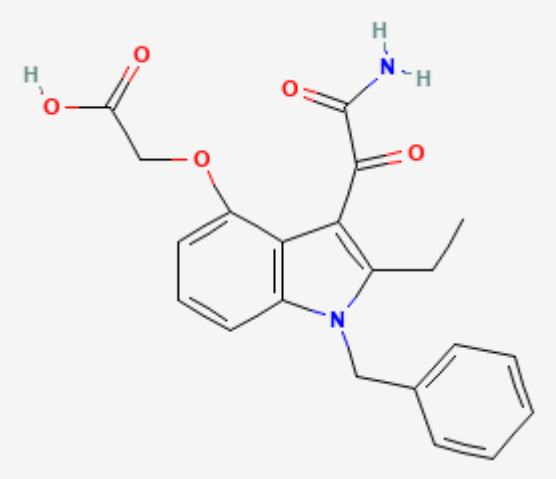
Através de análises proteômicas e toxicológicas é possível identificar os grupos de toxinas que desempenham um papel importante nos venenos, e agrupá-los de acordo com sua toxicidade e quantidade. As PLA_2 juntamente com as 3FTxs e metaloproteinases (SVMPs) pertencem aos grupos de alta toxicidade e abundância, podendo ocorrer variações entre as espécies, porém elas exercem um papel muito importante na fisiopatologia dos envenenamentos (Gutiérrez *et al*., 2021). As PLA_2 são divididas em três grupos: o grupo IB são as PLA_2 pancreáticas, enzimas digestivas encontradas nos mamíferos, já as PLA_2 presentes nos venenos de serpentes fazem parte do grupo IA e IIA. As PLA_2 são proteínas pequenas, com baixo peso molecular, podendo ser identificadas entre 14 a 18 kDa (Gutiérrez *et al*., 2021; Burke; Dennis, 2009; Valeriano-Zapana *et al*., 2013).

As PLA_2 estão presentes na composição dos venenos de quase todas as espécies de serpentes peçonhentas (Lewin *et al*., 2022; Tasoulis; Isbister, 2017), e apresentam diversas atividades tóxicas, como: neurotoxicidade, miotoxicidade, nefrotoxicidade, atividade edematogênica, anticoagulante, hemolítica e efeitos cardiovasculares. Além dessas atividades, as PLA_2 ainda podem atuar como catalisadores para outras toxinas tais como as metaloproteases (Gutiérrez *et al*., 2021). Por elas serem responsáveis por diferentes atividades tóxicas a busca por compostos que atuem inibindo suas ações são de grande importância.

O VPL (ácido 2-(1-benzil-2-etil-3-oxamolindol-4-il) oxiacético) (Figura 3) tem se apresentado como um inibidor sintético promissor de PLA_2 sendo que o seu uso direcionado aos venenos ofídicos tem sido conduzido para avaliar eficácia frente aos diferentes venenos distribuídos ao redor do mundo (Gutiérrez *et al*., 2021; Lewin *et al*., 2022).

Antes de ser avaliada na área da toxinologia, esta molécula foi estudada em doenças inflamatórias como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e sepse. Entretanto, os estudos não evoluíram após os ensaios clínicos de fase II e III, em que pese os estudos mostrarem que o Varespladib era seguro para uso em humanos em regimes de doses múltiplas. E justamente por se apresentar como um inibidor de PLA_2, foi que os toxinologistas passaram a avaliar sua atividade contra as PLA_2 presentes em peçonhas ofídicas. Assim, diferentes pesquisadores ao redor do mundo passaram a investigar a ação desta molécula contra peçonhas ricas em PLA_2.

Figura 3: Representação da estrutura química do Varespladib (LY315920)



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 155815, Varespladib. **Disponível em:** https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Varespladib#section=Structures.

Lewin *et al*. (2016) foram os primeiros a demonstrarem que o VPL inibia as PLA_2 de venenos de serpentes das famílias de viperídeos e elapídeos, em modelos *in vitro* e *in vivo*. De 2016 até os dias atuais mais de 30 artigos já foram publicados, com venenos de diferentes espécies e de diversas regiões do mundo, abordando a eficácia do VPL diante das atividades tóxicas desses venenos (Gutiérrez *et al*., 2021; Lewin *et al*., 2022).

Wang *et al*. (2018) avaliaram a eficácia do VPL contra atividade hemorrágica, mionecrótica e toxicidade sistêmica dos venenos brutos de *Deinagkistrodon acutus* (*D. acutus*), *Agkistrodon halys* (*A. halys*), *Bungarus multicinctus* (*B. multicintus*), e *Naja atra* (*N. atra*). O VPL mostrou ação inibitória dose dependente contra a atividade enzimática da PLA_2, *in vitro*. A atividade hemorrágica dos venenos *D. acutus* e *A. halys* foi quase totalmente inibida após o uso do VPL. O uso do VPL diminuiu os níveis séricos de CK nos ensaios *in vivo*, com exceção do veneno de *B. multicinctus*, e diminuiu significativamente os níveis séricos de alanina

aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e da isoenzima lactato desidrogenase (LDH1).

Também foram realizados ensaios *in vivo*, utilizando camundongos e suínos, com venenos de diferentes espécies da família Elapidae, com atividade neurotóxica e mecanismo de ação pré-sináptico, mostrando que o VPL foi capaz de prevenir ou retardar o óbito dos animais nestes ensaios (Gutiérrez *et al*., 2020; Lewin *et al*., 2018b; Lewin *et al*., 2018a).

As PLA_2 podem interferir no processo fisiológico de coagulação sanguínea, sendo classificadas em fortes, fracas e não coagulantes, atuando através da hidrólise ou adesão aos fosfolipídeos ou através da ligação com algum fator da cascata de coagulação, inibindo assim a cascata de coagulação (Kini, 2005, 2006). O VPL tem apresentado eficácia em inibir a atividade anticoagulante de alguns venenos através da inibição da atividade da PLA_2 (Dashevsky *et al*., 2021; Xie *et al*., 2020; Youngman *et al*., 2020; Zdenek *et al*., 2020).

Em estudos *ex vivo* utilizando preparações isoladas do nervo frênico-diafragma de camundongos, o VPL foi eficaz em inibir o bloqueio neuromuscular causado pelos venenos de *Oxyuranus scutellatus* (Oliveira *et al*., 2020) e *Crotalus durissus terrificus* (de Souza *et al*., 2022).

O veneno da *M. spixii* é composto por PLA_2 e 3FTxs (Sanz *et al*., 2019b), que constituem o racional teórico deste estudo: Varespladib atuando no alvo molecular das PLA_2, e quando em associação à Neostigmina (NEO), atuando em alvos moleculares das 3FTxs. A NEO faz parte do tratamento de envenenamentos causados por serpentes do gênero *Micrurus*, resultante dos achados de Vital Brazil (Vital Brazil; Fontana; Pellegrini Filho, 1976; Vital Brazil; Vieira, 1996), indicado para venenos que agem pós-sinapticamente.

Dessa forma, o presente estudo traz valiosa contribuição à área da toxinologia, seja na fisiopatologia do envenenamento como no espectro de ação do Varespladib com vistas ao seu redirecionamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as diferentes atividades tóxicas do veneno bruto de *M. spixii*, e a eficácia da associação do Varespladib e da Neostigmina comparativamente ao soro antielapídico, através de estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

Estudos *in vitro*

a) Quantificar as proteínas totais presentes no veneno bruto de *M. spixii*, através do método de dosagem de proteínas totais.
b) Identificar as bandas proteicas presentes no veneno bruto de *M. spixii*, e sua relação com os principais grupos de toxinas utilizando eletroforese em SDS-PAGE.
c) Avaliar a ação anticoagulante do veneno através de ensaios tromboelastométricos.
d) Avaliar a capacidade de neutralização do soro antielapídico e do Varespladib contra a ação anticoagulante do veneno, através de ensaios tromboelastométricos.

Estudos *in vivo*

a) Avaliar a atividade miotóxica do veneno, e a neutralização dessa atividade pelo soro antielapídico, Varespladib e a eficácia da associação de ambos, através da determinação dos níveis plasmáticos de creatina quinase.
b) Avaliar a capacidade de neutralização do soro antielapídico, Varespladib e Neostigmina contra a atividade letal do veneno de *M. spixii*.
c) Determinar o tempo de sobrevida dos animais, sujeitos aos tratamentos no ensaio de letalidade, utilizando o método de Kaplan-Meier.

Estudos *ex vivo*

a) Avaliar a ação do veneno bruto de *M. spixii* sobre a junção neuromuscular em preparações isoladas de ave (Biventer cervicis de pintainho).
b) Avaliar através de estudos miográficos a eficácia do Varespladib e da NEO, contra a ação do veneno de *M. spixii*, comparativamente ao soro antielapídico.

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental utilizando ensaios tanto *in vitro* e *in vivo* (camundongos) como *ex vivo* com preparações neuromusculares de aves.

4.1 Material

4.1.1 Veneno, Soro Antielapídico e Plasma Humano Citratado

O veneno liofilizado [Lote: 01/15-01] da espécie *M. spixii* foi doado pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (SP) por intermédio da colaboração da Dra. Marisa M. Teixeira da Rocha.

O soro antielapídico [Lote 090310-03A, prazo de validade para uso humano: 03/2013], uma preparação liquida, produzido pela Fundação Ezequiel Dias, foi doado pelo Professor Dr. Stephen Hyslop, da Universidade Estadual de Campinas (SP).

O plasma humano citratado (0,32% de concentração final), foi doado pela Colsan (Associação Beneficente de Coleta de Sangue) (Hemorrede SP/SUS), São Paulo, SP, Brasil ao Professor Dr. Benedito Carlos Prezoto do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan (SP) (Anexo 2).

4.1.2 Varespladib, Neostigmina e Atropina

O Varespladib (Número CAS: 172732-68-2, Sigma-Aldrich Chemical Co.), foi doado pelo Professor José Maria Gutierrez da Universidade da Costa Rica (San José, Costa Rica) e pelo Professor Rafael S. Floriano da Universidade do Oeste Paulista (SP).

O metilsulfato de Neostigmina (referência: N126-1G, número CAS: 51-60-5, Sigma-Aldrich Chemical Co.) e Atropina (referência: A0132-1G, número CAS: 5908-99-6, Sigma-Aldrich Chemical Co.) encontravam-se em estoque no LaPeNM (Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar).

4.1.3 Animais

Camundongos machos pesando entre 18-22 g, da linhagem Swiss foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, SP. Foram alocados (5 camundongos/gaiola) no biotério

do Laboratório de Herpetologia do IB e ambientados em sala com exaustão e ventilação apropriada, com ciclos de claro/escuro de 12 h controlados por *time.* Os animais foram acomodados em camas de maravalha livre de substâncias químicas e receberam ração (Nuvilab CR-1 Irradiada, Quimtia) e água *ad libitum.*

Pintainhos machos com 4 a 8 dias de vida, da linhagem HY-line W36, foram adquiridos da Agropecuária AgroPet, Itu, SP, e ambientados no LaPeNM durante 4 h antes do uso e receberam ração e água *ad libitum.*

Este estudo foi submetido e aprovado pelas Comissões de Ética de Uso de Animais do Instituto Butantan e da Universidade de Sorocaba (Anexos 3, 4, 5).

4.2 Métodos

4.2.1 Quantificação de proteínas totais do veneno

O teor de proteínas totais dos venenos foi estimado segundo o método descrito por Lowry *et al*. (1951) e modificado por Markwell *et al*. (1978). Inicialmente, foi determinada a Curva Padrão de Soro Albumina bovina (Bovine Serum Albumin (BSA)) e a correspondência entre os valores obtidos nas diferentes concentrações dentro de um intervalo de 31,2 a 1000 µg, e escolhidas as concentrações (em µg) dos venenos a serem usadas nos testes.

O veneno foi diluído em salina 0,85% (1 mg/mL) e a solução a ser testada preparada na proporção de 1:2 em um volume final de 50 µL por poço. Posteriormente, foram adicionados 150 µL da solução "C" [1 parte de solução "B" ($CuSO_4$ 4%) + 100 partes de solução "A" (Na_2CO_3 2% + NaOH 4% + tartarato de sódio 0,16% + SDS 1%)] e a placa (96 poços) foi mantida em repouso por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 15 µL (1 parte de reativo e fenol + 1 parte de H_2O) e a placa foi deixada em repouso por mais 45 min à temperatura ambiente. A absorbância foi lida em 660 nm utilizando-se o leitor de placas (SpectraMax), sendo o "branco" a amostra na qual o veneno não foi adicionado.

A quantidade de proteínas foi expressa em mg de proteína por mL de veneno, considerando como teor proteico a média entre as triplicatas.

4.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As amostras do veneno foram preparadas com 20 µL de uma solução de veneno (na proporção de 1,0 mg/mL - em solução salina 0,85%) com adição de 5 µL de tampão de amostra com ou sem a adição de 2 µL de β-mercaptoetanol, que age como redutor, quebrando pontes-dissulfeto com a finalidade de facilitar a identificação dos grupos proteicos, sendo que em alguns casos essas proteínas podem estar ligadas com outros grupos proteicos impedindo a identificação de todos (Müller; Winter, 2017).

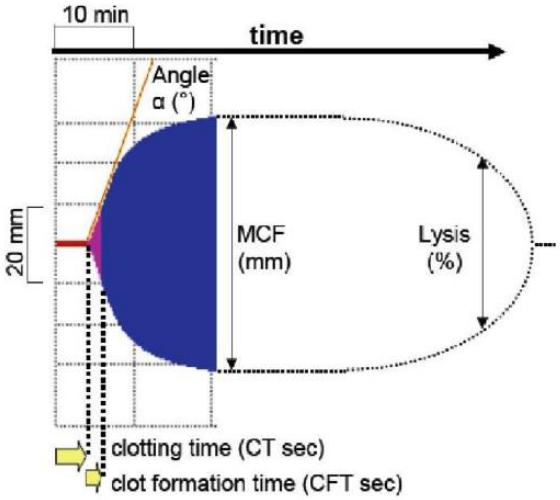
Em seguida o material foi homogeneizado e centrifugado por 5 min. Após este processo a amostra foi aquecida em banho seco por mais 5 min.

A técnica de eletroforese em SDS-PAGE foi realizada conforme Laemmli (1970). O gel foi preparado em gradiente de concentração de 10 a 20% de acrilamida para o gel de separação, e 4% para o gel de concentração, utilizando-se o equipamento da marca Amerschan Bioscience; cuba e placas, e fonte da marca Pharmacia Biotech; sendo a última padronizada com voltagem de 200V e miliamperagem fixada em 150 mA. Ao final da corrida, o gel foi submerso em solução corante de Coomassie B. Blue, por no mínimo 3 h e logo após colocado em solução descorante, para que as bandas de proteínas fossem visualizadas em suas respectivas *lines,* e por fim, submersos em água para hidratação, documentação e preservação.

4.2.3 Ensaio de tromboelastografia rotacional (ROTEM)

O ensaio de tromboelastografia rotacional (ROTEM) permite avaliar a formação e dissolução de coágulos em tempo real em pequenas amostras de sangue total citratado ou heparinizado, medindo as alterações viscoelásticas do sangue, através do monitoramento de diversos parâmetros, como as etapas de iniciação, formação, estabilidade, resistência e dissolução do coágulo, sendo visualmente mostrado (Figura 4) (Whiting; DiNardo, 2014). Também é possível analisar separadamente as diferentes etapas da cascata de coagulação, como a via intrínseca (INTEM) (ativada pelo ácido elágico) e extrínseca (EXTEM) (ativada pelo fator tecidual) (Drotarova *et al*., 2023).

Figura 4: Perfil típico de ensaio tromboelastométrico



Legenda: perfil ROTEM típico. **Fonte:** imagem obtida pelo Prof. Benedito Carlos Prezoto.

Os fatores da cascata de coagulação desempenham um papel fundamental no início da coagulação, tanto da via intrínseca quanto extrínseca, e o papel desses fatores podem ser observados como o valor do tempo de coagulação (TC) (*clotting time*), seja nos ensaios INTEM ou EXTEM (Drotarova *et al*., 2023). O TC compreende o tempo desde o início da análise até o início da formação do coágulo, quando esse tempo é encurtado tem-se hipercoagulabilidade, e quando ele é prolongado observa-se a hipocoagulabilidade. O tempo de recalcificação (TR) está diretamente relacionado com o TC, onde é adicionado 20 μL de $CaCl_2$ nas amostras analisadas, sendo o Ca^{2+}, um cofator importante na cascata de coagulação (Oguiura *et al*., 2014).

Nesta série de ensaios, o parâmetro do tempo de coagulação (CT) em segundos (s), desde o início da reação até a formação inicial do coágulo) do ensaio INTEM (tromboelastometria da via intrínseca) foi medido usando um sistema computadorizado de quatro canais ROTEM (Pentapharm, Munique, Alemanha), utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Nos ensaios foram utilizados plasma humano citratado doado pela Colsan (Associação Beneficente de Coleta de Sangue, Hemorrede SP/SUS, São Paulo, SP, Brasil), e as amostras de veneno foram dissolvidas em solução de NaCl 0,9% antes do uso, e diluições seriadas foram preparadas de acordo com o decorrer dos experimentos. O mesmo ocorreu com o VPL que foi dissolvido em solução de NaCl 0,9% e colocado em banho ultrassônico por 30 min antes do uso. O soro antielapídico foi utilizado na forma liquida. Os copos tinham um volume final de 340 μL.

Determinação do tempo de recalcificação e da dose efetiva anticoagulante (DEA) do veneno de *M. spixii* em amostras de plasma humano recalcificado

Em um primeiro momento foi determinado o parâmetro de TC do tempo de recalcificação das amostras de plasma humano, sendo considerado como controle negativo. A dose efetiva anticoagulante (DEA) foi determinada como a dose de veneno capaz de prolongar em 100% os valores do parâmetro de TC do tempo de recalcificação.

Para a determinação da DEA do veneno de *M. spixii*, dois grupos experimentais (n=6) foram realizados, conforme o seguinte protocolo: (1) adição de 60 μL de solução NaCl a 0,9% a 260 μL de plasma humano antes da calcificação com $CaCl_2$ (0,2 M) (grupo controle), para determinação do tempo de recalcificação (TR); (2) em 60 μL de solução NaCl a 0,9 %, adição de doses crescentes (0,25 μg; 0,5 μg; 1 μg e 2 μg) do veneno de *M. spixii*, para determinação da DEA.

Determinação da dose efetiva (DE) de soro antielapídico contra a DEA do veneno de *M. spixii*

A DE do soro antielapídico foi definida como sendo a dose mínima (em μL) suficiente para restaurar os valores de TC induzidos pela DEA do veneno de *M. spixii* para dentro do intervalo de tempo do TR das amostras de plasma não tratadas e recalcificadas em 100% dos ensaios (grupo controle).

Para a determinação da DE do soro antielapídico contra a DEA do veneno de *M. spixii*, o grupo experimental (n=6) com doses crescentes de soro foi preparado da seguinte maneira: (3) antes da recalcificação, 260 μL de plasma humano foram incubados por 1 min com 60 μL de solução de NaCl 0,9% contendo a DEA do veneno e doses crescentes do soro (0,5 μL; 1 μL e 2 μL), para determinação de sua DE.

Determinação da dose efetiva (DE) do Varespladib contra a DEA do veneno

A DE do Varespladib foi definida como a dose mínima (em μg ou ng) suficiente para restaurar os valores de TC induzidos pela DEA do veneno de *M. spixii* para aqueles dentro dos intervalos de tempo do TR das amostras de plasma não tratadas e recalcificadas em 100% dos ensaios (grupo controle).

Um grupo experimental (n=6) foi testado conforme o seguinte protocolo: (4) antes da recalcificação, 260 µL de plasma humano foram incubados por 1 min com 60 µL de solução de NaCl 0,9% contendo a DEA do veneno de *M. spixii* e doses crescentes de Varespladib (15 ng; 30 ng e 60 ng), para determinação de sua dose efetiva.

Eficácia da associação entre soro antielapídico e Varespladib

Para a determinação da eficácia da associação entre soro antielapídico e Varespladib foram utilizadas uma dose não eficaz do soro e uma dose não eficaz Varespladib. O grupo experimental (n=6) foi testado conforme o seguinte protocolo: (5) antes da recalcificação, 260 µL de plasma humano foram incubados por 1 min com 60 µL de solução de NaCl 0,9% contendo a dose EAD do veneno de *M. spixii*, com uma dose ineficaz de soro antielapídico (1 µL), e uma dose ineficaz de Varespladib (30 ng).

4.2.4 Avaliação da Atividade miotóxica

Para a avaliação da atividade miotóxica utilizou-se o método de quantificação dos níveis séricos da enzima creatina quinase (CK), que é liberada após uma lesão celular, conforme o método descrito por Gutiérrez; Arroyo; Bolãnos (1980).

Inicialmente, foi realizado um ensaio piloto para definir qual seria o tempo de coleta e a dose mínima necessária para produzir aumento significativo dos níveis de CK. Foram utilizadas as doses de 5 e 10 µg/animal (5,0 ou 10,0 µg/50 µL) e um controle negativo (solução estéril de NaCl 0,9%), em grupos de 3 camundongos.

Após o ensaio piloto, camundongos machos Swiss pensando entre 18 a 22 g foram randomicamente divididos em 5 grupos (n=5). Cada grupo recebeu 10 µg/50 µL de veneno por via intramuscular (musculo gastrocnêmico), com exceção do grupo controle (1) que recebeu 50 µL de solução estéril de NaCl 0,9%. Os grupos testados foram: (2) controle veneno (10 µg/50 µL); (3) soro antielapídico (2x a Dose Efetiva, DE, recomendada pelo fabricante); (4) Varespladib (250 µM) reconstituído em solução NaCl 0,9% e colocado em banho ultrassônico por 30 minutos antes do uso; (5) soro antielapídico (2x DE) + Varespladib (250 µM). Os animais foram colocados em aprofundamento anestésico com Cetamina (Syntec) e Xilazina (Syntec) e amostras de sangue foram coletadas 3h após (por punção cardíaca) utilizando seringas heparinizadas, e centrifugadas por 15 min a 10 rpm. A atividade de CK expressa em

U/L, foi determinada utilizando-se o kit CK MB UV (K069-1, Bioclin, Quibasa – Química Básica Ltda, Santa Branca, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as orientações do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em 340 nm em Leitor de Placas (SpectraMax i3).

4.2.5 Neutralização da atividade letal do veneno de *M. spixii*

Para este ensaio foram utilizadas amostras de veneno de *M. spixii* correspondentes a 6x a Dose Letal 50% (LD50) (1 LD50 = 8 μg/20g camundongo), conforme determinado por Tanaka *et al*. (2010).

Os animais foram randomicamente divididos em 8 grupos (n=10), receberam os tratamentos por via intraperitoneal (volume total de 0,5 mL) e foram observados durante 48 h. Os tratamentos administrados em cada grupo encontram-se descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: tratamento administrado em cada grupo

Grupo	Tratamento
1	controle veneno (48 μg/500 μL de solução NaCl 0,9% estéril)
2	Veneno (48 μg) + soro antielapídico (2x DE recomendada pelo fabricante)
3	Veneno (48 μg) + Varespladib (250 μM) reconstituído em solução NaCl 0,9% e colocado em banho ultrassônico por 30 min antes do uso
4	Veneno (48 μg) + soro antielapídico (2x DE) + Varespladib (250 μM)
5	Veneno (48 μg) + NEO (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg) reconstituídos em solução NaCl 0,9% estéril
6	Veneno (48 μg) + soro antielapidico (2x DE) + NEO (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg)
7	Veneno (48 μg) + soro antielapidico (2x DE) + Varespladib (250 μM) + NEO (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg)
8	Veneno (48 μg) + Varespladib (250 μM) + NEO (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg).

Fonte: elaboração própria.

Veneno, soro antielapídico e Varespladib foram pré incubados por 30 min a 37ºC e administrados imediatamente após esse período. Neostigmina e Atropina foram administrados imediatamente após o veneno e/ou demais substâncias. O tempo de sobrevida e o horário dos óbitos foram registrados durante um período de 48h, e através do método Kaplan-Meier foi estimada a probabilidade de sobrevida em vários intervalos de tempo.

4.2.6 Preparação Biventer cervicis (BC) de pintainho (*ex vivo*)

A preparação BC foi isolada e montada de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados com Isoflurano (Cristália, lote: 21070417) e, após a dissecação os músculos foram montados em cubas de 5 mL de capacidade, contendo solução nutritiva de Krebs, de seguinte composição (mM): NaCl 118,6; KCl 4,69; $CaCl_2$ 1,88; KH_2PO_4 1,17; $MgSO_4$ 1,17; $NaHCO_3$ 25,0 e $C_6H_{12}O_6$ 11,65, em água ultrapura. A preparação foi aerada de modo constante com carbogênio (95 % O_2; 5 % CO_2) e mantida a 37°C. Estímulos supramaximais (de 0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração, 5-12 V) provenientes do estimulador Panlab® LE12406TC foram aplicados ao músculo e as contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição exógena de KCl (20 mM) e ACh (110 µM), antes e depois do experimento, foram obtidas por meio de um transdutor isométrico MLT0201 (120 min). A obtenção dos dados foi através do sistema PowerLab 4/35 contendo o software LabChart e LabChart Pro (PL3504/P) conectado a uma unidade LE124060M Power Unit (ADInstruments). Após um período de estabilização de 10 min, os protocolos experimentais foram iniciados. Os protocolos farmacológicos estão descritos no APÊNDICE A (Tabela 2).

4.2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro-padrão da média (EPM) da média. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste Anova One-way seguido de Tukey, com valor de significância de $p < 0,05$, utilizando-se o software estatístico Origin 9.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Para os ensaios de tromboelastometria os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD) da média. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste T de Student, com valor de significância de $p < 0,05$, utilizando-se o software estatístico Origin 9.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Bioquímica do Veneno

5.1.1 Quantificação de Proteína

A concentração proteica encontrada no pool de venenos de *M. spixii* foi de 1,59 ± 0,09 mg/mL de veneno (Tabela 3). A absorbância da amostra foi lida em 660 nm e foi considerado o valor médio entre as triplicatas da amostra de veneno.

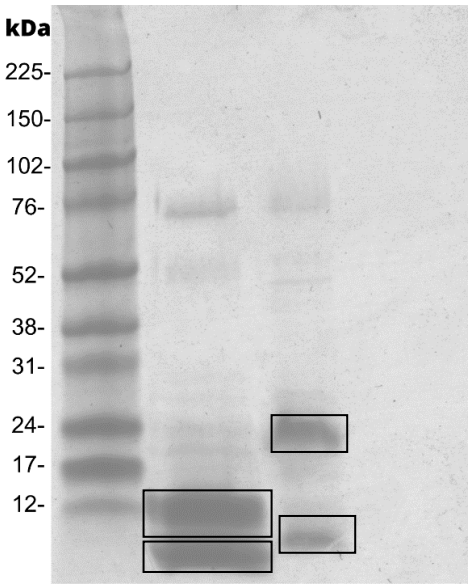
Tabela 3: concentração proteica do veneno de *M. spixii* (mg de proteína/mL de veneno)

	Concentração proteica (mg/mL)		
Amostra 1	1,65		
Amostra 2	1,63		
Amostra 3	1,49		
Média	1,59	± SD	0,09

5.1.2 Eletroforese em SDS-PAGE

O perfil eletroforético do veneno de *M. spixii* obtido por SDS-PAGE apresentou aproximadamente 8 bandas proteicas, em condições redutoras e não redutoras (Figura 5).

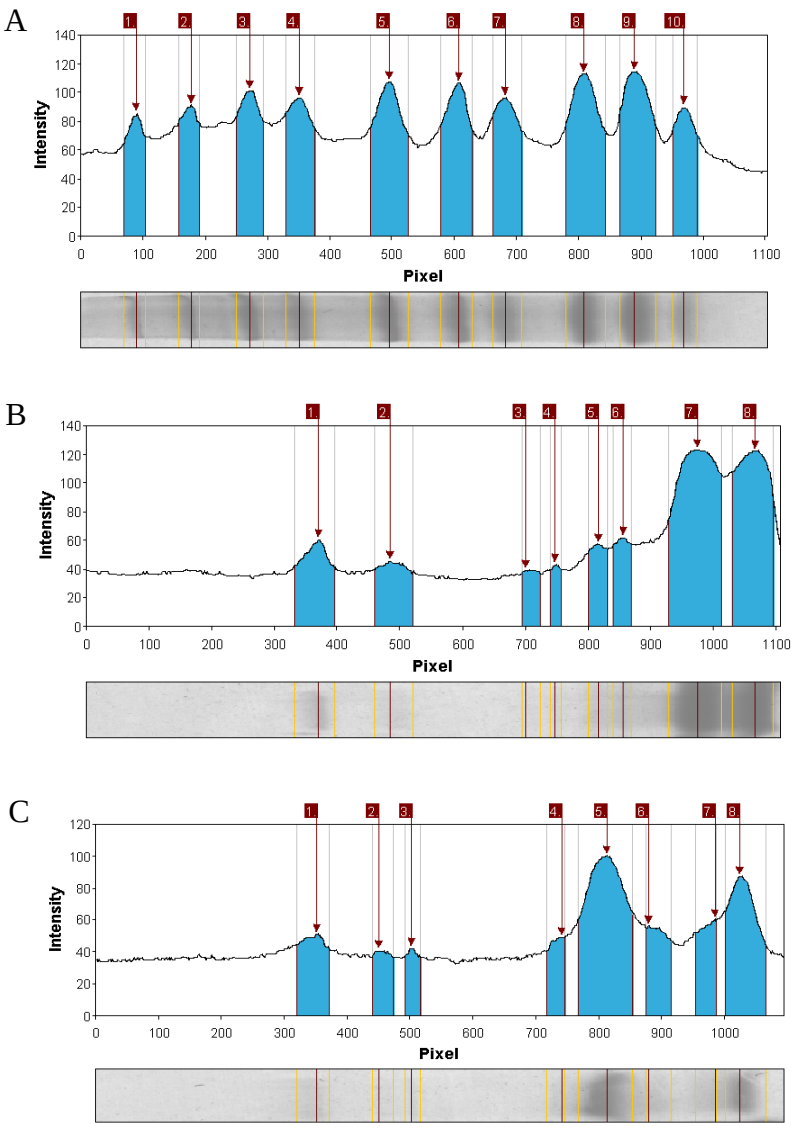
Figura 5: Gel de eletroforese em SDS-PAGE do veneno de *M. spixii*



Legenda. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE), gradiente de concentração entre 4-20%. Coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250. Padrão de peso molecular (Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (RPN800E). Os retângulos pretos evidenciam as duas principais bandas de proteínas encontradas em ambas as amostras (A). *M. spixii* reduzido (B). *M. spixii* não reduzido (C). **Fonte:** elaboração própria.

A análise densitométrica utilizando o software GelAnalyzer 19.1 (Figura 6) também identificou 8 bandas proteicas em ambas as amostras reduzida (6-B) e não reduzida (6-C). Através desta análise foi possível determinar o peso molecular aproximado de cada banda identificada (Figura 6-A), calcular o volume bruto aproximado e calcular o volume em porcentagem (Tabelas 4 e 5). O veneno apresentou duas bandas majoritárias nos pesos aproximados de 12 e 6 kDa na amostra reduzida, e duas bandas majoritárias nos pesos aproximados de 22 e 8 kDa na amostra não reduzida.

Figura 6: Análise por densitometria do gel de eletroforese em SDS - PAGE



Legenda: Análise densitométrica do veneno de *M. spixii*, evidenciando as bandas de proteínas. Padrão de peso molecular (A). *M. spixii* reduzido (B). *M. spixii* não reduzido (C). **Fonte:** elaboração própria.

Tabela 4: Análise por densitometria amostra reduzida

c	Raw volume	Cal. volume	Mw	Faixa de peso molecular da curva padrão
1	2546	9,2153 %	72	102-52
2	2664	9,6424 %	54	
3	1152	4,1697 %	30	31-12
4	702	2,5409 %	27	
5	1767	6,3957 %	23	
6	1789	6,4753 %	20	
7	9422	34,1031 %	12	
8	7586	27,4577 %	6	

Tabela 4. Análise densitométrica do veneno de *M. spixii* com redução utilizando o software GelAnalyzer 19.1. Banda corresponde ao número da banda. Volume bruto aproximado da banda (Raw volume). Valor em porcentagem do volume bruto para cada banda encontrada (Volume %). Peso molecular aproximado de cada banda (MW). Faixa de peso molecular da curva padrão (calibração). **Fonte:** elaboração própria.

Tabela 5: Análise por densitometria amostra sem redução

Banda	Raw volume	Volume %	Mw	Faixa de peso molecular da curva padrão
1	2509	11,1551 %	76	102-52
2	1373	6,1044 %	57	
3	1026	4,5616 %	51	
4	1403	6,2678 %	27	31-12
5	7452	33,1318 %	22	
6	2163	9,6168 %	18	
7	1843	8,1940 %	11	
8	4723	20,9986 %	8	

Tabela 5. Análise densitométrica do veneno de *M. spixii* sem redução utilizando o software GelAnalyzer 19.1. Banda corresponde ao número da banda. Volume bruto aproximado da banda (Raw volume). Valor em porcentagem do volume bruto para cada banda encontrada (Volume %). Peso molecular aproximado de cada banda (MW). Faixa de peso molecular da curva padrão (calibração). **Fonte:** elaboração própria.

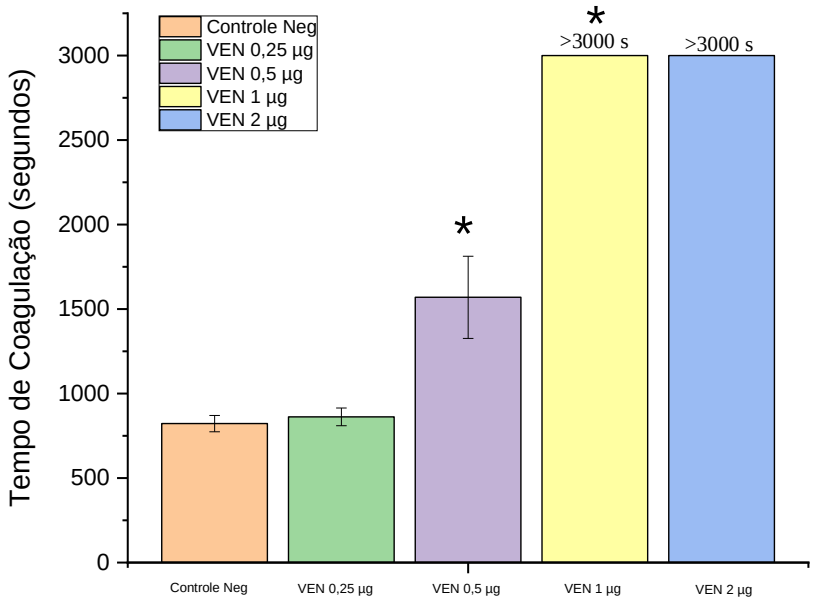
5.2 Caracterizações das atividades biológicas da peçonha

5.2.1 Ensaios tromboelastométricos

O veneno de *M. spixii* foi capaz de prolongar em 100% o tempo de recalcificação do plasma humano, sob as condições avaliadas. Doses crescentes (em μg) 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 do veneno foram utilizadas para determinar a dose efetiva anticoagulante e os valores do parâmetro de TC e TR do plasma humano recalcificado foram (em s): 862 ± 21,47 (0,25 μg); 1569 ± 99,12 (0,5 μg); ≥ 3000 ± 0 (1,0 μg); ≥ 3000 ± 0 (2,0 μg). As doses de 0,5 μg e 1,0 μg apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (Figura 7). Os resultados mostram que o veneno tem uma potente atividade anticoagulante, sendo tal efeito dose dependente.

Tanto a dose de 1 μg quanto de 2 μg prolongaram em mais que 100% o parâmetro de TC do tempo de recalcificação do plasma humano em comparação ao controle, porém, como ambas demonstraram atingir um platô, ou seja, ≥ 3000 s, a dose de 1,0 μg foi selecionada como referência para a realização dos demais protocolos.

Figura 7: Determinação da dose efetiva anticoagulante do veneno de *M. spixii*



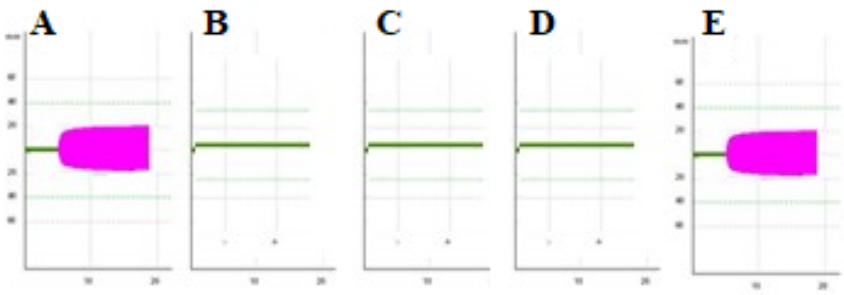
Legenda: Ação de doses crescentes do veneno de *M. spixii* em relação ao parâmetro tempo (s) de coagulação de amostras de plasma humano recalcificado, N=6 para grupo. >3000 s, onde o tempo foi superior a 3000 s. T de Student, com valor de significância de $p < 0,05$. *, $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. **Fonte:** elaboração própria.

Doses crescentes do soro antielapídico (0,5 µL, 1 µL e 2 µL) e VPL (15 ng, 30 ng e 60 ng) foram utilizadas para mensurar a DEA do veneno de *M. spixii* (1 µL). O parâmetro TC das amostras tratadas com a DEA do veneno e doses crescentes de soro foram (em s): 3000 ± 0 (0,5 µL); 2618 ± 112,24 (1 µL); 812,33 ± 19,59 (2 µL). Foram necessários 2 µL de soro antielapídico para restaurar os valores de TC induzidos pela DEA do veneno para dentro do intervalo de tempo do TR do grupo controle negativo.

Os valores do parâmetro TC das amostras de plasma humano tratadas com a dose DEA do veneno e doses crescentes de Varespladib foram (em s): 3000 ± 0 (15 ng); 2787 ± 197,37 (30 ng); 834,5 ± 47,47 (60 ng). É possível observar que a dose de 60 ng teve maior eficácia em neutralizar a atividade anticoagulante do veneno, restaurando o valor de TC para dentro do intervalo de tempo do grupo controle negativo.

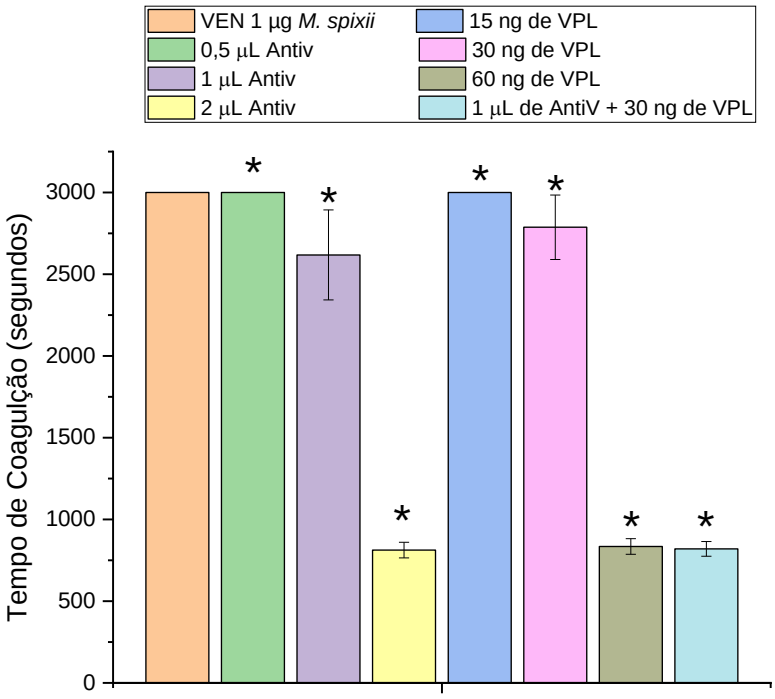
Para determinar a eficácia da associação entre o soro e o VPL, foram utilizadas doses de soro e VPL que apresentaram baixa eficácia isoladamente (1 µL e 30 ng respectivamente). O valor do parâmetro TC da amostra de plasma humano tratada com as doses de 1 µg de *M. spixii* + 1 µL de soro antielapídico + 30 ng de Varespladib foi (em s): 819,66 ± 18,29. Este resultado mostra que a associação entre o soro antielapídico e o VPL se mostrou eficiente em restaurar os valores de TC, apresentando uma inibição da atividade anticoagulante (*in vitro*) e sugerindo um efeito sinérgico entre ambas as substâncias (Figuras 8 e 9).

Figura 8: Perfil ITEM de amostras de plasma humano com diferentes tratamentos



Legenda: Perfil INTEM de amostras de plasma humano tratadas com: solução de NaCl 0,9% (A), ou com 1 µg de veneno de *M. spixii* (B); com 1 µg de veneno de *M. spixii* mais 1 µL de soro antielapídico (C); com 1 µg de veneno de *M. spixii* mais 30 ng de Varespladib (D) e com 1 µg de veneno de *M. spixii* mais 30 ng de Varespladib mais 1 µL de soro antielapídico (E) antes da recalcificação (com 20 µL de $CaCl_2$ 0,2 M). **Fonte:** elaboração própria.

Figura 9: Eficácia do soro antielapídico e Varespladib contra a atividade anticoagulante do veneno de *M. spixii*



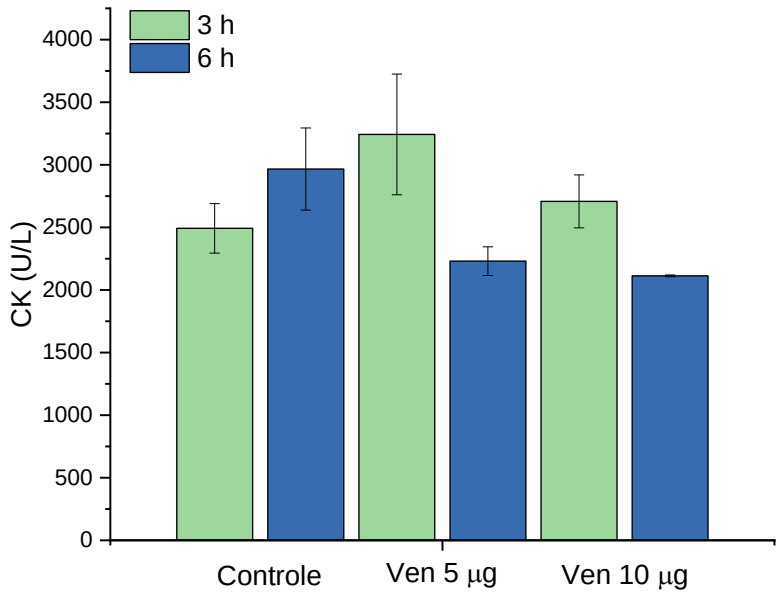
Legenda: Tempo de coagulação de amostras de plasma humano recalcificado contendo: Veneno de *M. spixii* (1 µg) em relação aos grupos de soro antielapídico (AntiVen), Varespladib e soro antielapídico + Varespladib, N=6 para grupo. T de Student, com valor de significância de $p < 0,05$. * indica $p<0,05$ em relação ao VEN (1 µg). AntiV, soro antielapídico. VPL, Varespladib. **Fonte:** elaboração própria.

5.2.2 Determinação da atividade miotóxica

Realizou-se inicialmente um teste piloto para determinar qual a dose de veneno de *M. spixii* necessária para produzir um aumento significativo de CK em 3 grupos (n=3) sendo: (1) controle negativo (50 µL de solução de NaCl 0,9%), (2) veneno *M. spixii* 5 µg/50 µL, (3) veneno *M. spixii* 10 µg/50 µL, administrados via intramuscular na pata traseira. O sangue foi coletado pelo plexo orbital 3h após a administração, utilizando anestésico local, e 6h após o sangue foi coletado por punção cardíaca, com aprofundamento anestésico.

A maioria das amostras de sangue coletadas apresentou sinais de hemólise, o que dificultou a leitura da absorbância. No entanto, ao analisar os resultados, observou-se que o pico de CK ocorria 3h após a administração e que após 6h os níveis diminuíam. A partir disso, decidiu-se utilizar um anticoagulante no momento da coleta para diminuir a hemólise nas amostras. A Figura 10 ilustra os resultados obtidos neste ensaio piloto.

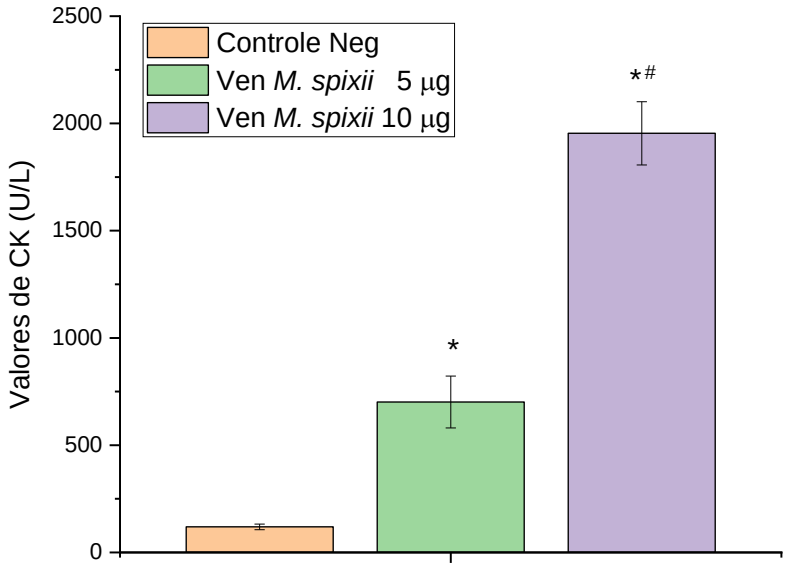
Figura 10: Níveis plasmáticos de CK no primeiro ensaio piloto



Legenda: Níveis plasmáticos de CK (creatina quinase) após administração i.m. (50 μL volume total). Os resultados estão apresentados pela média ± EPM (erro padrão da média) de 3 animais por grupo. Avaliação dos níveis de CK no Plasma, 3h e 6h após a administração. Administração de 50 μL de solução NaCl 0,9% i.m (NaCl 0,9%). Administração de 5 μg/50 μL de veneno (5 μg). Administração de 10 μg/50 μL de veneno (10 μg). Anova One-way seguido de Tukey, com valor de significância de $p < 0,05$. Sem diferença estatística entre os grupos ao nível de $p<0,05$. **Fonte:** elaboração própria.

Após os resultados obtidos no ensaio piloto decidiu-se dar continuidade nos demais grupos. Para tanto, foram estabelecidos 3 grupos (n=5), sendo: (1) controle negativo (50 μL de solução de NaCl 0,9%), (2) veneno *M. spixii* 5 μg/50 μL, (3) veneno *M. spixii* 10 μg/50 μL, administrados via intramuscular na pata traseira (Figura 11). As doses de 5 μg e 10 μg foram utilizadas para definir qual dose de veneno seria utilizada nos demais grupos, buscando reproduzir os resultados do ensaio piloto sem interferência. Nestes protocolos e nos demais subsequentes o sangue foi coletado 3h após a administração, através de punção cardíaca, com aprofundamento anestésico e utilizando seringas heparinizadas.

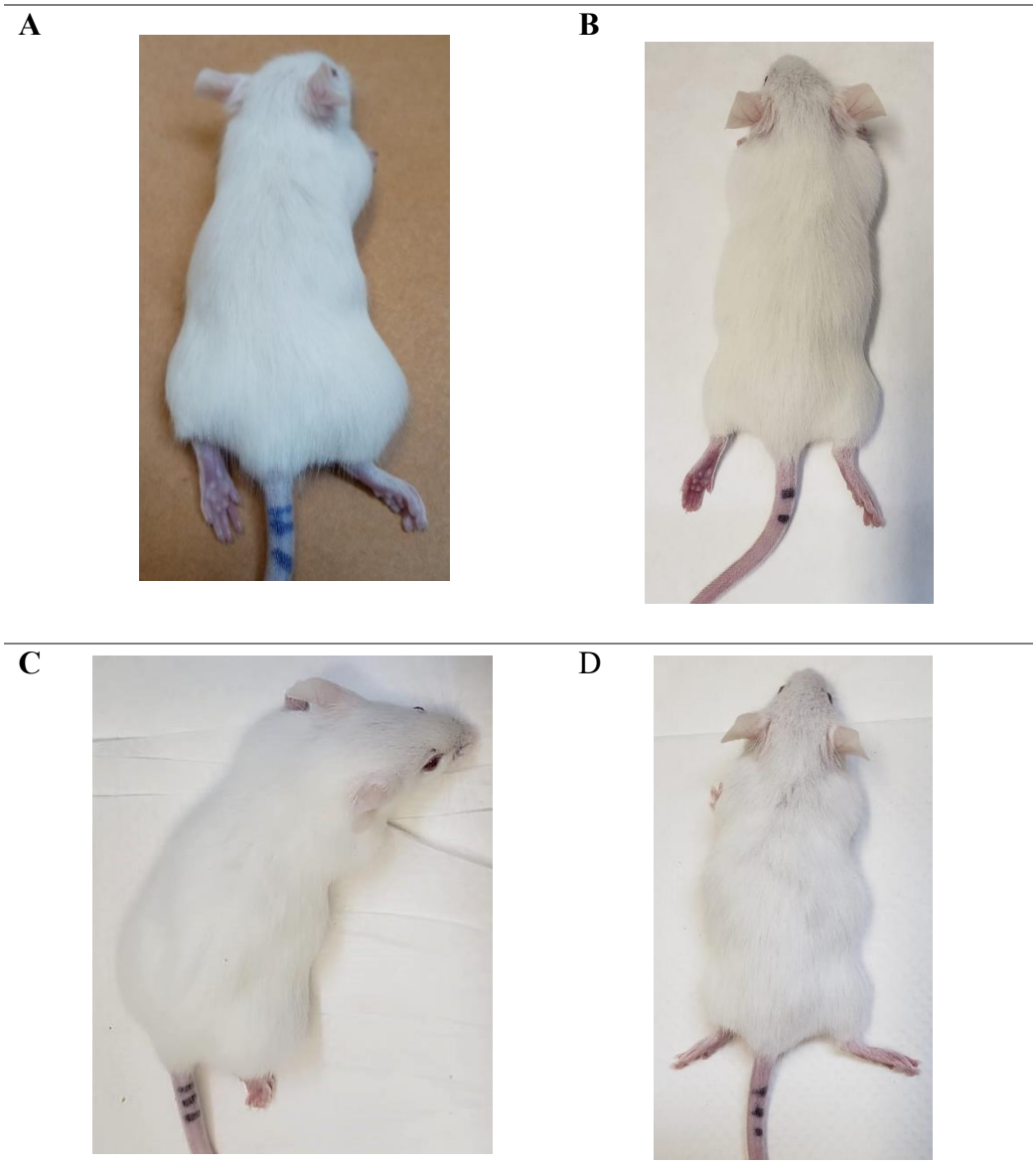
Figura 11: Níveis plasmáticos de CK no grupo controle e grupo veneno



Legenda: Níveis plasmáticos de CK (creatina quinase) após administração i.m. (50 µL volume total). Os resultados estão apresentados pela média ± EPM de 5 animais por grupo. O CK foi avaliado no plasma 3h após a administração. Administração de 50 µL de solução NaCl 0,9% i.m. (NaCl 0,9%). Administração de 5 µg/50 µL de veneno i.m. (5 µg). Administração de 10 µg/50 µL de veneno i.m. (10 µg). Anova One-way seguido de Tukey, com valor de significância de $p < 0,05$. *, $p<0,05$ comparado ao NaCl 0,9%. #, $p<0,05$ comparado ao 5 µg. **Fonte:** elaboração própria.

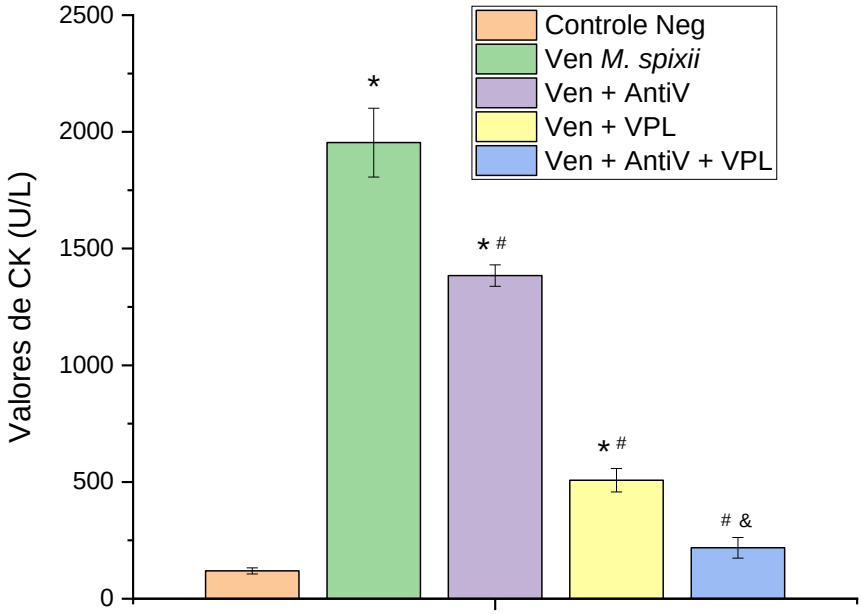
Nos demais grupos (n=5) utilizou-se a dose de 10 µg de veneno de *M. spixii*. Durante a realização dos ensaios observou-se que: os animais dos grupos (3) e (5) apresentaram pouco ou nenhum edema, pouca ou nenhuma parestesia da pata onde foram administradas as soluções com veneno, estavam mais dispostos, se alimentando e o sangue coletado apresentou pouca hemólise após centrifugação. Em comparação, os animais do grupo (4) apresentaram mais edema, parestesia da pata, prostração, sinais de fraqueza, o sangue coletado apresentou mais hemólise quando comparado com os outros dois grupos. A Figura 12, mostra os camundongos de cada grupo, evidenciando os sinais de edema encontrados nos animais. A Figura 13 ilustra graficamente os resultados de todos os grupos.

Figura 12: Camundongos dos grupos tratados de 2 a 5 para posterior dosagem de CK



Legenda: (**A**) Camundongo do grupo (2) veneno (10 μg/50 μL) administrado na pata traseira direita, apresenta edema local e parestesia na pata. (**B**) Camundongo do grupo (3) veneno + soro antielapídico (10 μg veneno + 13 μL soro em 50 μL) administrado na pata traseira direita, sem edema local e pouca parestesia na pata. (**C**) Camundongo do grupo (4) veneno + Varespladib (10 μg de veneno + 4,8 μg de Varespladib (250 μM) em 50 μL), administrado na pata traseira direita, apresenta edema local e parestesia na pata. (**D**) Camundongo do grupo (5) com veneno + soro + Varespladib (10 μg de veneno + 13 μL de soro + 4,8 μg de Varespladib (250 μM) em 50 μL) administrado na pata traseira direita, apresenta pouco edema local e sinais de parestesia na pata. O grupo 1 que recebeu solução de NaCl 0,9% não foi mostrado. **Fonte:** elaboração própria.

Figura 13: Níveis plasmáticos de CK em todos os grupos avaliados



Legenda: Níveis plasmáticos de CK (creatina quinase) após administração i.m. (50 µL volume total). Os resultados estão apresentados pela média ± EPM (n=5). O CK foi avaliado no soro do sangue coletado 3h após a administração. Administração de 50 µL de solução de NaCl 0,9% i.m. (Controle Neg). Administração de 10 µg/50 µL i.m. (Ven *M. spixii*). Administração de 10 µg de veneno + 13 µL de soro em um volume total de 50 µL (Veneno + AntiV). Administração de 10 µg de veneno + 4,8 µg de Varespladib (250 µM) em um volume total de 50 µL (Veneno + VPL). Administração de 10 µg de veneno + 13 µL de soro + 4,8 µg de Varespladib em um volume total de 50 µL (Veneno + AntiV + VPL). Anova One-way seguido de Tukey, com valor de significância de $p < 0,05$. *, $p<0,05$ comparado ao NaCl 0,9%. (controle negativo). #, $p<0,05$ comparado ao veneno. &, $p<0,05$ comparado ao Ven + AntiV. AntiV, soro antielapídico**.** VPL, Varespladib. **Fonte:** elaboração própria.

5.2.3 Neutralização da letalidade/toxicidade do veneno

Durante a realização do ensaio de neutralização da atividade letal foi possível observar alguns sinais de envenenamento entre os animais de cada grupo, tais como: dificuldade respiratória em quase todos os animais, ptose palpebral, vibrissas eriçadas, piloereção, contração da parede abdominal e espasticidade de membros posteriores (caminhar com os membros posteriores esticados), onde a ocorrência de variações dos sinais apresentados por cada grupo, eram principalmente em relação à intensidade. Os camundongos foram randomicamente divididos em 8 grupos distintos conforme a descrição da tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: tratamento administrado em cada grupo

Grupo	Tratamento
1	controle veneno (48 μg/500 μL de solução NaCl 0,9% estéril)
2	Veneno (48 μg) + soro antielapídico (2x DE recomendada pelo fabricante)
3	Veneno (48 μg) + Varespladib (250 μM) reconstituído em solução NaCl 0,9% e colocado em banho ultrassônico por 30 min antes do uso
4	Veneno (48 μg) + soro antielapídico (2x DE) + Varespladib (250 μM)
5	Veneno (48 μg) + NEO (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg) reconstituídos em solução NaCl 0,9% estéril
6	Veneno (48 μg) + soro antielapidico (2x DE) + neostigmina (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg)
7	Veneno (48 μg) + soro antielapidico (2x DE) + Varespladib (250 μM) + NEO (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg)
8	Veneno (48 μg) + Varespladib (250 μM) + NEO (80 μg/kg) + atropina (8 μg/kg).

Fonte: elaboração própria.

O soro antielapídico (2x DE) foi administrado em 4 grupos diferentes. Em todos os grupos onde houve administração do soro antielapídico, não houve óbito. Os sinais apresentados pelos animais ocorreram em menor intensidade, também foi possível observar que eles se recuperaram mais rapidamente quando comparados com os demais grupos. A Neostigmina (80 μg/kg) e Atropina (8 μg/kg), foram administradas em 4 grupos diferentes, nesses grupos foram observados aumento de secreção nos olhos em alguns dos animais. O número de óbitos e a descrição dos sinais e intensidade apresentados por cada grupo estão descritos na tabela 6 a seguir.

Tabela 6: Número de óbitos e intensidade dos sinais apresentados

(continua)

Grupo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Nº de óbitos	9/10	0/10	7/10	0/10	7/10	0/10	0/10	9/10
Dificuldade Respiratória	+++		+++		+++			+++
Ptose palpebral	+++	++	++	++		++	++	++
Vibrissas eriçadas			++	++		++	++	
Piloereção			++	++		++	++	++
Contração da parede abdominal	++		++		++			

Tabela 6: Número de óbitos e intensidade dos sinais apresentados

(conclusão)

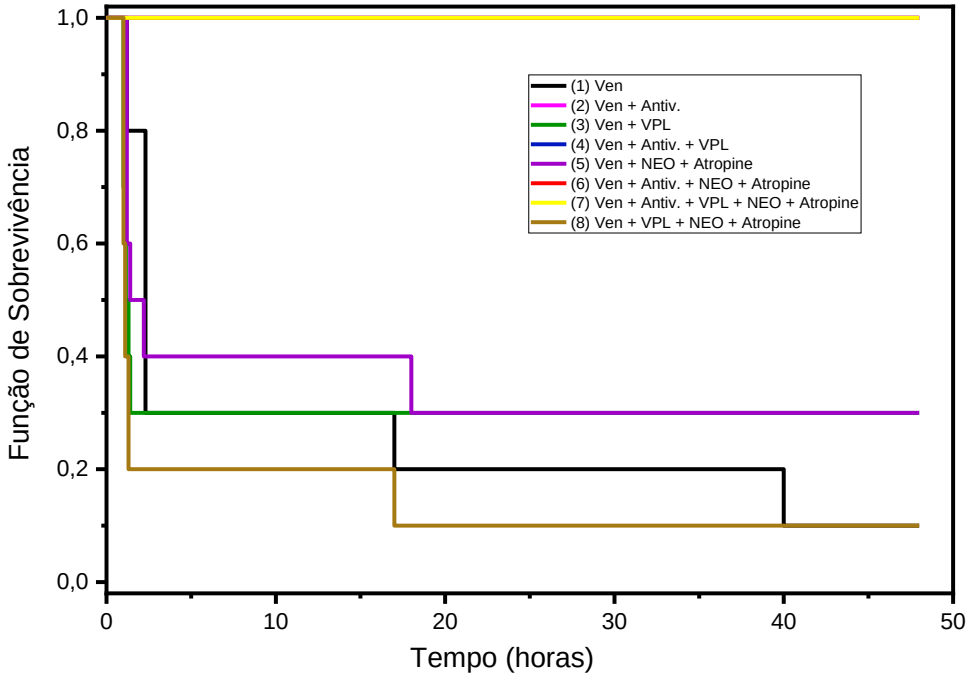
Grupo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Espasticidade de membros posteriores	+++			++	++		++	++
Coceira na região abdominal	++		++					
Prostração	+++	+	++					++
Agitação			+	+				
Lacrimejamento dos olhos						++	++	

Legenda: Número de óbitos por grupo e os sinais apresentados em cada grupo e a intensidade, sendo: menor intensidade (+); média intensidade (++); alta intensidade (+++). **Fonte:** elaboração própria.

A análise de sobrevivência dos animais em decorrência do tempo (48 horas) é evidenciada através do gráfico do tipo Kaplan-Meier (Figura 14). Neste tipo de análise é possível observar a função de sobrevivência, que é dada de acordo com o número de óbito e o tempo de observação, onde 1,0 equivale a nenhum óbito e 0 ao número total de óbitos. A função vai diminuindo conforme os animais evoluem para o óbito, e permanece no número de animais que sobreviveram até finalização do tempo de observação. Por exemplo, no grupo veneno, somente 1 animal sobreviveu, então apresenta o resultado de 0,1 em 48h. Esta análise avalia a probabilidade de um evento ocorrer em decorrência do tempo de observação. Neste caso o evento analisado foi a ocorrência ou não do óbito.

Ainda através da análise de Kaplan-Meier é possível observar que todos os grupos que receberam o tratamento com o soro antielapídico permaneceram em 1,0 durante todo o período de observação. Também é possível observar o tempo que os animais foram evoluindo ao óbito ao longo do tempo, sendo que a maioria dos animais evoluíram para o óbito dentro das primeiras horas de observação, entre 0 a 5h de observação.

Figura 14: Análise da função de sobrevivência Kaplan-Meier



Legenda: análise de sobrevivência por Kaplan-Meier. A sobrevida é uma variável relacionada a tempo e evento, medindo o tempo entre o início da observação até a ocorrência de determinado evento. As linhas de cores rosa (2), azul escura (4), vermelha (6) e amarela (7) se encontram na mesma posição, se sobrepondo, ficando visível apenas a linha de cor amarela. Note que esses grupos incluíram o soro antielapídico no tratamento instituído, que garantiu a sobrevivência dos animais. Ven, veneno. AntiV, soro antielapídico**.** VPL, Varespladib**.** NEO, Neostigmina. **Fonte:** elaboração própria.

5.2.4 Avaliação da ação neurobloqueadora em BC de pintainho

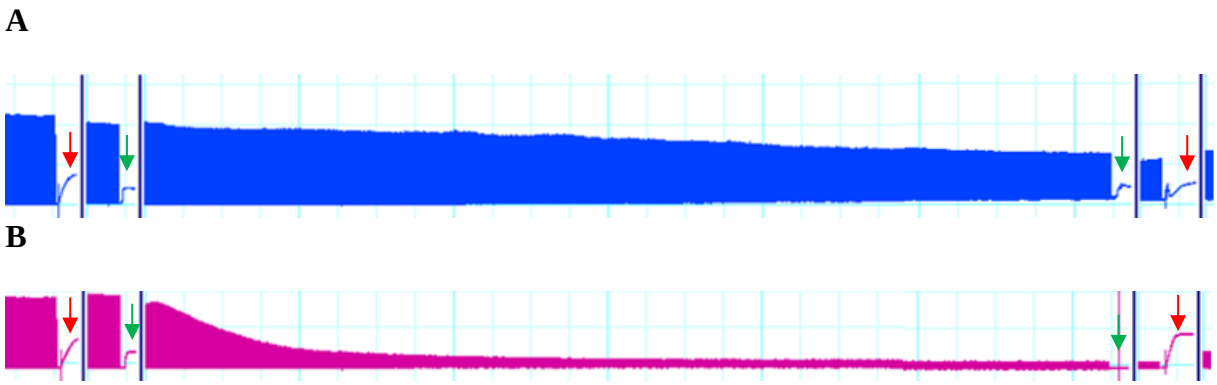
5.2.4.1 Ação do veneno bruto de *M. spixii* sobre as preparações isoladas de BC

A amplitude das contrações musculares foi avaliada em decorrência do tempo (120 min) em músculos de BC de pintainhos, expostos ao veneno bruto de *M. spixii* (10 μg/mL). Tais dados foram registrados e armazenados utilizando o programa Lab Chart Pro. As contraturas evocadas pela adição exógena de ACh e KCl foram registradas antes e ao final de cada protocolo, com ausência de estímulo elétrico.

O veneno bruto de *M. spixii* casou bloqueio neuromuscular nas preparações isoladas de BC, que pode ser observado através da diminuição da amplitude das contrações musculares (Figuras 15, 16 e 17), no entanto não causou bloqueio total da resposta contrátil nas condições avaliadas. Ainda assim, o veneno foi capaz de inibir a resposta contraturante à adição exógena de ACh, e reduzir significativamente a resposta contraturante ao agonista KCl (Figuras 17 e 18).

A Figura 15 (A e B), representa um experimento de controle Krebs (A) e um experimento contendo 10 μg/mL de veneno bruto de *M. spixii* (B). Note em ambos, a adição de ACh e KCl, tanto no início, quanto no final do experimento, e a ação do veneno em inibir a resposta à ACh.

Figura 15: Registros miográficos da preparação BC, sob estímulo indireto



Legenda: Registros miográficos de dois experimentos realizados utilizando a preparação BC de pintainho, sob estímulo indireto, durante 120 min, a 37ºC. A seta vermelha indica a adição exógena de KCl, e a seta verde indica a adição exógena de ACh, note que as respostas contraturantes foram realizadas ao início e ao final de cada experimento, em ausência de estímulo elétrico. (A) um experimento realizado com controle Krebs. (B) um experimento realizado com 10 μg/mL de veneno de *M. spixii*. **Fonte:** elaboração própria.

5.2.4.2 Protocolos de neutralização da ação neurobloqueadora do veneno

A neutralização da ação neurobloqueadora do veneno de *M. spixii* foi realizada utilizando: (1) soro antielapídico, (2) VPL, (3) uma mistura de soro e VPL e (4) NEO. Os protocolos foram realizados com pré-incubação (veneno pré-incubado com as substâncias avaliadas) e pós-veneno (veneno é adicionado ao banho e após 15 min de ação é adicionado as substâncias a seres avaliadas).

Nos protocolos de pré incubação, as substâncias foram pré-incubadas com o veneno (10 μg/mL) durante 30 min, em temperatura ambiente, e posteriormente administradas ao banho. O soro antielapídico foi utilizado na proporção recomendada pelo fabricante (10 mL de soro neutraliza 15 mg de veneno de *Micrurus* spp.). O VPL foi solubilizado em solução de Krebs e colocado em banho ultrassônico por 30 min, sendo utilizado na concentração de 10 μg/mL. A mistura entre soro antielapídico e VPL foi realizada utilizando-se a dose reduzida em 50% de

ambos (5 mL de soro neutraliza 15 mg de veneno de *Micrurus* spp.; 5 μg/mL de VPL). A NEO não foi pré incubada diretamente com o veneno por 30 min, pois devido à sua ação farmacológica. No entanto, ela foi adicionada ao banho simultaneamente com o veneno na dose de 20 μL.

Nos protocolos de pós-incubação, as mesmas doses foram utilizadas, porém, as substâncias foram adicionadas 15 min após a adição do veneno. A mistura entre soro antielapídico e VPL foi pré-incubada sem o veneno, por 30 min em temperatura ambiente, antes de ser adicionada ao banho.

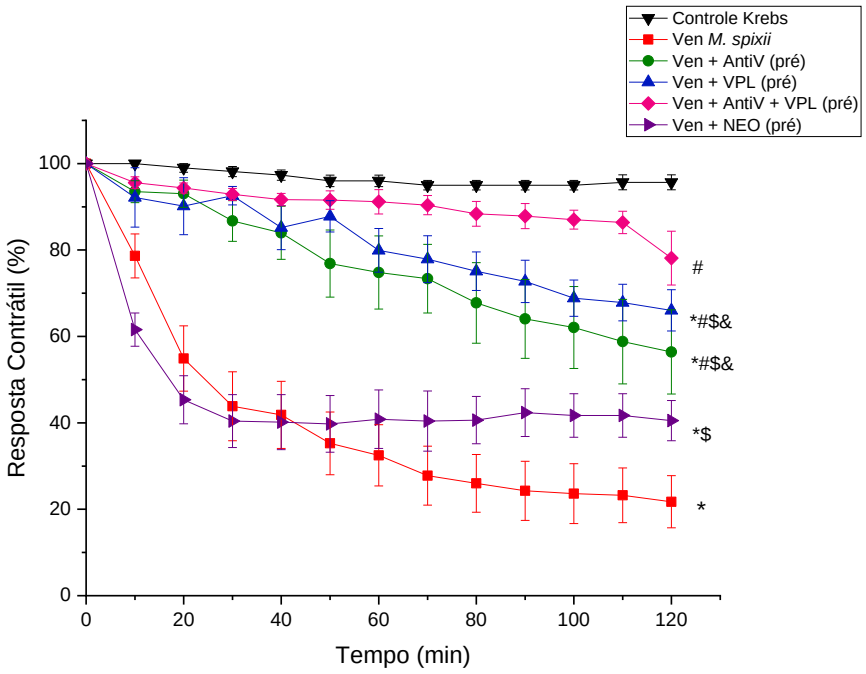
Nos experimentos de pré-incubação, o soro antielapídico na dose utilizada, apresentou eficácia parcial em impedir o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno. Fibras responsivas aos 120 min foram de 56,4 % ± 9,74 (Figura 16). No entanto, foi totalmente ineficaz no bloqueio causado pela ação do veneno sobre as respostas contraturantes provocadas pela adição exógena de ACh e KCl (Figuras 18-A e 19-A).

Assim como o soro antielapídico, o VPL também apresentou eficácia parcial em inibir a ação do veneno na redução da resposta contrátil, sendo que fibras responsivas aos 120 min foram de 66,03 % ± 4,76 (Figura 16). Não havendo diferenças estatísticas significativas no nível de 0,05 entre esses dois grupos. O VPL também foi ineficaz em impedir a ação do veneno sobre as respostas contraturantes evocadas pela adição de ACh e KCl (Figuras 18-A e 19-A).

A associação entre as duas substâncias apresentou melhor eficácia contra o bloqueio causado pela ação do veneno, 78,12 % ± 6,22 de fibras responsivas aos 120 min (Figura 16). Apresentando diferença significativa quando comparado com os grupos onde as substâncias foram avaliadas isoladamente. Porém, a mistura das duas substâncias, seguiu sem apresentar eficácia nas respostas contraturantes à ACh, mas apresentou eficácia na resposta contraturante ao KCl (Figuras 18-A e 19-A).

Ainda no protocolo de pré incubação, a NEO não apresentou eficácia contra a redução da resposta contrátil provocada pela ação do veneno, sendo 40,51 % ± 4,64 de fibras responsivas aos 120 min (Figura 16). A NEO também não foi eficaz em impedir o bloqueio das respostas contraturantes à ACh (Figura 18-A), porém em 2 experimentos foram observados um aumento (>100 %) da resposta contraturante à ACh, mas isso não se repetiu nos demais. Em relação ao KCl a NEO teve resultado similar com a associação do soro e VPL (Figura 19-A).

Figura 16: Resposta contrátil do musculo BC (pré-incubação)



Legenda: Resposta contrátil do músculo BC em relação ao tempo. O veneno foi pré incubado por 30 min em temperatura ambiente com o soro antiofídico (AntiV) e com o Varespladib (VPL). A Neostigmina (20 μL) (NEO) não foi pré-incubada com o veneno, porém foi adicionada no mesmo instante que o veneno ao banho. ANOVA, seguido por teste Tukey com significância igual a $p < 0,05$. *, $p < 0,05$ em relação ao controle Krebs, em todos os tempos. #, $p < 0,05$ em relação ao veneno, em todos os tempos. $, $p < 0,05$ em relação ao grupo Ven + AntiV + VPL, em todos os tempos. &, $p < 0,05$ em relação ao Vem + NEO, em todos os tempos. Pré, pré-incubação. Ven, veneno. AntiV, soro antielapídico**.** VPL, Varespladib. NEO, Neostigmina. **Fonte:** elaboração própria.

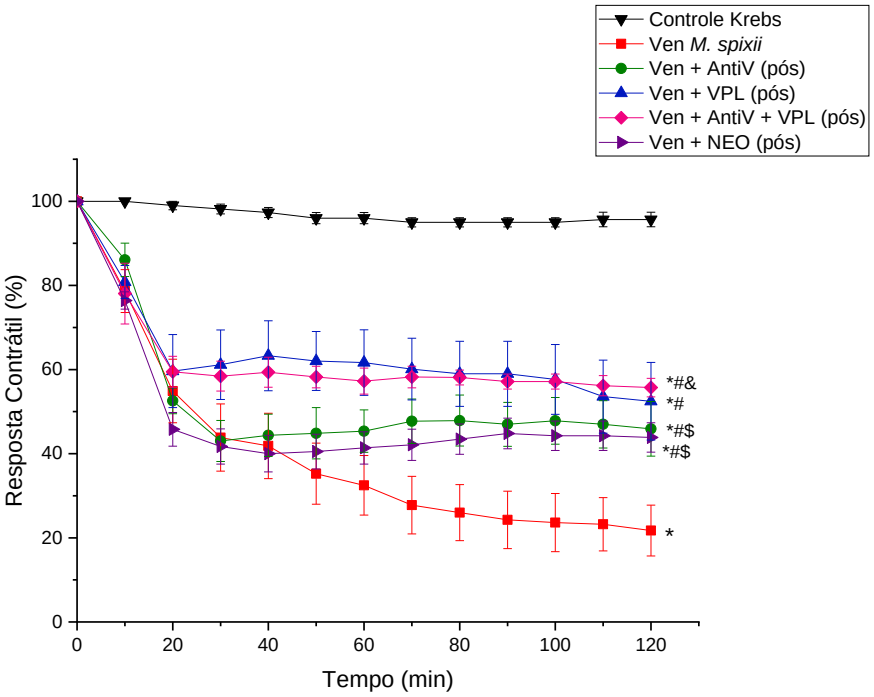
Nos experimentos de pós-incubação, o soro antielapídico, adicionado 15 min após a adição do veneno, apresentou eficácia parcial em impedir o bloqueio neuromuscular causado pela ação veneno. Fibras responsivas aos 120 min foram de 45,91 % ± 6,5 (Figura 17). Nas repostas contraturantes evocadas pela adição exógena de ACh e KCl, o soro antielapidico apresentou melhor eficácia contra o bloqueio causado pela ação veneno, quando comparado com a pré-incubação (Figura 18-B e 19-B).

O VPL também apresentou eficácia parcial na pós incubação, sendo que fibras responsivas aos 120 min foram de 52,46 % ± 9,21 (Figura 17). O VPL também foi ineficaz em impedir a ação do veneno sobre as respostas contraturantes evocadas pela adição de ACh e KCl (Figuras 18-B e 19-B).

A associação entre soro antielapidico e VPL apresentou um resultado semelhante ao VPL isolado, 55,71 % ± 2,2 de fibras responsivas ao final de 120 min (Figura 17). A associação das substâncias, apresentou melhor eficácia ao restaurar a resposta contraturante à ACh, que na pré incubação (Figura 18-B). Mas não foi eficaz contra a diminuição da resposta contraturante ao KCl (Figura 19-B).

A NEO apresentou resultados muitos similares, tanto no modelo de pré-incubação quanto no de pós. Sendo que na pós-incubação as fibras responsivas foram de 43,86 % ± 3,49 aos 120 min (Figura 17). E não apresentou eficácia em restaurar as respostas contraturantes à ACh e KCl (Figura 18-B e 19-B).

Figura 17: Resposta contrátil do musculo BC (pós-incubação)



Legenda: Resposta contrátil do músculo BC em relação ao tempo. O veneno foi adicionado e os tratamentos foram adicionados 15 minutos após a adição do veneno. Anova One-way seguido de Tukey, com valor de significância de $p < 0,05$. *, $p < 0,05$ em relação ao controle Krebs, em todos os tempos. #, $p < 0,05$ em relação ao veneno, em todos os tempos. $, $p < 0,05$ em relação ao grupo Ven + VPL, em todos os tempos. &, $p < 0,05$ em relação ao Vem + NEO, em todos os tempos. Pós, após o veneno. Ven, veneno. AntiV, soro antielapídico**.** VPL, Varespladib. NEO, Neostigmina. **Fonte:** elaboração própria.

5.2.4.3 Respostas contraturantes à adição exógena de ACh e KCl na preparação de BC

A preparação de BC de pintainhos apresenta algumas características importantes em relação a preparação de mamífero, isso porque a preparação de pintainho possui múltiplas fibras inervadas, e um número maior de placas terminais ao longo de seu comprimento, além de receptores extrínsecos de ACh. Permitindo avaliar, além dos estímulos indiretos, as contraturas causadas por adição exógena aos agonistas ACh e KCl na ausência de estímulo elétrico (Figura 18 A e B e 19 A e B).

O veneno de *M. spixii* aboliu completamente a resposta contraturante à ACh (10,2 % ± 6,9) ao final de 120 min de experimento. E reduziu significativamente a resposta contraturante ao KCl (57,9 % ± 10,17).

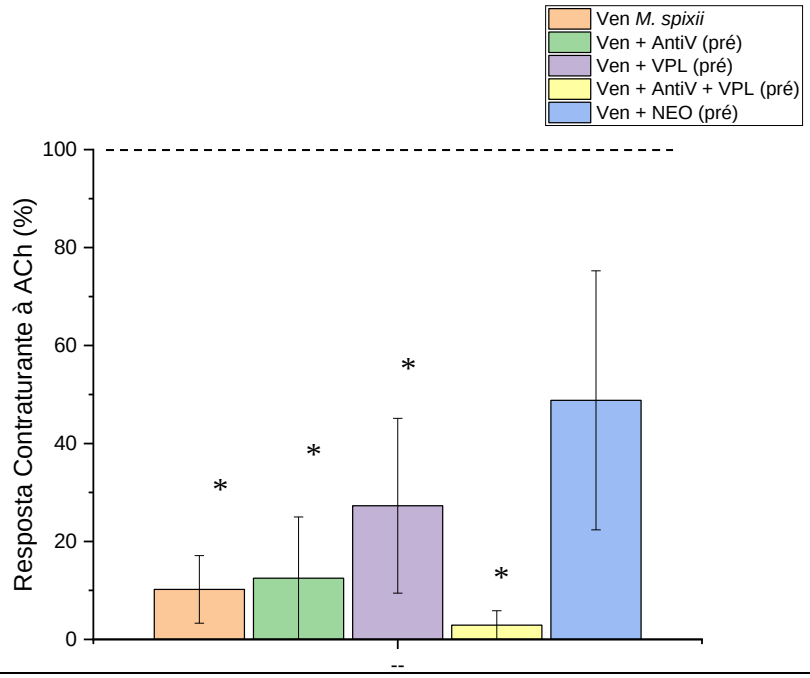
Todos os tratamentos avaliados (soro antielapídico, VPL, soro antielapídico + VPL e NEO) em pré incubação foram ineficazes em impedir a ação do veneno sobre a resposta contraturante à ACh (Figura 18-A), ou aumentar a resposta contraturante ao KCl (Figura 19-A). A associação entre soro antielapídico e VPL foi eficaz apenas em impedir o bloqueio a resposta contraturante ao KCl, mas não foi eficaz contra o bloqueio a resposta de ACh.

Nos experimentos de pós-incubação, o soro antielapídico, VPL e NEO não tiveram nenhuma eficácia em restaurar as respostas contraturantes à ACh exógena. Mas, a associação entre soro antielapídico e VPL apresentou um resultado melhor que aquele obtido do modelo de pré-incubação sem, contudo, recuperar completamente a resposta contraturante (Figura 18-B). No entanto, nenhum dos tratamentos avaliados foi eficaz em restaurar a resposta contraturante ao KCl (Figura 19-B).

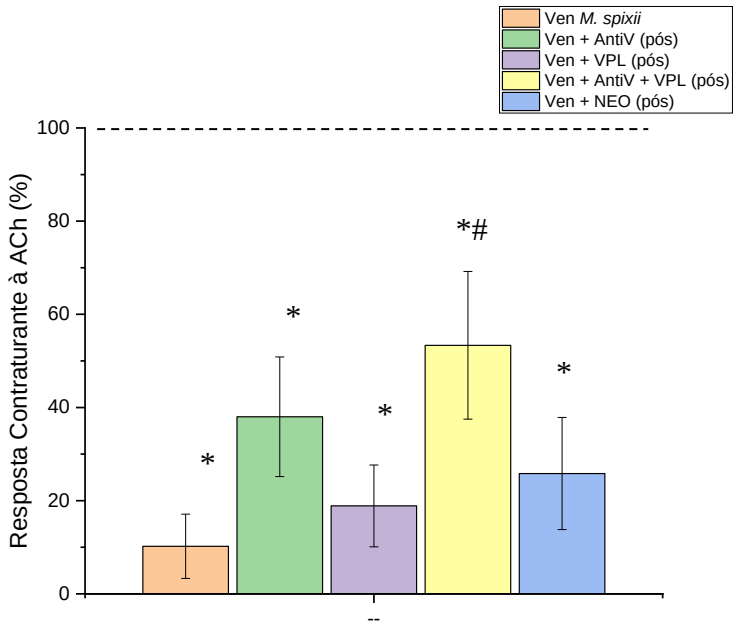
As Figuras 18 e 19 ilustram os resultados obtidos da resposta contraturante na ausência de estímulo elétrico, frente à adição exógena de ACh (110 µM) e KCl (20 mM) em todos os grupos avaliados.

Figura 18: Resposta contraturante à adição exógena de ACh

A



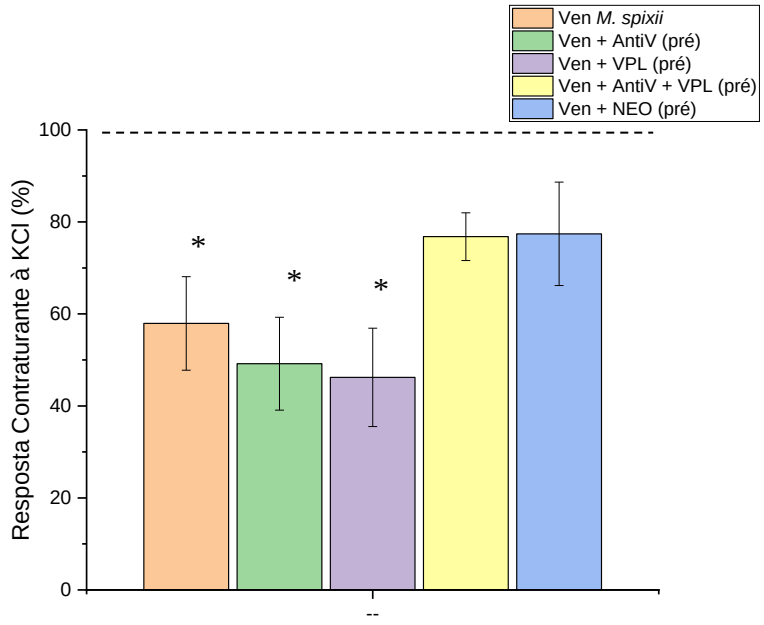
B



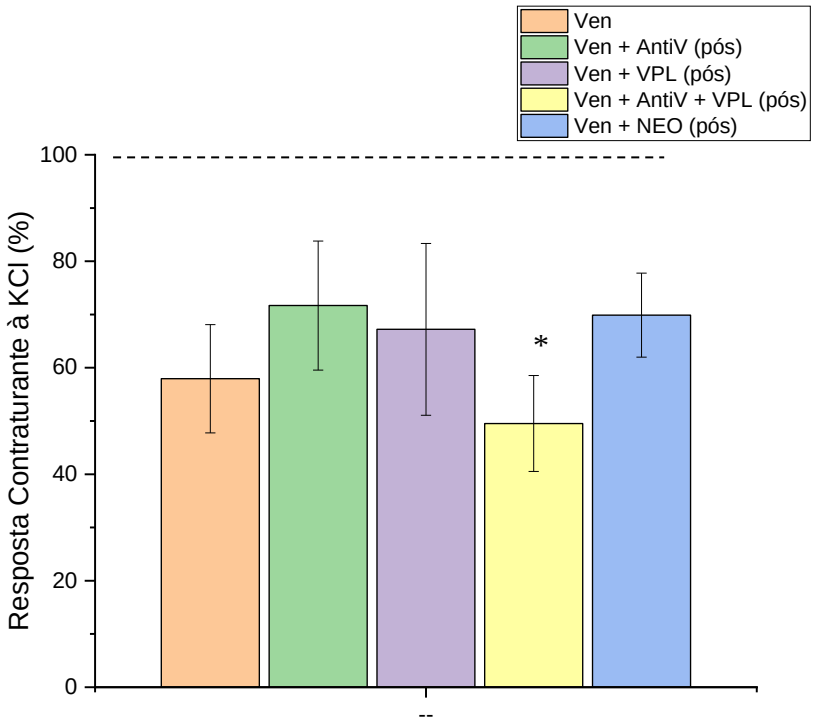
Legenda: Amplitude das respostas contraturantes após a adição exógena de 100 µL ACh, ao final de cada experimento, (n=8 no grupo veneno; n=6 para demais grupos). A adição inicial do mesmo agonista, no início do experimento e antes da adição do veneno, foi considerada como controle (representado pela linha pontilhada). Cada coluna expressa a média ± EPM. Anova One-way seguido de Tukey, com valor de significância de $p < 0,05$. Em **(A)** os experimentos de pré-incubação. *, $p < 0,05$ em relação ao controle. Em **(B)** os experimentos de pós-incubação. *, $p < 0,05$ em relação ao controle. #, $p < 0,05$ em relação ao veneno *M. spixii*. AntiV, soro antielapídico**.** VPL, Varespladib. NEO, Neostigmina. **Fonte:** elaboração própria.

Figura 19: Respostas contraturantes à adição exógena de KCl

A



B



Legenda: Amplitude das respostas contraturantes após a adição exógena de 100 µL KCl, ao final de cada experimento, (n=8 no grupo veneno; n=6 para demais grupos). A adição inicial do mesmo agonista, no início do experimento e antes da adição do veneno, foi considerada como controle (representado pela linha pontilhada). Cada coluna expressa a média ± EPM. Anova One-way seguido de Tukey, com valor de significância de $p < 0,05$. Em **(A)** os experimentos de pré-incubação. *, $p < 0,05$ em relação ao controle. Em **(B)** os experimentos de pós-incubação. *, $p < 0,05$ em relação ao controle. AntiV, soro antielapídico**.** VPL, Varespladib. NEO, Neostigmina.
Fonte: elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Dados da literatura (Campbell; Lamar, 2004; Silva Jr *et al*., 2021, p. 391) apontam que na América do Sul, as cobras corais pertencem aos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus.* No Brasil existem cerca de trinta e três espécies do gênero *Micrurus* e três do gênero *Leptomicrurus*. Conforme já mencionado, a peçonha dessas espécies de serpentes, são conhecidas principalmente por sua ação neurotóxica, com neurotoxinas que atuam em nível pré- (β-neurotoxinas) e pós- (α-neurotoxinas) sináptico em junções neuromusculares (Goularte *et al*., 1995; Gutiérrez *et al*., 2016). Mas, além da atividade neurotóxica, esses venenos podem apresentar atividade miotóxica, inflamatória, causar alterações cardiovasculares e interferir na cascata de coagulação (Carbajal-Saucedo *et al*., 2014; Dashevsky *et al*., 2021; Terra *et al*., 2015;). Existem poucos estudos acerca das peçonhas de *Micrurus*, isso ocorre porque esses animais produzem uma quantidade muito pequena de veneno, sendo de difícil coleta, além disso, são difíceis de serem encontradas em seus habitats naturais e não se adaptam bem ao cativeiro (Silva Jr *et al*., 2021, p. 399; Campbell; Lamar, 2004; Nascimento *et al*., 2016; Sanz *et al.*, 2019b).

As espécies de *Micrurus* estão distribuídas amplamente por todo o território brasileiro, também se sabe que a composição das peçonhas sofre influência de diversos fatores como: sazonalidade, idade, sexo, alimentação, habitat, tipo de presa (Oliveira *et al*., 2022; Silva Jr *et al*., 2021, p. 391). As *Micrurus* possuem uma dieta mais restrita e específica, se alimentando principalmente de pequenas serpentes e anfisbenídeos (Campbell; Lamar, 2004). O tipo de alimentação influencia na composição da peçonha, e já foi demonstrado que as peçonhas de *Micrurus* tendem a apresentar maior toxicidade quando avaliadas na presa de preferência da espécie (Silva Jr; Aird, 2001).

Devido à gravidade dos acidentes ofídicos, à alta morbidade e mortalidade, a busca por novos compostos que atuem contra as toxinas presentes nas peçonhas se faz de grande importância, isso porque o tratamento com soro antielapídico isoladamente não é capaz de controlar todas as atividades tóxicas que os venenos apresentam, além de certas desvantagens como a necessidade de refrigeração, que impactam na segurança de seu uso (Gutiérrez *et al*., 2021). Considerando o cenário brasileiro, onde a maioria dos acidentes ocorre em áreas rurais e florestais e comunidades de difícil acesso a necessidade de refrigeração do soro antielapídico torna-se um grande problema que impacta diretamente no tratamento das vítimas, isso porque em muitas regiões do Brasil a rede de energia elétrica é escassa. É por esta razão que este estudo priorizou a análise da eficácia da molécula Varespladib (VPL), comparativamente ao soro

antielapídico bivalente e Neostigmina (NEO), contra as diferentes atividades da peçonha bruta de *M. spixii*.

Por tratar-se de um veneno que estava armazenado no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e para garantir a fidedignidade dos resultados obtidos nesse trabalho, optou-se pela caracterização bioquímica do veneno, com a quantificação total de proteínas (1,59 ± 0,09 mg/mL de veneno) e eletroforese em SDS-PAGE. Nesse sentido, tornou-se imprescindível proceder a caracterização bioquímica do veneno alvo deste estudo, para permitir a sua comparação com dados da literatura, já que os venenos ofídicos são majoritariamente compostos por proteínas e peptídeos, sendo essas moléculas as principais responsáveis por causarem os efeitos tóxicos como neurotoxicidade, hemotoxicidade e citotoxicidade. Outra razão importante para a caracterização bioquímica do veneno, é que a composição dos venenos varia inter- e intra- espécies, além de sofrerem influência de outros fatores como exemplificado anteriormente (Oliveira *et al*., 2022; Silva Jr *et al*., 2021, p. 391).

Um estudo realizado com diferentes espécies do gênero *Micrurus*, incluindo a *M. spixii*, identificou que as principais bandas proteicas para estes venenos se encontravam na faixa de 10 a 15 kDa (Alape-Girón *et al*., 1999). Valeriano-Zapana e colaboradores (2013) também identificaram através de eletroforese que as principais bandas proteicas do veneno de *M. spixii* estavam abaixo de 14 kDa. Ainda neste trabalho, os autores isolaram a fração correspondente à PLA_2, que através da espectrometria de massas apresentou peso molecular de 14149.005 Da. Um outro estudo, também com o veneno de *M. spixii*, identificou que as proteínas desse veneno se encontravam na faixa de 10 – 15 kDa. A PLA_2 isolada do veneno apresentou massa molecular de 12809,49 Da (Terra *et al*., 2015). As PLA_2 identificadas através de eletroforese nos venenos de serpentes elapídicas, apresentam peso molecular em torno de 7 – 16 kDa (Prieto Da Silva *et al*., 2001), enquanto as 3FTx pertencentes a família dos polipeptídios não enzimáticos e apresentam peso molecular entre 6 – 9 kDa (Donato *et al*., 2014; Dufton; Hider, 1988). Nossos resultados, mostraram duas bandas majoritárias, com peso molecular de 12 e 6 kDa na amostra reduzida e 22 e 8 kDa na amostra não reduzida, confirmando o que já foi observado na literatura para esse veneno, e evidenciando que existem duas principais proteínas presentes nesse veneno, sendo a PLA_2 e a 3FTx. O β-mercaptoetanol é muito utilizado como agente redutor em análises de eletroforese em SDS-PAGE, ele atua quebrando pontes dissulfeto cisteina – cisteina, levando a obtenção de resultados mais confiáveis, permitindo a identificação dos grupos proteicos (Müller; Winter, 2017).

A *M. spixii* é uma das maiores cobras corais presentes no território brasileiro, e a peçonha desta espécie é composta principalmente por α – neurotoxina 3FTx e β-neurotoxina PLA_2, que juntas representam mais de 90 % da composição da peçonha (Aird *et al*., 2017; Silva Jr *et al*., 2021, p. 401). Um estudo de venômica (caracterização dos componentes presentes nos venenos de animais) identificou que o veneno de *M. spixii* é composto por 56,5 % de 3FTx, 37,4 % de PLA_2, 5,1% de L-aminoácido oxidase (LAO) e 1,0 % de proteína semelhante a inibidor de serina proteinase do tipo Kunitz (Sans *et al*., 2019b). Diversos estudos têm mostrado que existe uma importante variação na proporção dessas toxinas nas diversas espécies do gênero *Micrurus*, e que essa variação causa um impacto importante nas atividades biológicas do veneno em humanos, sintomatologia e no tratamento aplicado (Silva Jr *et al*., 2021, p. 391-397).

Em uma segunda etapa, foram realizados ensaios de caracterização das atividades biológicas e avaliação da eficácia do soro antielapídico, VPL e NEO. Foram realizados ensaios de tromboelastometria *in vitro* para determinação da atividade anticoagulante sobre o plasma humano, avaliação dos níveis séricos de CK para determinação da atividade miotóxica, neutralização da atividade letal com os agentes analisados, e ensaios miográficos para avaliar a ação neurobloqueadora do veneno em *ex vivo* sobre preparações isoladas de BC de pintainhos.

Nos ensaios de tromboelastometria *in vitro*, o veneno de *M. spixii* apresentou potente atividade anticoagulante, aumentando significativamente o tempo de recalcificação do plasma humano, sendo essa atividade dose dependente. A atividade anticoagulante já havia sido descrita para outras espécies de *Micrurus*, como *M. frontalis*, *M. nigrocinctus*, *M. fulvius*, *M. surinamensis* e mais outras 13 espécies do gênero (Cecchini *et al*., 2005; Dashevsky *et al*., 2021; Fernández *et al*., 2018; Oliveira; Noronha; Lozano, 2017). O veneno também mostrou elevada atividade miotóxica nos testes *in vivo*, com elevação significativa dos níveis séricos de CK, sendo o pico de atividade 3h após o envenenamento. Outros autores também já haviam identificado a atividade miotóxica do veneno de *M. spixii*, e relacionado tal atividade com a ação da PLA_2 (Valeriano-Zapana *et al*., 2013; Terra *et al*., 2015). Ainda assim, a atividade miotóxica também já foi descrita para outras espécies de *Micrurus*, como *M. lemniscatus carvalhoi, M. frontalis frontalis, M. surinamensis surinamensi, M. nigrocinctus, M. fulvius* (Cecchini *et al*., 2005; Goularte *et al*., 1995; Lewin *et al*., 2018b).

O veneno também apresentou alta atividade letal no ensaio de letalidade, causando a paralisia de membros posteriores e levando ao óbito por paralisia respiratória dentro de até 3h após o envenenamento. Tanaka *et al.* (2010) já haviam demonstrado em seu estudo que o

veneno de *M. spixii* estava entre os venenos mais letais, com outras duas espécies de cobras corais avaliadas, *M. corallinus* e *M. altirostris*.

Nos ensaios miográficos em *ex vivo* com preparações isoladas de BC de pintainhos, o veneno apresentou uma potente atividade neurobloqueadora, com redução significativa da amplitude de contração muscular. No entanto, o veneno não causou bloqueio total da contração muscular, e o pós lavagem com solução de Tyrode não foi registrado. Ainda assim, o veneno foi capaz de bloquear completamente as respostas contraturantes à ACh, e reduzir pela metade as respostas contraturantes ao KCl. O bloqueio das respostas contraturantes à ACh exógena, demonstram que este veneno tem uma alta atividade pós-sináptica, enquanto a redução da resposta contraturante ao KCl, é um indício de atividade miotóxica (Harvey *et al*., 1994).

Outros estudos miográficos envolvendo diferentes espécies de *Micrurus* já foram realizados para determinar a ação neurobloqueadora destes venenos (Cecchini *et al*., 2005; De Abreu *et al*., 2008; Goularte *et al*., 1995; Terra *et al*., 2015; Vital Brazil; Fontana; Heluany, 1995; Yang *et al*., 2017), esses estudos mostraram que existem variações no bloqueio neuromuscular entre as espécies, e que essas variações ocorrem devido a diferença e/ou ausência de alguma das duas principais neurotoxinas PLA_2 e 3FTx, e que a composição desses venenos dependem de diversos fatores, tais como filogenética, alimentação, habitat, idade e sexo. Além disso, alguns venenos destas espécies induzem ao bloqueio neuromuscular predominante pré-sináptico, com ação das β- neurotoxinas PLA_2, enquanto outras tem o bloqueio predominante pós-sináptico, com ação das α- neurotoxinas 3FTx (Gutiérrez *et al*., 2016). O bloqueio neuromuscular provocado pelo veneno de *M. spixii* já foi relatado na literatura por alguns autores, utilizando preparações nervo frênico-diafragma de ratos, camundongos e pintainhos (Couceiro *et al*., 2023; Terra *et al*., 2015; Vital Brazil; Fontana; Heluany, 1995; Yang *et al*., 2017). Yang *et al.* (2017) realizaram um estudo com *M. euryxanthus, M. fulvius, M. pyrrhocryptus, M. spixii* e *M. tener*. Os resultados mostram que todas as espécies causaram bloqueio neuromuscular em preparações de BC de pintainho, e que todas causaram bloqueio da resposta contraturante a ACh exógena, ao carbacol, mas não ao KCl, corroborando aos resultados encontrados neste trabalho.

No Brasil, o único tratamento aprovado e disponível em casos de acidentes ofídicos é a administração do soro antiofídico, produzido pelo Instituto Butatan (SP), Fundação Ezequiel Dias (MG) e Instituto Vital Brazil (RJ) e disponibilizado gratuitamente pelo sistema único de saúde (SUS). Nos acidentes envolvendo cobras corais, é recomendada a administração do soro

antielapídico bivalente, produzido a partir da mistura dos venenos de *M. frontalis* e *M. corallinus*. No entanto, a eficácia de neutralização deste soro antielapídico tem sido bastante questionada, porque sua produção não abrange a diversidade de espécies de *Micrurus* presentes no Brasil, e ele não apresenta eficácia contra diversas atividades especificas desses venenos (Silva Jr; Aird, 2001; Tanaka *et al*., 2010).

O soro antielapídico possui baixa eficácia de neutralização contra três das quatro atividades avaliadas. O soro antielapídico não foi eficaz em neutralizar a atividade anticoagulante *in vitro*, sendo necessário utilizar uma proporção de 2:1 do soro, para que houvesse neutralização. Além disso, o soro antielapídico também não foi tão eficaz em proteger contra a atividade miotóxica, evidenciada pelo aumento dos níveis séricos de CK, mesmo na concentração de 2x DE. Nos ensaios de letalidade, o soro antielapídico apresentou eficácia contra os efeitos sistêmicos do envenenamento, no entanto, é importante frisar que ele foi utilizado na concentração de 2x DE. Entretanto, um outro estudo demonstrou a baixa eficácia de neutralização do soro antielapídico sobre a atividade letal de *M. spixii* e demais espécies de *Micrurus* (Tanaka *et al*., 2010).

Nos ensaios miograficos em *ex vivo*, o soro antielapídico foi utilizado na concentração recomendada pelo fabricante, com ajuste para a dose de veneno utilizada nos protocolos. Nos protocolos de pré incubação, o soro antielapídico apresentou eficácia parcial contra a ação neurobloqueadora causada pelo veneno. No entanto ele foi totalmente ineficaz contra o bloqueio das respostas contraturantes à ACh e KCl exógenos. Na pós-incubação, o soro antielapidico apresentou resultados similares com o que foi encontrado no modelo de pré-incubação, tanto na resposta contrátil, quanto na resposta contraturante à ACh e KCl.

Além do tratamento utilizando o soro antielapídico, o Ministério da Saúde também recomenda a administração de drogas anticolinesterásicas, como a Neostigmina (Brasil, 2001; Vital Brazil; Vieira, 1996). A ação da NEO é inibir a enzima acetilcolinesterase, que é responsável pela degradação da ACh em colina + acetato. Ao bloquear esta enzima, a degradação não ocorre, e a ACh torna-se disponível por mais tempo na fenda sináptica. Os resultados deste estudo mostraram que a utilização da NEO nos ensaios de letalidade não foi tão eficiente em reduzir o número de óbitos, assim como, não teve efeitos significativos sobre a sintomatologia dos animais, em especial na dificuldade respiratória. Nos ensaios miográficos, a NEO apresentou resultados semelhantes tanto no modelo de pré-incubação quanto no pós-incubação, não sendo eficaz em reverter o bloqueio da resposta contrátil causado pelo veneno,

entre todos os tratamentos avaliados, foi o que apresentou menor eficácia. Na reposta contraturante à ACh, no modelo de pré-incubação, a NEO apresentou maior eficácia, sendo que em 2 experimentos a resposta contraturante ficou >100%, porém isso não se repetiu nos demais n do grupo, tal efeito pode ser atribuído a própria ação da substância, que consequentemente aumenta a disponibilidade de ACh. Apesar de não haver diferença estatística entre o grupo ven + NEO e o controle Krebs, o erro padrão do grupo ficou grande, demonstrando que há uma grande variação encontrada entre os valores dentro do grupo. Em relação ao KCl, a NEO teve uma eficácia parcial tanto no modelo de pré- quanto no de pós-incubação, ficando bem próximo dos demais tratamentos administrados. Assim como ocorreu em nossos estudos, a NEO também não foi capaz de reverter o bloqueio neuromuscular (*ex vivo*) causado pelo veneno de *Micrurus nigrocinctus* (Goularte *et al*., 1995).

A indicação da NEO em casos de envenenamento envolvendo serpentes do gênero *Micrurus* ainda permanece incerta, e sua indicação precisa ser reavaliada. Uma possível explicação para a ineficácia da NEO é que a dose utilizada foi insuficiente para reverter o quadro de envenenamento, ou a 3FTx presente neste veneno não apresenta efeito semelhante ao curare, e o uso da NEO não seria capaz de reverter os efeitos mesmo em doses maiores. Ainda assim, as 3FTx poderiam se ligar muito rapidamente e covalentemente aos receptores nicotínicos dificultando a reversão desta ligação, porém não foram realizados outros ensaios para comprovar tais hipóteses. A atropina, antagonista muscarínico da ACh, administrada juntamente com a NEO (nos ensaios de letalidade *in vivo*) para conter os efeitos muscarínicos da ACh, como aumento de secreções e diminuição dos batimentos cardíacos, não possui qualquer relação com a ação do veneno em si.

A compreensão acerca dos mecanismos de ação desempenhados pelas α-neurotoxinas é bastante complexa. A extensa variabilidade estrutural apresentada pelas 3FTx possui grande relação com os diversos mecanismos de ação já descritos para esse grupo de toxinas. É importante ressaltar que estas toxinas apresentam efeitos tóxicos potentes e uma variedade de atividades biológicas. Esse grupo de toxinas pode atuar de maneira similar ao curare, ou impedindo a ligação da ACh ao receptor nicotínico (nAChr). Além disso, essas neurotoxinas também podem atuar em outros locais, como por exemplo nas vias muscarínicas, no sistema gabaérgico e glutamartérgico, por esta razão o foco de estudo dessas neurotoxinas devem ir além do sistema colinérgico e sua ação sobre os receptores muscarínicos (Donato *et al*., 2014; Silva Jr *et al*., 2021, p. 403-421). Um estudo conduzido por Vital Brazil, Fontana e Heluany (1995), demonstraram que o veneno de *M. spixii* pode levar a uma dessensibilização da

modulação não competitiva do nAChr, porém, neste estudo não foi comprovado se esta ação ocorre através da PLA_2 ou pela 3FTx, visto que esse veneno tem ação tanto pré- quanto pós-sináptica, mas os dados apontam que esteja mais relacionado com a ação da 3FTx.

O Varespladib (VPL), é uma molécula sintética, que possui a capacidade de inibir enzimas fosfolipásicas, e com isso seu uso tem sido direcionado ao tratamento de acidentes ofídicos envolvendo peçonhas ricas em PLA_2 (Lewin *et al*., 2016). Estudos no mundo todo, envolvendo peçonhas de diferentes espécies, utilizando-se de diferentes metodologias, tem sido realizado para avaliar a eficácia do VPL e contribuir para seu redirecionamento.

Dashevsky *et al.* (2021) realizaram um estudo *in vitro*, com mais de 13 espécies do gênero *Micrurus*, e demonstraram que o VPL é eficaz em neutralizar a atividade anticoagulante desses venenos, quando comparado com o soro Coralmyn, que apresenta pouca eficácia de neutralização dessa atividade. Um outro estudo realizado com duas espécies do gênero *Bitis*, também demonstrou a eficácia do VPL contra a atividade anticoagulante da peçonha destas espécies (Youngman *et al*., 2020).

Nossos resultados mostram que o VPL sozinho se apresentou altamente eficaz em neutralizar a atividade anticoagulante da peçonha de *M. spixii*, sendo que foram necessários somente 60 ng para neutralizar a atividade anticoagulante. A associação entre uma dose ineficaz de soro antielapídico com uma dose ineficaz do VPL, também apresentou excelente eficácia de neutralização, mostrando um efeito sinérgico entre ambas as substâncias. Esse mesmo efeito também foi observado nos ensaios de miotoxicidade e miográficos. Do mesmo modo, o VPL sozinho também apresentou alta eficácia contra a atividade miotóxica, com redução dos níveis séricos de CK, quando pré incubado com a peçonha de *M. spixii*. Similarmente ao que ocorreu nos ensaios de coagulação, a associação de ambos (soro antielapídico + VPL), mostrou alta eficácia de neutralização da atividade miótoxica, sendo o melhor resultado entre os três tratamentos avaliados.

Bryan-quiróz *et al.* (2019), já haviam demonstrado que o VPL foi capaz de neutralizar as atividades miotóxicas *in vivo* de PLA2 dos grupos estruturais I e II, sendo I, a toxina pseudesina e II a miotoxina I isolada de *Bothrops asper* e a crotoxina B de *Crotalus vegrandis.* Um outro estudo realizado com a miotoxina I da peçonha de *Bothrops moojeni*, também identificou a eficácia do VPL em reduzir os níveis séricos de CK *in vivo* (Salvador *et al*., 2021). O VPL também foi eficaz contra a mionecrose *in vivo* provocada por outras quatro espécies de

serpentes (*Deinagkistrodon acutus*, *Agkistrodon halys*, *Bungarus multicinctus* e *Naja atra)* (Wang *et al*., 2018). Assim, a literatura mostra que o VPL tem apresentado eficácia contra as atividades miotóxicas dependentes de PLA_2, de diferentes venenos.

No ensaio de neutralização da atividade letal, o VPL sozinho não foi eficaz, os animais vieram ao óbito rapidamente e com sinais de paralisia respiratória. Tanto o resultado do grupo que recebeu VPL sozinho, quanto o resultado do grupo que recebeu NEO + Atropina ficaram iguais no número de óbitos. Entretanto, a associação de VPL + soro antielapídico protegeu contra a letalidade, porém, muito provavelmente essa proteção tenha ocorrido mais pela ação do soro antielapídico, que foi utilizado na concentração de 2x DE, e o VPL pode contribuído pouco para a neutralização. Lewin *et al*. (2018b) em seu estudo com a *M. fulvius*, serpente presente encontrada principalmente nos Estados Unidos, mostrou que o VPL foi eficaz contra a letalidade provocada por esta espécie, entretanto, a peçonha desta espécie de *Micrurus* é composta majoritariamente por PLA_2, sendo a principal toxina responsável pela sua atividade neurotóxica. Isso ajudaria a explicar a eficácia do VPL contra a letalidade desta espécie, e a sua não eficacia contra a letalidade da *M. spixii*, visto que a PLA_2, não é o componente majoritário nesta espécie.

Em seguida, nos ensaios miográficos de pré-incubação, o VPL isoladamente apresentou eficácia parcial contra ação neurobloqueadora da peçonha de *M. spixii* na dose utilizada. Entretanto foi completamente ineficaz contra o bloqueio das respostas contraturantes a ACh e contra a redução da resposta contraturante ao KCl exógeno. Porém, a associação realizada utilizando-se uma dose reduzida em 50% tanto de VPL quanto de soro antielapídico, apresentou melhores resultados contra o bloqueio neuromuscular do veneno, sendo mais eficaz que ambas as substâncias isoladas. Mas, a associação entre ambos seguiu sem eficácia contra o bloqueio as respostas contraturantes à ACh, mas apresentou melhor resultado contra a redução da resposta contraturante ao KCl. Nos ensaios de pós-incubação, o VPL também apresentou eficácia parcial contra o bloqueio da resposta contrátil, sendo ligeiramente menor que no modelo pré-incubação. Nas respostas contraturantes à adição exógena de ACh não se observou qualquer eficácia, e na resposta contraturante ao KCl apresentou maior eficácia do que no modelo de pré-incubação. A associação entre soro antielapídico e VPL (com dose reduzida em 50% de ambos), apresentou baixa eficácia, ficando muito próximo do resultado encontrado com o VPL isolado. Nas respostas contraturantes à ACh e ao KCl, a associação de ambos apresentou um resultado melhor do que encontrado no modelo de pré-incubação, porém ainda não foi completamente eficaz em restaurar as respostas contraturantes.

Os resultados encontrados tanto nos ensaios de letalidade, quanto nos ensaios miográficos, sugerem que a ação neurobloqueadora deste veneno está atribuída principalmente a α-neurotoxina 3FTx, de ação pós-sináptica, que atuaria sobre os receptores nAChr do neurônio pós-sináptico, tornando-os irresponsivos à ACh. Outro indício que comprova a atividade pós-sináptica é o bloqueio da resposta contraturante à ACh exógena, o fato de o VPL não ser capaz de reverter essa atividade, mostra que o bloqueio neuromuscular está relacionado com a ação da 3FTx, toxina da qual o VPL não é capaz de atuar sobre.

Um recente estudo avaliou a atividade fosfolipásica de quatro espécies de *Micrurus*, sendo *M. altirostris*, *M. corallinus*, *M. spixii* e *M. dumerilli carinicauda*, todas as espécies apresentaram atividade fosfolipásica, sendo que a espécie *M. spixii* apresentou a mais alta entre todas as espécies. O VPL foi eficiente em inibir as atividades fosfolipásicas das quatro espécies avaliadas. Todas as quatro espécies causaram bloqueio neuromuscular, sendo que a *M. spixii* levou ao bloqueio total da contração muscular mais rápido que todas as outras. O VPL pré-incubado com o veneno foi capaz de reduzir o bloqueio neuromuscular causado pelos venenos de *M. altirostris*, *M. corallinus* e *M. dumerilli carinicauda*, em diferentes graus, mas não obteve nenhuma eficácia contra o bloqueio neuromuscular causado pela espécie *M. spixii* (Couceiro *et al*., 2023).

Outros estudos também realizados com preparações nervo frênico-diagrama de camundongo, demonstraram a eficácia do VPL contra o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Oxyuranus scutellatus* (de Souza *et al*., 2022; Oliveira *et al*., 2020). Porém, é importante destacar que os venenos dessas espécies são compostos principalmente por neurotoxinas do tipo PLA_2.

Nossos resultados mostraram que nas atividades que envolvem mais especificamente a ação de PLA_2, como a atividade anticoagulante e miotóxica, o VPL isolado foi capaz de neutralizar tais atividades, e que a associação entre soro antielapídico e VPL aumentou a eficácia de ambos, demonstrando existir um mecanismo de sinergismo entre eles, que ainda não foi esclarecido. No entanto, o VPL isolado não teve eficiência contra a atividade letal do veneno de *M. spixii*, assim como, apresentou eficácia parcial contra o bloqueio neuromuscular nos ensaios miográficos. E muito provavelmente a baixa eficácia do VPL nestas atividades é devida ao fato de que elas dependem exclusivamente da ação de α-neurotoxinas pós-sinápticas.

Parte dos resultados obtidos neste trabalho foram apresentados nos seguintes congressos: Venoms and Toxins 2023 (Anexo 6) e SBTx e IST 2023 (XVII Congress of the Brazilian Society of Toxinology; XIII Congress of the Pan-American Section of the International Society on Toxonology) (Anexo 7).

7 CONCLUSÃO

Em suma, conclui-se que o Varespladib é uma molécula capaz de inibir atividades que envolvem a ação de PLA_2, como a atividade anticoagulante e miotóxica do veneno de *M. spixii*. No entanto na de letalidade e no bloqueio neuromuscular em *ex vivo* que não dependem da ação da PLA_2, mas sim da α-neurotoxina 3FTx, o Varespladib apresentou pouca ou nenhuma eficácia. Em contrapartida, o soro antielapídico que deveria ser eficiente contra todas as atividades tóxicas do veneno, somente foi eficaz no ensaio de letalidade, e utilizando uma dose duas vezes maior do que o recomendado pelo fabricante. A Neostigmina também não foi eficiente em reverter a sintomatologia respiratória nos ensaios de letalidade.

É evidente que precisam ser realizados estudos que expliquem o mecanismo de ação das α-neurotoxinas 3FTx, tanto na letalidade quanto no bloqueio neuromuscular das espécies de *Micrurus*. A indicação do uso da Neostigmina nesses envenenamentos merece ser revista.

Concluindo, o Varespladib é uma molécula promissora, e nossos resultados mostram que esta molécula pode ser utilizada no tratamento complementar a soroterapia em alguns casos de acidentes ofídicos.

REFERÊNCIAS

AIRD, S. D. *et al*. Coralsnake venomics: analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. **Toxins**, v. 9, n. 6, p. 187, 2017. DOI: 10.3390/toxins9060187. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5488037/. Acesso em: 28 mar. 2023.

ALAPE-GIRÓN, A. *et al*. Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. **European journal of biochemistry**, v. 259, n. 1-2, p. 225-234, 1999. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00021.x. Disponível em: https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.1999.00021.x?sid=nlm%3Apubmed. Acesso em: 05 abr. 2023.

ARAÚJO, S. C. M.; CÂMARA, J. T.; GUEDES, T. B. Snakebites in Northeastern Brazil: accessing clinical-epidemiological profile as a strategy to deal with Neglected Tropical Diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 56, p. e0224-2023, 2023. DOI: https://doi.org/10.1590/0037-8682-0224-2023. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/KpJpFxDdHMkc3H4D5WWf9Cr/. Acesso em: 05 abr. 2023.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; MACHADO, C. A Profile of Snake Bites in Brazil, 2001 to 2012. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.1000194. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9308. Acesso em: 06 abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em: https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual-de-Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf. Acesso em: 3 set. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net (2023). Brasília, DF. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def. Acesso em: 19 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais**. Boletim epidemiológico (*online*), 2019, v. especial, p. 81-83. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/raiva/boletim-especial-vigilancia-em-saude-no-brasil-2003-2019.pdf/view. Acesso em: 3 set. 2022.

BRYAN-QUIRÓS, W. *et al*. Neutralizing properties of LY315920 toward snake venom group I and II myotoxic phospholipases A_2. **Toxicon**, v. 157, p. 1-7, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.292. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010118310134?via%3Dihub. Acesso em: 3 jun. 2023.

BUCARETCHI, F. *et al*. Coral snake bites (*Micrurus spp*.) in Brazil: a review of literature reports. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 3, p. 222-234, 2016. DOI: https://doi.org/10.3109/15563650.2015.1135337. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15563650.2015.1135337. Acesso em: 5 set. 2022.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A_2 Biochemistry. **Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy**, v. 23, n. 1, p. 49, 2009. DOI: 10.1007/s10557-008-6132-9. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2823292/. Acesso em: 04 jun. 2023.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous of the western hemisphere**. 2 ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 2004. *E-book*.

CARBAJAL-SAUCEDO, A. *et al*. Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (squamata: Elapidae) venom *in vitro*. **Toxins**, v. 6, n. 1, p. 359-370, 2014. DOI: 10.3390/toxinas6010359. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920266/. Acesso em: 5 set. 2022.

CECCHINI, A. L. *et al*. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 140, n. 1, p. 125-134, 2005. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.11.012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1095643304003319. Acesso em: 5 set. 2023.

COUCEIRO, F. Y. G. M. *et al*. Involvement of phospholipase A_2 in the neuromuscular blockade caused by coralsnake (*Micrurus* spp.) venoms in mouse phrenic nerve-diaphragm preparations in vitro. **Toxicon**, v. 234, p. 107263, 2023. DOI: 10.1016/j.toxicon.2023.107263. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010123002490. Acesso em: 15 nov. 2023.

CUNHA, O. R. da; NASCIMENTO, F. P. do. Ofídios da Amazônia XIV–As espécies de *Micrurus*, *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* do Sul do Pará e Oeste do Maranhão, incluindo áreas de Cerrado deste estado (Ophidia: Elapidae e Viperidae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Nova série Zoologia**, 1982. Disponível em: https://repositorio.museu-goeldi.br/handle/mgoeldi/1051. Acesso em: 15 set. 2022.

DASHEVSKY, D. *et al*. Anticoagulant *Micrurus* venoms: Targets and neutralization. **Toxicology Letters**, v. 337, p. 91-97, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.11.010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427420304677. Acesso em: 04 mar. 2023.

DE ABREU, V. A. *et al*. Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 519-527, 2008. DOI: https://doi.org/10.1080/15563650701647405. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15563650701647405. Acesso em: 25 jun. 2023.

DE SOUZA, J. *et al*. Effect of the phospholipase A_2 inhibitor Varespladib, and its synergism with crotalic antivenom, on the neuromuscular blockade induced by *Crotalus durissus terrificus* venom (with and without crotamine) in mouse neuromuscular preparations. **Toxicon**, v. 214, p. 54-61, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.05.001. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010122001295. Acesso em: 22 set. 2022.

DONATO, M. F. *et al*. **Peçonha da serpente *Micrurus* lemniscatus lemniscatus (Roze, 1967), caracterização parcial das propriedades bioquímicas e farmacologias: neurotoxicidade e atividade pré sináptica de toxina de três dígitos**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências, Fisiologia e Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciencias Biologias da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2014. Disponivel em: https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/58062. Acesso em: 25 set. 2022.

DROTAROVA, M. *et al*. Basic Principles of Rotational Thromboelastometry (ROTEM®) and the Role of ROTEM—Guided Fibrinogen Replacement Therapy in the Management of Coagulopathies. **Diagnostics**, v. 13, n. 20, p. 3219, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/diagnostics13203219. Disponível em: https://www.mdpi.com/2075-4418/13/20/3219. Acesso em: 15 mar. 2023.

DUFTON, M. J.; HIDER, R. C. Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. **Pharmacology & therapeutics**, v. 36, n. 1, p. 1-40, 1988. DOI: https://doi.org/10.1016/0163-7258(88)90111-8. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0163725888901118?via%3Dihub. Acesso em: 16 mar. 2023.

FERNÁNDEZ, M. L. *et al*. Intravascular hemolysis induced by phospholipases A_2 from the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*: Functional profiles of hemolytic and non-hemolytic isoforms. **Toxicology Letters**, v. 286, p. 39-47, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.037. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427417314984?via%3Dihub. Acesso em: 20 mar. 2023.

GINSBORG, B. L.; WARRINER, J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 410-411, 1960. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1960.tb01264.x. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1481857/. Acesso em: 25 out. 2022.

GOULARTE, F. C. *et al*. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. **Toxicon**, v. 33, n. 5, p. 679-689, 1995. DOI: https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00178-B. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004101019400178B?via%3Dihub. Acesso em: 16 set. 2023.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al*. Mecanismo de ação dos venenos de cobras corais. Goiânia, Editorial da PUC Goiás, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al*. Snakebite envenoming. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.63. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrdp201763. Acesso em: 20 jan. 2023.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al*. The search for natural and synthetic inhibitors that would complement antivenoms as therapeutics for snakebite envenoming. **Toxins**, v. 13, n. 7, p. 451, 2021. DOI: 10.3390/toxinas13070451. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8309910/. Acesso em: 20 jan. 2023.

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. DOI: 10.3390/toxins12020131. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32093386/. Acesso em: 25 jun. 2023.

GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, v. 18, n. 5-6, p. 603-610, 1980. DOI: https://doi.org/10.1016/0041-0101(80)90087-2. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0041010180900872. Acesso em: 25 jun. 2023.

HARVEY, A. L. *et al*. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 257-265, 1994. DOI: https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90078-7. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0041010194900787. Acesso em: 10 out. 2023.

INSTITUTO BUTANTAN. Soro Antielapídico (bivalente). São Paulo: Instituto Butantan, 2017. Bula Paciente. Disponível em: https://butantan.gov.br/assets/pdf/soros_vacinas/soros/Bula-Soro-Antielapidico-Instituto-Butantan-Paciente-Consulta-Remedios.pdf. Acesso em: 15 de ago. de 2022.

KINI, R. M. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A_2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147-1161, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15922780/. Acesso em: 15 mar. 2023.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006. DOI: 10.1042/BJ20060302. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1533313/. Acesso em: 15 mar. 2023.

KOH, C. Y.; BENDRE, R.; KINI, R. M. Repurposed drug to the rescue of snakebite victims. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 542, p. eabb6700, 2020. DOI: 10.1126/scitranslmed.abb6700. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32376770/. Acesso em: 15 mar. 2023.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. DOI: https://doi.org/10.1038/227680a0. Disponível em: https://www.nature.com/articles/227680a0#citeas. Acesso em: 25 jul. 2023.

LEWIN, M. R. *et al.* Delayed oral LY333013 rescues mice from highly neurotoxic, lethal doses of Papuan Taipan (*Oxyuranus scutellatus*) venom. **Toxins**, v. 10, n. 10, p. 380, 2018a. DOI: 10.3390/toxins10100380. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6215158/. Acesso em: 25 jan. 2023.

LEWIN, M. R. *et al.* Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A_2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. **Toxins**, v. 8, n. 9, p. 248, 2016. DOI: 10.3390/toxins8090248. Disponivel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037474/. Acesso em: 25 jan. 2023.

LEWIN, M. R. *et al*. Delayed LY333013 (oral) and LY315920 (intravenous) reverse severe neurotoxicity and rescue juvenile pigs from lethal doses of *Micrurus fulvius* (eastern coral snake) venom. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 479, 2018b. DOI: 10.3390/toxins10110479. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6265968/. Acesso em: 25 jan. 2023.

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. DOI: 10.3390/toxins14110783. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9695340/. Acesso em: 26 jan. 2023.

LOMONTE, B. *et al*. Three-finger toxins from the venom of *Micrurus tschudii* (desert coral snake): Isolation and characterization of tschuditoxin-I. **Toxicon**, v. 167, p. 144-151, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.06.023. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010119301989?via%3Dihub. Acesso em: 15 mar. 2023.

LOWRY, O. H. *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951. Disponível em: https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf . Acesso em: 10 mar. 2024.

MARKWELL, M. A. K. *et al*. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 206-210, 1978. DOI: https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9. Disponivel em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269778905869. Acesso em: 10 mar. 2024.

MÜLLER, T.; WINTER, D. Systematic evaluation of protein reduction and alkylation reveals massive unspecific side effects by iodine-containing reagents. **Molecular & cellular proteomics**, v. 16, n. 7, p. 1173-1187, 2017. DOI: 10.1074/mcp.M116.064048. Disponivel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5500753/. Acesso em: 10 ago. 2023.

NASCIMENTO, L. R. de S. *et al*. **Revisão taxonômica do complexo *Micrurus spixii* Wagler, 1824 (Serpentes, Elapidae).** 2016. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade do Pará. Pará, Belém, 2016. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPA_aeef46bbe598857b7ec436d9796849b1. Acesso em: 10 nov. 2022.

OLIVEIRA, A. L. *et al*. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. **Nature Reviews Chemistry**, v. 6, n. 7, p. 451-469, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s41570-022-

00393-7. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41570-022-00393-7. Acesso em: 10 fev. 2023.

OGUIURA, N. *et al.* An alternative micromethod to access the procoagulant activity of *Bothrops jararaca* venom and the efficacy of antivenom. **Toxicon**, v. 90, p. 148-154, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.004. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010114002335?via%3Dihub. Acesso em: 10 mar. 2023.

OLIVEIRA, F. da R.; NORONHA, M. das D. N.; LOZANO, J. L. L. Biological and molecular properties of yellow venom of the Amazonian coral snake *Micrurus surinamensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 365-373, 2017. DOI: https://doi.org/10.1590/0037-8682-0408-2016. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/c99dnVsy8PsBGx45whDLMDf/?format=html&lang=en#. Acesso em: 15 fev. 2023.

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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.08.023. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004101012030372X?via%3Dihub. Acesso em: 15 nov. 2022.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 24-29, 2001. DOI: https://doi.org/10.1590/S0104-42302001000100026. Disponível em: https://www.scielo.br/j/ramb/a/PsGWFbY5RwdZdQSMJmHxpSN/?lang. Acesso em: 10 mar. 2023.

PRIETO DA SILVA, A. R. *et al*. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 949-953, 2001. DOI: 10.1016/s0041-0101(00)00233-6. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010100002336. Acesso em: 17 ago. 2023.

ROSSETTO, O.; RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. **Toxicology Letters**, v. 149, n. 1-3, p. 91-101, 2004. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.023. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427403004879?via%3Dihub. Acesso em: 20 mar. 2023.

SALVADOR, G. H. M. *et al*. The synthetic varespladib molecule is a multi-functional inhibitor for PLA2 and PLA_2-like ophidic toxins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 7, p. 129913, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129913. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416521000714?via%3Dihub. Acesso em: 10 dez. 2022.

SANZ, L. *et al*. Comparative venomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii*, and *Micrurus surinamensis*. **Toxicon**, v. 166, p. 39-45, 2019b. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.05.001. Disponível em: 10.1016/j.toxicon.2019.05.001. Acesso em: 25 set. 2023.

SANZ, L. *et al*. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA_2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. **Journal of Proteomics**, v. 200, p. 90-101, 2019a. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.03.014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391919300958?via%3Dihub. Acesso em: 15 ago. 2022.

SILVA JR, N. J.; AIRD, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 128, n. 3, p. 425-456, 2001. DOI: 10.1016/s1532-0456(00)00215-5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11255115/. Acesso em: 25 set. 2023.

SILVA JR, N. J. *et al.* **Advances in Coralsnake Biology: with na emphasis on South America**. Eagle Mountain, Utah, United States: Eaglr Mountain Publishing, LC, 2021. *E-book*.

TANAKA, G. D. *et al*. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e622, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000622. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2834742/. Acesso em: 25 set. 2023.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 290, 2017. DOI: 10.3390/toxins9090290. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618223/. Acesso em: 16 mar. 2023.

TERRA, A. L. C. *et al*. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A_2. **Toxicon**, v. 103, p. 1-11, 2015. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.06.011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115001580?via%3Dihub. Acesso em: 28 mar. 2023.

VALERIANO-ZAPANA, J. A. *et al*. Purificación y caracterización de una nueva PLA_2 del veneno total de *Micrurus spixii* Purification and characterization of a new PLA2 of whole venom of *Micrurus spixii*. **Revista ECIPerú Volumen**, v. 9, n. 2, 2013. Disponível em: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4813670. Acesso em: 28 set. 2023.

VERGARA, I. *et al*. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 295-306, 2014. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.02.027. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391914000918?via%3Dihub. Acesso em: 03 nov. 2023.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. **Farmacodinâmica**, p. 1044-1074, 1982.

VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 26, n. 6, p. 212-218, 1980.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; HELUANY, N. F. Mode of action of the coral snake *Micrurus spixii* venom at the neuromuscular junction. **Journal of Natural Toxins**, v. 4, n. 1, p. 19-33, 1995.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; PELLEGRINI FILHO, A. Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. **Mem Inst Butantan**, v. 40, n. 41, p. 221-240, 1976. Disponível em: https://bibliotecadigital.butantan.gov.br/arquivos/53/PDF/21.pdf. Acesso em: 12 abr. 2023.

VITAL BRAZIL, O.; VIEIRA, R. J. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 61-67, 1996. DOI: https://doi.org/10.1590/S0036-46651996000100012. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/nRzLqq3HDHZVcgmZzqbcTFv/?lang=en. Acesso em: 16 ago. 2022.

WANG, Y. *et al*. Exploration of the inhibitory potential of varespladib for snakebite envenomation. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 391, 2018. DOI: 10.3390/molecules23020391. Disponivel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017252/pdf/molecules-23-00391.pdf. Acesso em: 19 jun. 2023.

WILLIAMS, D. J. *et al*. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007059, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007059. Disponivel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6383867/pdf/pntd.0007059.pdf. Acesso em: 19 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control**. Geneva: World Health Organization; 2019. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789241515641. Acesso em: 15 jun. 2022.

WHITING, D.; DINARDO, J. A. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. **American journal of hematology**, v. 89, n. 2, p. 228-232, 2014. DOI: https://doi.org/10.1002/ajh.23599. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.23599. Acesso em: 18 abr. 2023.

XIAO, H. *et al*. Inactivation of venom PLA_2 alleviates myonecrosis and facilitates muscle regeneration in envenomed mice: A time course observation. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1911, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081911. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222452/pdf/molecules-23-01911.pdf. Acesso em: 15 ago. 2023.

XIE, C. *et al*. Varespladib inhibits the phospholipase A_2 and coagulopathic activities of venom components from hemotoxic snakes. **Biomedicines**, v. 8, n. 6, p. 165, 2020. DOI: 10.3390/biomedicines8060165. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7345350/#:~:text=We%20demonstrated%20here%20that%20varespladib,anticoagulation)%20induced%20by%20venom%20toxins. Acesso em: 16 ago. 2023.

YANG, D. C. *et al*. The bold and the beautiful: a neurotoxicity comparison of New World coral snakes in the *Micruroides* and *Micrurus* genera and relative neutralization by antivenom. **Neurotoxicity Research**, v. 32, n. 3, p. 487-495, 2017. DOI: 10.1007/s12640-017-9771-4. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s12640-017-9771-4. Acesso em: 05 nov. 2023.

YOUNGMAN, N. J. *et al*. Varespladib (LY315920) neutralises phospholipase A_2 mediated prothrombinase-inhibition induced by Bitis snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 236, p. 108818, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108818. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045620301186. Acesso em: 16 dez. 2022.

ZDENEK, C. N. *et al*. Anticoagulant activity of black snake (Elapidae: *Pseudechis*) venoms: Mechanisms, potency, and antivenom efficacy. **Toxicology letters**, v. 330, p. 176-184, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427420301478#:~:text=Pseudechis%20(Black%20snake)%20venoms%20were,colletti. Acesso em: 14 mar. 2023.

ZINENKO, O.; TOVSTUKHA, I.; KORNIYENKO, Y. PLA_2 inhibitor varespladib as an alternative to the antivenom treatment for bites from nikolsky's viper *Vipera berus* nikolskii. **Toxins**, v. 12, n. 6, p. 356, 2020. DOI: 10.3390/toxins12060356. Disponivel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7354479/. Acesso em: 16 fev. 2023.

APÊNDICE A – PROTOCOLOS MIOGRÁFICOS PREVISTOS

Treinamento do aluno

Antes de iniciar o ensaio piloto e os demais protocolos o aluno deverá passar por um treinamento para aprender a retirar as preparações, sendo esse treinamento necessário para evitar a perca de animais por execução incorreta da técnica e obedecer aos princípios dos 3R's (reduction; replacement e refinement). Serão necessários 3 pintainhos para o treinamento.

Ensaios pilotos *ex vivo*

Os ensaios pilotos serão realizados com a finalidade de definir qual será a concentração a ser adotada nos demais protocolos farmacológicos previstos. Após a realização dos ensaios pilotos e eleita a concentração de trabalho serão iniciados os protocolos previstos na tabela

Testagem da atividade e sensibilidade do veneno: um *screening* será realizado utilizando diferentes concentrações de veneno (10 e 15 μg/mL) na preparação biventer cervicis de pintainho para definir qual a melhor concentração a ser utilizada (n=1, cada) (1 pintainho).

1- **Definição da concentração do Varespladib:** um *screening* será realizado na preparação biventer cervicis de pintainho para definir qual concentração de Varespladib sera utilizada (n=1, cada) (1 pintainho).
2- **Definição da concentração de Neostigmina:** será utilizada a concentração recomendada pelo Ministério da Saúde no tratamento ao acidente elapídico.
3- **Definição da concentração de soro antielapídico:** O soro antielapídico será utilizado na concentração 2X à recomendada pelo fabricante (2X DE).

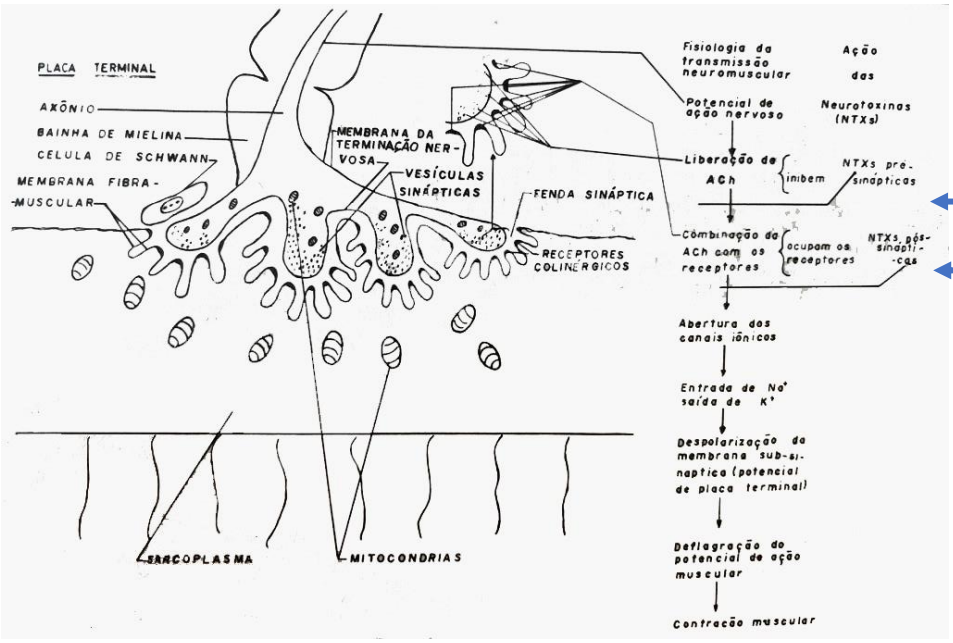
Tabela 2: Protocolos Farmacológicos Previstos

Protocolo	Número de experimentos (n)	Quantidade de animais
Controle Krebs	6	3
Controle Varespladib	6	3
Controle Veneno	6	3
Modelo pré incubação		
Veneno + soro antielapídico	6	3
Veneno + Varespladib	6	3
Veneno + Varespladib + soro antielapídico	6	3
Veneno + NEO	6	3
Modelo pós incubação: definir de acordo com a cinética de bloqueio do veneno o tempo (15 min, 30 min ou 60 min) e após avaliar varespladib, NEO e soro antielapídico.		
Veneno + soro antielapídico (15, 30 ou 60 min)	6	3
Veneno (15, 30 ou 60 min) + Varespladib	6	3
Veneno (15, 30 ou 60 min) + Varespladib + soro antielapídico	6	3
Veneno (15, 30 ou 60 min) + NEO	6	3

Foram executados 11 protocolos experimentais (n=6), utilizando a preparação biventer cervicis de pintainho. Além destes, também foram utilizados 3 animais para o treinamento e 2 no ensaio piloto. Cada animal fornece 2 biventer cervicis, totalizando 38 animais.

ANEXO 1 – ESTRUTURA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Figura 1: Esquema da ultraestrutura da junção neuromuscular



Legenda: Por mecanismos diferentes, as neurotoxinas ofídicas pré- e pós-sinápticas reduzem a amplitude do potencial de placa terminal, razão do bloqueio neuromuscular que produzem. **Fonte:** Vital Brazil (1980).

ANEXO 2 - CARTA DE DOAÇÃO DE PLASMA HUMANO

COLSAN - ASSOCIACAO BENEFICENTE DE COLETA DE SANGUE
06020341 14:17:50 12/02/14 Folha: 1

RELATORIO DE DISTRIBUICAO P/ TERCEIROS
Periodo de 12/02/14 a 12/02/14

Requisica : 00200642
Unidade de Saude: 0297-INSTITUTO BUTANTAN
Data Solicitacao: 11/02/14
Data Entrega : 12/02/14

1713320-049	1740727	RS	01303	162 ml	A	POSITIVO	LIBERADO	16/11/13	16/11/14
1714006-009	9141182	PFA	01303	174 ml	O	POSITIVO	LIBERADO	06/01/14	06/01/15
1714006-031	9141202	ESM	01303	213 ml	O	POSITIVO	LIBERADO	06/01/14	06/01/15
7613348-015	9140206	CAF	01303	206 ml	O	POSITIVO	LIBERADO	14/12/13	14/12/14
7613348-026	9140221	ASS	01303	232 ml	O	POSITIVO	LIBERADO	14/12/13	14/12/14
7614006-009	9105261	MCRGM	01303	232 ml	O	POSITIVO	LIBERADO	06/01/14	06/01/15

ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO CEUA DO INSTITUTO BUTANTAN

INSTITUTO BUTANTAN
A serviço da vida

Instituto Butantan de São Paulo
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da associação entre Varespladib e Neostigmina em alvos pré (Beta-neurotoxinas) e pós (Alfa-neurotoxinas) sinápticos contra os efeitos do veneno de Micrurus spixii. ", protocolada sob o CEUA nº 1807290922 (ID 002881), sob a responsabilidade de **Marisa Maria Teixeira da Rocha** *e equipe; Nathalia Margarida Cantuaria* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) na reunião de 14/12/2022.

We certify that the proposal "Evaluation of the association between Varespladib and Neostigmine in pre (Beta-neurotoxins) and post (Alphaneurotoxins) synaptic targets against the effects of Micrurus spixii venom.", utilizing 119 Heterogenics mice (119 males), protocol number CEUA 1807290922 (ID 002881), under the responsibility of **Marisa Maria Teixeira da Rocha** *and team; Nathalia Margarida Cantuaria* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute of São Paulo (CEUAIB) in the meeting of 12/14/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 11/2022 a 02/2023 Área: Herpetologia

Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 20 a 25 dias	Quantidade: 119
Linhagem:	Swiss		Peso: 18 a 22 g	

São Paulo, 26 de maio de 2023

Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

ANEXO 4 – APROVAÇÃO DO CEUA DA UNISO

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rod. Raposo Tavares, km 92,5 – CEP 18023-000 - Sorocaba - SP - Brasil

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " **Efeito da associação Varespladib/Neostigmina em alvos pré- (fosfolipases A2, PLA2s, β-neurotoxinas) e pós- (toxinas de três dedos, 3FTxs, α-neurotoxinas) sinápticos do veneno de coral *Micrurus spixii*** ", registrada com o número **229\2022**, sob a responsabilidade de **Yoko Oshima Franco** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea, e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Sorocaba, em reunião do dia 14\04\2023.

Finalidade da proposta: ( ) Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização (data de início e término): Início: 01/04/2023 Término: 30/06/2024
Espécie/linhagem/Raça: Ave - pintainho, HY–line; Camundongo heterogênico, Swiss
Número de animais autorizados: 12 aves e 57 camundongos
Peso/idade: Aves: 4 – 8 dias, 40 – 50 g; camundongos: 2 meses, 25 – 35 g
Sexo: Machos
Origem do(s) animal(is), indicando informações sobre o fornecedor: Camundongos: Anilab, Paulinia (SP); Pintainhos: Avicultura Santa Barbara, Sorocaba (SP).

Profa. Dra. Ana Carolina Rusca Correa Porto
Coordenadora da Comissão

ANEXO 5 – EMENTA CEUA UNISO

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA–UNISO

CARTA RESPOSTA

Protocolo nº 229/2022
Interessados: Nathalia Margarida Cantuária
Orientador: Yoko Oshima Franco
Título do Projeto: Avaliação da associação entre Varespladib e Neostigmina em alvos pré (β-neurotoxinas) e pós (α-neurotoxinas) sinápticos contra os efeitos do veneno de *Micrurus spixii*
Solicitação: Autorização para a Inversão do uso de animais para 57 pintainhos e 12 camundongos.

Após os esclarecimentos enviados na carta do dia 6 de novembro de 2023, essa comissão entende que, em não havendo inclusão de nenhum protocolo novo no projeto além daqueles que já foram aprovados, nem alteração do número de animais como um todo, a inversão da quantidade de animais para 57 pintainhos e 12 camundongos, relacionada a justificativa enviada na solicitação de 04 de outubro de 2023, está autorizada.

Data: 24/11/2023

Assinatura: _____
Nome: Ana Carolina Rusca Correa Porto
Coordenadora da CEUA-UNISO

ANEXO 6 – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO CONGRESSO VENOMS AND TOXINS 2023

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that

Nathalia Cantuaria

University of Sorocaba, Brazil

participated virtually in

Venoms and Toxins 2023 | Hybrid | St Edmund Hall, Oxford, UK

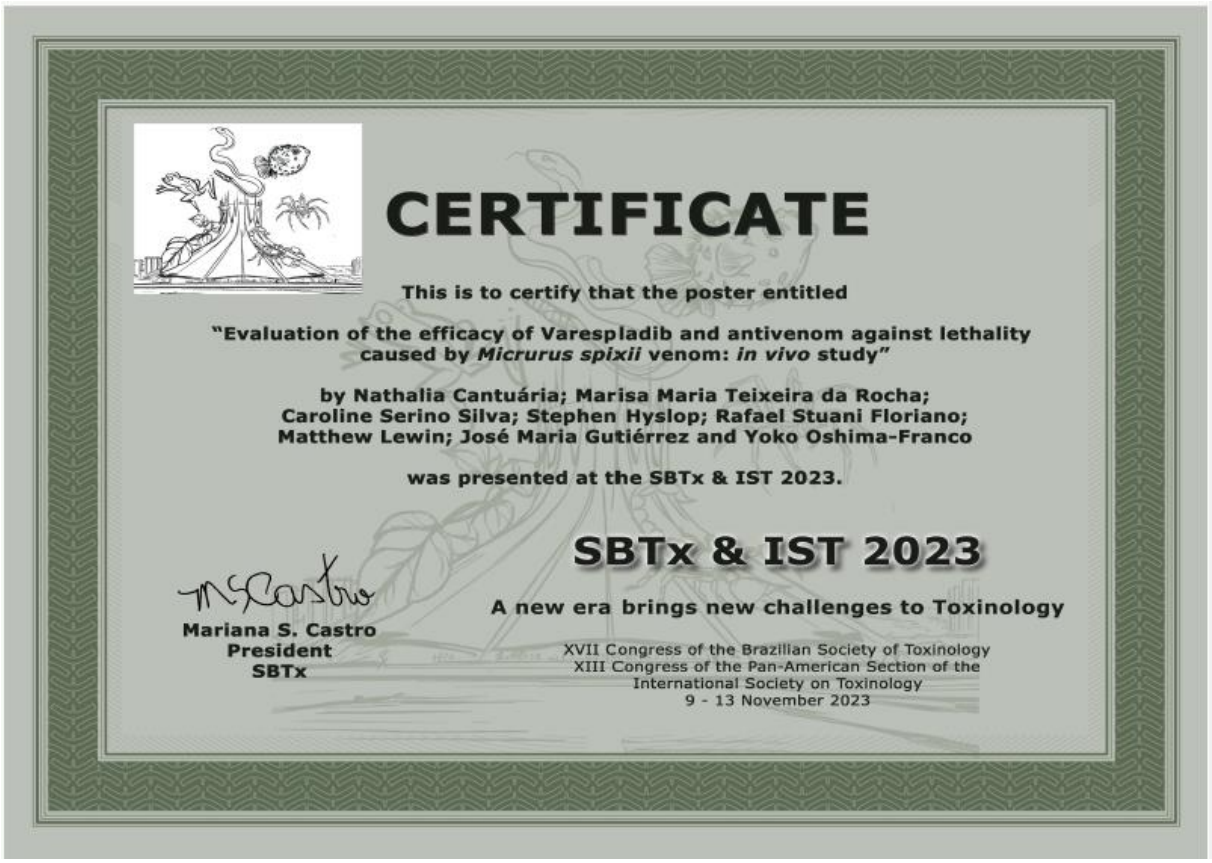
22-24 August 2023

Poster presentation title: Evaluation of Varespladib action against the myotoxic effects of *Micrurus spixii* venom

Professor A Nekaris | Dr M Sohail | Dr R de Cássia Collaço

This certificate does not imply any specific competence or confirm attendance of the whole conference

ANEXO 7 – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO CONGRESSO SBTx & IST 2023



CERTIFICATE

This is to certify that the poster entitled

"Evaluation of the efficacy of Varespladib and antivenom against lethality caused by *Micrurus spixii* venom: *in vivo* study"

by Nathalia Cantuária; Marisa Maria Teixeira da Rocha; Caroline Serino Silva; Stephen Hyslop; Rafael Stuani Floriano; Matthew Lewin; José Maria Gutiérrez and Yoko Oshima-Franco

was presented at the SBTx & IST 2023.

Mariana S. Castro
President
SBTx

SBTx & IST 2023

A new era brings new challenges to Toxinology

XVII Congress of the Brazilian Society of Toxinology
XIII Congress of the Pan-American Section of the International Society on Toxinology
9 - 13 November 2023