



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RAPHAEL SCHEZARO RAMOS

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E BIOLÓGICAS DA PEÇONHA DE
***Micrurus surinamensis* (COBRA CORAL SEMI-AQUÁTICA)**

CAMPINAS

2020

RAPHAEL SCHEZARO RAMOS

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E BIOLÓGICAS DA PEÇONHA DE
***Micrurus surinamensis* (COBRA CORAL SEMI-AQUÁTICA)**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Co-Orientador: Prof. Dr. Edward Gerard Rowan

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
RAPHAEL SCHEZARO RAMOS, ORIENTADA PELO
PROF. DR. STEPHEN HYSLOP E CO-ORIENTADA
PELO PROF. DR. EDWARD GERARD ROWAN.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Schezaro-Ramos, Raphael, 1990-
Sch29a Atividades farmacológicas e biológicas da peçonha de *Micrurus surinamensis* (cobra coral semi-aquática) / Raphael Schezaro Ramos. –
Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Stephen Hyslop.

Coorientador: Edward Gerard Rowan.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neurotoxinas. 2. Bloqueadores neuromusculares. 3. Cobras corais. 4. Eletrofisiologia. 5. Peçonhas. I. Hyslop, Stephen, 1964-. II. Rowan, Edward Gerard. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pharmacological and biological actions of *Micrurus surinamensis* venom (semiaquatic coralsnake)

Palavras-chave em inglês:

Neurotoxins

Neuromuscular blocking agents

Coral snakes

Electrophysiology

Venoms

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Stephen Hyslop [Orientador]

Fábio Bucarechi

Yoko Oshima Franco

Thalita Rocha

Soraia Katia Pereira Costa

Data de defesa: 10-08-2020

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8832-2543>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6602755778270561>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RAPHAEL SCHEZARO RAMOS

ORIENTADOR: PROF. DR. STEPHEN HYSLOP

COORIENTADOR: PROF. DR. EDWARD GERARD ROWAN

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. STEPHEN HYSLOP

2. PROF. DR. FÁBIO BUCARETCHI

3. PROFA. DRA. YOKO OSHIMA FRANCO

4. PROFA. DRA. THALITA ROCHA

5. PROFA. DRA. SORAIA KATIA PEREIRA COSTA

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 10/08/2020

DEDICATÓRIA

Para todos aqueles que cruzaram com este trabalho em algum momento de suas trajetórias acadêmicas. Aqueles que, em meio aos tropeços, tiraram forças pra continuar. Aqueles que tiveram que trilhar caminhos mais longos e tortuosos, assim traçados pelos privilégios que não lhe foram fornecidos. Aqueles que por vezes cederam às expectativas e questionaram seus potenciais. Acreditem nas suas histórias.

Para todos aqueles que, cegados pelos seus prejuízos, não conseguiram sonhar. Aqueles que não acharam que pertenciam a certos lugares. Aqueles que nem se quer souberam da existência das diferentes possibilidades. Eu tenho a legítima esperança de um futuro iluminado, mas sinto muito se ele for distante demais para todos desfrutarmos.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigado à minha família, **Maria Aparecida, Paulino, Patrícia, Paula e Juliana**. Obrigado por todas as vezes que me apoiaram e deram base para chegar até aqui. Obrigado por toda nossa história juntos.

Muito obrigado ao meu parceiro **Luiz Paulo**. Obrigado pelas correções de textos em Inglês. Obrigado por, em seus mais genuínos gestos, me inspirar a ser uma pessoa mais solidária, consciente e determinada. Obrigado por todos os puxões de orelha quando eu precisei. Obrigado por todas as vezes que acreditou em mim quando eu mesmo tive dificuldade. Obrigado por me motivar, me acompanhar e me ouvir.
Obrigado por todo o amor.

Muito obrigado aos meus amigos **Cecília, Everton, Gabriela, Heloiza, Lenna, Tatiênia e Valesca**. Obrigado por toda a preocupação e carinho. Obrigado por todas as vezes que estiveram prontos para me ajudar antes mesmo de eu pedir.
Obrigado por me orgulharem tanto.

Muito obrigado à minha amiga e parceira de trabalho **Ananda**. Obrigado por todos os momentos inesquecíveis que dividimos no nosso laboratório. Obrigado pelas risadas e por tornar os dias mais leves. Obrigado por todas as vezes que me entendeu. Obrigado pela parceria, dedicação e confiança. Obrigado por me ensinar tanto. Eu não poderia ficar mais feliz com uma parceira de trabalho.

Muito obrigado à amiga e técnica de laboratório **Patrícia**. Obrigado por todo tempo e paciência dedicado para me passar seus conhecimentos. Obrigado por me apoiar, motivar e inspirar. Obrigado por nossas conversas regadas de piadas e conselhos.
Obrigado por nossos abraços diários que sempre fizeram meus dias de trabalho começarem da melhor forma possível.

Muito obrigado à amiga **Lourdes**. Obrigado por todos os momentos de ensinamentos científicos e humanos. Obrigado por nossos cafezinhos acompanhados de discussões ricas que viajavam pelas diferentes áreas do conhecimento. Obrigado pelo carinho e preocupação.

Muito obrigado ao técnico de laboratório **José Ilton**. Obrigado por toda a paciência com meus incessantes gritos de socorro. Obrigado por todas as vezes que foi solícito quando sua ajuda e ensinamentos me foram necessários.

Muito obrigado os colegas de laboratório **Beatriz, Caio, Dandara, Julian, Kristian e Mariana**. Obrigado por toda a ajuda. Obrigado pelos momentos de descontração. Obrigado pela parceria durante nossas jornadas acadêmicas.

Muito obrigado aos colegas de pesquisa **Alberto, Ana Carolina, Camila, Caroline, Jéssica, Júlia, Júnia, Mariana, Paulo, Rafael, Rita, Sandra e Vanessa**. Obrigado por todos os nossos cafés juntos, pela companhia e por compartilhar experiências.

Muito obrigado às funcionárias **Cráudia, Edvania e Maria**. Obrigado por sempre manter nosso ambiente de trabalho impecável. Obrigado por todo carinho. Obrigado por nossos cafezinhos, conversas, abraços e sorrisos.

Muito obrigado aos funcionários do biotério **Aguinaldo, Antônio, Miguel e Ivani**. Obrigado por todo o cuidado e atenção com os animais.

Muito obrigado aos secretários, **Cidinha e Maísa**. Obrigado por sempre serem solícitos quando precisei. Obrigado pela simpatia, boas conversas e bons conselhos.

Muito obrigado ao secretário **Gustavo**. Obrigado por toda atenção e prontidão nas diversas vezes que necessitei de ajuda e conselhos. Muito obrigado pela amizade, carinho e apoio.

Muito obrigado ao meu orientador **Prof. Dr. Stephen Hyslop**. Obrigado pela oportunidade de ser seu aluno. Obrigado por todas as orientações para realização deste e de outros trabalhos. Obrigado por acreditar no meu potencial, investir tempo em mim e me abrir tantas portas. Obrigado pelo alto grau de exigência e ética na pesquisa. Obrigado por se preocupar com minha formação humana e não apenas acadêmica. Obrigado por ser tão presente, conselheiro e se mostrar de braços abertos para qualquer momento que fosse necessário. Serei eternamente grato por toda influência que você tem na minha formação. Fico feliz de dizer que evolui imensamente como pesquisador e humano neste tempo que fui seu aluno.

Muito obrigado ao meu co-orientador **Prof. Dr. Edward Gerard Rowan**. Obrigado por me receber em seu laboratório e em Glasgow. Obrigado por tudo que me ensinou, pela confiança e pelo carinho. Obrigado pela paciência em me ajudar a trilhar meus primeiros passos como eletrofisiologista.

Muito obrigado a todos os colaboradores deste trabalho, **Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli, MSc. Jhonathan Angel Araujo Fernández, Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior e Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano**. Obrigado por todo conhecimento transmitido, confiança e tempo dedicado.

Muito obrigado a todos os professores que encontrei em minha trajetória, em especial minhas ex-orientadoras **Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni e Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura**. Obrigado por terem sido essenciais na minha formação.

Muito obrigado a todas as agências financiadoras que possibilitaram a realização dessa pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Obrigado pelo suporte financeiro que possibilitou a minha dedicação exclusiva ao doutorado (processo nº. 88882.435308/2019-01), incluindo o período de estágio no exterior (processo nº. 88881.190184/2018-01).

Muito obrigado à **Universidade Estadual de Campinas** e a **University of Strathclyde**. Obrigado pelas portas abertas para estes ambientes incríveis de construção e transformação.

Muito obrigado aos animais que possibilitaram a realização dessa pesquisa.
Meus mais sinceros respeito e agradecimento.

*“Vita brevis,
ars longa,
occasio praeceps,
experimentum periculosum,
iudicium difficil”*

(Hipócrates)

RESUMO

A peçonha de *Micrurus surinamensis*, uma cobra coral semi-aquática que se alimenta exclusivamente de peixes, é constituída principalmente de toxinas *three-finger* (3FTx), incluindo α -neurotoxinas (antagonistas competitivos de receptores nicotínicos). O objetivo desse trabalho foi investigar a neurotoxicidade e miotoxicidade desta peçonha em preparações neuromusculares de camundongo (nervo frênico-diafragma, NFD) e pintainho (biventer cervicis, BC) e, também, avaliar seu efeito em coração semi-isolado de barata e sobre embriões e larvas de zebrafish. Nas preparações NFD e BC, a peçonha causou bloqueio neuromuscular que dependia da concentração e tempo de incubação, com maior sensibilidade na BC. A peçonha causou bloqueio neuromuscular mediado predominantemente por α -neurotoxinas, como mostrado pelos seguintes achados: **(a)** bloqueio das respostas tetânicas em NFD, sem causar desvanecimento tetânico (*fade* tetânico); **(b)** abolição das respostas contráteis à acetilcolina e carbacol; **(c)** reversão parcial do bloqueio neuromuscular nas duas preparações na presença de neostigmina (inibidor da acetilcolinesterase juncional) e 3,4-diaminopiridina (bloqueador de canais de K^+); **(d)** reversão completa do bloqueio em NFD após lavagem, mesmo depois de bloqueio prolongado, mas reversão apenas parcial em BC; **(e)** bloqueio da despolarização do diafragma causada por carbacol em NFD; **(f)** bloqueio progressivo dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) em NFD; e **(g)** ausência de efeito sobre o potencial de ação composta de nervo ciático de camundongo (não afetou os canais neuronais de Na^+ e K^+). A peçonha não mostrou atividade PLA_2 e não foi miotóxica, pelos seguintes critérios: **(a)** tensão da linha de base inalterada na presença de peçonha em NFD e BC, **(b)** respostas contráteis inalteradas em NFD e BC sob estimulação direta, **(c)** potencial de membrana do músculo do diafragma inalterado pela peçonha, **(d)** respostas ao K^+ exógeno inalteradas em BC, e **(e)** ausência de alterações histológicas no músculo das duas preparações. A peçonha não afetou o ritmo cardíaco em coração semi-isolado de barata, ao contrário da peçonha de *Micrurus frontalis* (controle positivo) que causou bradicardia persistente. A incubação de embriões de zebrafish com a peçonha resultou em mortalidade de 43-49% após 2 dias pós-fertilização (dpf) e mortalidade larval de 52-58% após 4 dpf ($\geq 300 \mu\text{g/ml}$); a lavagem das larvas não alterou a mortalidade. A maior concentração de peçonha testada ($1000 \mu\text{g/ml}$) reduziu a taxa de eclosão no 4 dpf. A peçonha também reduziu a atividade do nado no 4 dpf; esta inibição foi revertida lavando-se as larvas. Alterações relacionadas ao desenvolvimento, tais como curvatura da espinha dorsal, foram vistas no 7 dpf. Estes resultados sugerem que a peçonha de *M. surinamensis* inibe reversivelmente a neurotransmissão através do bloqueio dos receptores nicotínicos pós-sinápticos por α -neurotoxinas, sem o envolvimento de PLA_2 β -neurotóxicas ou miotoxicidade. A ausência de efeito sobre o coração semi-isolado de barata talvez esteja relacionada à falta de PLA_2 nesta peçonha.

Palavras-chave: neurotoxinas; bloqueadores neuromusculares; cobra coral; eletrofisiologia; peçonhas.

ABSTRACT

The venom of *Micrurus surinamensis*, a large semiaquatic coral snake that feeds exclusively on fish, is composed mainly of three-finger toxins (3FTx), including α -neurotoxins (competitive nicotinic receptor antagonists). The aim of this work was to investigate the neurotoxicity and myotoxicity of this venom in mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) and chick biventer cervicis (BC) isolated neuromuscular preparations, as well as its effect on cockroach semi-isolated heart and on zebrafish embryos and larvae. The venom caused concentration- and time-dependent blockade in PND and BC preparations, with the latter being more sensitive. The venom-induced neuromuscular blockade was caused mainly by α -neurotoxins, as indicated by the following results: **(a)** progressive blockade of tetanic responses in PND, but without tetanic fade; **(b)** abolition of the contractile responses to exogenous acetylcholine and carbachol; **(c)** partial reversal of the blockade in both preparations in the presence of neostigmine (an inhibitor of junctional acetylcholinesterase) or 3,4-diaminopyridine (a K^+ channel blocker); **(d)** complete reversal of the blockade in PND after washing, even after prolonged blockade, but only partial reversal in BC; **(e)** blockade of the depolarization caused by carbachol in PND; **(f)** progressive blockade of miniature endplate potentials (mepps) in PND; and **(g)** no effect on the compound action potential of mouse sciatic nerve (lack blockade of neuronal Na^+ and K^+ channels). The venom was devoid of phospholipase A_2 activity and was not myotoxic, as indicated by the **(a)** unaltered basal tension in the presence of venom in both preparations, **(b)** unaltered contractile responses in directly stimulated PND and CBC preparations, **(c)** unaltered resting membrane potential of mouse diaphragm muscle after incubation with venom, **(d)** lack of effect on the responses to exogenous K^+ in CBC preparations, and **(e)** lack of histological alterations in muscle of both preparations. The venom did not affect cardiac rhythm in cockroach semi-isolated heart, in contrast to the venom of *Micrurus frontalis* (positive control) that caused progressive, sustained bradycardia. Incubation of zebrafish embryos with venom caused mortality of 43-49% at 2 days post-fertilization (dpf) and larval mortality of 52-58% at 4 dpf ($\geq 300 \mu\text{g/ml}$); subsequent washing of the larvae did not change the mortality. The highest venom concentration ($1000 \mu\text{g/ml}$) reduced the hatching rate at 4 dpf. Venom also reduced the swimming activity at 4 dpf and this was reversed by washing the larvae. Developmental alterations, such as spinal curvature, were seen at 7 dpf. These results suggest that *M. surinamensis* venom reversibly blocks neuromuscular transmission through the blockade of post-synaptic nicotinic receptors by α -neurotoxins, with no involvement of PLA_2 β -neurotoxins or myotoxicity. The lack of effect on cockroach semi-isolated heart may reflect the absence of PLA_2 in the venom.

Keywords: neurotoxins; neuromuscular blocking agents; coral snakes; electrophysiology; venoms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Organização anatômica do aparato de veneno em cobras corais	21
Figura 2.	Distribuição dos gêneros de cobras corais nas Américas	22
Figura 3.	Distribuição das cobras corais (principalmente o gênero <i>Micrurus</i>) no Brasil	23
Figura 4.	Exemplos dos diferentes padrões de coloração encontradas em cobras corais (<i>Micrurus</i>).....	24
Figura 5.	Relação da distribuição geográfica de cobras corais e o conteúdo de PLA ₂ e 3FTx	28
Figura 6.	Estrutura espacial das diferentes classes de 3FTx	29
Figura 7.	Junção neuromuscular e os sítios de ação de neurotoxinas.....	33
Figura 8.	<i>Micrurus surinamensis</i>	38
Figura 9.	Desenvolvimento normal de embriões de zebrafish.....	52
Figura 10.	Atividade PLA ₂ das peçonhas de <i>M. brasiliensis</i> , <i>M. frontalis</i> , <i>M. spixii</i> e <i>M. surinamensis</i>	56
Figura 11.	Bloqueio neuromuscular causada pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo	57
Figura 12.	Registros miográficos representativos dos experimentos mostrados na Fig. 11	58
Figura 13.	Registro miográfico do bloqueio neuromuscular provocado em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> e subsequente reversão por lavagem	59

Figura 14.	Reversão do bloqueio neuromuscular após as lavagens mostradas nas Figs. 12 e 13.....	60
Figura 15.	Análise morfológica de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo incubadas com solução Tyrode sozinha ou a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	60
Figura 16.	Ausência de bloqueio pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo sob estimulação direta	61
Figura 17.	Reversão parcial e transitório por 3,4-diaminopiridina e neostigmina após bloqueio neuromuscular de 50% e total causado pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo.....	63
Figura 18.	Resposta à estimulação tetânica em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo incubadas com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	65
Figura 19.	A peçonha de <i>M. surinamensis</i> não altera o potencial de membrana em repouso do músculo de diafragma de camundongo	66
Figura 20.	A peçonha de <i>M. surinamensis</i> bloqueia reversivelmente a resposta ao carbacol.....	67
Figura 21.	Potenciais de placa terminal em miniatura de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo antes e após incubação com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	69
Figura 22.	Ausência de efeito da peçonha de <i>M. surinamensis</i> sobre o potencial de ação composto de nervo ciático isolado de camundongos.....	71
Figura 23.	Bloqueio neuromuscular causada pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> em preparações biventer cervicis de pintainho (estimulação indireta).....	72
Figura 24.	Registro miográfico das preparações biventer cervicis de pintainho (estimulação indireta) incubadas com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	74

Figura 25.	Contraturas das preparações biventer cervicis de pintainho incubadas com a peçonha de <i>M. surinamensis</i> em resposta à acetilcolina, carbacol e KCl	76
Figura 26.	Reversibilidade por lavagem do bloqueio neuromuscular causada pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> em preparações biventer cervicis de pintainho	77
Figura 27.	Análise morfológica de preparações biventer cervicis de pintainho incubadas com solução Krebs sozinha (controle) e com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	78
Figura 28.	Ausência de efeito da peçonha de <i>M. surinamensis</i> sobre a atividade contrátil de preparações biventer cervicis de pintainho durante estimulação direta	79
Figura 29.	Registros miográficos de preparações biventer cervicis de pintainho incubadas com peçonha até bloqueio neuromuscular total, seguido de reversão parcial e transitória por neostigmina ou 3,4-diaminopiridina	79
Figura 30.	Efeito da peçonha de <i>M. surinamensis</i> sobre a mortalidade de embriões e larvas de zebrafish em relação aos dias pós-fertilização	82
Figura 31.	Curvas da mortalidade de embriões e larvas de zebrafish incubados com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	83
Figura 32.	Taxa de eclosão dos ovos de zebrafish em 4 e 7 dias pós fertilização durante incubação com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	84
Figura 33.	Atividade locomotora (mm de nado) de larvas de zebrafish incubadas com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	85
Figura 34.	Imagens representativas dos embriões e larvas de zebrafish incubadas com a peçonha de <i>M. surinamensis</i> , 3,4-dicloroanilina ou apenas com água de aquário	88
Figura 35.	Frequência cardíaca (batimentos por minuto, bpm) de coração semi-isolado de barata na presença de salina (controle negativo) e peçonha de <i>M. surinamensis</i> ou <i>M. frontalis</i> (controle positivo)	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tempos de 50%, 90% e 100% (total) de bloqueio neuromuscular em preparações biventer cervicis de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo incubadas com a peçonha de <i>M. surinamensis</i>	80
Tabela 2.	Reversão do bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> em preparações biventer cervicis de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo	81
Tabela 3.	Atividade locomotora de larvas de zebrafish após incubação com peçonha de <i>M. surinamensis</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3,4-DAP	3,4-Diaminopiridina
3,4-DCA	3,4-Dicloroanilina
5-HT	5-Hidroxitriptamina
3FTx	Toxinas de três dígitos (<i>three-finger toxins</i>)
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ACh	Acetilcolina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
ANOVA	Análise de variância (<i>analysis of variance</i>)
BC	Biventer cervicis
CAT	Colina acetiltransferase
CCh	Carbacol
CK	Creatinoquinase (<i>creatine kinase</i>)
DP	Desvio padrão
Dpf	Dias pós-fertilização
DHP	Diidropiridina
ELISA	Ensaio imunosorbente ligado a enzima (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
GABA	Ácido gama-aminobutírico (<i>gamma aminobutyric acid</i>)

HE	Hematoxilina-eosina
Hpf	Horas pós-fertilização
Neo	Neostigmina
NFD	Nervo frênico-diafragma
NGF	Fator de crescimento neuronal (<i>nerve growth factor</i>)
NMDA	N-metil D-aspartato
PAC	Potencial de ação composto
PLA₂	Fosfolipase A ₂ (<i>phospholipase A₂</i>)
PMR	Potencial de membrana em repouso
PND	Nervo frênico-diafragma (<i>phrenic nerve-diaphragm</i>)
PPTM	Potencial de placa terminal em miniatura
RNAse	Ribonuclease
SNAP-25	Proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma (<i>synaptosomal associated protein, 25 kDa</i>)
SNARE	Proteína de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida (<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
1.1.	As cobras corais.....	22
1.2.	Epidemiologia dos acidentes com cobras corais.....	24
1.3.	Aspectos clínicos do envenenamento por <i>Micrurus</i> spp.	26
1.4.	As peçonhas de cobras corais	27
1.4.1.	Composição geral.....	27
1.4.2.	As toxinas <i>three-finger</i> (3FTx)	28
1.4.3.	As fosfolipases A ₂ (PLA ₂)	30
1.5.	Neurotoxicidade das peçonhas de cobras corais.....	31
1.5.1.	Fisiologia da junção neuromuscular	31
1.5.2.	Neurotoxicidade.....	34
1.5.2.1.	As α -neurotoxinas.....	34
1.5.2.2.	As β -neurotoxinas.....	35
1.6.	<i>Micrurus surinamensis</i>	38
2.	OBJETIVOS.....	42
3.	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1.	Reagentes.....	43
3.2.	Peçonhas	43

3.3. Animais.....	43
3.4. Determinação da atividade fosfolipásica	45
3.5. Ensaio farmacológicos e biológicos.....	45
3.5.1. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo	45
3.5.1.1. Ensaio miográficos.....	46
3.5.1.2. Ensaio eletrofisiológicos.....	47
3.5.2. Registro extracelular do potencial de ação composto (PAC) em nervo ciático de camundongo	48
3.5.3. Preparação biventer cervicis (BC) de pintainho.....	50
3.5.4. Análise histológica	51
3.5.5. Embriotoxicidade em zebrafish.....	52
3.5.6. Coração semi-isolado de barata	54
3.6. Análise estatística	54
4. RESULTADOS	56
4.1. Atividade fosfolipásica (PLA ₂)	56
4.2. Ensaio miográficos em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo.....	56
4.3. Ensaio eletrofisiológicos em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.....	66
4.4. Potencial de ação composto em nervo ciático isolado de camundongo.....	70

4.5. Ensaio miográfico em preparação biventer cervicis de pintainho.....	72
4.6. Embriotoxicidade em zebrafish	81
4.7. Cardiotoxicidade em coração semi-isolado de barata.....	89
5. DISCUSSÃO.....	91
5.1. Efeitos sobre preparações de camundongo <i>in vitro</i>	91
5.1.1. A relevância da miotoxicidade	92
5.1.2. Ausência de ação pré-sináptica mediada por α -neurotoxinas	93
5.1.3. A ação pós-sináptica mediada por α -neurotoxinas	95
5.2. Efeitos sobre preparações de pintainho <i>in vitro</i>	97
5.3. Efeitos sobre embriões e larvas de zebrafish <i>in vivo</i>	100
5.4. Efeitos sobre coração semi-isolado de barata.....	103
5.5. Considerações gerais.....	105
6. CONCLUSÃO	108
7. REFERÊNCIAS	109
ANEXOS	128

1. INTRODUÇÃO

A família Elapidae apresenta serpentes distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo e inclui grupos tais como as najas (*Naja* spp.), as mambas (*Dendroaspis* spp.), as cobras-tigres (*Notechis* spp.) e as cobras corais (*Micrurus*, *Micruroides* e *Leptomicrurus* das Américas e *Maticora* e outros gêneros da Ásia). A família pode ainda ser dividida em duas subfamílias: Elapinae, contemplando as espécies terrestres da África, Américas e Ásia; e Hydrophiinae, espécies marinhas da Ásia e Oceania [1]. As peçonhas destas serpentes são conhecidas pela sua alta neurotoxicidade e elevada letalidade dos acidentes não tratados; nestes casos, a morte resulta da paralisia respiratória causada pelo bloqueio neuromuscular periférico [2-6].

As serpentes elapídicas apresentam aparato de veneno constituído por dentição especializada para a inoculação de veneno, glândula de veneno e músculo compressor glandular (Fig. 1). Possuem dentição proteróglifa (*protero* = dianteiro, *glyphé* = sulco), isto é, duas presas para inoculação de peçonha fixas na parte anterior do maxilar. Com a contração do músculo *adductor mandibulae externus superficialis*, a pressão interior da glândula de veneno aumenta, provocando a expulsão da peçonha através do ducto de veneno. Após passar pelo interior da glândula acessória, a peçonha desemboca em um sulco com sutura anterior da presa de veneno, que possibilita a sua inoculação [7].

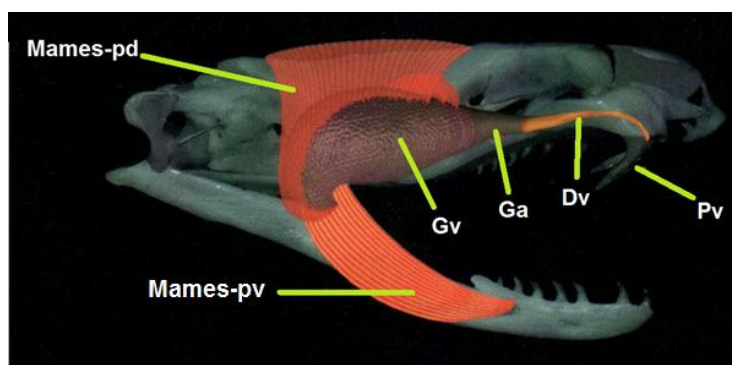


Figura 1. Organização anatômica do aparato de veneno em cobras corais. Esta organização é típica da maioria das serpentes elapídicas. Legenda: Dv – ducto de veneno; Ga – glândula acessória; Gv – glândula de veneno; Mames-pd – músculo *adductor mandibulae externus superficialis-pars dorsalis*; Mames-pv – músculo *adductor mandibulae externus superficialis-pars ventralis*; Pv – presa de veneno proteróglifa. Fonte: adaptado de Oliveira et al. [7].

1.1. As cobras corais

Nas Américas, as serpentes elapídicas são representadas pelas cobras-corais, nome popular que faz menção às bandas coloridas (principalmente amarelo, vermelho e preto, que lembram as cores de corais marinhas) que a maioria das espécies apresenta em seu corpo. As serpentes corais das Américas abrangem os gêneros *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides*, formando um grupo taxonômico com 82 espécies e subespécies. Destes, o gênero *Micrurus* (*mikrós* = pequena; *oura* = cauda) é o de maior importância epidemiológica, contando com aproximadamente 70 espécies, distribuídas da Patagônia até o Sul dos Estados Unidos (Fig. 2) [4, 8-11]. No Brasil são encontrados os gêneros *Leptomicrurus* e *Micrurus*, compreendendo 33 espécies de cobras corais, além de suas subespécies, sendo a Bacia Amazônica o habitat da maior diversidade (Fig. 3) [4, 12, 13].

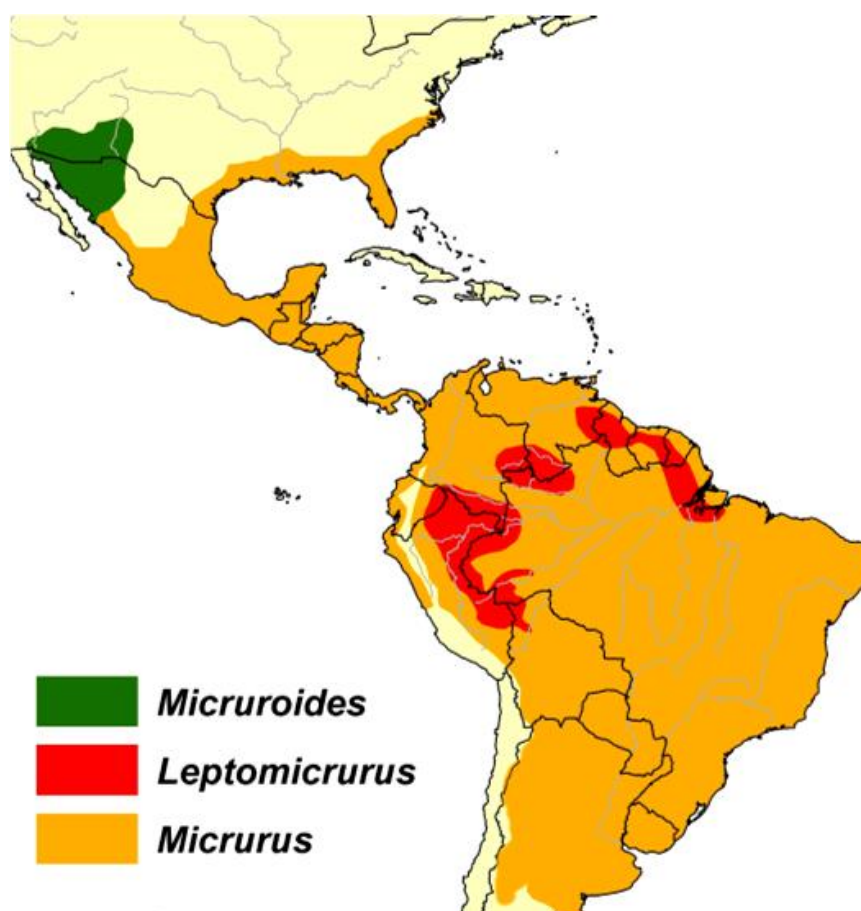


Figura 2. Distribuição dos gêneros de cobras corais nas Américas. Fonte: Lomonte *et al.* [9].

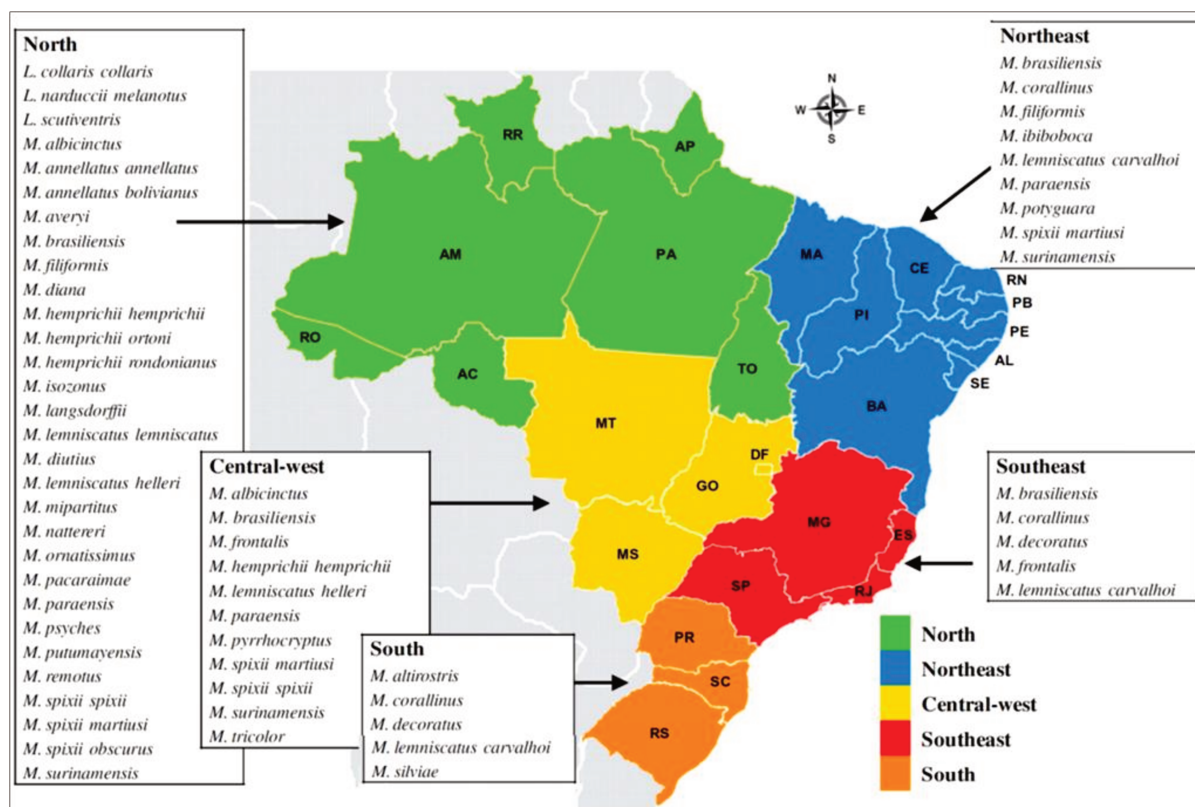


Figura 3. Distribuição das cobrais corais (principalmente o gênero *Micrurus*) no Brasil. Fonte: adaptado de Bucarety et al. [4].

As cobrais corais exibem considerável variação de coloração, com escamas organizadas em diferentes padrões: **1)** monoadal, com anéis pretos ou amarelos bordados por estreito anel branco ou amarelo, separados por anéis vermelhos; **2)** triadal, com triadas de três anéis pretos separados por dois anéis brancos, amarelos ou laranjas, sendo a triada separada por anéis vermelhos; ou **3)** bicolor, com dois anéis alternados nas cores preto, amarelo e vermelho (Fig. 4). Podem ainda apresentar melanismo (escamas mais escuras) na região dorsal e ventral [10]. São serpentes de hábitos semifossoriais (subterrâneos), noturnos e crepusculares, tornando difícil sua observação em seu habitat. Apresentam dieta variada entre espécies, mas que costuma ser de animais vermiformes: lagartos ápodos, serpentes não peçonhentas, anfisbenas, onicóforos, lacraias, cecílias e peixes filiformes; de modo geral, aves e mamíferos não fazem parte da dieta destas serpentes [8, 10, 14].



Figura 4. Exemplos dos diferentes padrões de coloração encontradas em cobras corais (*Micrurus*). Padrão (A) monoadal (*M. corallinus*), (B) triadal (*M. frontalis*) e (C) bicolor (*M. mipartitus*). Fonte: adaptado de Silva Jr et al. [10].

1.2. Epidemiologia dos acidentes com cobras corais

Nas Américas, os acidentes por cobras corais são os menos prevalentes entre todos os acidentes ofídicos, raramente levando ao óbito. Dados divulgados pelo Ministério da Saúde mostram que, de 23.331 acidentes ocorridos em 2017 nos quais o gênero da serpente foi identificado, 280 (1,2%) envolveram cobras corais [15]. Arquivos do Instituto Butantan, alimentados através de dados obtidos no Hospital Vital Brazil (São Paulo - SP, Brasil) corroboram com essas informações. Nas faixas de tempo entre os anos 1902 a 1945, 1954 a 1977 e 2002 a 2013, ocorreram 11.921 acidentes ofídicos, entre os quais: 10.718 (89,9%) foram relacionados ao gênero *Bothrops*, 1.128 (9,5%) ao gênero *Crotalus*, 57 (0,5%) ao gênero *Micrurus*, e 18 (0,1%) ao gênero *Lachesis* [16-20]. Já na Argentina, no período de 1979 e 2003, as cobras corais foram responsáveis por 0,2% dos acidentes ofídicos (46 casos reportados) [21]. Ainda que também raros, os acidentes por cobras corais são mais frequentes na América Central e na Colômbia, correspondendo a aproximadamente 2% dos casos de ofidismo [22]. Dados sugerem frequência maior nos Estados Unidos da América, onde foram registrados 1254 casos envolvendo cobras corais entre os anos de 1983 e 2007, correspondendo a 3,6% de todos os acidentes ofídicos no país [23].

Diversos fatores contribuem para a raridade dos acidentes envolvendo cobras corais. A boca pequena (e consequente reduzido ângulo de abertura bucal) e o fato de possuírem presas inoculadoras pequenas limitam a capacidade de mordedura, o que explica a maior ocorrência das picadas em regiões do corpo humano como mãos (ao tentar manusear incorretamente as serpentes) e pés (após a serpente ser pisada acidentalmente). Isso, aliado aos hábitos semifossoriais e sua pouca agressividade comparada às cascavéis (*Crotalus* spp.) e jararacas (*Bothrops* spp.), dificulta acidentes em humanos [4, 24]. Além da raridade dos acidentes, muitos deles são assintomáticos ou produzem apenas um quadro clínico leve [7, 13]. É provável que a incidência de acidentes causados por cobras corais seja menor do que a relatada devido à identificação inadequada das serpentes pelos profissionais de saúde, especialmente quando se trata de acidentes envolvendo cobras corais falsas. O mimetismo entre estes dois grupos de serpentes é refletido em padrões de coloração e comportamentos defensivos semelhantes. Dentre as cobras corais falsas, os gêneros mais conhecidos no Brasil são *Atractus*, *Erythrolamprus*, *Oxyrhopus* e *Simophis* [4, 8, 13, 24].

Bucaretychi *et al.* [4] mostraram que de 150 casos de envenenamento envolvendo cobras corais no Brasil entre os anos de 1867 a 2014, 61,3% ocorreram na região Sul e 20% no Sudeste, sendo que as principais espécies envolvidas em acidentes ocorrem nessas regiões: *M. corallinus* (24,0%) e *M. frontalis* (8,0%). As outras espécies que também tiveram casos relatados são: *M. lemniscatus* (3,3%), *M. hemprichii* (1,3%), *M. filiformis* (0,7%), *M. ibiboboca* (0,7%), *M. spixii* (0,7%) e *M. surinamensis* (0,7%), além de 22 casos (14,7%) nos quais a espécie não foi identificada. Os acidentes ocorrem principalmente em regiões periurbanas próximas a áreas de preservação e em áreas de avanço agropastoril, em decorrência da invasão do habitat desses animais. A expectativa é que, com a expansão dessas áreas nas regiões Norte e Nordeste do país, ocorrerão mais acidentes envolvendo espécies dessas regiões [4, 24]. Enquanto que no Brasil as principais espécies causadoras de acidentes são *M. corallinus* e *M. frontalis*, em outras localidades a maior prevalência é relacionada a cobras corais diferentes, tais como: *M. pyrrhocryptus* na Argentina [21], *M. mipartitus* na Colômbia [22], *M. nigrocinctus* e *M. alleni* na América Central [25], *M. diastema*, *M. distans* e *M. laticollaris* no México e na Guatemala [25], e *M. fulvius* e *M. tener* nos Estados Unidos da América [26].

1.3. Aspectos clínicos do envenenamento por *Micrurus* spp.

As manifestações locais do envenenamento por *Micrurus* spp. são caracterizadas principalmente por efeitos neurológicos e incluem dor de intensidade variada e parestesia. Outras manifestações locais, como edema, são menos comuns e de pouca relevância clínica. A mionecrose (avaliada pelo aumento na creatinoquinase, CK, na circulação) é rara e não há hemorragia [4, 13, 27, 28].

Quanto às manifestações sistêmicas, o quadro clínico clássico de envenenamento por cobras corais é caracterizado pela neurotoxicidade periférica expressa através da paralisia neuromuscular, assemelhando-se ao envenenamento por curare. Entre 1 e 3 horas após a picada, o paciente já apresenta sinais da síndrome miastênica aguda. Casos isolados apresentam sintomatologia mais tardia, evidente apenas 7 a 18 horas após o acidente. A evolução dos sintomas ocorre de forma gradual, inicialmente afetando grupos musculares de menor importância para a manutenção da vida, até evoluir para a paralisia diafragmática e, conseqüentemente, parada respiratória. Desta forma, os sintomas frequentemente mostram a seguinte sequência de evolução: ptose palpebral, visão turva ou de difícil acomodação, oftalmoplegia, midriase, miose, anisocoria ou nistagmo, dificuldade na deglutição e mastigação, ptose mandibular e diminuição no reflexo de vômito, dificuldade em andar ou permanecer na posição ereta, paralisia total dos membros; dispneia pela paralisia da musculatura torácica intercostal, e finalmente asfixia pela paralisia diafragmática. Casos graves de paralisia podem causar falência respiratória, levando à necessidade de intubação traqueal e ventilação mecânica [4, 13, 28-30].

No Brasil, o principal tratamento utilizado em casos de acidentes com cobras corais é a administração intravenosa de soro heterólogo antielapídico. Este é produzido a partir dos anticorpos específicos, obtidos pela imunização de equinos com as peçonhas de *M. frontalis* e *M. corallinus* (as duas espécies responsáveis pela maioria dos acidentes com cobras corais no país) [31]. O tratamento é definido de acordo com a gravidade do caso: em acidentes leves (apenas com manifestações locais), é feita a observação clínica por ao menos 24 h, sem administração de soro antielapídico; em acidentes moderados (com sinais de miastenia aguda, porém sem paralisia), é recomendada a administração de 5

ampolas do soro antielapídico; por fim, em acidentes graves (com miastenia aguda e paralisia) recomenda-se o uso de 10 ampolas de soro antielapídico, assistência respiratória (quando necessária) e considerar o teste terapêutico com administração de neostigmina por via intravenosa, precedida de atropina intravenosa [4, 13, 32].

1.4. As peçonhas de cobras corais

1.4.1. Composição geral

As peçonhas das cobras corais são predominantemente constituídas por fosfolipases A₂ (PLA₂), algumas das quais atuam como β -neurotoxinas causando bloqueio neuromuscular pré-sináptico, e toxinas de três dígitos (*three-finger toxins*, 3FTx), que incluem as α -neurotoxinas que produzem bloqueio neuromuscular pós-sináptico, mas há também outros componentes com abundância bem menor, tais como fosfolipases B, metaloproteinases, 5'-nucleotidases, L-aminoácido oxidases, fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF – *vascular endothelial growth factor*), lectinas, toxinas nociceptivas, peptídeo natriurético tipo C, e purinas [9, 14, 33-37]. A proporção destas toxinas varia entre as espécies de *Micrurus* e, no caso das PLA₂ e 3FTx, mostra alguma relação com a distribuição geográfica das serpentes, sendo que as PLA₂ predominam em espécies da América do Norte e América Central, enquanto as 3FTx predominam em espécies da América do Sul (Fig. 5). Assim, em duas espécies da América do Norte as proporções destas toxinas são: *M. fulvius* – 58,3% de PLA₂ e 24,9% de 3FTx, e *M. tener* – 45,6% de PLA₂ e 24,9% de 3FTx, enquanto que em duas espécies da América do Sul, são: *M. corallinus* – 81,7% de 3FTx e 11,9% de PLA₂ e *M. altirostris* – 79,5% de 3FTx e 13,7% de PLA₂. Entretanto, há exceções a esta generalização, como é o caso de *M. frontalis*, encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, que apresenta um pouco mais PLA₂ (49,2%) que 3FTx (42,4%) [9, 35, 36, 38].



Figura 5. Relação da distribuição geográfica de cobras corais e o conteúdo de PLA₂ e 3FTx. Note que quanto mais ao norte, mais se encontram espécies com predominância de PLA₂ em suas peçonhas (rosa), e quanto mais ao sul, mais predominam as 3FTx (laranja). Fonte: Lomonte *et al.* [9].

1.4.2. As toxinas *three-finger* (3FTx)

As 3FTx recebem seu nome devido ao arranjo de sua molécula, com núcleo hidrofóbico formado por pontes dissulfeto de onde saem três “dedos” (alças) com β -estrutura de cadeia tripla (Fig. 6). Já foram descritas as sequências completas de mais de 90 3FTx das peçonhas de *M. altirostris*, *M. clarki*, *M. corallinus*, *M. diastema*, *M. dumerillii*, *M. fulvius*, *M. frontalis*, *M. laticollaris*, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus*, *M. pyrrhocryptus*, *M. surinamensis* e *M. t. tschudii* [35, 36, 39-43].

São toxinas que predominam em peçonhas elapídicas (dos gêneros *Bungarus*, *Dendroaspis*, *Micrurus*, *Naja* e outros) e podem ser divididas em três grupos: 3FTx de cadeia curta, com oito resíduos de cisteína que interagem formando quatro pontes dissulfeto; as de cadeia longa, com 10 resíduos de cisteína

que interagem formando cinco pontes dissulfeto; e as não convencionais, com nove resíduos de cisteína, sendo que oito deles interagem formando quatro pontes dissulfeto, restando um resíduo que pode interagir com outras toxinas, formando homodímeros ou heterodímeros (Fig. 6). As 3FTx de cadeia curta ocorrem na peçonha de todas as espécies de cobras corais estudadas até o momento, enquanto que as de cadeia longa foram encontradas nas peçonhas de *M. altirostris*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. fulvius* e *M. surinamensis*. Já as 3FTx não convencionais foram encontradas apenas na peçonha de *M. altirostris* [35, 36].

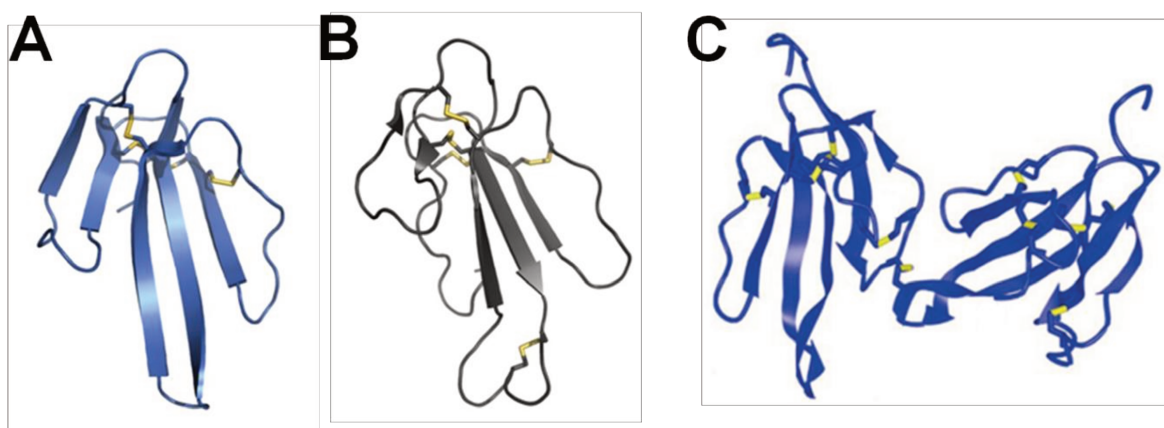


Figura 6. Estrutura espacial das diferentes classes de 3FTx. Note o núcleo hidrofóbico formado por pontes dissulfeto (indicadas em amarelo) de onde saem os três “dedos”. **(A)** 3FTx de cadeia curta (toxina muscarínica 7, ou MT7, da peçonha de *Dendroaspis augusticeps*). **(B)** 3FTx de cadeia longa (α -cobratoxina, de *Naja kaouthia*). **(C)** homodímero formado por 3FTx não convencionais (irditoxina de *Boiga irregularis*, uma espécie não elapídica). Fonte: Adaptado de Kessler *et al.* [44] e Utkin [45].

Além da variação estrutural, as 3FTx possuem ampla diversidade farmacológica. A maioria das 3FTx caracterizadas de peçonhas de cobras corais consiste de α -neurotoxinas, causando bloqueio dos receptores nicotínicos pós-sinápticos da junção neuromuscular. Algumas 3FTx de cadeia curta possuem estrutura semelhante à κ -bungarotoxina (de *Bungarus multicinctus*, da Ásia), indicando que talvez tenham maior afinidade por receptores nicotínicos neuronais que musculares. Além de α -neurotoxinas, a família das 3FTx contém toxinas que: **(1)** interagem com o sítio alostérico de receptores GABA_A, aumentando a capacidade destes de interagir com agonistas, **(2)** atuam como agonistas e

antagonistas em receptores colinérgicos muscarínicos, **(3)** aumentam a liberação de glutamato, **(4)** bloqueiam canais de cálcio do tipo L, **(5)** inibem a acetilcolinesterase juncional, como no caso da fasciculinas, e **(6)** exercem ação semelhante a cardiotoxinas. Para mais informações, ver as revisões em em Kini e Doley [46], Aird e Silva Jr [35], Aird *et al.* [36]; Kessler *et al.* [44], Utkin [45], Kini e Koh [47] e Tsetlin *et al.* [48].

1.4.3. As fosfolipases A₂ (PLA₂)

Conforme indicado acima, as PLA₂ representam o primeiro ou segundo grupo mais abundante de toxinas em peçonhas de cobras corais, e já foram sequenciadas mais de 120 destas proteínas. As PLA₂ de cobras corais estão classificadas no grupo IA destas enzimas, e consistem de formas cataliticamente ativas e não catalíticas [9, 35-37]: as cataliticamente ativas possuem em seu sítio ativo os aminoácidos H48, D49, Y52 e D101 necessários para atividade enzimática, enquanto nas não catalíticas estes são substituídos por outros aminoácidos. Apesar do grande número destas enzimas já sequenciadas, poucas delas foram caracterizadas quanto à sua atividade biológica – as mais bem caracterizadas provêm das peçonhas de *M. corallinus*, *M. dumerilii carinicauda*, *M. fulvius*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus*, *M. spixii*, e *M. tener* [6]. As atividades biológicas associadas a estas enzimas até o momento incluem ação anticoagulante, pró-inflamatória, hemólise, mionecrose, hemorragia e neurotoxicidade [6, 9, 36, 37, 49]. Apesar da diversidade de PLA₂ em peçonhas de cobras corais, ainda não está clara a proporção delas que é representada por β -neurotoxinas de ação pré-sináptica e pouco se sabe da contribuição destas toxinas para a neurotoxicidade observada *in vitro* e *in vivo*. De fato, até o momento, só foram caracterizadas farmacologicamente três PLA₂ β -neurotoxinas destas peçonhas: a MiDCA1 de *M. d. carinicauda* [50, 51] e duas isoformas da peçonha de *M. lemniscatus* (Floriano RS e Hyslop S, dados não publicados).

1.5. Neurotoxicidade das peçonhas de cobras corais

Uma vez que a grande maioria das toxinas presentes em peçonhas de elapídicos não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, as ações neurotóxicas observadas são predominantemente periféricas, atingindo a junção neuromuscular [3]. De acordo com o sítio onde agem na junção neuromuscular, são divididas em pré-sinápticas (atuando no nervo motor) e pós-sinápticas (atuando no músculo esquelético) [6, 49, 52-55]. Os mecanismos fisiológicos envolvidos na função da junção neuromuscular e as ações de α - e β -neurotoxinas são apresentados na Fig. 7.

1.5.1. Fisiologia da junção neuromuscular

A junção neuromuscular é uma região altamente especializada constituída por terminal nervoso motor, fenda sináptica e placa motora do músculo esquelético. Na região terminal do nervo motor há captação e acúmulo de colina, a qual provém da hidrólise de componentes da membrana celular (esfingomielina e fosfatidilcolina) ou da degradação de moléculas de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. A colina é então conjugada com acetil-CoA (proveniente da glicólise produzida pelas mitocôndrias) pela enzima colina acetiltransferase (CAT), levando à síntese do neurotransmissor ACh, que então é armazenado em vesículas sinápticas no terminal nervoso [56].

Com o auxílio de proteínas de ancoragem e ativação, as vesículas se acoplam em uma região do axolema chamada zona sináptica ativa, onde ocorre a liberação de neurotransmissores para a fenda sináptica. A exocitose ocorre pela interação de proteínas chamadas de sinaptotagmina e complexo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). O complexo SNARE pode ser dividido em proteínas associadas à membrana da vesícula sináptica (v-SNARE, compreendendo a sinaptobrevina) e à membrana pré-sináptica (t-SNARE, incluindo a syntaxina e a SNAP-25). Quando um potencial de ação do axônio atingir o terminal nervoso, ocorre abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, levando ao influxo de Ca^{2+} . A sinaptotagmina, uma proteína inserida na membrana vesicular, responde ao aumento na concentração de Ca^{2+} mudando sua

conformação. Este mecanismo possibilita o rearranjo do complexo SNARE em α -hélices entre as suas proteínas presentes na vesícula e na membrana pré-sináptica (mudança de conformação de *cis*-SNARE para *trans*-SNARE), o que então leva à fusão da vesícula com a membrana do terminal nervoso e liberação da ACh [56-60].

Uma vez liberada, a ACh é rapidamente degradada pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, sendo hidrolisada em acetil-CoA e colina (etapa 5 da Fig. 7). A colina poderá ser reabsorvida pelo terminal nervoso e participar na síntese de novas moléculas de ACh. Enquanto não é hidrolisada, duas moléculas de ACh podem interagir com receptores nicotínicos pré-sinápticos (no terminal nervoso; etapa 1 da Fig. 7) e pós-juncionais (abundantes na placa motora; etapa 2 da Fig. 7), promovendo abertura do canal destes receptores, levando ao influxo de Na^+ (e de Ca^{2+} na região pré-sináptica) e efluxo de K^+ . A ligação da ACh aos receptores pré-sinápticos leva à modulação positiva (*positive feedback*) sobre a liberação de ACh. Já a ligação da ACh aos receptores pós-sinápticos causa a despolarização da placa motora [61-63].

Próximo à placa motora está localizada a zona perijuncional, região com grande densidade de canais de Na^+ dependentes de voltagem e que participa da propagação do potencial de ação após despolarização da placa motora (etapa 3 da Fig. 7). O potencial de ação é propagado até os túbulos T, que penetram o interior da fibra muscular até próximo ao retículo sarcoplasmático. Na membrana dos túbulos T ocorrem os receptores de dihidropiridina (DHP), os quais mudam sua conformação em resposta à despolarização, causando a ativação de receptores rianodínicos do retículo sarcoplasmático. Os receptores rianodínicos são canais de Ca^{2+} e sua ativação promove abertura do poro destes canais, levando à liberação de Ca^{2+} intracelular, o que, por sua vez, inicia os mecanismos envolvidos na contração muscular (etapa 4 da Fig. 7) [64].

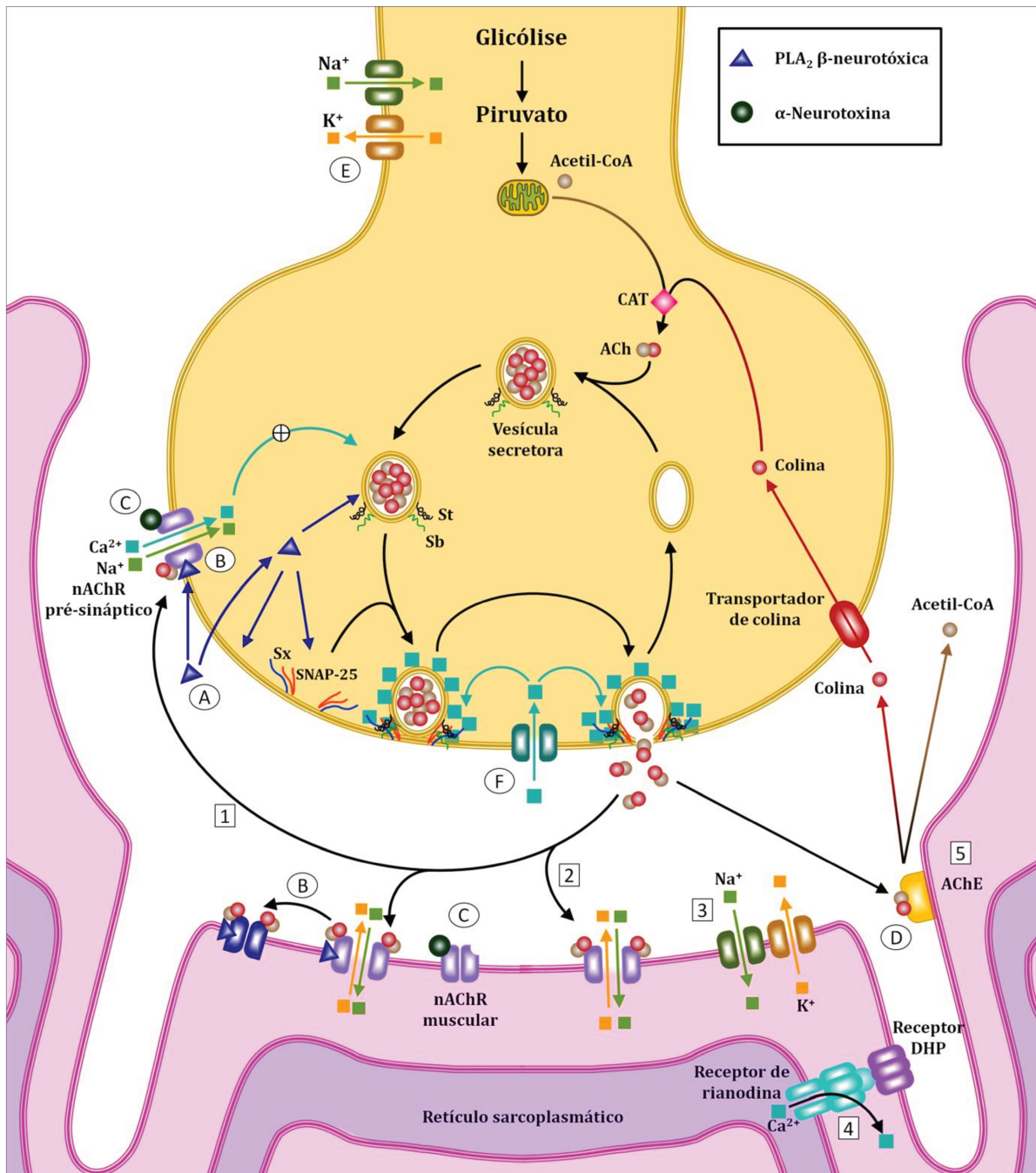


Figura 7. Junção neuromuscular e os sítios de ação de neurotoxinas. A fisiologia da junção neuromuscular é discutida na seção 1.51., referenciando as diferentes etapas (1, 2, 3, 4 e 5) apresentadas na figura. As neurotoxinas podem agir por diferentes caminhos: (A) internalização pelo terminal nervoso seguido por degradação da membrana celular ou proteínas nela aderida, interferindo na exocitose de ACh (β -neurotoxinas); (B) modulação alostérica de nAChR pré- e pós-sinápticos ou alteração das propriedades da membrana próxima a eles; (C) bloqueio competitivo de nAChR pré- e pós-sinápticos (α -neurotoxinas); (D) inibição da AChE (fasciculinas); (E) bloqueio dos canais de K⁺ dependentes de voltagem do terminal nervoso, prolongando o potencial de ação (dendrotoxinas); (F) bloqueio dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem pré-sinápticos (calciceptinas). Legenda: acetilcolina (ACh); acetilcolinesterase (AChE); colina acetiltransferase (CAT); receptor colinérgico nicotínico (nAChR); receptor de dihidropiridina (receptor DHP); sinaptobrevina (Sb); proteína de 25 kDa associada à sinaptossoma (SNAP-25); sinaptotagmina (St); e syntaxina (Sx). Fonte: Ilustração R. Schezaro-Ramos.

1.5.2. Neurotoxicidade

Conforme indicado anteriormente, a principal manifestação clínica do envenenamento sistêmico em acidente por cobra coral é a neurotoxicidade periférica [4, 13, 20]. A primeira descrição detalhada da neurotoxicidade de peçonhas de cobras corais brasileiras foi apresentada pelo Dr. Vital Brazil Mineiro da Campanha, fundador do Instituto Butantan (São Paulo) e do Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro), que resumiu os casos clínicos descritos na literatura brasileira até então, além de compilar relatos fornecidos por colegas médicos que haviam tratado casos de envenenamento em diferentes locais do Brasil; também foram realizadas investigações preliminares sobre a neurotoxicidade de algumas peçonhas (principalmente *M. lemniscatus* e *M. frontalis*) em animais experimentais [65]. Posteriormente, Dr. Oswaldo Vital Brazil (filho do Dr. Vital Brazil) realizou investigações farmacológicas detalhadas com várias peçonhas de *Micrurus* nas quais estabeleceu o principal mecanismo de ação delas, mostrando que se tratava de bloqueio neuromuscular periférico envolvendo ações pré- e pós-sinápticas [66-76].

1.5.2.1. As α -neurotoxinas

Conforme já indicado, as 3FTx representam uma das duas classes mais abundantes de toxinas em peçonhas de *Micrurus* (sendo as PLA₂ o outro grupo) [9, 36, 37], porém nem todas as 3FTx são letais ou produzem bloqueio neuromuscular [39, 42, 77]. As α -neurotoxinas (6-8 kDa) representam uma subfamília das 3FTx e são responsáveis pelo potente bloqueio neuromuscular pós-sináptico através do antagonismo competitivo nos receptores nicotínicos pós-sinápticos [54]. Várias α -neurotoxinas de *Micrurus* spp. já foram isoladas e parcialmente caracterizadas quanto à sua ação farmacológica (mas não necessariamente em relação à capacidade de causar bloqueio em preparações neuromusculares *in vitro*). Entre estas toxinas estão as frontoxinas de *M. frontalis* [78], mipartoxina 1 de *M. mipartitus* [79], MlatA1 de *M. laticollaris* [80], toxina NHX8 de *M. corallinus* [81], tschuditoxina-I de *M. tschudii tschudii* [43], e várias α -neurotoxinas de *M. browni browni* [77], *M. nigrocinctus* [82-84] e *M. pyrrhocryptus* [85]. Além disso, estudos recentes mostram algumas combinações interessantes de atividade neurotóxica, como: **(1)** a

fulditoxina de *M. fulvius*, um complexo dimérico de duas α -neurotoxinas que é capaz de se organizar em um complexo tetramérico e produz potente bloqueio neuromuscular reversível que aparentemente envolve interação com um sítio diferente do sítio clássico para α -neurotoxinas no receptor nicotínico, além de interagir com receptores nicotínicos musculares ($\alpha 2\beta\gamma\epsilon$), ela também se liga a receptores neuronais ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$) [41]; e **(2)** brownitoxina-1 de *M. browni browni*, um complexo multimérico que consiste de pelo menos uma 3FTx e uma PLA₂, onde os componentes individuais não são letais, mas quando presentes em forma de um complexo ocorre a letalidade [77].

Uma vez que produzem bloqueio competitivo, a ação bloqueadora de muitas α -neurotoxinas pode ser revertida aumentando-se a concentração de ACh na fenda sináptica através do uso de drogas anticolinesterásicas como a neostigmina. Esta abordagem é usada clinicamente para reverter o bloqueio causado por peçonhas de *Micrurus* com ação predominantemente pós-sináptica [4, 13, 76]. A classificação das 3FTx em cadeia curta, cadeia longa e não convencionais revela importante relação com a reversibilidade do bloqueio uma vez que as 3FTx de cadeia longa costumam apresentar maior afinidade pelo receptor, tornando a reversão do bloqueio mais difícil. Por outro lado, as 3FTx de cadeia curta geralmente têm seu bloqueio rapidamente revertido por lavagem [36, 49, 54, 86]. O bloqueio produzido pela fulditoxina (vide supra) também é facilmente revertido, supostamente pelo fato da toxina se ligar a um sítio não convencional no receptor nicotínico [41].

1.5.2.2. As β -neurotoxinas

As PLA₂ são encontradas em quantidades variadas nas peçonhas de *Micrurus* [9, 36, 37]. Em algumas peçonhas, tais como as de *M. browni browni* [77], *M. clarki* [39] e *M. fulvius* [87-89], as PLA₂ parecem ser os principais componentes responsáveis pela neurotoxicidade da peçonha. As atividades biológicas atribuídas às PLA₂ nestas peçonhas incluem letalidade [39, 77, 87-89], citotoxicidade [90], ação inflamatória e edematogênica [90, 91], hemólise [92, 93], ação anticoagulante [90, 91], modulação de receptores muscarínicos [94], e bloqueio neuromuscular [50, 95]. Entretanto, com relação a última atividade, pouco se tem investigado da

neurotoxicidade destas enzimas, e a proporção de PLA₂ que representa β -neurotoxinas é desconhecida para a grande maioria destas peçonhas (embora toda β -neurotoxina seja uma PLA₂, o contrário não é verídico). De fato, até o momento, só foram caracterizadas farmacologicamente de forma detalhada três PLA₂ β -neurotoxinas destas peçonhas: a MiDCA1 de *M. d. carinicauda* [50, 51] e duas isoformas da peçonha de *M. lemniscatus* (Floriano RS e Hyslop S, dados não publicados). Outras PLA₂ neurotóxicas tem sido isoladas das peçonhas de *M. browni browni* [77], *M. fulvius* [87], *M. carvalhoi* [94, 96, 97] e *M. spixii* [95], mas ainda não foram bem caracterizadas quanto ao seu mecanismo de ação, isto é, uma demonstração clara de uma ação pré-sináptica.

O bloqueio pré-sináptico por PLA₂ neurotóxicas demonstra algumas características, tais como: **(1)** dependência da atividade enzimática da toxina – embora não seja um requisito absoluto, muitas PLA₂ neurotóxicas mostram um vínculo estreito entre a atividade enzimática e a neurotoxicidade; este vínculo pode ser avaliado inibindo a atividade enzimática [77, 88, 89] ou substituindo o Ca²⁺ pelo Sr²⁺ na solução fisiológica *in vitro*; **(2)** um efeito trifásico sobre a liberação de ACh, ou seja, uma breve diminuição, seguida por aumento transitório e, por fim, inibição completa e irreversível da liberação, levando ao bloqueio completo, mecanismo que pode ser visto como uma resposta facilitadora na contratilidade muscular antes do bloqueio e também pode ser avaliado pelas alterações no perfil de respostas dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) [98]; e **(3)** resistência à reversão por inibidores da acetilcolinesterase como neostigmina já que a ação pré-sináptica, por não envolver os receptores nicotínicos pós-sinápticos, é geralmente insensível à esta intervenção, sendo que esta insensibilidade à reversão explica por que esta manobra é de pouca utilidade na clínica para tratar o envenenamento por espécies como a *M. corallinus* cuja peçonha tem ação predominantemente pré-sináptica [4]. Além destas características, sabe-se que as PLA₂ β -neurotóxicas também são capazes de modular alostericamente os receptores nicotínicos pós-sinápticos, tornando-os menos sensíveis à ativação pela ACh [99-103]. Este fenômeno tem sido demonstrado principalmente *in vitro* e em alguns modelos simples *in vivo*, de modo que a sua relevância para o envenenamento *in vivo* ainda não está clara.

Vários mecanismos têm sido propostos para o bloqueio neuromuscular causado por PLA₂ β -neurotoxinas após sua ligação irreversível à membrana do

terminal nervoso. Estes mecanismos incluem: **(1)** clivagem das proteínas do complexo SNARE, impedindo as etapas de ancoragem, ativação e fusão vesicular; **(2)** inibição da sinaptotagmina, impedindo a mudança de conformação de *cis*-SNARE para *trans*-SNARE (como faz a β -bungarotoxina) [98]; **(3)** bloqueio dos canais de K^+ que prolonga a repolarização da membrana, levando à maior liberação de ACh até sua depleção; e **(4)** lesão da membrana pré-sináptica [104]. Para revisões, ver Pungertar e Križaj [52] e Šribar *et al.* [55].

No caso da MiDCA1 de *M. d. carinicauda*, trata-se de uma PLA₂ não miotóxica que inicialmente causa redução seguido por facilitação e uma nova redução progressiva dos PPTM até o bloqueio total, acompanhado de redução no conteúdo quântico. Este perfil é refletido nas respostas contráteis do músculo (em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo), onde se observa facilitação seguida por bloqueio neuromuscular [50]. Estes efeitos parecem ser mediados em grande parte pela capacidade da toxina de inibir seletivamente canais de K^+ neuronais do tipo Kv2.1, sem efeito sobre diversos outros tipos de canais de K^+ , e canais de Ca^{2+} e Na^+ [51]. No caso das duas PLA₂ de *M. lemniscatus*, que também não são miotóxicas, uma produz resposta trifásica nos PPTM e a outra não, mas ambas levam ao bloqueio irreversível destes potenciais e da atividade contrátil, com redução no conteúdo quântico. Ao contrário da MiDCA1, as duas toxinas de *M. lemniscatus* inibem os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, sem afetar os canais de Na^+ e K^+ . Além disso, estimulam a clivagem da syntaxina e da SNAP-25 (*synaptosomal associated proteins of 25 kDa*), duas proteínas intracelulares do complexo SNARE envolvidas na ancoragem e fusão das vesículas pré-sinápticas, etapa necessária para a exocitose da ACh.

Apesar de várias peçonhas de *Micrurus* causarem miotoxicidade experimentalmente (mediada principalmente por PLA₂) quando injetadas em músculo esquelético (geralmente o gastrocnêmio) de camundongo [49, 105-107] e produzirem lesões histológicas e ultraestruturais após incubação com preparações neuromusculares *in vitro* [108-110], há pouca evidência de que este fenômeno seja um fator importante ou relevante no bloqueio neuromuscular causado por estas peçonhas *in vivo*, *in vitro* [6] ou no envenenamento humano [4]. Além disso, conforme mostrado acima para MiDCA1 de *M. d. carinicauda* e as duas PLA₂ de *M.*

lemniscatus, a miotoxidade não é necessária para produzir bloqueio neuromuscular pré-sináptico.

1.6. *Micrurus surinamensis*

Dentre as *Micrurus* brasileiras, *M. surinamensis* (Fig. 8) é a única representante semi-aquática e é encontrada nas regiões amazônicas de vários países sul-americanos (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, as Guianas, Peru e Venezuela). No Brasil, ocorre nas regiões Centro-Oeste e Norte (estados do Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) em florestas tropicais úmidas e florestas secundárias próximas a fluxos de água (Fig. 3) [4].



Figura 8. *Micrurus surinamensis*. O padrão de coloração mostra que esta é uma espécie triadal (ver Fig. 4). Fonte: Bucaretschi *et al.* [4].

É a espécie de maior comprimento e circunferência dentre as *Micrurus* brasileiras, chegando até em 1.342 mm comprimento (média de 675 mm). Enquanto a maior parte das espécies de *Micrurus* se alimenta de anfíbios e outras serpentes,

M. surinamensis possui uma dieta quase exclusiva de peixes. Esta seletividade predatória mostra importante correlação com a ação da peçonha, que é mais letal em peixes (*Synbranchus marmoratus* e *Gymnotus carapo*) que em camundongos, anfíbenas e serpentes [10, 14, 111].

Estudos bioquímicos mostraram que a peçonha de *M. surinamensis* possui algumas atividades enzimáticas, tais como hialuronidase e arilamidase. Mas, ao contrário de muitas cobras corais, apresenta pouca ou nenhuma atividade PLA₂, proteolítica, L-aminoácido oxidase, quimotripsina-símile, fosfodiesterase, trombina-símile, dipeptidil-peptidase, elastase, fosfomonoesterase alcalina, 5'-nucleotidase, leucina aminopeptidase e acetilcolinesterase [14, 33, 112-115]. Também possui um perfil cromatográfico mais simples que outras *Micrurus* [111]. De modo semelhante, análises eletroforéticas indicaram que a peçonha de *M. surinamensis* apresenta predominantemente componentes de baixa massa molecular (<14 kDa), o que é típica das α -neurotoxinas (6-8 kDa) encontradas em peçonhas de cobras corais [114, 115].

Estudos proteômicos [38, 116] e transcriptômico [36] revelaram uma composição mais simples desta peçonha, uma vez que ela é quase exclusivamente composta de 3FTx (95%), com pouca PLA₂ (4,5%) e quantidades bem reduzidas de outras componentes como L-aminoácido oxidase. Estas análises também identificaram outros componentes em baixas quantidades, tais como: L-aminoácido oxidases, metaloproteinases tipo III, fatores de crescimento neuronal (NGF – *nerve growth factor*), peptídeos natriuréticos tipo C, RNase A, toxinas nociceptivas (homólogas da MitTx de *Micrurus tener*, subunidades α e β), inibidores do tipo Kunitz de serina proteases, hialuronidases e lectinas tipo C [36, 38, 116].

Apesar desta composição mais simples, a peçonha mostra alta potência letal em camundongos (via intraperitoneal) quando comparada com outras cobras corais [112], mesmo o camundongo não sendo a presa normal desta espécie. Em camundongos injetados pelas vias intraperitoneal e intracraniana, a peçonha produz efeitos neurotóxicos que culminam na morte por parada respiratória [113, 115, 117]. A injeção intramuscular e subcutânea em camundongos promove pouca ou nenhuma miotoxicidade, por vezes acompanhada de ligeiro aumento da creatinoquinase (CK) plasmática, pouco edema e hemólise, e nenhum efeito sobre a

nocicepção e a função renal [106, 107, 112, 113, 118, 119]. A peçonha demonstra atividade anticoagulante quando testada *in vitro* [115].

Quanto à neurotoxicidade, em estudo preliminar Heluany Sobrinho [120] mostrou que a peçonha causa bloqueio neuromuscular *in vitro* em preparações neuromusculares nervo frênico-diafragma (NFD) de ratos e biventer cervicis (BC) de pintainho, porém os mecanismos envolvidos não foram investigados a fundo. Posteriormente, Olamedi-Portugal *et al.* [116] isolaram seis α -neurotoxinas desta: três de cadeia-curta (Ms1, Ms3 e Ms11) e três de cadeia-longa (Ms2, Ms4 e Ms5). Entre elas, Ms1, Ms3, Ms4 e Ms5 mostraram-se letais para peixes (zebrafish), enquanto Ms1 e Ms3 foram letais para camundongos. Estes autores não avaliaram a capacidade destas toxinas de causar bloqueio neuromuscular em preparações isoladas, mas foi demonstrado que Ms1 e Ms11 aboliram completamente a corrente iônica decorrente da abertura dos receptores nicotínicos em resposta à ACh em células de rabdomiossarcoma humano (linhagem celular TE671) em cultura, enquanto Ms3 causou inibição de 90%. O bloqueio pelas toxinas Ms11 e Ms3 foi completamente reversível. Com exceção destes trabalhos, não se tem investigado a neurotoxicidade da peçonha de *M. surinamensis* em detalhe.

Embora o envenenamento por *M. surinamensis* em humanos não seja comum, Pardal *et al.* [121] relataram um caso com rápidas manifestações clínicas. Dentro de 20 min após a picada, a vítima já apresentou distúrbios neurológicos (visão turva, ptose palpebral, e dificuldade na fala e ao caminhar) indicativos de envenenamento sistêmico. Pouco depois, manifestou impossibilidade total de fala e dificuldade respiratória, necessitando de respiração artificial imediata. Mesmo após administração de antiveneno e anticolinesterásico, os efeitos neurotóxicos demoraram em ser revertidos, apresentando alguma melhora apenas após 24 h de terapia. Este perfil de envolvimento neurológico foi semelhante ao quadro geral de envenenamento por outras espécies de *Micrurus* [4, 13, 20]. A aparente baixa eficácia do antiveneno em reverter o quadro de envenenamento pode ser reflexo da quantidade maior de peçonha que esta espécie é capaz de injetar comparada a outras espécies do gênero (até 4,6 vezes maior), uma vez que tem um rendimento de peçonha maior que outras *Micrurus* [12]; também pode indicar uma composição da peçonha diferente das outras *Micrurus* (conforme discutido anteriormente) e o fato da mistura de peçonhas usada para produzir o antiveneno não incluir a peçonha

de *M. surinamensis* [são usadas apenas as peçonhas de *M. corallinus* e *M. frontalis* no protocolo de imunização [31]].

De fato, estudos experimentais imunológicos usando ensaios *in vitro* (ELISA e *western blot*) e de neutralização da letalidade *in vivo* (em camundongos) indicaram que a peçonha de *M. surinamensis* é imunologicamente diferente das outras *Micrurus* e pouco neutralizada pelo antiveneno usado na clínica [114, 115, 119, 122]. Em ensaio de ELISA e *western blot*, os soros produzidos pela imunização de camundongos com as peçonhas de *M. corallinus*, *M. frontalis* e *M. spixii* também não mostraram reatividade cruzada com a peçonha de *M. surinamensis*. De modo semelhante, soro produzido pela imunização de camundongos com a peçonha de *M. surinamensis* não apresenta reatividade cruzada com as peçonhas de *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. spixii* [123]. Os estudos eletroforético e imunoquímico também mostram que *M. surinamensis* possui pouca reatividade ao antiveneno murino e equino de *M. nigrocinctus*, com ausência de ao menos três epítomos comuns às outras *Micrurus* estudadas [34]. Em termos práticos, estas diferenças imunológicas reforçam a repetida sugestão da necessidade de ter um antiveneno polivalente para as Américas que possa neutralizar as atividades biológicas de diversas espécies de *Micrurus* [25, 117, 123-126].

2. OBJETIVOS

Considerando que a neurotoxicidade da peçonha de *M. surinamensis* tem sido pouco estudada, o objetivo principal desta investigação foi avaliar as ações farmacológicas e biológicas desta peçonha em diferentes modelos animais. Especificamente, avaliar a toxicidade em preparações neuromusculares isoladas de camundongo (nervo frênico-diafragma) e pintainho (biventer cervicis), a embriotoxicidade em zebrafish e a cardiotoxicidade em baratas. Nas preparações de camundongo, investigar a reversibilidade do bloqueio neuromuscular por neostigmina (inibidor da acetilcolinesterase) e 3,4-diaminopiridina (de modulador de canais de K⁺). Avaliar também as possíveis alterações no potencial de ação composto em nervo ciático de camundongo *in vitro*.

A hipótese geral deste trabalho foi que, como a peçonha consiste quase que exclusivamente de 3FTx, o bloqueio neuromuscular nas preparações de camundongo e de ave seria essencialmente pós-sináptico e seria reversível com as técnicas empregadas. No modelo de zebrafish, a hipótese era que a peçonha exerceria algum tipo de neurotoxicidade já que a *M. surinamensis* se alimenta de peixes, porém não foi estabelecido de antemão que tipo de manifestação tóxica seria esperado. Já no caso do modelo de baratas, a hipótese era que a peçonha teria um efeito deletério na função cardíaca, baseada em parte em estudos anteriores com peçonhas de outros elapídeos (espécies de *Naja*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

A 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi)benzóico, a acetilcolina (ACh), o carbacol (CCh) e a neostigmina (Neo) foram adquiridos do laboratório Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, EUA). Os sais e glicose utilizados no preparo das soluções fisiológicas eram de alto grau de pureza e foram obtidos dos laboratórios: Sigma-Aldrich, Abbott Lab. do Brasil (São Paulo, SP, Brasil), Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Quimibrás (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Labsynth (Diadema, SP, Brasil) e Cetus (Santo Amaro, SP, Brasil).

3.2. Peçonhas

A peçonha de *Micrurus surinamensis*, tal como as peçonhas de *M. brasiliensis*, *M. frontalis* e *M. spixii* (utilizadas como controles positivos em alguns ensaios) foram fornecidas pelo Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Jr. da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás, Goiânia, GO), herpetologista profissional com ampla experiência na taxonomia de cobras corais, o qual identificou as espécies e coletou as peçonhas. As peçonhas foram liofilizadas e mantidas a -20 °C até o uso. Este projeto foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN, nº de registro A7555B8 e A95A470).

3.3. Animais

Os camundongos machos da linhagem BALB/c (18-25 g; 8-16 semanas de idade) foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas com tampa de engradado de alumínio (5 a 10 camundongos/caixa), alocadas em estantes ventiladas (Alesco®). As caixas estavam forradas com maravalha (trocada 3 vezes por semana), abastecidas com água e ração (Nuvital®) *ad libitum* (trocada ou suplementada diariamente), em ambiente com temperatura constante de 23 ± 1

°C e iluminação controlada (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com luzes acesas às 6h00).

Os pintainhos da linhagem HY-LINE W 36 (40 g, 4-7 dias de idade) foram fornecidos pela granja Globo Aves Agrícola Ltda. (Campinas, SP) e foram mantidos em gaiolas de grade metálica em estante convencional aberta (5 a 10 pintainhos/gaiola), com cama de serragem fina que foi trocada três vezes por semana. As gaiolas foram abastecidas com água e quirera *ad libitum* (trocada ou suplementada diariamente), em ambiente com temperatura constante de 23 ± 1 °C e iluminação controlada (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com luzes acesas às 6h00).

Os zebrafish (*Danio rerio*) tipo selvagem (wild-type) foram disponibilizados pelo Laboratório/Biotério Zebrafish (LabZeb), localizado no Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Os animais adultos eram mantidos em aquários de 20 e 30 litros (2 a 3 peixes/litro), com pH 7,0 e temperatura de 25 ± 1 °C. Os aquários estavam dispostos em sala climatizada a 23 °C, com ciclo claro/escuro de 14/10 horas [127]. Semanalmente, os aquários foram limpos e os parâmetros indicadores da qualidade da água (pH, amônia, nitrito e nitrato) foram verificados. A alimentação consistia de ração flocada TetraMin® (Tetra, Blacksburg, VA, EUA) uma vez ao dia, artêmia uma vez ao dia e camarão *Mysis* liofilizado (First Bite Aquarium Foods, Lincolnshire, Reino Unido) uma vez ao dia.

Os experimentos envolvendo camundongos, pintainhos e zebrafish foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA/UNICAMP, protocolos de nº 4478-1, 5416-1 e 5433-1). Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos gerais para o uso de animais na pesquisa, estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pela Lei Federal no. 11.794 de 01 de outubro de 2008, em conjunto com as diretrizes para a experimentação animal promulgadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasília, DF).

As baratas (*Nauphoeta cinerea*) foram obtidas de fornecedor comercial e mantidas em caixas de polipropileno forradas com substrato de papelão. As caixas

foram abastecidas com água e ração (Nuvital®) *ad libitum* (trocada ou suplementada diariamente).

3.4. Determinação da atividade fosfolipásica

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por Holzer e Mackessy [128] e modificado por Ponce-Soto *et al.* [129]. Foram utilizadas amostras de 20 µl das peçonhas de *M. brasiliensis*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. surinamensis* (0,1–10 µg) diluídas em água deionizada. As amostras ou água deionizada (controle negativo, 20 µl) foram incubadas a 37 °C por 20 min com 200 µl de solução tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) e 20 µl de substrato (ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi)benzóico, 3 mM), resultado em um volume final de 133 µl. A atividade enzimática foi monitorada a 425 nm e expressa em nmol/min. O ensaio foi sempre realizado em triplicata, sendo repetido em três dias diferentes (n = 3).

3.5. Ensaio farmacológicos e biológicos

3.5.1. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo

Os protocolos envolvendo as preparações NFD foram realizados de acordo com os métodos descritos por Bülbring [130] e adaptado por Floriano *et al.* [131]. Os camundongos foram eutanasiados pelo aprofundamento da anestesia com isoflurano (via inalatória) seguido de exsanguinação. Uma vez confirmada a eutanásia dos animais, a caixa torácica e a parede abdominal foram expostas, removendo-se a pele do animal que recobre estas regiões. Através de uma incisão na parede abdominal pouco abaixo da caixa torácica, o diafragma foi isolado da aorta adjacente, fígado e esôfago. A caixa torácica foi aberta através de uma incisão paralela às costelas, atravessando também o esterno. Os nervos frênicos direito e esquerdo foram isolados com o auxílio de hastes de vidro e delicadamente amarrados na região mais distante possível da inervação do diafragma. Durante todo o processo, o diafragma e os nervos frênicos foram gotejados com solução nutritiva Tyrode (composição, em mM): NaCl 137, KCl 2,7, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 0,49, NaH₂PO₄ 0,42, NaHCO₃ 11,9 e C₆H₁₂O₆ 11,1, aerada constantemente com

carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Após remoção do conjunto composto por diafragma, nervos frênicos e costelas, ele foi imerso em solução Tyrode aerada. Os hemidiafragmas foram separados, mantendo-se os nervos frênicos correspondentes e aproximadamente 0,5 cm da caixa torácica onde o músculo está inserido.

3.5.1.1. Ensaios miográficos

Os hemidiafragmas das preparações NFD foram amarrados por sua região tendinosa. As costelas das preparações NFD isoladas foram fixadas em ganchos metálicos presentes no fundo de cubas de acrílico vedadas. As cubas foram preenchidas por 5 ml de solução Tyrode aerada constantemente, submergindo completamente a preparação NFD. As cubas foram devidamente posicionadas em banho-maria a 37 °C. O nervo frênico foi cuidadosamente posicionado sobre duas hastes de tungstênio de eletrodos acoplados em estimulador Grass S48 (Grass Medical Instruments, Quincy, MA, EUA). A linha amarrada ao hemidiafragma foi fixada em transdutor isométrico (modelo TRI201AD) conectado a um fisiógrafo (modelo PowerLab ML866) e amplificadores (modelo Quad Bridge ML224; todos da ADInstruments, Sydney, Austrália). O hemidiafragma foi estendido até tensão de 5 g. As contrações musculares foram registradas no software LabChart 7 (ADInstruments) em um microcomputador Dell.

Nos protocolos de estimulação indireta (estímulo do nervo frênico), utilizaram-se estímulos supramaximais com duração de 0,2 ms e frequência de 0,1 Hz. Nos protocolos de estimulação direta (estímulo do músculo hemidiafragma), incubou-se previamente a preparação NFD com *d*-tubocurarina (11,7 µM) até os estímulos indiretos serem completamente abolidos e, então, utilizaram-se estímulos de 70 mV com duração de 2 ms e frequência de 0,1 Hz. Nos protocolos de estímulo tetânico (estímulo do nervo frênico em alta frequência), utilizaram-se séries de estímulos supramaximais com duração de 0,2 ms e frequência de 70 Hz, por 10 seg, a cada 15 min do experimento.

Após período mínimo de 20 min para estabilização, as preparações foram submetidas a diferentes protocolos de incubação. As preparações estimuladas indiretamente foram incubadas com diferentes concentrações da peçonha de *M*.

surinamensis (0,1–30 µg/ml) ou apenas com solução Tyrode (controle negativo) por no máximo 1 h ou até que fosse atingido bloqueio neuromuscular total. Após este período, as preparações foram lavadas três vezes através da troca da solução onde estão incubadas por solução Tyrode livre de peçonha, a fim de avaliar a reversão do bloqueio neuromuscular. Em alguns experimentos, a incubação com 30 µg/ml da peçonha foi mantida por 1 h após bloqueio neuromuscular total para só então ser avaliada a reversão do bloqueio através de diversas séries de três lavagens. A reversão do bloqueio neuromuscular causado por 10 µg/ml da peçonha também foi avaliada através da adição de 230 µM de 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP; bloqueador não seletivo de canais de K⁺ dependentes de voltagem pré-sinápticos) ou 2,9 µM de neostigmina (Neo; anticolinesterásico) ao banho exatamente quando atingido 50% de bloqueio neuromuscular ou bloqueio total. As preparações estimuladas diretamente foram incubadas por 1 h com 30 µg/ml da peçonha ou apenas com solução Tyrode (controle negativo). As preparações submetidas a estímulo tetânico foram incubadas por 2 h com peçonha (3 e 10 µg/ml) ou apenas solução Tyrode (controle negativo). Cada grupo experimental correspondeu a seis experimentos com preparações NFD de animais diferentes.

3.5.1.2. Ensaios eletrofisiológicos

As preparações NFD foram fixadas horizontalmente com o auxílio de alfinetes entomológicos com sua face torácica voltada para cima, em cuba revestida de resina e silicone, preenchida com 2 ml de solução Tyrode aerada a temperatura ambiente (aproximadamente 25° C). As cubas foram posicionadas na platina de estereoscópio (modelo Wild M7 S, Leica, Wetzlar, Alemanha) com capacidade para aumento de até 40 vezes. Utilizando a técnica descrita por Fatt e Katz [132], os microeletrodos de vidro (1,5 mm de diâmetro externo e 0,86 mm de diâmetro interno; modelo GC150F, Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) foram preparados por meio do Vertical Pipete Puller (modelo 700D, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) e preenchidos com KCl 3 M, sendo que apenas foram utilizados aqueles que apresentavam resistência entre 10–20 MΩ. Com o auxílio de micromanipuladores (Leitz, Stuttgart, Alemanha), os microeletrodos foram introduzidos no meio intracelular das fibras musculares superficiais na região de placa terminal, a fim de registrar os diferentes biopotenciais de interesse (potenciais

de membrana em repouso, despolarização em resposta ao carbacol e potencial de placa terminal em miniatura). Os biopotenciais foram obtidos por meio de um amplificador de sinais (modelo 5A, Getting Instruments, San Diego, CA, EUA) e observados em osciloscópio Tektronix (Beaverton, OR, EUA). Os registros foram armazenados em um microcomputador (Accept – São Paulo, SP, Brasil) carregado com o software para aquisição de dados WinEDR (John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, Reino Unido).

Para o registro do potencial de membrana em repouso (PMR), as preparações NFD foram incubadas por 2 h com 30 µg/ml de peçonha de *M. surinamensis* ou apenas com solução Tyrode (controle negativo). O PMR foi avaliado imediatamente antes do período de incubação e após 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 min, sendo que foram empaladas cinco células diferentes em cada intervalo. Antes e após o período de incubação, a despolarização em resposta a 68,5 µM de carbacol (CCh) foi avaliada. Ao constatar se houve ou não alteração do PMR pela ação despolarizante do CCh, foi efetuada a lavagem da preparação através de três trocas da solução de incubação por solução Tyrode livre de peçonha e CCh. Após a lavagem, aguardou-se 15 min de repouso para avaliar novamente o PMR, confirmando se todo CCh foi removido e se o PMR retornou aos valores basais. Cada grupo experimental correspondeu a seis experimentos com preparações NFD de animais diferentes.

Para o registro dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM), as preparações NFD foram incubadas por 30 min com a peçonha de *M. surinamensis* (1-30 µg/ml) ou apenas com solução Tyrode (controle negativo). Cinco placas motoras foram empaladas pelo período de 1 min ao longo do experimento: imediatamente antes da incubação e 10, 20 e 30 min após início da incubação. Cada grupo experimental correspondeu a seis experimentos com preparações NFD de animais diferentes.

3.5.2. Registro extracelular do potencial de ação composto (PAC) em nervo ciático de camundongo

Os protocolos de registro de PAC em nervo ciático de camundongos foram realizados de acordo com os métodos descritos por Floriano *et al.* [131]. Os

camundongos foram eutanasiados pelo aprofundamento da anestesia com isoflurano (via inalatória) seguido de exsanguinação. Após a eutanásia ser confirmada, os camundongos foram posicionados com o ventre voltado para baixo e a pele da região dorsal e das patas posteriores foi removida. Os tecidos adjacentes aos nervos ciáticos foram removidos e estes foram isolados cuidadosamente, de forma a se preservar o maior comprimento de nervo ausente de ramificações. Então, o nervo foi delicadamente seco em papel toalha e posicionado em uma cubeta de registro com três compartimentos cilíndricos de 500 µl de capacidade cada, de forma que o comprimento do nervo se distribuisse predominantemente no compartimento central. O isolamento elétrico entre os compartimentos foi feito com vaselina, preenchendo-se completamente as fendas que os separam. Os dois compartimentos externos foram preenchidos com solução Tyrode (composição descrita na seção 3.5.1.), sendo que a adição de peçonha foi feita no compartimento central em um volume de 400 µl. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (aproximadamente 25° C) em solução Tyrode previamente oxigenada por 1 h antes do início dos protocolos.

Para o registro do potencial de ação composto do nervo, dois eletrodos do tipo *pellet* de prata cloretada foram utilizados, sendo que um deles foi mergulhado no compartimento central da cuba de registro (para aterramento) e o outro em um dos compartimentos da extremidade (para registro dos PAC). O eletrodo de estimulação elétrica foi posicionado no outro compartimento extremo. Um estimulador Grass S88 (Grass Medical Instruments) foi utilizado para aplicação dos estímulos supramaximais (1 Hz, 0,05 ms de duração) através da unidade de isolamento de estímulo (modelo SIU 5ª, Grass Medical Instruments). Os sinais foram amplificados através de um amplificador de sinais (modelo 5A, Getting Instruments) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram armazenados em um microcomputador (Accept) carregado com o software para aquisição de dados WinWCP 4.5.7 (John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, Reino Unido).

Após um período mínimo de 30 min de estabilização, foi adicionada peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml, correspondendo à maior concentração usada nos experimentos com preparações NFD) ao compartimento central da cubeta para incubação por 1 h de experimento. O controle negativo consistiu de nervos ciáticos incubados apenas com solução Tyrode. Em cada experimento, a

amplitude dos PAC adquiridos foi avaliada. Também foi avaliado o tempo refratário entre potenciais pareados após o período de incubação. Os estímulos pareados se iniciaram com 10 ms de latência entre si e, a cada série de estímulos, diminuiu-se em 1 ms da latência. Cada grupo experimental correspondeu a seis experimentos com preparações NFD de animais diferentes.

3.5.3. Preparação biventer cervicis (BC) de pintainho

Os protocolos envolvendo as preparações BC foram realizados de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner [133] e Floriano *et al.* [131]. Os pintainhos foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com isoflurano (via inalatória) seguido de exsanguinação. Os pintainhos foram posicionados com o ventre voltado para baixo e a pele da região posterior do topo da cabeça até o fim do pescoço foi removida. Os tecidos adjacentes foram removidos para melhor visualização dos músculos biventer cervicis e estes foram amarrados pelas suas extremidades tendíneas. Os músculos foram então removidos do animal e montados em cubas de 5 ml contendo solução Krebs (composição, mM): NaCl 118,6, KCl 4,69, CaCl₂ 1,88, KH₂PO₄ 1,17, NaHCO₃ 25 e glicose 11,65, aerada constantemente com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Os ensaios foram realizados em banho de órgãos (modelo Panlab Automatic Organ Bath, Harvard Apparatus) a 37° C. As preparações BC foram acopladas a transdutor isométrico (modelo TRI201AD) e tensionadas a 1 g e submetidas a estímulos elétricos por eletrodos bipolares posicionados entre tendão e músculo para se obter estimulação de campo (estimulador modelo Panlab LE 11336 TC, ADInstruments). As respostas contráteis das preparações BC foram obtidas através de um fisiógrafo (modelo PowerLab ML866) e amplificador (modelo Quad Bridge ML224), e registradas no software LabChart 7 (todos da ADInstruments), em um microcomputador Dell. Nos protocolos de estimulação indireta (estímulo de nervo), utilizaram-se estímulos supramaximais com duração de 0,2 ms e frequência de 0,1 Hz. Nos protocolos de estimulação direta (estímulo de músculo), incubou-se previamente a preparação BC com *d*-tubocurarina (11,7 µM) até os estímulos indiretos serem completamente abolidos e, então, utilizaram-se estímulos de 70 mV com duração de 2 ms e frequência de 0,1 Hz. Após período mínimo de 20 min para estabilização, as preparações foram incubadas apenas com solução Krebs livre de peçonha (controle

negativo) ou com diferentes concentrações da peçonha de *M. surinamensis* (0,1–30 µg/ml) por 1 h ou até o bloqueio neuromuscular total ser alcançado.

As contraturas induzidas por acetilcolina (ACh, 1 mM), carbacol (CCh, 20 µM) e KCl (40 mM) foram avaliadas antes e após os tratamentos das preparações, na ausência de estímulo elétrico. Após estabilização das contraturas, lavaram-se as preparações três vezes através da troca da solução de incubação por solução Krebs livre de peçonha. Após a última contratura em resposta ao KCl, as preparações foram lavadas e novamente estimuladas indiretamente a fim de avaliar a reversibilidade do bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha. Em alguns experimentos, a reversão do bloqueio neuromuscular causado por 1 µg/ml da peçonha foi avaliada através da adição de 230 µM de 3,4-DAP ou 2,9 µM de neostigmina ao banho exatamente quando o bloqueio total foi atingido. Cada grupo experimental correspondeu a seis experimentos com preparações BC de animais diferentes.

3.5.4. Análise histológica

Os músculos hemidiafragma e biventer cervicis submetidos aos ensaios miográficos de estímulo indireto e incubados apenas com solução Tyrode/Krebs (controle negativo) e 30 µg/ml da peçonha de *M. surinamensis* foram usados para análise histológica (n=6). Os tecidos foram fixados em formol 10% e processados da seguinte forma: desidratação em uma série crescente de etanol, diafanização e infiltração em parafina, e emblocamento, seguido por cortes seriados em secções de 5 µm, utilizando micrótomo (modelo RM2245, Leica). Os cortes foram montados em lâminas silanizadas (10 lâminas de cada tecido, sendo 3 cortes para cada lâmina) e, então, coradas com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram observadas em microscópio óptico (modelo DM5000B, Leica) e as imagens capturadas por câmera (modelo DFC 300FX CCD, Leica) acoplada a um microcomputador carregado com o software Q Win Plus c 3.2.0 (Leica). As células foram avaliadas usando os seguintes indicativos de lesão miotóxica: vacúolos, hipercontração de miofibrilas, edema, lesão delta, mionecrose e “células ghost”. Foram consideradas células normais aquelas que apresentavam estrutura íntegra, perfil poligonal, núcleo periférico e nenhum indicativo de lesão miotóxica.

3.5.5. Embriotoxicidade em zebrafish

O ensaio de embriotoxicidade de zebrafish foi adaptado do método descrito em OECD [134]. Após o acasalamento ocorrido espontaneamente entre os peixes adultos, os ovos foram coletados, colocados em placa de Petri com água de aquário e analisados individualmente com auxílio de estereoscópio (modelo Wild M7 S, Leica). Os ovos selecionados para o estudo foram aqueles que mostraram embriões fertilizados e com no máximo 16 células, isto é, com menos de 2 hpf (horas pós-fertilização), conforme representado na Fig. 9.

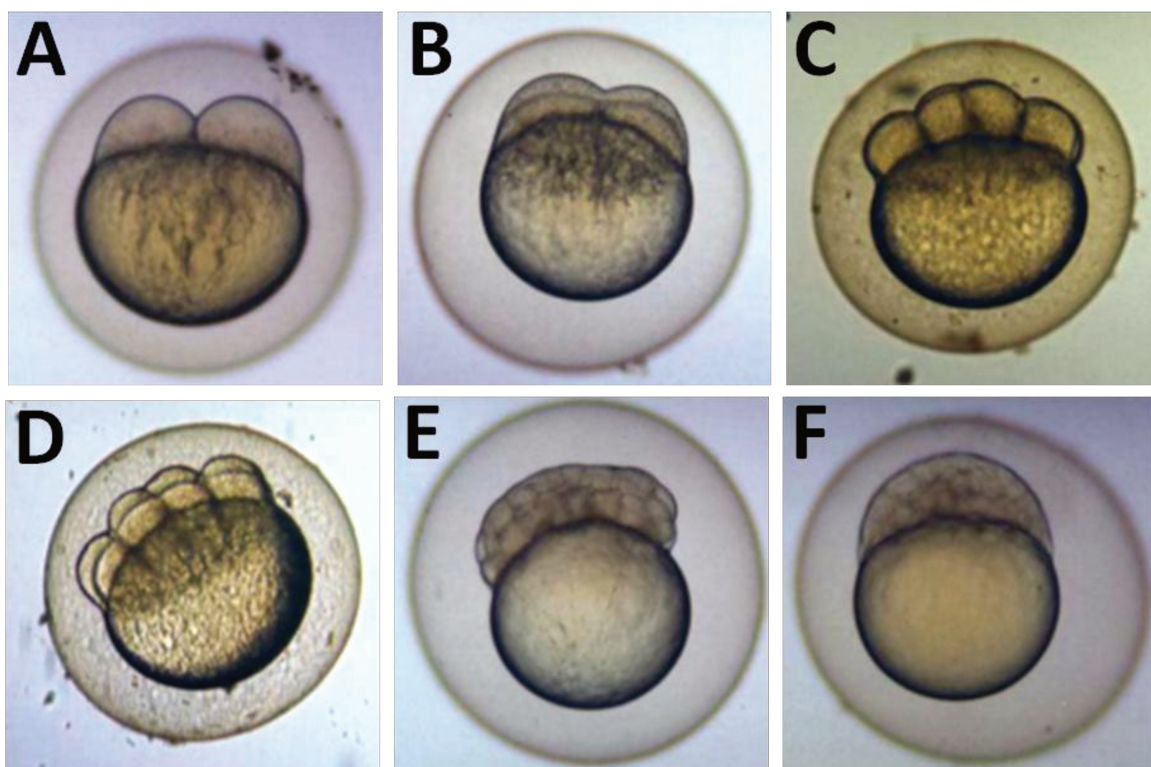


Figura 9. Desenvolvimento normal de embriões de zebrafish. (A) 0,75 hpf, 2 células (período de zigoto em clivagem); (B) 1 hpf, 4 células; (C) 1,2 hpf, 8 células; (D) 1,5 hpf, 16 células; (E) 4,7 hpf, mostrando o início da epíbole (período de blástula); (F) 5,3 hpf, epíbole de aproximadamente 50% (período de gástrula). Fonte: Adaptado a partir de Braunbeck e Lammer [135].

Os embriões selecionados foram então randomizados em placas de cultura de 96 poços (1 embrião/poço) contendo 200 μ l de água de aquário, diferentes concentrações de peçonha de *M. surinamensis* diluída em água de

aquário (3–1000 µg/ml) ou 4 mg/ml de 4,3-dicloroanilina (4,3-DCA; agente teratogênico; controle positivo) diluída em água de aquário. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo que cada série de experimentos contou com 10 peixes por grupo experimental. A placa contendo os embriões foi mantida em estufa para controle da temperatura (24 °C) em ciclo claro/escuro de 14/10 h. Os embriões/larvas foram removidos da estufa apenas uma vez ao dia, exatamente a cada 24 h do início da incubação com peçonha, a fim de terem seu desenvolvimento observado. A confirmação da morte dos embriões foi feita com o auxílio de estereoscópio através da identificação da presença dos seguintes parâmetros: coagulação dos ovos, ausência de batimentos cardíacos, não desligamento da cauda ao córion e ausência da formação de somitos. Outros parâmetros também avaliados diariamente foram: teratogenicidade, atividade locomotora em resposta a estímulo mecânico (toque suave na superfície da solução em que estavam incubados) e eclosão dos ovos.

Em 4 dpf, no desenvolvimento normal, os ovos de zebrafish já estão eclodidos e os peixes se encontram no estado larval, sendo possível avaliar sua atividade locomotora. Utilizando um sistema de vídeo-rastreamento automatizado (DanioVision, Noldus – Wageningen, Holanda), a atividade locomotora das larvas foi registrada durante 15 min e quantificou-se a distância percorrida por cada larva através do software EthoVision XT (Noldus). Após todas as avaliações, os peixes sobreviventes foram cuidadosamente removidos da placa de 96 poços e colocados individualmente em placas de Petri contendo água de aquário livre de peçonha ou droga. Os peixes em estado larval foram obrigados a nadar através de estímulos mecânicos (delicados toques com ponteiros plásticos em suas caudas), a fim de facilitar a remoção da droga ou peçonha de seu organismo. Após aproximadamente 2 min na placa de Petri, os peixes foram novamente incubados individualmente em placa de 96 poços, desta vez com apenas 200 µl de água de aquário para todos os grupos, a fim de avaliar se os efeitos da peçonha são revertidos uma vez que os zebrafish não estavam mais expostos à peçonha ou ao 3,4-DCA. Em 7 dpf, todos os parâmetros foram novamente avaliados.

3.5.6. Coração semi-isolado de barata

Os experimentos com coração semi-isolado de barata foram modificados a partir da metodologia descrita por Dos Santos *et al.* [136]. Baratas adultas (*Nauphoeta cinerea*) foram colocadas individualmente em béquer de vidro posicionado em banho de gelo, a fim de resfriar os insetos, diminuindo seu metabolismo e movimentação, facilitando assim a manipulação. Logo que observada a diminuição na resposta locomotora das baratas, elas foram posicionadas com o ventre voltado para cima e imobilizadas em placa de Petri revestida com resina com o auxílio de alfinetes entomológicos. Incisões foram feitas longitudinalmente ao longo das laterais do abdômen das baratas, permitindo a remoção do exoesqueleto para exposição dos órgãos internos. O trato gastrointestinal, tecido adiposo e demais vísceras foram deslocadas a fim de expor o coração. As baratas foram posicionadas em microscópio óptico (modelo DM5000B, Leica) acoplado a câmera (modelo DFC 300FX CCD, Leica) e microcomputador carregado com o software Q Win Plus c 3.2.0 (Leica). Os batimentos cardíacos das baratas foram registrados por período de estabilização mínimo de 5 min, seguido por 30 min de incubação com 10 µl de solução salina (NaCl 0,9 %) ou com a peçonha de *M. surinamensis* (100 µg) ou *M. frontalis* (10 µg) diluídas em solução salina. Experimentos preliminares foram feitos para escolher as quantidades das peçonhas a serem utilizadas, nos quais se observou que 10 µg foi a menor quantidade da peçonha de *M. frontalis* a afetar a frequência cardíaca. A quantidade da peçonha de *M. surinamensis* (100 µg) foi escolhida por ser a maior concentração que não precipitou quando diluído em 10 µl de água (volume utilizado neste ensaio). Os vídeos resultantes dos experimentos foram posteriormente avaliados para obtenção das frequências cardíacas das baratas.

3.6. Análise estatística

As alterações nas respostas contráteis de preparações NFD e BC foram expressas como uma porcentagem relativa aos valores basais (tempo zero), considerados como 100%. Já as alterações nas contraturas em resposta à ACh, CCh e KCl de preparações BC foram expressas como uma porcentagem relativa

aos valores basais (contraturas obtidas antes das incubações com peçonha ou controle negativo), considerados como 100%.

Nos protocolos eletrofisiológicos, o potencial de membrana em repouso, a despolarização da membrana em resposta ao CCh e a amplitude e frequência de potenciais de placa terminal em miniatura de preparações NFD foram expressos a partir de valores absolutos obtidos. Por outro lado, as alterações no PAC de nervo ciático de camundongo foram expressas como uma porcentagem relativa aos valores basais (tempo zero), considerados como 100%. Já os resultados do protocolo de estímulo pareado em nervo ciático foram expressos como a razão entre a amplitude do segundo PAC (P2) pelo primeiro PAC (P1) do estímulo pareado (razão P2/P1).

Nos experimentos com zebrafish, a mortalidade de embriões/larvas foi expressa como porcentagem do número total de peixes em cada grupo, e a taxa de eclosão dos ovos foi expressa como porcentagem dos peixes vivos. Por outro lado, os resultados de atividade locomotora das larvas foram expressos a partir de valores absolutos obtidos. Nos experimentos com coração semi-isolado de baratas, os resultados foram expressos como os valores absolutos obtidos (frequência cardíaca).

Todos os resultados apresentados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), assim como os resultados citados de trabalhos anteriores. As comparações estatísticas foram feitas usando o teste *t* de Student ou ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer, com $p < 0,05$ indicando significância. Todas as análises foram feitas usando o software Prism v.5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Atividade fosfolipásica (PLA₂)

A Fig. 10 mostra a atividade PLA₂ das peçonhas de *M. brasiliensis*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. surinamensis* (as três primeiras serviram de controles positivos). A peçonha de *M. surinamensis* não apresentou atividade PLA₂ em quantidades até 10 µg enquanto que as outras peçonhas mostraram atividade que variava conforme a quantidade testada.

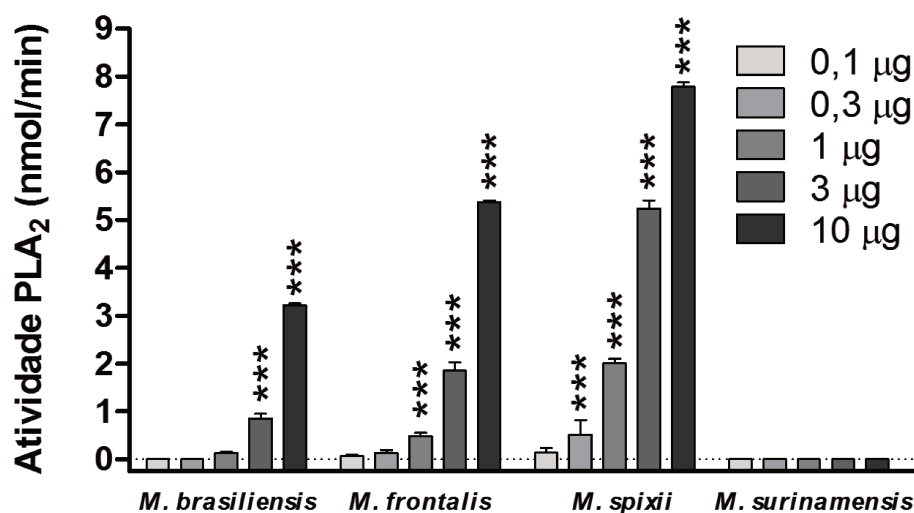


Figura 10. Atividade PLA₂ das peçonhas de *M. brasiliensis*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. surinamensis*. Cada coluna representa a média da atividade (nmol/min) ± DP (n = 3). ***p<0,01 comparado à quantidade correspondente da peçonha de *M. surinamensis*.

4.2. Ensaio miográficos em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo

Os hemidiafragmas de camundongo foram imersos em solução nutritiva Tyrode e estimulados indiretamente através de seus nervos frênicos. A resposta contrátil foi avaliada durante 60 min de incubação na presença da peçonha de *M. surinamensis* (0,1–30 µg/ml) ou na sua ausência (controle Tyrode, controle negativo). A incubação com a peçonha de *M. surinamensis* promoveu bloqueio neuromuscular dependente de tempo e concentração (Fig. 11). A menor

concentração capaz de produzir bloqueio foi 3 $\mu\text{g/ml}$, o qual tornou-se significativo após 30 min (comparado ao controle Tyrode). As concentrações 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ causaram redução imediata das respostas contráteis, levando ao bloqueio completo após 35 min e 15 min respectivamente. Nenhuma concentração de peçonha promoveu facilitação da resposta contrátil prévia ao bloqueio neuromuscular.

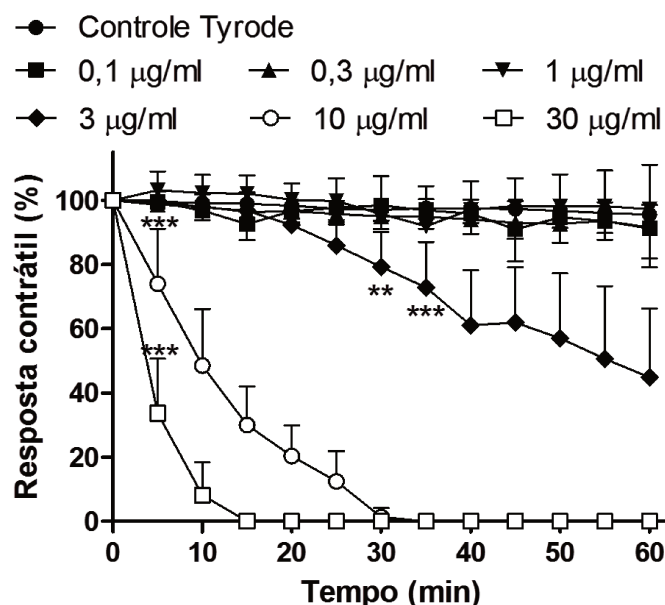


Figura 11. Bloqueio neuromuscular causada pela peçonha de *M. surinamensis* em preparações NFD de camundongo durante estimulação indireta por 1 h, a 37 °C. Preparações controle foram incubadas com solução Tyrode sem peçonha. As respostas contráteis foram expressas como porcentagem (%) da contratilidade basal (antes da adição de peçonha). Cada ponto representa a média $\pm$ DP ($n = 6$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao controle de Tyrode).

Os registros miográficos relativos a estes experimentos mostram que não houve alteração na linha de base durante a incubação com as diferentes concentrações de peçonha (Fig. 12). Imediatamente após 1 h de incubação (com 3 $\mu\text{g/ml}$ da peçonha) ou o bloqueio neuromuscular total (10 e 30 $\mu\text{g/ml}$), as preparações foram lavadas três vezes com solução Tyrode sem peçonha, a fim de avaliar a reversibilidade do bloqueio por lavagem. Os registros miográficos mostram que a lavagem promoveu progressiva reversão do bloqueio neuromuscular, sendo a recuperação mais lenta com as maiores concentrações de peçonha.

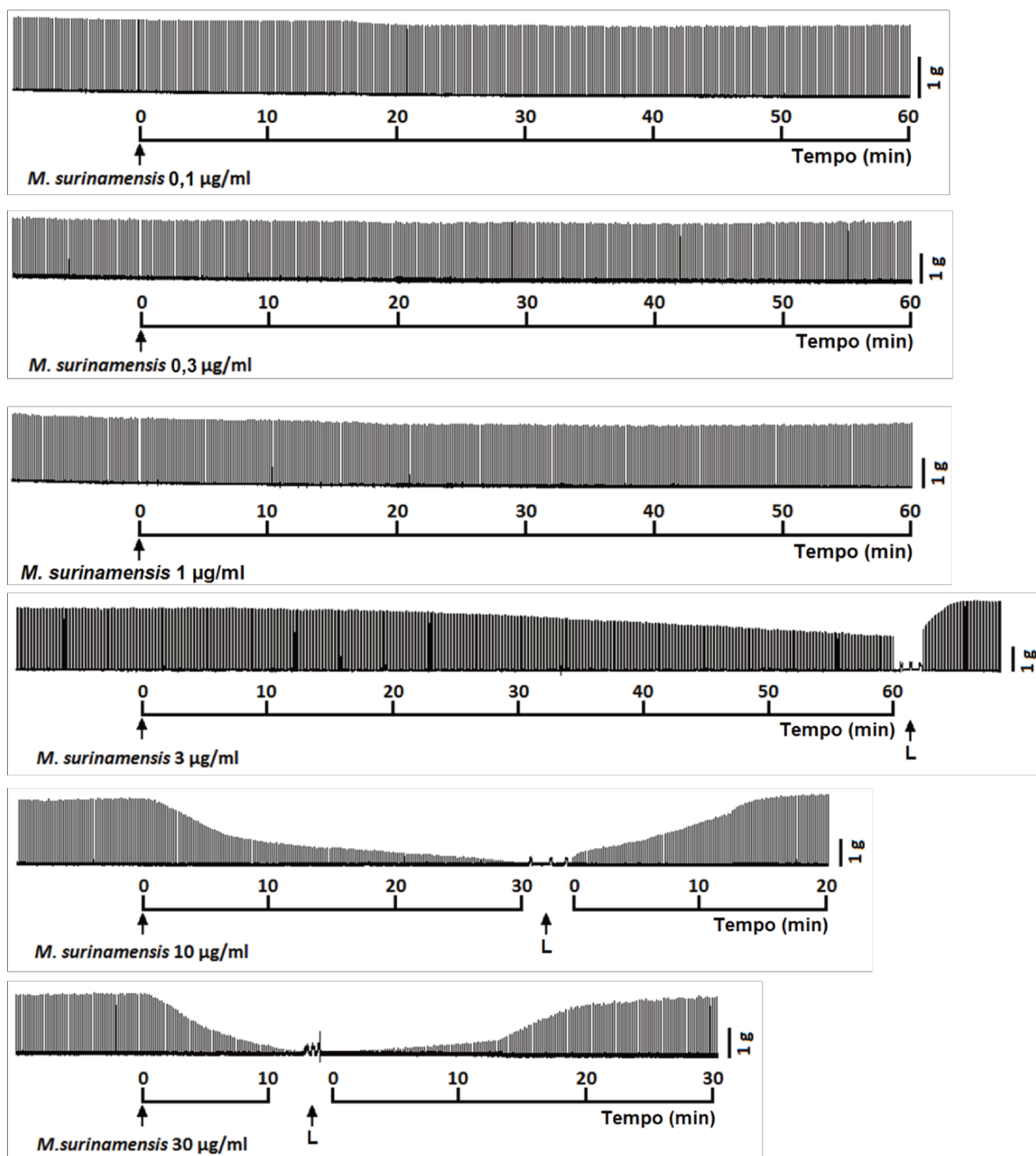


Figura 12. Registros miográficos representativos dos experimentos mostrados na Fig. 11. Após 1 h de incubação (com a concentração de 3 µg/ml) ou bloqueio neuromuscular total (10 e 30 µg/ml), as preparações foram lavadas (L) três vezes com solução Tyrode sem peçonha para avaliar a reversão do bloqueio neuromuscular (registros representativos de $n = 6$ cada). Houve reversão total do bloqueio após as lavagens.

Uma vez que foi observada a reversão do bloqueio neuromuscular por lavagem, novos experimentos foram feitos para avaliar se o tempo entre o bloqueio total e a lavagem influenciava na reversibilidade. Assim, após o bloqueio total causado pela concentração mais alta de peçonha (30 µg/ml), as preparações foram

mantidas por mais 1 h na mesma solução de incubação. Mesmo nessas condições, ainda foi possível reverter o bloqueio neuromuscular (Fig. 13). No entanto, as preparações foram mais resistentes à reversão que nos experimentos representados na Fig. 12, sendo necessário mais que uma série de lavagens para ser observada reversão similar.

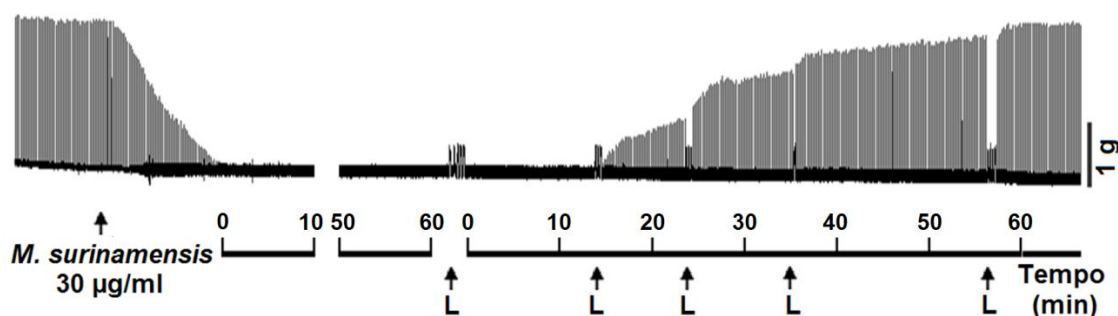


Figura 13. Registro miográfico do bloqueio neuromuscular provocado em preparações NFD de camundongo pela peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml) e subsequente reversão, após permanência do bloqueio por 1 h, por séries de três lavagens (L) com solução Tyrode sem peçonha. Registro representativo de 6 experimentos. Este protocolo foi feito para avaliar se o tempo de bloqueio total influenciava na reversibilidade por lavagens. O resultado mostra que ainda houve reversão, porém em escala de tempo maior quando comparado com o último traçado na Fig. 12.

A avaliação quantitativa da reversibilidade por lavagem mostra que a resposta contrátil foi completamente recobrada (Fig. 14). Todas as concentrações de peçonha avaliadas (3-30 µg/ml) tiveram seus efeitos revertidos pela lavagem, mesmo quando a exposição à peçonha (30 µg/ml) foi prolongada para 1 h após o bloqueio neuromuscular total.

A análise histológica qualitativa das preparações incubadas com a peçonha mostrou que, mesmo a maior concentração estudada (30 µg/ml) não foi capaz de causar lesão miotóxica (Fig. 15). Tanto as preparações incubadas apenas com solução Tyrode (controle negativo) quanto as incubadas com peçonha apresentaram predominantemente células com estrutura íntegra, perfil poligonal, núcleo periférico e nenhum sinal de comprometimento do mecanismo contrátil.

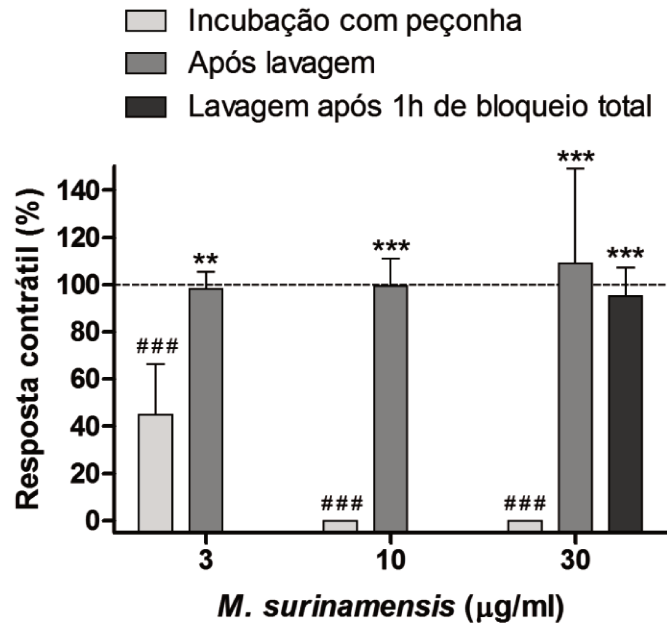


Figura 14. Reversão do bloqueio neuromuscular após as lavagens mostradas nas Figuras 12 e 13. As preparações foram lavadas após 1 h de incubação com a concentração de 3 µg/ml, após bloqueio total com as concentrações de 10 e 30 µg/ml, e após 1 h de bloqueio total (30 µg/ml). Cada coluna representa a média $\pm$ DP ($n = 6$); ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado às respostas contráteis ao fim da incubação com peçonha, porém sem lavagem; ### $p < 0,001$ comparado às respostas contráteis antes da adição de peçonha (100%).

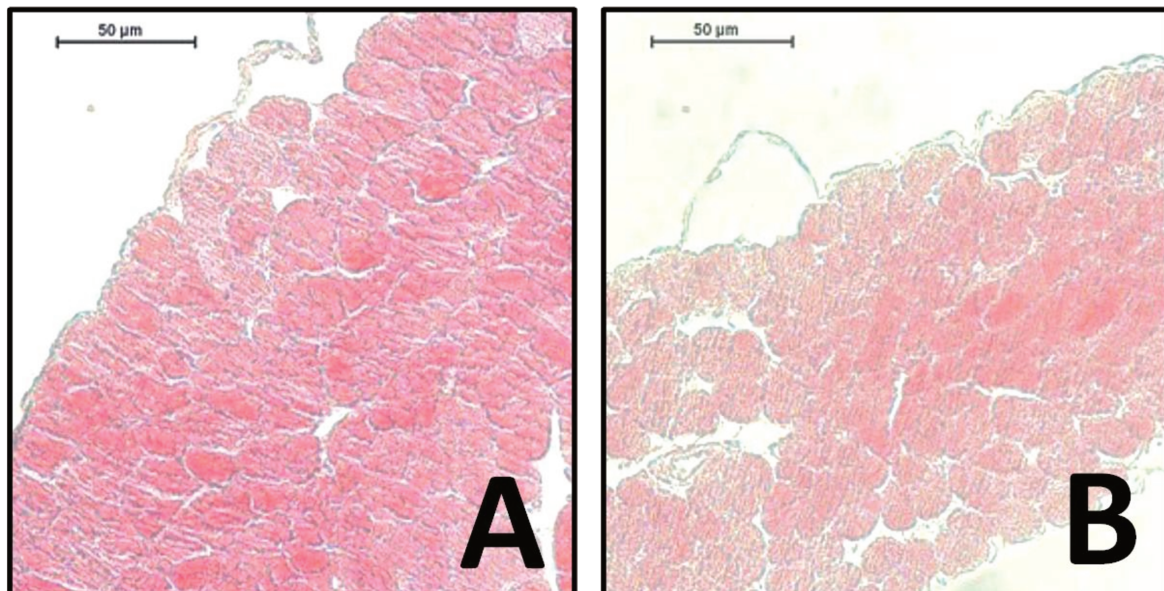


Figura 15. Análise morfológica de preparações NFD incubadas com solução Tyrode sozinha (controle negativo) (A) ou a peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml; B). Ambos os tecidos mostram uma predominância de células normais, sem presença de lesão ou alteração de sua conformação. Coloração HE. Barra = 50 µm.

A ação da peçonha de *M. surinamensis* (30 $\mu\text{g/ml}$) sobre preparações NFD também foi avaliada quando a resposta contrátil foi evocada por estímulo direto (estímulo do músculo do hemidiafragma) (Fig. 16). Nessas condições, a peçonha foi incapaz de produzir qualquer bloqueio neuromuscular durante 60 min de incubação, não apresentando diferença significativa quando comparada ao controle negativo (preparações estimuladas diretamente e incubadas apenas com solução Tyrode).

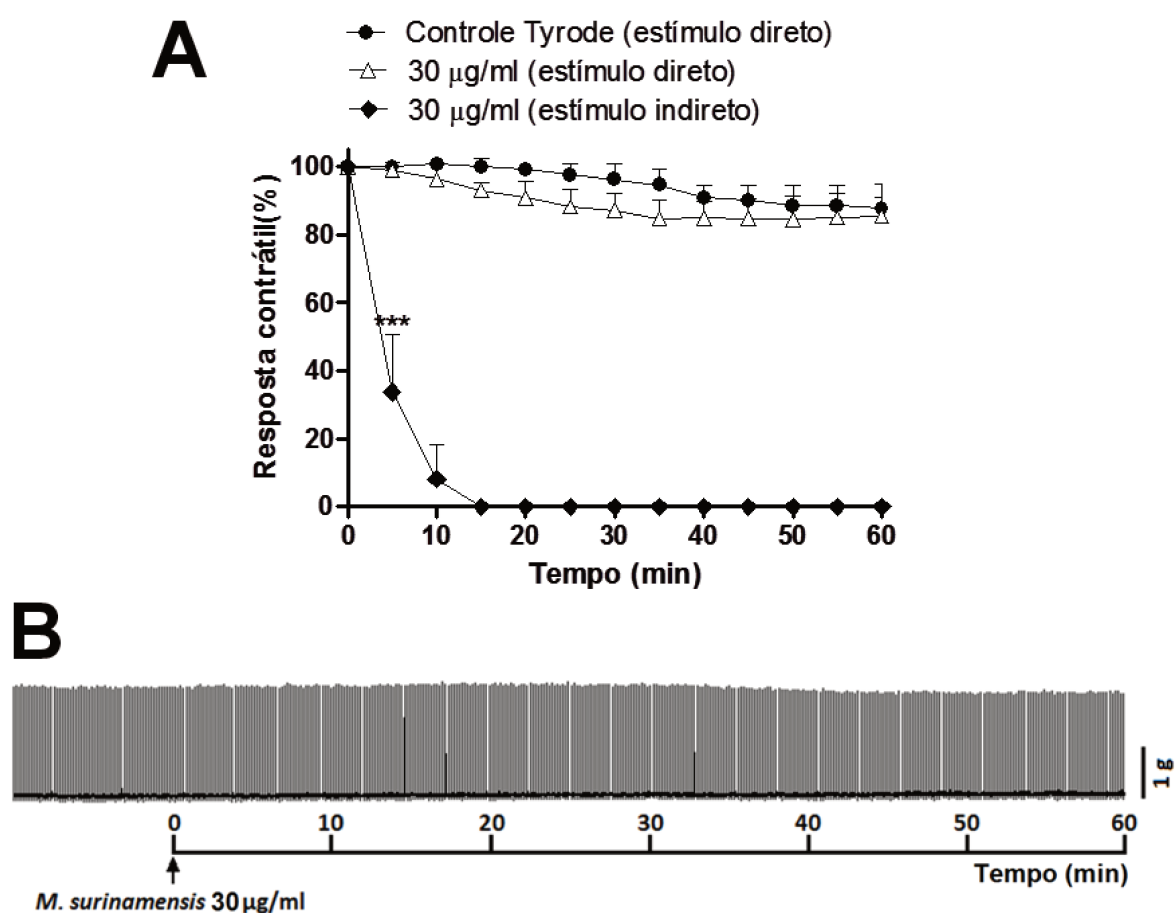


Figura 16. Ausência de bloqueio pela peçonha de *M. surinamensis* (30 $\mu\text{g/ml}$) em preparações NFD de camundongo sob estimulação direta por 60 min a 37 °C. **(A)** As respostas foram expressas como porcentagem do valor basal (antes da adição de Tyrode ou peçonha). Cada ponto representa a média $\pm$ DP ($n = 6$; *** $p < 0,001$ deste ponto em diante comparado às preparações incubadas com peçonha e estimuladas diretamente). **(B)** Registro miográfico representativo da resposta contrátil.

A fim de avaliar a reversibilidade do bloqueio em resposta ao aumento da oferta de ACh, neostigmina (Neo) e 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) foram adicionadas ao banho após 50% de bloqueio ou bloqueio total produzido por 10 µg/ml da peçonha de *M. surinamensis* (Fig. 17). A concentração de peçonha foi escolhida por ser a menor concentração capaz de produzir bloqueio total dentro de 60 min. A Neo é uma droga anticolinesterásica, isto é, inibe a acetilcolinesterase, reduzindo a degradação de ACh, provocando seu acúmulo na fenda sináptica. Já a 3,4-DAP é um bloqueador de canais de K⁺, provocando redução no efluxo de K⁺, prolongando o potencial de ação, que por sua vez permite que os canais de Ca²⁺ presentes no terminal nervoso permaneçam abertos por mais tempo. Com maior influxo de Ca²⁺, a despolarização do nervo leva ao recrutamento de mais vesículas de ACh que o normal, causando maior liberação do neurotransmissor e, assim, seu acúmulo na fenda sináptica.

Tanto Neo quanto 3,4-DAP foram capazes de reverter o bloqueio de forma transitória. O perfil de reversão foi semelhante tanto quando as drogas foram adicionadas ao banho após 50% de bloqueio, quanto após bloqueio total: rápida reversão parcial das respostas contráteis seguida por retomada do bloqueio da resposta contrátil até que o bloqueio total fosse alcançado. A análise quantitativa das reversões promovidas pelas drogas mostra que nenhuma foi capaz de restaurar a resposta contrátil para os valores observados antes da incubação com a peçonha. Nota-se também que 3,4-DAP produziu reversões estatisticamente semelhantes quando adicionada após bloqueio de 50% e bloqueio total, ao passo que Neo promoveu menor reversão quando adicionada após o bloqueio total.

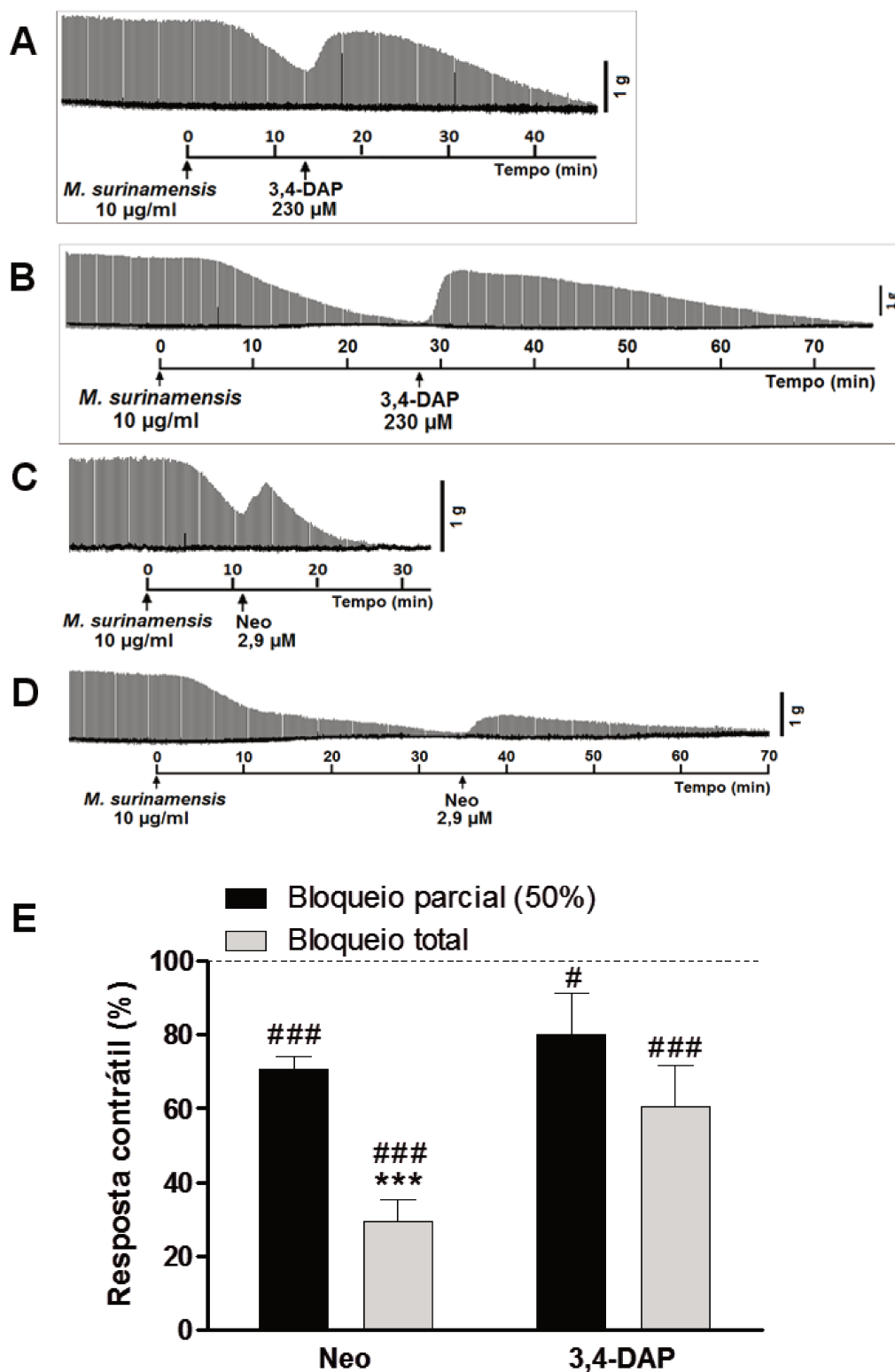


Figura 17. Reversão parcial e transitório por 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP; A,B) e neostigmina (Neo, C,D) após bloqueio neuromuscular de 50% (A,C) e total (B,D) causado pela peçonha de *M. surinamensis* (10 µg/ml) em preparações NFD de camundongos. (E) Valores médios da reversão do bloqueio mostrado nos painéis A a D. Em (E), as colunas representam a média $\pm$ DP ($n = 6$). # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ comparado à resposta contrátil antes da adição de peçonha (100%). *** $p < 0,001$ comparado à reversão observada após bloqueio de 50%.

Para avaliar se peçonha possuiu ação pré-sináptica capaz de alterar a liberação de ACh, preparações NFD foram submetidas à estimulação tetânica (estímulos de alta frequência) na presença de peçonha de *M. surinamensis* (3 e 10 µg/ml) (Fig. 18). Nestes experimentos avaliou-se tanto a resposta contrátil do músculo hemidiafragma (primeiro pico da resposta tetânica), quanto a sua contração tetânica (contração mantida ao final de cada período de estimulação tetânica). O desaparecimento das respostas contráteis foi semelhante ao observado com as preparações estimuladas indiretamente incubadas com as mesmas concentrações de peçonha (Fig. 11). As contrações tetânicas também foram afetadas, como é possível observar pela progressiva perda de força de contração durante as séries de estímulo de alta frequência. Este efeito foi mais evidente na incubação com 3 µg/ml de peçonha, possivelmente por causar bloqueio mais lento (comparada à concentração de 10 µg/ml), permitindo melhor visualização deste efeito sobre a estimulação tetânica.

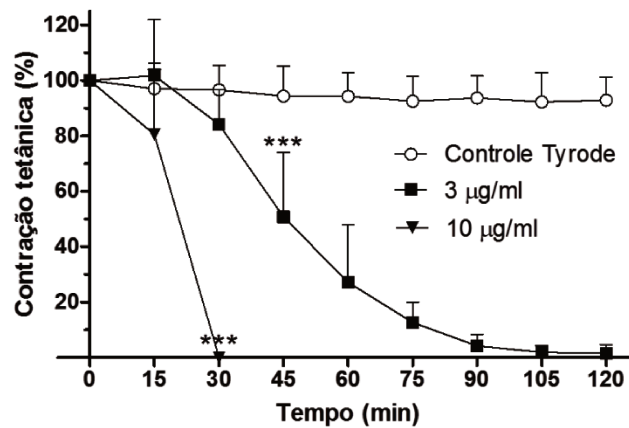
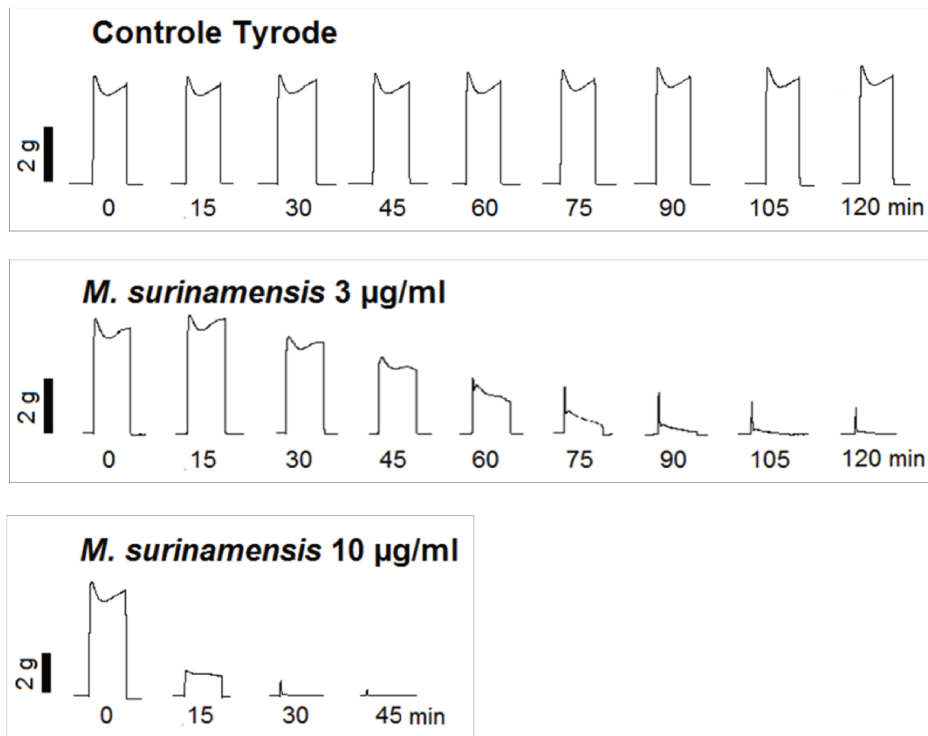
A**B**

Figura 18. Resposta à estimulação tetânica em preparações NFD de camundongo incubadas com a peçonha de *M. surinamensis* (3 e 10 µg/ml). (A) Contração tetânica (%) das preparações durante incubação com a peçonha ou na sua ausência (controle Tyrode) a 37 °C. Os pontos representam a média $\pm$ DP (n = 6; ***p<0,001 comparado à resposta contrátil basal, antes da adição de peçonha). (B) Registros miográficos representativos de preparações incubadas apenas com solução Tyrode e as duas concentrações de peçonha.

4.3. Ensaios eletrofisiológicos em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

O potencial de membrana em repouso (PMR) das preparações NFD foi monitorado nas regiões de placa terminal do músculo hemidiafragma durante 2 h de incubação com 30 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha (Fig. 19). Os PMR registrados durante a incubação com a peçonha não apresentaram diferença significativa em relação aos das preparações incubadas apenas com solução Tyrode (controle negativo) – não houve despolarização ou hiperpolarização da membrana muscular. Antes do início da incubação com a peçonha (tempo 0 minuto), a média dos PMR registrados foi $-80,0 \pm 1,2$ mV (média do grupo controle: $-81,5 \pm 2,9$ mV) e após 2 h de incubação com a peçonha, a média dos PMR registrados foi $-79,6 \pm 1,2$ mV (comparado com $-80,7 \pm 3,3$ mV para o grupo controle).

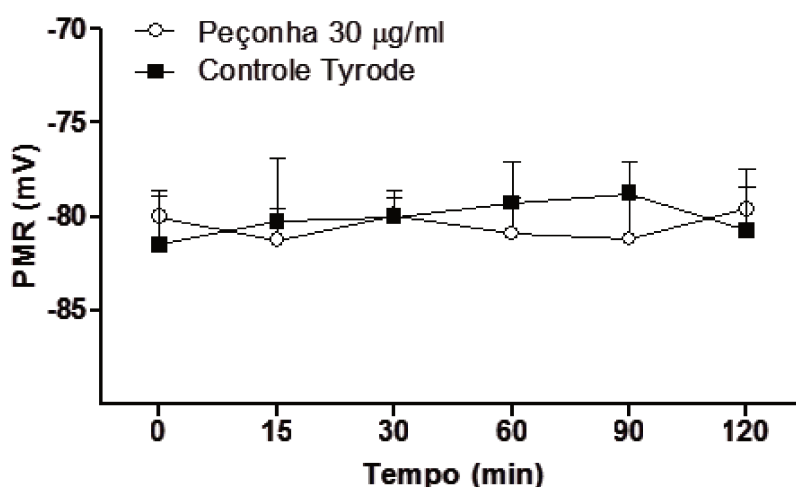


Figura 19. A peçonha de *M. surinamensis* (30 $\mu\text{g/ml}$) não altera o potencial de membrana em repouso (PMR) do músculo de diafragma de camundongo durante incubação de 2 h. Os pontos representam a média $\pm$ DP ($n = 6$).

A fim de avaliar a despolarização da placa terminal decorrente da abertura dos receptores nicotínicos musculares, adicionou-se carbacol (CCh) ao banho das preparações NFD antes e após a incubação com 30 $\mu\text{g/ml}$ da peçonha de *M. surinamensis* (Fig. 20). A resposta basal (antes da exposição à peçonha) mostrou que a incubação com CCh foi capaz de despolarizar a placa terminal de um

potencial de $-80,5 \pm 0,8$ mV para $-50,8 \pm 2,7$ mV. O PMR foi restaurado para $-80,0 \pm 1,2$ mV após a lavagem da preparação com solução Tyrode fresca. A resposta basal do grupo controle (que não foi incubado com peçonha) foi estatisticamente semelhante: despolarização de $-81,0 \pm 1,5$ mV para $-46,7 \pm 1,2$ mV em resposta ao CCh, com repolarização para $-78,6 \pm 1,1$ mV após a lavagem. Após 2 h, a placa terminal das preparações controle ainda foi capaz de despolarizar em resposta ao CCh, elevando seu potencial de membrana de $-80,7 \pm 1,9$ mV para $-47,5 \pm 2,6$ mV (retornando para $-79,5 \pm 2,4$ mV após lavagem). Por outro lado, a placa terminal das preparações incubadas com peçonha não respondeu ao CCh, apresentando potenciais de membrana médios de: $-80,9 \pm 1,9$ mV após 2 h de incubação com a peçonha; $-81,1 \pm 2,1$ mV após exposição ao CCh; e $-79,6 \pm 1,2$ mV após lavagem com solução Tyrode.

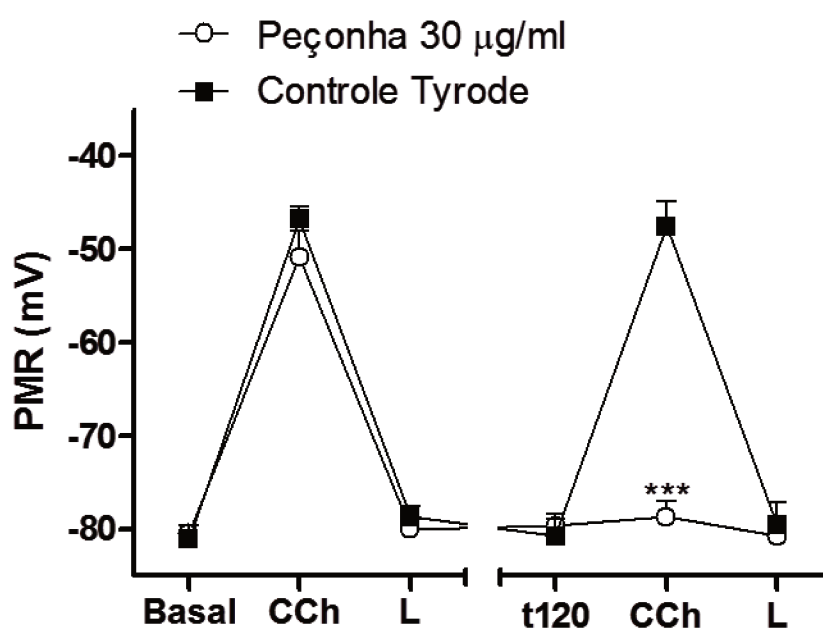


Figura 20. A peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml) bloqueia reversivelmente a resposta ao carbacol (CCh, 68,5 µM). A despolarização do potencial de membrana em repouso (PMR) da placa terminal de diafragma de camundongo causada pelo CCh foi avaliada na ausência de peçonha (primeira aplicação de CCh) e após incubação com Tyrode (controle) ou peçonha durante 2 h (segunda aplicação de CCh). A peçonha atenuou a despolarização à segunda aplicação de CCh. L = três lavagens com solução Tyrode sem droga e peçonha. Os pontos representam a média $\pm$ DP (n = 6; ***p<0,001 comparado ao controle Tyrode).

Buscando observar os efeitos da peçonha sobre a liberação espontânea de ACh, foram avaliadas a amplitude e a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) de preparações NFD incubadas com diferentes concentrações de peçonha (1-10 $\mu\text{g/ml}$) por 30 min (Fig. 21). Adotou-se 30 min de incubação pois experimentos preliminares mostraram que a menor concentração de peçonha usada (1 $\mu\text{g/ml}$) causava seus efeitos dentro deste período. Concentrações menores que 1 $\mu\text{g/ml}$ não produziram efeito dentro de 60 min de incubação. Antes da incubação com a peçonha, todos os grupos apresentaram padrões semelhantes de frequência e amplitude de seus PPTM, sem presença de diferença significativa quando comparados com o grupo controle (incubado apenas com solução Tyrode). A amplitude média dos PPTM também não apresentou diferença significativa entre os grupos: $1,73 \pm 0,52$ mV no grupo controle; $1,70 \pm 0,69$ mV com 1 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha; $1,76 \pm 0,56$ mV com 3 $\mu\text{g/ml}$; e $1,74 \pm 0,65$ mV 10 $\mu\text{g/ml}$.

De forma geral, a incubação com peçonha provocou diminuição na frequência dos PPTM de forma dependente da concentração e do tempo, sem alterações significativas nas suas amplitudes. Após 10 min de incubação, a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ aboliu completamente os PPTM. Concentrações menores causaram diminuição na frequência dos PPTM proporcional à concentração de peçonha: 3 $\mu\text{g/ml}$ reduziram significativamente PPTM com amplitude de 1,5 a 2,2 mV, ao passo que 1 $\mu\text{g/ml}$ reduziu apenas aqueles com 1,5 a 1,8 mV. A amplitude média dos grupos foi: $1,72 \pm 0,70$ mV no grupo controle; $1,69 \pm 0,81$ mV com 1 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha; e $1,62 \pm 1,1$ mV com 3 $\mu\text{g/ml}$. Já após 20 min de incubação, nenhum PPTM foi observado na incubação com 3 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha, mas houve redução na frequência com 1 $\mu\text{g/ml}$ (PPTM entre 1,5 e 2,2 mV). Neste período, a amplitude média dos PPTM de cada grupo foi: $1,71 \pm 0,74$ mV no grupo controle e $1,48 \pm 0,94$ mV com 1 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha. Por fim, com 30 min de incubação, todos os PPTM também foram abolidos com 1 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha.

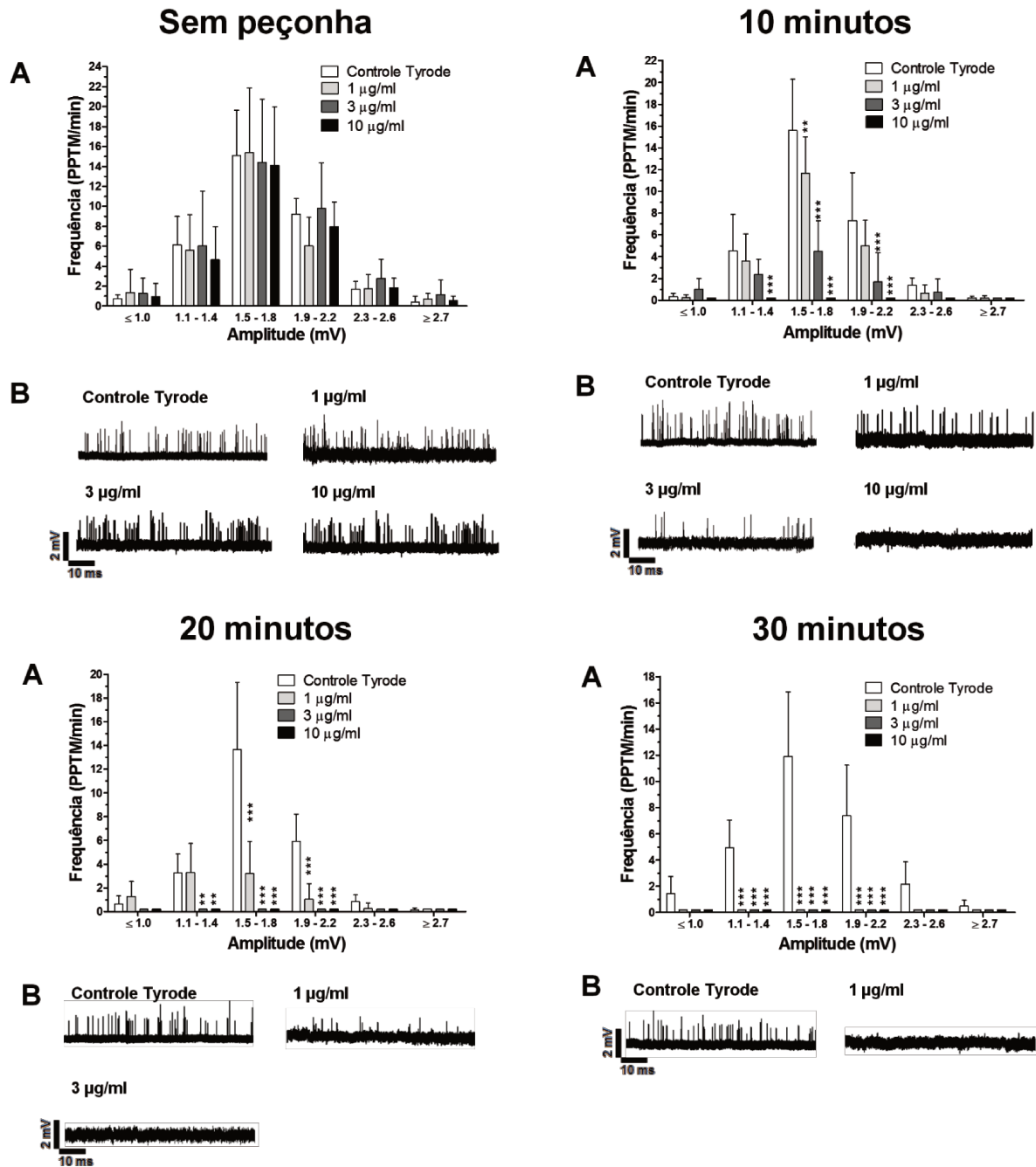


Figura 21. Potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) de preparações NFD de camundongo antes e após incubação (10, 20 e 30 min) com a peçonha de *M. surinamensis* (1-10 µg/ml). **(A)** Relação entre frequência (PPTM/min) e amplitude (mV) dos PPTM registrados na placa terminal das preparações imersas em solução Tyrode a 37 °C. As colunas representam a média $\pm$ DP ($n = 6$). **(B)** Registros eletrofisiológicos representativos de cada condição: controle com solução Tyrode sozinha e 1, 3 e 10 µg/ml de peçonha. Note que após 30 min não houve PPTM na presença da peçonha – a redução nos PPTM foi progressiva ao longo dos 30 min.

4.4. Potencial de ação composto em nervo ciático isolado de camundongo

Nervos ciáticos de camundongo foram isolados, incubados com peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml) e seus potenciais de ação composto (PAC) foram registrados (Fig. 22). A concentração de peçonha foi escolhida por ser a maior adotada nos experimentos em preparações NFD. Durante 60 min de incubação com peçonha, nenhuma alteração na amplitude dos PAC foi observada, com valores semelhantes aos do grupo controle (incubado apenas com solução Tyrode). Após este período, os nervos ciáticos foram submetidos a um protocolo de estímulo pareado: séries repetidas de dois estímulos, de forma que em cada repetição, o intervalo entre estímulos foi reduzido em 1 ms. A incubação com a peçonha não afetou a amplitude dos PAC durante este protocolo quando comparado ao do grupo controle.

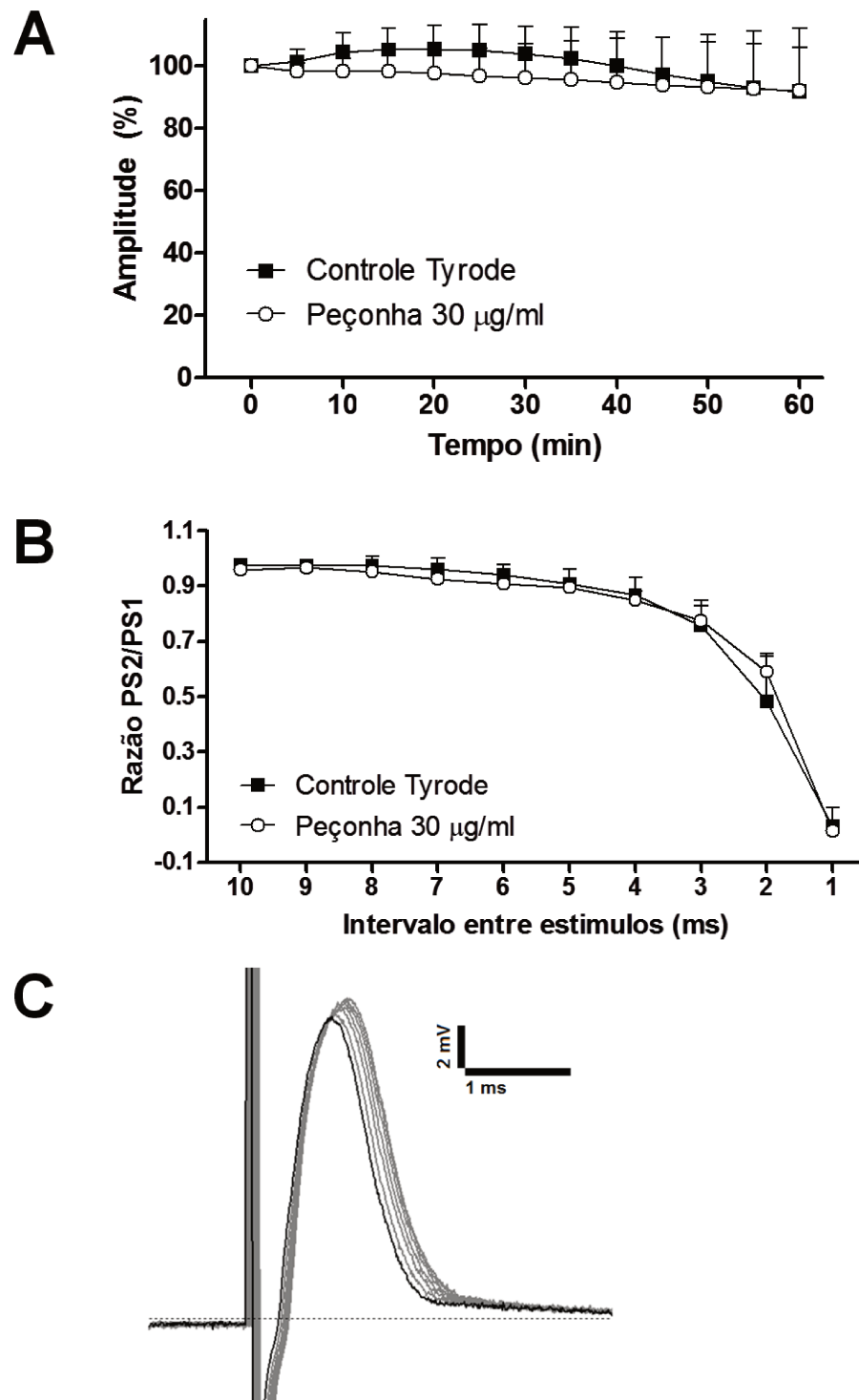


Figura 22. Ausência de efeito da peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml) sobre o potencial de ação composto de nervo ciático isolado de camundongos. A ausência de efeito nos parâmetros deste potencial indica que a peçonha não afetou os canais de K^+ e Na^+ neuronais. **(A)** Amplitude (% da amplitude basal) dos potenciais de ação durante 1 h de incubação com a peçonha ou com solução Tyrode sozinha. **(B)** Razão da amplitude do primeiro e segundo potencial de ação (PS2/PS1) durante estimulação pareada e sua relação com a duração do intervalo entre estímulos. Dados obtidos após 1 h de incubação com peçonha e na ausência de peçonha. **(C)** Registros dos potenciais de ação durante 1 h de incubação com a peçonha. Os pontos em **(A)** e **(B)** representam a média $\pm$ DP ($n=6$).

4.5. Ensaios miográficos em preparação biventer cervicis de pintainho

Preparações biventer cervicis (BC) de pintainhos foram incubadas com solução nutritiva Krebs e submetidas à estimulação indireta (estímulo de nervo). A resposta contrátil foi avaliada durante 1 h de incubação na presença da peçonha de *M. surinamensis* (0,1–30 $\mu\text{g/ml}$) ou na sua ausência (controle Krebs, controle negativo) (Fig. 23).

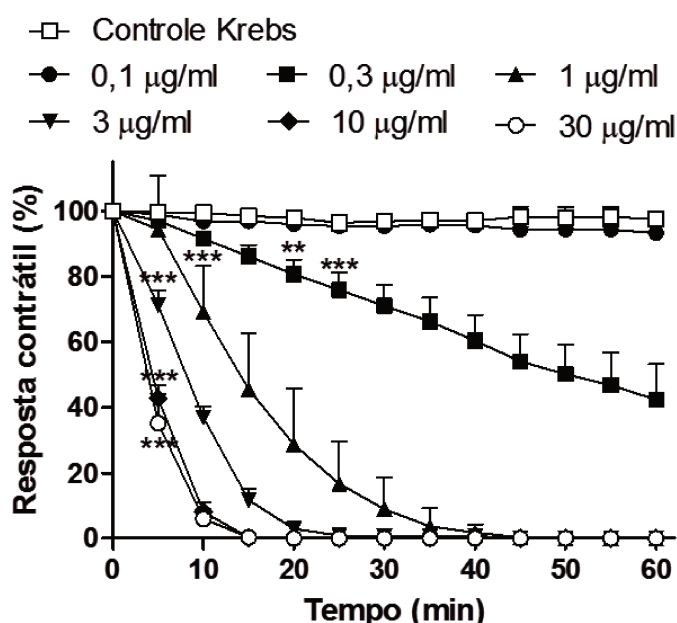


Figura 23. Bloqueio neuromuscular causada pela peçonha de *M. surinamensis* em preparações biventer cervicis (BC) de pintainho (estimulação indireta). As preparações controle foram incubadas com solução Krebs sozinha a 37 °C. Os pontos representam a média $\pm$ DP ($n = 6$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao controle Krebs para pontos deste intervalo em diante).

A peçonha produziu bloqueio neuromuscular dependente de tempo e concentração. A menor concentração capaz de reduzir a resposta contrátil foi 0,3 $\mu\text{g/ml}$, tornando-se significativo a partir de 20 min de incubação (comparado ao controle Krebs). Todas as concentrações $> 0,3 \mu\text{g/ml}$ causaram bloqueio total dentro de 1 h de incubação. A concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ atenuou as respostas contráteis a partir de 10 min de incubação, ao passo que concentrações maiores levaram < 5 min

para produzir seus efeitos. As duas maiores concentrações (10 e 30 $\mu\text{g/ml}$) produziram bloqueio neuromuscular com cinética semelhante, sem apresentar diferença significativa entre si em nenhum intervalo analisado (a cada 5 min do início da incubação). Nenhuma concentração de peçonha promoveu facilitação da resposta contrátil prévia ao bloqueio neuromuscular.

Os registros miográficos relativos a estes experimentos (Fig. 24) mostram que não houve alteração na linha de base durante a incubação com as diferentes concentrações de peçonha. Antes do início da incubação com a peçonha e ao seu término, foram avaliadas as respostas contraturantes à ACh (1 mM), à CCh (20 μM) e ao KCl (40 mM), na ausência de estímulo elétrico. A comparação da amplitude das contraturas antes e após a incubação com peçonha mostra que houve redução (com 0,1 e 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha) e desaparecimento (com 1–30 $\mu\text{g/ml}$) das contraturas em resposta a ACh e CCh. Por outro lado, a resposta contraturante ao KCl não foi alterada. Ao fim de cada contratura, as preparações foram lavadas três vezes com solução Krebs fresca, livre de peçonha para avaliar a reversibilidade do bloqueio neuromuscular. Os registros miográficos mostram que a lavagem foi incapaz de reverter o bloqueio neuromuscular por completo, e não se observou qualquer retorno das respostas contráteis nas preparações incubadas com 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha.

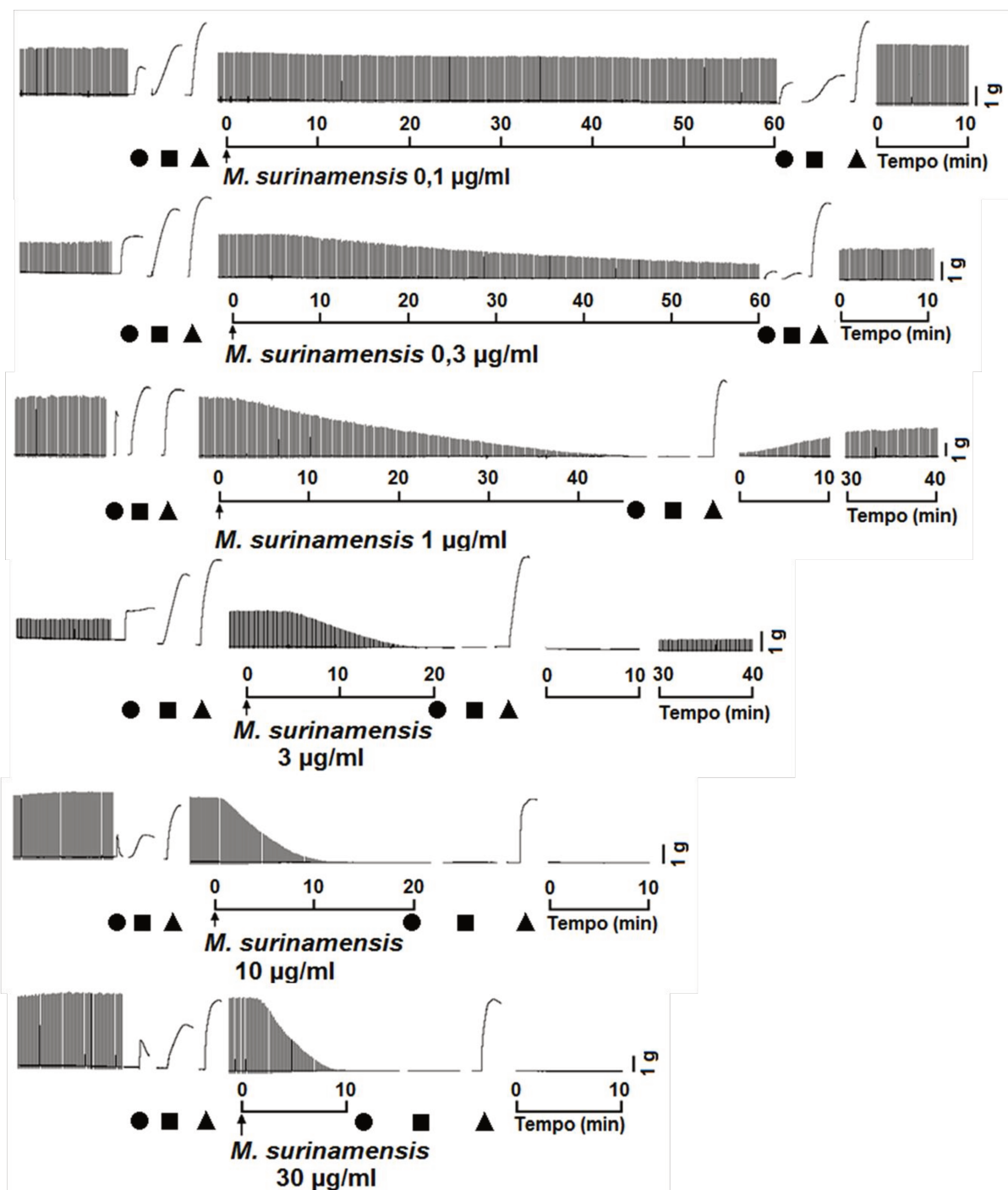


Figura 24. Registro miográfico das preparações BC de pintainho (estimulação indireta) incubadas com a peçonha de *M. surinamensis* por até 1 h a 37 °C. Após 1 h de incubação (0,1 e 0,3 µg/ml) ou bloqueio neuromuscular total (3-30 µg/ml), as preparações foram lavadas com solução Tyrode para avaliar a reversão do bloqueio. Foram avaliadas as atividades contraturantes em resposta a 1 mM de ACh (●), 20 µM de CCh (■) e 40 mM de KCl (▲) antes e após a incubação com peçonha. Os traçados são representativos de n= 6 para cada condição.

A análise quantitativa das contraturas em resposta a ACh, CCh e KCl mostrou que a incubação com peçonha reduziu de forma concentração-dependente a resposta contraturante à ACh e ao CCh, mas não interferiu na resposta ao KCl (Fig. 25). As contraturas após 1 h de incubação apenas com solução Krebs (controle negativo) não apresentaram diferença significativa quando comparadas com as realizadas antes do protocolo de incubação (resposta basal): as amplitudes das contraturas em resposta a ACh, CCh e KCl foram, respectivamente, $98,2 \pm 5,6\%$, $102,7 \pm 3,2\%$ e $102,0 \pm 7,2\%$ da resposta basal. As contraturas em resposta à ACh foram reduzidas para $67,4 \pm 15,5\%$, $22,3 \pm 24,2\%$ e $1,5 \pm 3,7\%$ do basal após incubação com 0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha, respectivamente. Já as contraturas em resposta ao CCh foram reduzidas para $37,9 \pm 33,9\%$ e $10,4 \pm 10,9\%$ do basal após incubação com 0,1 e 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha, respectivamente. Concentrações $\geq 3 \mu\text{g/ml}$ aboliram as contraturas em resposta à ACh, ao passo que a resposta contraturante ao CCh foi abolida por concentrações $\geq 1 \mu\text{g/ml}$. As contraturas em resposta ao KCl observadas durante a incubação com peçonha foram: $91,2 \pm 18,2\%$ (com 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha); $91,1 \pm 5,8\%$ (0,3 $\mu\text{g/ml}$); $102,2 \pm 8,1\%$ (1 $\mu\text{g/ml}$); $110,6 \pm 11,4\%$ (3 $\mu\text{g/ml}$); $114,4 \pm 7,1\%$ (10 $\mu\text{g/ml}$); e $99,3 \pm 17,1\%$ (30 $\mu\text{g/ml}$) da resposta basal.

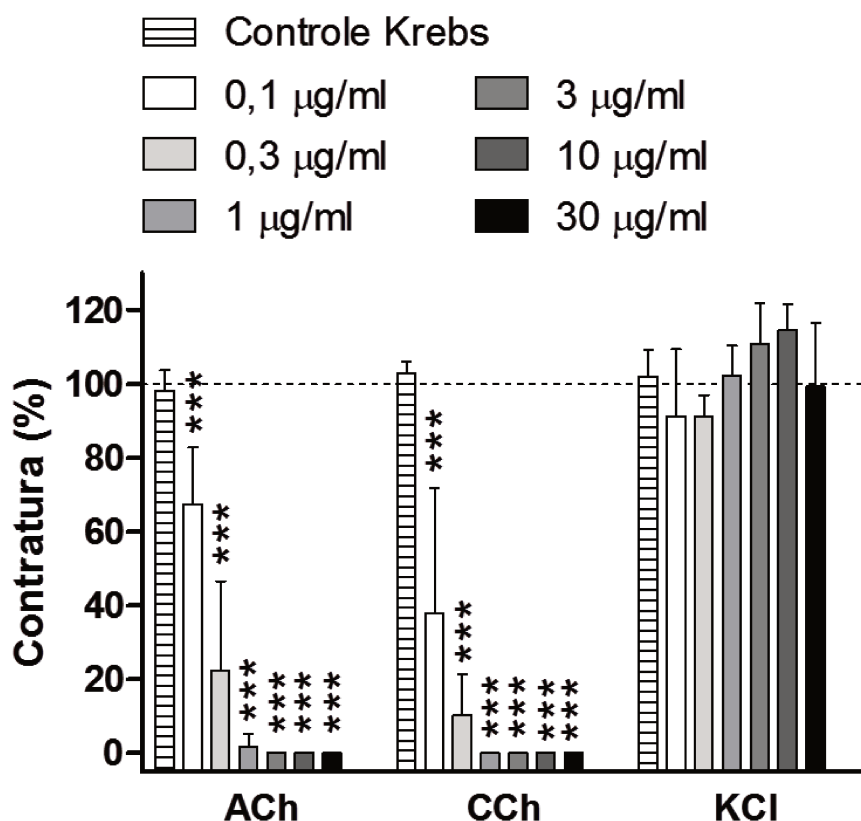


Figura 25. Contraturas das preparações BC de pintainho incubadas com a peçonha de *M. surinamensis* (0,1-30 µg/ml) em resposta a 1 mM de acetilcolina (ACh), 20 µM de carbacol (CCh) e 40 mM de KCl. As contraturas são expressas como porcentagem (%) da resposta basal (antes da incubação de peçonha). As colunas representam a média $\pm$ DP (n=6; ***p<0,001 comparado ao controle com Krebs – 100%).

A análise quantitativa mostra que a lavagem não foi capaz de reverter completamente o bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha (0,3–30 µg/ml) (Fig. 26). Não se observou qualquer reversão significativa com as três maiores concentrações (3, 10 e 30 µg/ml). A concentração de 1 µg/ml foi capaz de produzir bloqueio neuromuscular total, o qual foi apenas parcialmente revertido pela lavagem. A lavagem ainda foi ineficaz em reverter o bloqueio parcial produzido por 1 h de incubação com 0,3 µg/ml de peçonha, já que as respostas contráteis antes e após a lavagem não apresentam diferença significativa.

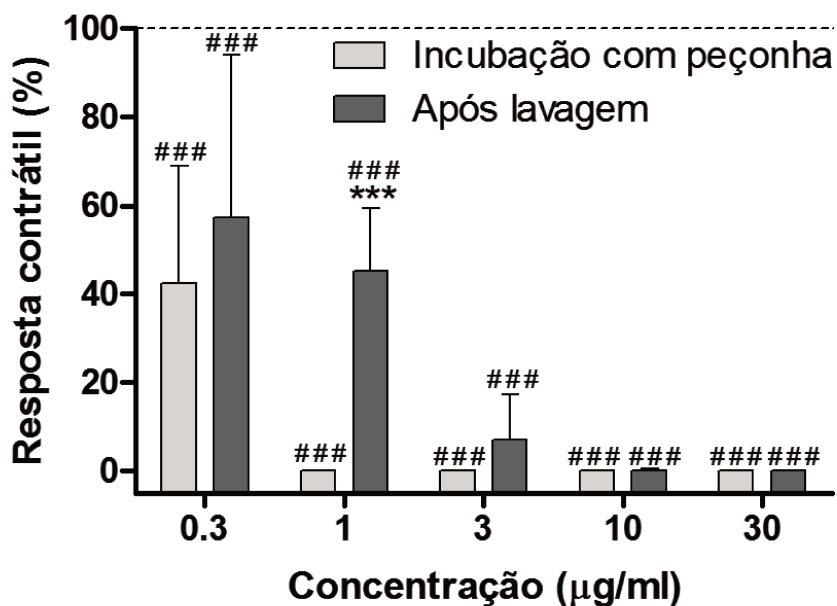


Figura 26. Reversibilidade por lavagem do bloqueio neuromuscular causada pela peçonha de *M. surinamensis* em preparações BC de pintainho. As preparações foram lavadas com solução Krebs após 1 h de incubação (0,3 µg/ml) ou após bloqueio total (1-30 µg/ml). As colunas representam a média $\pm$ DP (n = 6). ***p<0,001 comparado à resposta contrátil com peçonha sozinha; ###p<0,001 comparado às respostas contráteis antes da adição de peçonha (100%).

A análise histológica qualitativa mostrou que a maior concentração de peçonha testada não causou miotoxicidade em preparações BC (Fig. 27) já que a maioria das células conservaram estrutura íntegra, perfil poligonal, núcleo periférico e sem lesão à microscopia de luz.

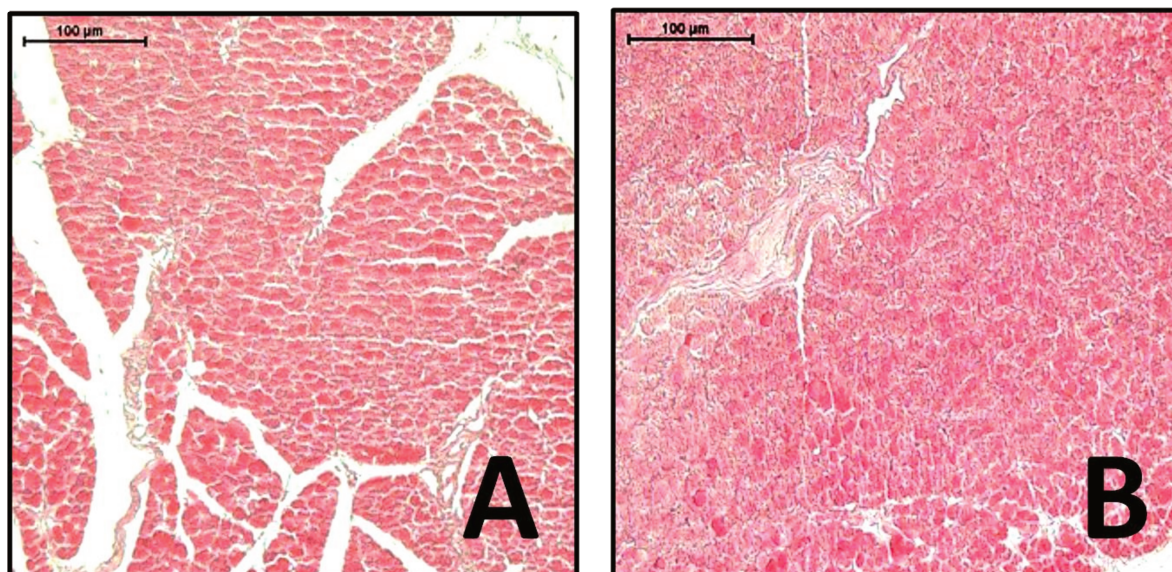


Figura 27. Análise morfológica de preparações BC incubadas com solução Krebs sozinha (controle, A) e com a peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml; B). A incubação com peçonha não causou lesões morfológicas características da miotoxidade. Coloração HE. Aumento de 20x. Barra = 100 µm.

O efeito da peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml) também foi avaliado em preparações BC estimuladas diretamente (estímulo de músculo) (Fig. 28). Nessas condições, a incubação com a peçonha por 1 h não alterou a resposta contrátil quando comparada ao controle negativo (preparações estimuladas diretamente e incubadas apenas com solução Krebs).

Assim como em preparações NFD, a reversibilidade do bloqueio neuromuscular em resposta ao aumento da oferta de ACh também foi avaliada em preparações BC. Neo ou 3,4-DAP, quando adicionados ao banho imediatamente após o bloqueio total por 1 µg/ml de peçonha, reverteram o bloqueio parcialmente e de forma transitória; esta reversão transitória foi seguida por diminuição da resposta contrátil até o bloqueio total ser reestabelecido (Fig. 29).

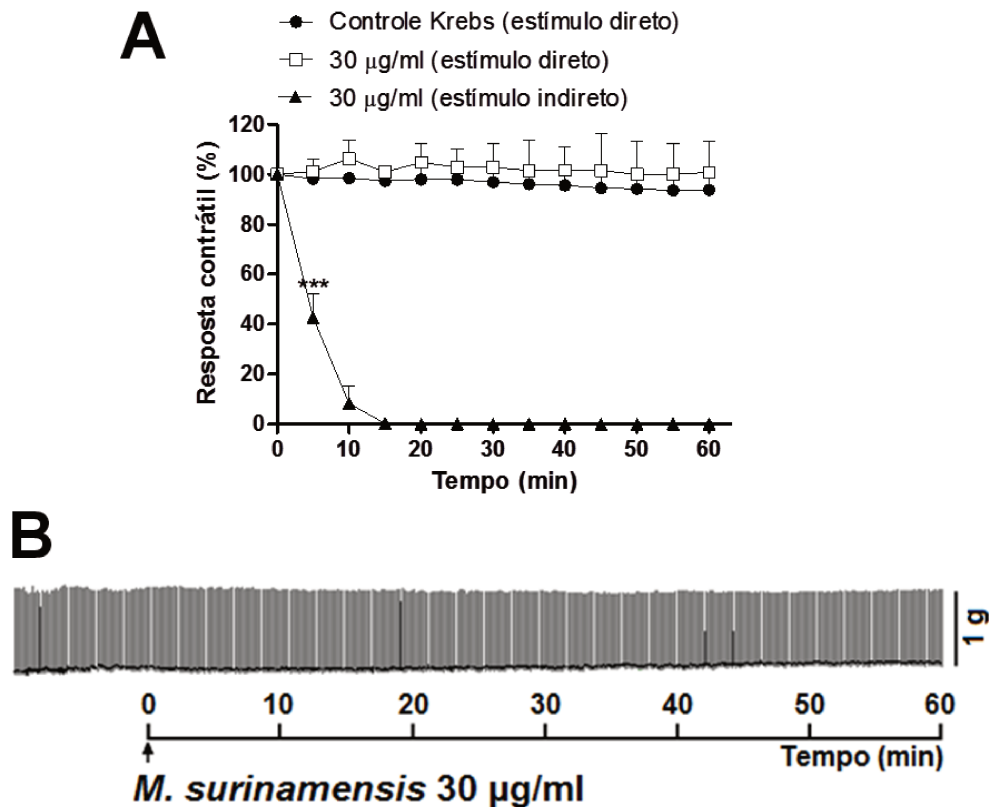


Figura 28. Ausência de efeito da peçonha de *M. surinamensis* sobre a atividade contrátil de preparações BC de pintainho durante estimulação direta. (A) Valores médios da resposta contrátil (%) das preparações durante incubação com solução Krebs sozinha (controle, estímulo direto) ou peçonha de *M. surinamensis* (30 µg/ml, estímulo direto ou indireto) durante 1 h a 37 °C. Os pontos representam a média $\pm$ DP (n = 6; ***p<0,001 deste intervalo em diante comparado à estimulação direta). **(B)** Registro miográfico representativo na presença de peçonha.

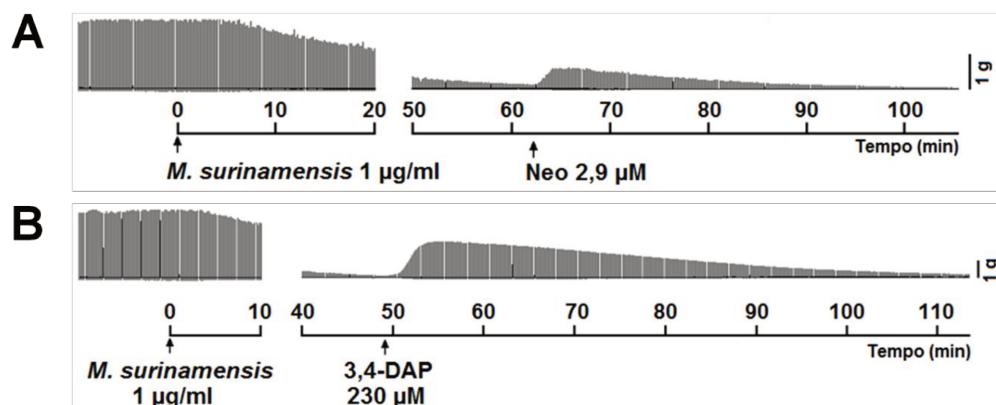


Figura 29. Registros miográficos de preparações BC de pintainho incubadas com peçonha (1 µg/ml) até bloqueio neuromuscular total, seguido de reversão parcial e transitória por neostigmina (Neo, 2,9 µM; A) ou 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP, 230 µM; B). Os registros são representativos de n=6 para cada condição.

A Tabela 1 mostra os tempos necessários para as diferentes concentrações de peçonha produzirem 50%, 90% e 100% de bloqueio neuromuscular em preparações NFD de camundongo e BC de pintainho. Pode-se observar que as diferentes preparações neuromusculares apresentaram diferente sensibilidade ao bloqueio pela peçonha. Concentrações ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ produziram bloqueio total em preparações BC, ao passo que apenas concentrações ≥ 10 $\mu\text{g/ml}$ levaram as preparações NFD ao bloqueio total. Por outro lado, a maior concentração testada (30 $\mu\text{g/ml}$) produziu 50%, 90% e 100% de bloqueio em tempos estatisticamente semelhantes entre as duas preparações. Análises estatísticas adicionais revelaram que os tempos de 50% e 90% de bloqueio produzido por 3 $\mu\text{g/ml}$ em preparações BC e 10 $\mu\text{g/ml}$ em NFD foram semelhantes. Os tempos de 50% de bloqueio produzidos por 1 $\mu\text{g/ml}$ em BC e 10 $\mu\text{g/ml}$ em NFD também não foram diferentes entre si.

Tabela 1. Tempos de 50% (t_{50}), 90% (t_{90}) e 100% (total) de bloqueio neuromuscular em preparações BC de pintainho e NFD de camundongo incubadas com a peçonha de *M. surinamensis*.

Peçonha ($\mu\text{g/ml}$)	Preparação BC			Preparação NFD		
	t_{50} (min)	t_{90} (min)	Total (min)	t_{50} (min)	t_{90} (min)	Total (min)
0,1	-	-	-	-	-	-
0,3	$40 \pm 7^{\#}$	-	-	-	-	-
1	14 ± 2	26 ± 7	~ 45	-	-	-
3	8 ± 2	15 ± 2	~ 40	-	-	-
10	5 ± 2	9 ± 2	~ 15	9 ± 5	$20 \pm 5^*$	~ 30
30	4 ± 2	8 ± 2	~ 15	3 ± 2	7 ± 5	~ 15

Os valores representam a média $\pm$ DP ($n = 6$; $*p < 0,05$ comparado à preparação BC). $^{\#}n=4$ já que duas preparações não atingiram 50% de bloqueio após 1 h de incubação com a peçonha.

A Tabela 2 apresenta os valores de reversão do bloqueio produzido pela peçonha através de lavagem e aumento na oferta de ACh (pela adição de Neo ou 3,4-DAP). Enquanto que a lavagem não causou reversão (com 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha) ou apenas reversão parcial (com 0,3-3 $\mu\text{g/ml}$) do bloqueio em preparações BC, nas preparações NFD houve reversão completa, até mesmo com incubação prolongada por 1 h após bloqueio total ser atingido com 30 $\mu\text{g/ml}$. Já as reversões

causadas por Neo e 3,4-DAP foram transitórias e de amplitude semelhante entre as duas preparações.

Tabela 2. Reversão do bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha de *M. surinamensis* em preparações BC de pintainho e NFD de camundongo.

Método de reversão	Peçonha (µg/ml)	Reversão da resposta contrátil (%)	
		Preparação BC	Preparação NFD
Lavagem repetida Após bloqueio total ou 60 min de incubação com peçonha	0,3	57,3 ± 36,7%	-
	1	45,1 ± 17,4%	-
	3	6,9 ± 11,0%	98,2 ± 10,0%*
	10	0 ± 0%	99,5 ± 14,21%*
	30	0 ± 0%	94,2 ± 17,6%*
Após 60 min de bloqueio total	30	-	95,1 ± 17,4%
Neo (2,9 µM) Após bloqueio total	1	28,5 ± 7,8%, transitório	-
	10	-	29,5 ± 14,4%, transitório
3,4-DAP (230 µM) Após bloqueio total	1	62,5 ± 17,4%, transitório	-
	10	-	60,6 ± 27,4%, transitório

Métodos de reversão: Lavagem com solução Tyrode livre de peçonha ao final de 1 h de incubação (0,3 µg/ml em BC e 3 µg/ml em NFD), imediatamente após bloqueio total (1-30 µg/ml em BC e 10-30 µg/ml em NFD) e após bloqueio total mantido por 1 h (30 µg/ml em NFD); adição de neostigmina (Neo, 2,9 µM) ou de 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP, 230 µM) imediatamente após bloqueio total. Os valores representam a média ± DP (n = 6; *p<0,05 comparado à preparação BC).

4.6. Embriotoxicidade em zebrafish

Ovos de zebrafish com 2 hpf (horas pós-fertilização) foram incubados por 4 h com diferentes concentrações de peçonha de *M. surinamensis* (3-1000 µg/ml), 4 mg/ml de 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA; controle positivo) ou apenas água de aquário (controle negativo). Após este período, as larvas e embriões foram lavados e realocados em poços contendo apenas água de aquário, a fim de avaliar se os efeitos são revertidos quando os animais não estão mais expostos à peçonha e 3,4-DCA. A mortalidade dos embriões e larvas foi avaliada durante a incubação com 3,4-DCA ou peçonha, em 1, 2, 3, 4 dpf (dias pós-fertilização), e após lavagem, em 7 dpf (Fig. 30). A 3,4-DCA é agente irritante de membranas não específico e inibidor

metabólico, já demonstrado por causar mortalidade em embriões e larvas de zebrafish [137].

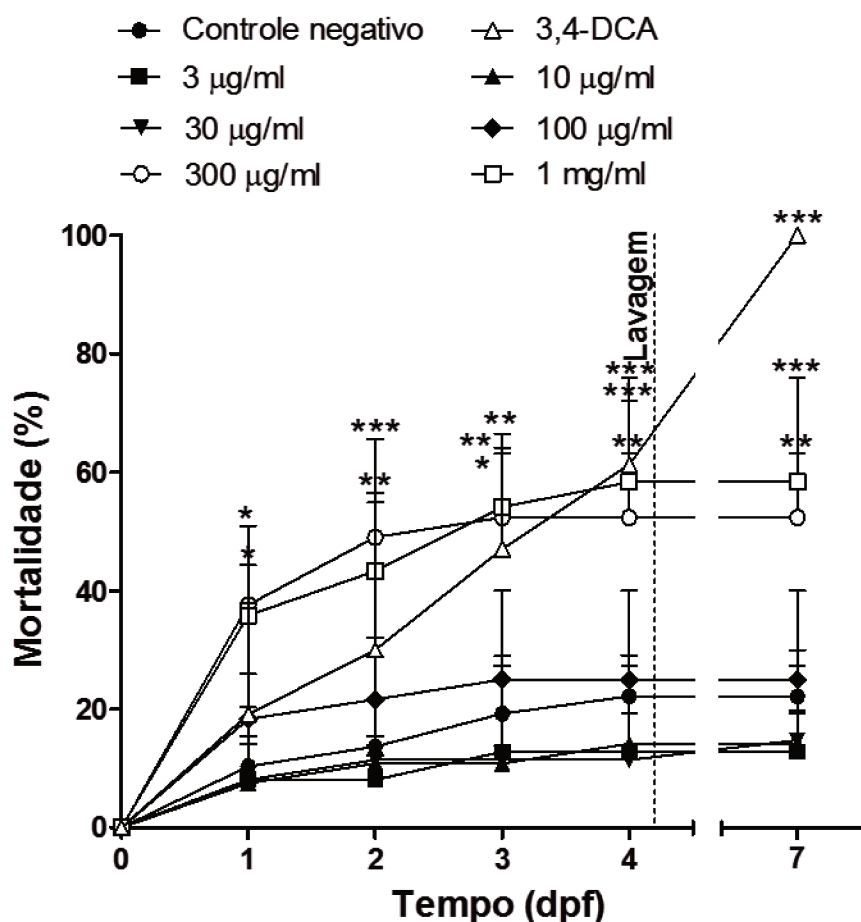


Figura 30. Efeito da peçonha de *M. surinamensis* (3-1000 µg/ml) sobre a mortalidade de embriões (até 2 dpf) e larvas (a partir de 3 dpf) de zebrafish em relação aos dias pós-fertilização. O controle negativo foi incubado apenas com água de aquário. O controle positivo foi incubado com 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA, 4 mg/ml). Após 4 dpf, as larvas foram lavadas e incubadas apenas com água de aquário, para nova avaliação em 7 dpf. Cada ponto representa a média ± DP (n = 30; *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 comparado ao controle negativo).

O grupo controle negativo apresentou mortalidade de: 10,3 ± 10,0% dos zebrafish em 1 dpf; 13 ± 15,2% em 2 dpf; 19,3 ± 9,7% em 3 dpf; 22,2 ± 6,9% em 4 dpf; e 22,2 ± 7,9% em 7 dpf. A 3,4-DCA causou mortalidade de forma tempo-dependente, tornando-se significativamente diferente do grupo controle em 3 dpf (morte de 47,0 ± 17,2% dos zebrafish). A mortalidade em 4 dpf subiu para 61,3 ±

10,8%. Mesmo após a remoção dos zebrafish do meio contendo 3,4-DCA, em 7 dpf todos os peixes estavam mortos.

Apenas as duas maiores concentrações de peçonha testadas (300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) produziram mortalidade significativamente diferente do grupo controle negativo. Na incubação com 300 $\mu\text{g/ml}$, observou-se mortalidade de: $37,6 \pm 6,7\%$ dos zebrafish em 1 dpf; $49,0 \pm 16,5\%$ em 2 dpf; $52,4 \pm 10,8\%$ em 3 dpf; e $52,4 \pm 10,8\%$ em 4 dpf. Já na incubação com 1 mg/ml de peçonha, as taxas de mortalidade foram de: $35,8 \pm 15,1\%$ em 1 dpf; $43,3 \pm 11,5\%$ em 2 dpf; $54,2 \pm 12,3\%$ em 3 dpf; e $58,3 \pm 17,6\%$ em 4 dpf. Após a lavagem dos zebrafish, em 7 dpf, não se observou morte de mais nenhum peixe. Não houve diferença significativa entre as taxas de mortalidade observadas com as duas concentrações.

Ao comparar as curvas de mortalidade em 1, 2, 3, 4 e 7 dpf (Fig. 31), observa-se que o efeito não foi tempo-dependente. A maior taxa de mortalidade ocorreu em até 1 dpf, com menos novas mortes no decorrer dos dias seguintes de incubação. Isso foi reforçado pela falta de diferença significativa entre os diferentes dias avaliados (1-4 dpf).

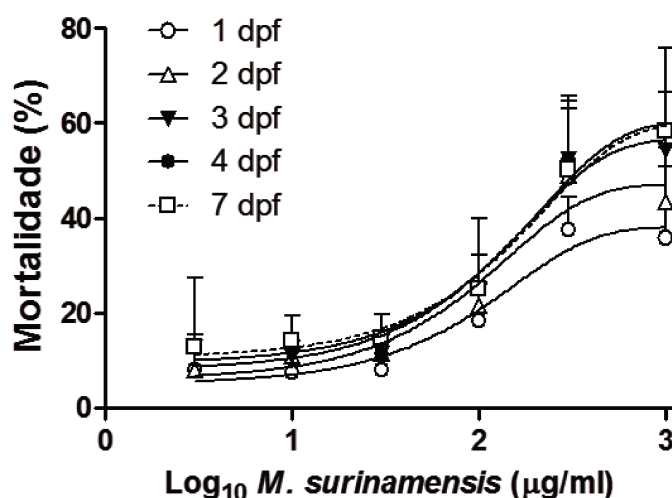


Figura 31. Curvas da mortalidade de embriões (até 2 dpf) e larvas (a partir de 3 dpf) de zebrafish incubados com a peçonha de *M. surinamensis* (3-1000 $\mu\text{g/ml}$). Os embriões foram incubados com a peçonha imediatamente após fertilização dos ovos e a mortalidade foi avaliada a cada dia pós-fertilização (dpf). Após 4 dpf, as larvas foram lavadas e incubadas apenas com água de aquário, para nova avaliação em 7 dpf. Os pontos representam a média $\pm$ DP ($n = 30/\text{intervalo}$ e concentração). Não houve diferença significativa entre os períodos ($p < 0,05$).

A taxa de eclosão dos ovos de zebrafish também foi avaliada (Fig. 32). Em 4 dpf, todos os ovos sobreviventes do grupo controle negativo já haviam eclodido, assim como aqueles incubados com as duas menores concentrações de peçonha (3 e 10 $\mu\text{g/ml}$). A concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram a maioria dos seus ovos eclodidos em 4 dpf, sem diferença significativa quando comparadas ao grupo controle. Já as concentrações de 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ causaram redução na eclosão dos ovos para $79,6 \pm 17,0\%$, $73,33 \pm 20,8\%$ e $44,4 \pm 9,6\%$, respectivamente. Após lavagem e reincubação dos zebrafish apenas com água de aquário, em 7 dpf, todos os ovos dos grupos incubados com peçonha estavam eclodidos. O grupo controle positivo incubado com 3,4-DCA mostrou redução na taxa de eclosão em 4 dpf. Já em 7 dpf, a 3,4-DCA havia causado morte de todos os peixes, com seus ovos eclodidos ou não.

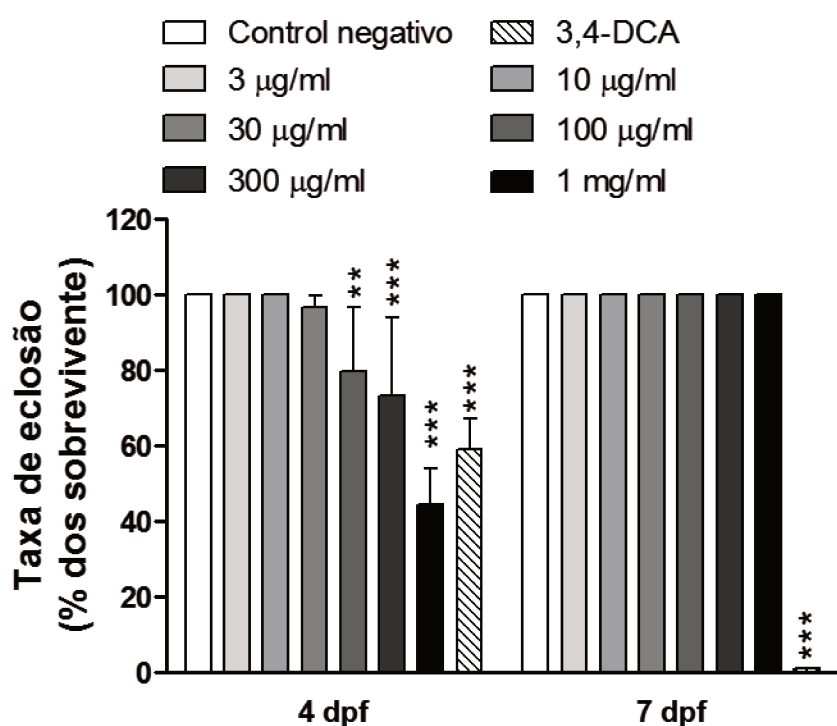


Figura 32. Taxa de eclosão dos ovos de zebrafish em 4 e 7 dias pós fertilização (dpf), durante incubação com a peçonha de *M. surinamensis* (3-1000 $\mu\text{g/ml}$). O controle negativo foi incubado apenas com água de aquário. O controle positivo foi incubado com 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA, 4 mg/ml). Após 4 dpf, as larvas foram lavadas e incubadas apenas com água de aquário, para nova avaliação em 7 dpf. As colunas representam a média $\pm$ DP ($n = 30$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao controle negativo).

A atividade locomotora dos zebrafish que já haviam eclodido de seus ovos (larvas) foi avaliada em 4 e 7 dpf (Fig. 33 e Tabela 3). Nos dois períodos avaliados, tanto no grupo controle negativo quanto nas diferentes concentrações de peçonha, as larvas apresentaram atividade locomotora variada. Em 7 dpf, após os zebrafish serem lavados e reincubados apenas com água de aquário, observou-se aumento da sua atividade locomotora.

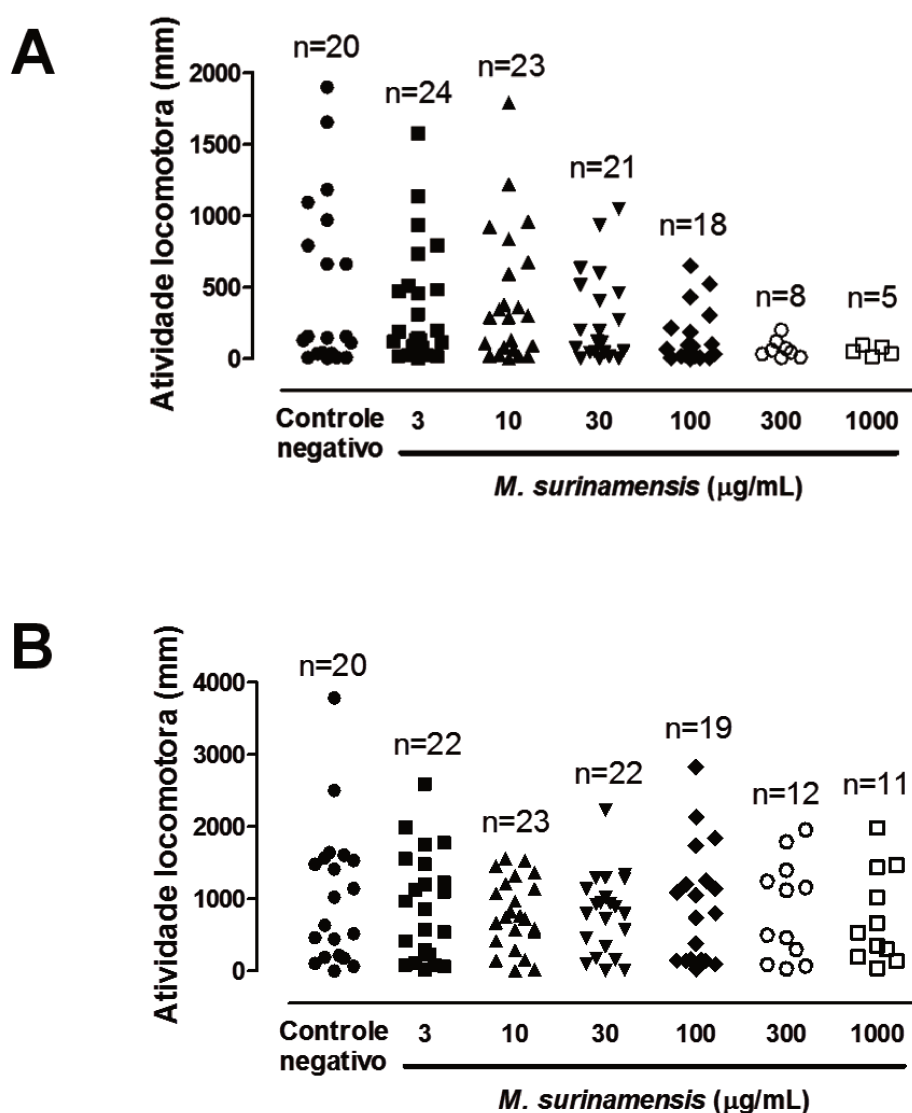


Figura 33. Atividade locomotora (mm de nado) de larvas de zebrafish incubadas com a peçonha de *M. surinamensis* (3-1000 µg/ml). A locomoção das larvas foi avaliada em 4 (A) e 7 (B) dias pós-fertilização (dpf). O controle negativo foi incubado apenas com água de aquário. Após 4 dpf, as larvas foram lavadas e incubadas apenas com água de aquário, para nova avaliação em 7 dpf. Os dados estão representados em gráfico de dispersão, onde cada ponto representa um peixe (n = 5-24).

Tabela 3. Atividade locomotora de larvas de zebrafish após incubação com peçonha de *M. surinamensis*.

Intervalo (dpf)	Peçonha (µg/ml)	Distância nadada (mm)	
		Range	Média ± DP
4	Controle (água)	4,3 – 1901,7	489,3 ± 595,4
	3	0,0 – 1579,0	362,1 ± 410,8
	10	3,5 – 1792,0	414,9 ± 463,9
	30	0,0 – 1048,0	276,4 ± 314,3
	100	0,0 – 650,8	154,5 ± 197,6
	300	8,6 – 201,0	69,5 ± 64,6
	1000	18,0 – 94,8	57,3 ± 31,8
7	Controle (água)	0,0 – 3784,0	1025,0 ± 956,7
	3	15,5 – 2590,0	911,0 ± 733,3
	10	3,6 – 1559,0	786,4 ± 485,4
	30	4,3 – 2228,0	790,1 ± 543,7
	100	30,9 – 2829,0	897,3 ± 805,5
	300	30,1 – 1959,0	842,7 ± 686,0
	1000	43,0 – 1985,0	742,4 ± 645,5

A atividade locomotora das larvas foi avaliada 4 dpf e 7 dpf, após incubação dos embriões com peçonha desde 1 dpf. Os valores médios ± DP são do número de larvas indicados na Fig. 33.

Os zebrafish incubados com as diferentes concentrações de peçonha, com 3,4-DCA (controle positivo) e com apenas água do aquário (grupo controle negativo) tiveram seu desenvolvimento avaliado em 1, 2, 3, 4 e 7 dpf (Fig. 34). Os embriões de todos os grupos apresentaram formação adequada dos somitos e desligamento da cauda ao córion em 1 dpf. As larvas do grupo controle negativo se mostraram bem pigmentadas, com coluna vertebral retilínea e postura com o dorso voltado para a superfície constantemente. A partir de 3 dpf, todos os peixes do grupo controle negativo se moveram imediatamente em resposta a suave toque com ponteira plástica na superfície da solução de incubação, sem contato com os peixes (atividade locomotora em resposta a estímulo mecânico). Por outro lado, os peixes incubados com 3,4-DCA mostraram desenvolvimento atípico, apresentando estatura reduzida, presença de edema (a partir de 2 dpf) e teratogênese.

Os zebrafish incubados com peçonha tiveram grau de desenvolvimento semelhante ao grupo controle negativo. Mesmo os peixes que ainda não haviam eclodido de seus ovos em 3 e 4 dpf mostraram pigmentação e estatura semelhantes aos das larvas já eclodidas do grupo controle negativo. No entanto, os zebrafish incubados com a maior concentração de peçonha estudada (1000 $\mu\text{g/ml}$) apresentaram microftalmia (redução patológica no tamanho do globo ocular), especialmente evidente em 7 dpf. Também foi observado que, na incubação com 30 e 100 $\mu\text{g/ml}$, os peixes apresentaram resistência em mover-se em resposta ao estímulo mecânico, sendo necessários mais dois ou três toques com a ponteira para que eles nadassem. Na incubação com 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ a atividade locomotora em resposta ao estímulo mecânico foi completamente abolida. Durante a incubação com concentrações de 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha (até 4 dpf), notou-se também que parte das larvas já eclodidas apresentaram distúrbios de equilíbrio, mantendo-se com uma de suas laterais voltadas para a superfície. Após a lavagem do grupo incubado com 1000 $\mu\text{g/ml}$, em 7 dpf, os zebrafish que só então haviam eclodido apresentaram curvaturas de sua coluna em grau variado.

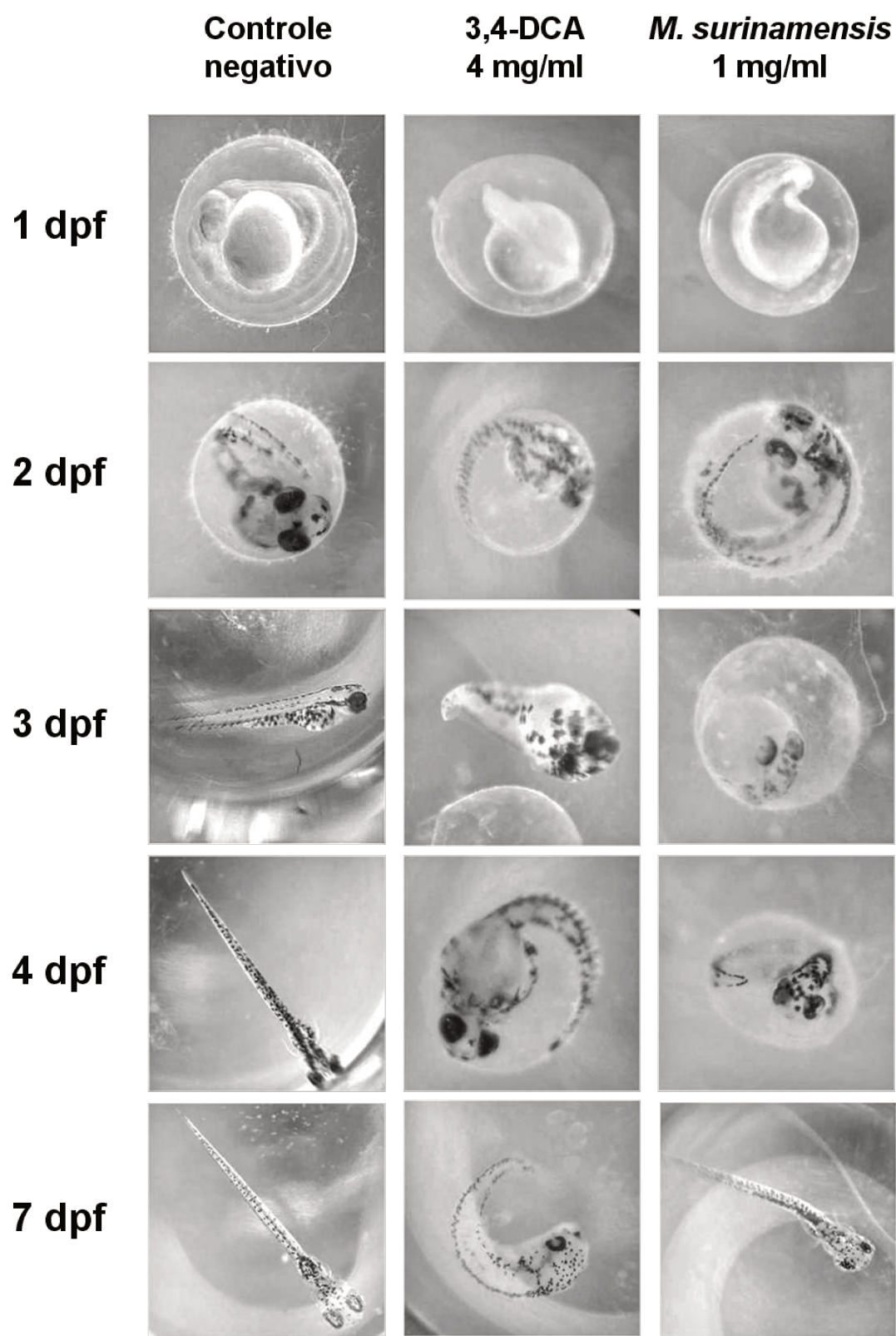


Figura 34. Imagens representativas dos embriões e larvas de zebrafish incubadas com a peçonha de *M. surinamensis* (1 mg/ml), 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA, 4 mg/ml; controle positivo) ou apenas com água de aquário (controle negativo). Após 4 dpf, as larvas foram lavadas e incubadas apenas com água de aquário, para nova avaliação em 7 dpf.

4.7. Cardiotoxicidade em coração semi-isolado de barata

A frequência cardíaca do coração semi-isolado de baratas foi avaliada durante 30 min após aplicação de solução salina (controle negativo), 10 µg da peçonha de *M. frontalis* (controle positivo) ou 100 µg da peçonha de *M. surinamensis* (Fig. 35). Experimentos preliminares foram feitos para escolher as quantidades das peçonhas utilizadas, nos quais se observou que 10 µg foi a menor quantidade da peçonha de *M. frontalis* a afetar a frequência cardíaca. A quantidade da peçonha de *M. surinamensis* (100 µg) foi escolhida por ser a maior quantidade que não precipitou quando diluído em 10 µl de água (volume utilizado neste ensaio). O grupo controle negativo não mostrou alterações na frequência cardíaca, apresentando 53 ± 8 e 55 ± 5 batimentos por minuto (bpm) antes e após 30 min de incubação, respectivamente. O tratamento a peçonha de *M. surinamensis* também não causou alterações na frequência cardíaca, quando comparado com o grupo controle negativo. Já a incubação com a peçonha de *M. frontalis* causou redução progressiva da frequência cardíaca, sendo significativamente diferente do controle negativo a partir de 6 min de incubação com a peçonha. Em três das seis baratas avaliadas, os batimentos cardíacos foram completamente abolidos. Em duas das seis baratas avaliadas, observou-se recuperação dos batimentos cardíacos após 25 min de incubação com a peçonha de *M. frontalis*.

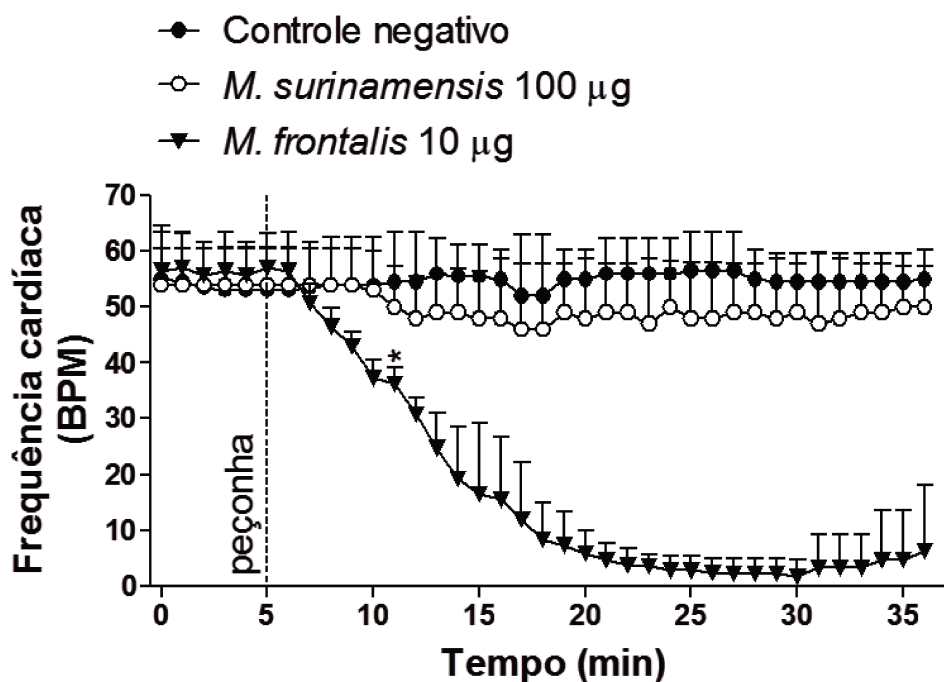


Figura 35. Frequência cardíaca (batimentos por minuto, bpm) de coração semi-isolado de barata na presença de salina (controle negativo) e peçonha de *M. surinamensis* (100 µg) ou *M. frontalis* (10 µg, controle positivo). A peçonha foi adicionada após 5 min de registro basal (período de estabilização) dos batimentos cardíacos. Os pontos representam a média $\pm$ DP (n=6; *p<0,05 deste intervalo em diante em relação ao controle negativo).

5. DISCUSSÃO

O envenenamento por *Micrurus* spp. é caracterizado por manifestações de neurotoxicidade, sendo a paralisia neuromuscular a mais proeminente. Diversos estudos já mostraram que a neurotoxicidade observada nos acidentes com humanos pode ser reproduzida em modelos animais *in vivo* [68, 74, 138] e *in vitro* [71, 74, 75, 109, 131, 139-143]. Os resultados da presente investigação confirmam este padrão no sentido de reproduzir em preparações isoladas parte da neurotoxicidade vista no envenenamento clínico pela *M. surinamensis* [121].

Investigamos a neurotoxicidade da peçonha de *M. surinamensis* usando preparações *in vitro* de NFD de camundongo e BC de pintainho que, historicamente, tem sido as duas preparações mais empregadas no estudo das peçonhas de cobras corais. No entanto, a maioria das cobras corais se alimenta de vertebrados que não são aves ou mamíferos, tais como serpentes, anfisbenas, peixes filiformes, cecílias, lagartos, e de invertebrados como onicóforos [144]. Assim, os achados farmacológicos observados nas preparações NFD e BC podem não refletir a real especificidade dos componentes destas peçonhas [14, 49]. Por isso, para ir além destes modelos tradicionais, investigamos também o efeito desta peçonha em dois modelos pouco usados com estas peçonhas até o momento: embriões e larvas de zebrafish *in vivo* e coração semi-isolado de barata *in vivo*. Apesar de aves e mamíferos não representarem a presa natural das cobras corais, as preparações isoladas destes vertebrados ainda são bastante úteis para estudar a neurotoxicidade observada em humanos e para avaliar a capacidade neutralizante de antivenenos contra o bloqueio neuromuscular causado por estas serpentes e por elapídeos de modo geral [145, 146].

5.1. Efeitos sobre preparações de camundongo *in vitro*

Em preparações NFD de camundongo, a peçonha de *M. surinamensis* causou bloqueio neuromuscular dependente de concentração e tempo. Enquanto que na concentração de 10 µg/ml a peçonha de *M. surinamensis* produziu 50% e 90% de bloqueio em respectivamente 9 ± 5 min e 20 ± 5 min, nesta mesma concentração as peçonhas de outras espécies causaram semelhantes bloqueios

em: ~11 min (50%) e ~24 (90%, *M. altirostris*) [139]; 26 ± 3 min (50%) e ~58 min (90%, *M. laticollaris*) [142]; 16 ± 5 min (50%) e 36 ± 6 min (90%, *M. lemniscatus lemniscatus*) [131]; ~39 min (50%) e ~75 min (90%, *M. nigrocinctus*) [109]; e 62 ± 4 min (50%) e ~100 min (90%, *M. pyrrhocryptus*) [140]. A comparação do tempo necessário para peçonha de *M. surinamensis* produzir bloqueio com os dados de outras cobras corais sugere uma potência maior que a das outras espécies.

5.1.1 A relevância da miotoxicidade

O bloqueio neuromuscular causado por peçonhas ofídicas não elapídicas pode estar relacionado a uma mistura de ações neurotóxicas e miotóxicas [147-151]. Em preparações neuromusculares *in vitro*, a miotoxicidade pode levar à contratura muscular uma vez que a lesão do sarcolema causa a perda de sua permeabilidade seletiva, resultando em influxo desordenado de Ca^{2+} e, assim, hipercontração dos miofilamentos [104, 152]. Apesar da miotoxicidade ter sido observada com as peçonhas de diversas cobras corais em camundongos [105-107], este fenômeno não é um fator importante no bloqueio neuromuscular causado por estas peçonhas [6] e também não é uma manifestação clínica relevante no envenenamento humano [4, 13]. Os resultados obtidos aqui com a peçonha de *M. surinamensis* corroboram com esses achados uma vez que: **(1)** não houve elevação da linha de base nas preparações NFD (resposta normalmente associada à contratura muscular [109]); **(2)** não houve alteração da contratilidade muscular em preparações sob estimulação elétrica direta; **(3)** não houve alteração no potencial de membrana em repouso; e **(4)** a análise histológica não revelou lesões musculares características de miotoxicidade.

A conclusão de que a peçonha de *M. surinamensis* não produz miotoxicidade em preparações NFD corrobora com trabalhos anteriores onde ela não apresentou ação miotóxica em camundongos [112, 118], embora outras investigações relataram baixa atividade miotóxica para esta peçonha [106, 113]. Considerando que a peçonha utilizada nesse trabalho foi coletada de serpentes encontradas no Brasil, enquanto que a utilizada por Gutiérrez *et al.* [106] foi proveniente da Colômbia e apresentou ação miotóxica, esta diferença na atividade miotóxica pode estar relacionada à variação regional na composição da peçonha.

De qualquer forma, o conjunto de evidências apresentado acima indica que o bloqueio neuromuscular observado com esta peçonha é mediado por neurotoxinas que, conforme discutido adiante, são essencialmente pós-sinápticas.

5.1.2. Ausência de ação pré-sináptica mediada por β -neurotoxinas

A neurotoxicidade das peçonhas de cobras corais é mediada por uma combinação de bloqueio dos receptores nicotínicos pós-sinápticos (ação das 3FTx α -neurotóxicas) e a inibição da liberação de acetilcolina dos terminais nervosos pré-sinápticos (ação das PLA₂ β -neurotoxinas) [4, 6, 49]. A presença de 3FTx e PLA₂ na peçonha de *M. surinamensis* já foi confirmada por análise proteômica [38, 116] e transcriptômica da glândula de veneno [36]. A análise transcriptômica da glândula de veneno de *M. surinamensis* indicou a presença de 12 PLA₂ com sítio catalítico conservado (com os seguintes resíduos de aminoácidos: H48, D49, Y52 e D101) e, por tanto, provavelmente providas de ação enzimática [36]. No entanto, trabalhos anteriores já demonstraram tanto a presença [33, 113, 115], quanto a ausência [114, 119] de atividade PLA₂ nesta peçonha. Conforme demonstrado aqui, não foi observada atividade PLA₂ *in vitro*. Uma vez que também foram identificadas PLA₂ cataliticamente inativas no transcriptoma da glândula de veneno [36], a ausência de atividade enzimática que observamos não pode representar ausência de PLA₂, tão pouco ausência da ação β -neurotóxica. Outras peçonhas de cobras corais já se mostraram ativas na junção neuromuscular mesmo na ausência de Ca²⁺ extracelular, íon essencial para a atividade PLA₂ [131, 139]. Desta forma, a participação dos mecanismos α - e β -neurotóxicos no bloqueio neuromuscular de preparações NFD foi investigada por diferentes protocolos miográficos e eletrofisiológicos.

As PLA₂ β -neurotóxicas produzem bloqueio neuromuscular por mecanismo trifásico, caracterizado pelo aumento transitório na liberação de ACh seguido pela sua abolição [52, 55]. A fase de facilitação do bloqueio trifásico pode ser observada em preparações NFD através de aumento transitório na amplitude de respostas contráteis ou na frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) [50, 98, 131, 142]. Nas concentrações estudadas, a peçonha de *M. surinamensis* não produziu nenhum destes efeitos, indicando ausência de β -

neurotoxinas. Pelo contrário, a peçonha reduziu a frequência dos PPTM de forma dependente de concentração e tempo, sem afetar sua amplitude de forma significativa. Peçonhas contendo predominantemente α -neurotoxinas, assim como α -neurotoxinas isoladas, causam redução na amplitude dos PPTM prévia ao desaparecimento [78, 79, 153], efeito que pode estar relacionado ao bloqueio progressivo dos receptores nicotínicos pós-juncionais.

Ao contrário dos nossos achados, uma redução na amplitude dos PPTM foi observada em preparações NFD de ratos incubadas com a peçonha de *M. surinamensis* [120]. Nos nossos resultados, a maior diminuição da amplitude dos PPTM ocorreu após 20 min de incubação com 1 μ g/ml de peçonha, com redução para 87% da amplitude média observada no grupo controle negativo (sem diferença significativa). Além disso, nossos resultados também diferem em tempo de abolição dos PPTM. Observamos completo desaparecimento dos PPTM após 30 e 20 min de incubação das preparações de camundongos com 1 e 3 μ g/ml de peçonha, respectivamente. Por outro lado, os achados em ratos mostraram abolição dos PPTM somente após 47 min com 5 μ g/ml de peçonha. Assim sugerimos que as discrepâncias observadas entre nossos resultados e os achados em preparações de ratos decorrem de diferenças nos lotes de peçonha (origens geográficas diferentes) e na sensibilidade entre os dois modelos animais.

A estimulação tetânica de preparações NFD fornece outra abordagem para diferenciar efeitos α - e β -neurotóxicos. Na estimulação tetânica são aplicados estímulos de alta frequência no nervo frênico, promovendo liberação prolongada de ACh e, assim, contratura tetânica. Peçonhas e toxinas que apresentam ação β -neurotóxica inibem a liberação de ACh, levando ao relaxamento progressivo da contratura tetânica ao longo de cada série de estímulos (efeito chamado de desvanecimento tetânico ou *fade* tetânico) [154]. Este fenômeno geralmente não é visto com α -neurotoxinas. Durante estimulação tetânica, a peçonha de *M. surinamensis* aboliu a resposta contrátil, com cinética semelhante ao bloqueio neuromuscular observado durante estimulação indireta. Antes do bloqueio neuromuscular se estabelecer, observou-se pouca diminuição da contratura tetânica. Resultados similares foram obtidos com α -neurotoxinas isoladas, tais como a α -bungarotoxina de *Bungarus multicinctus* [155] e a mipartoxina-I de *Micrurus mipartitus* [79], e com a peçonha de *Micrurus pyrrhocryptus* cuja ação é

predominantemente pós-sináptica [140]. Mais uma vez, a evidência aponta uma ação predominantemente α -neurotóxica da peçonha de *M. surinamensis*. Vale reforçar que, apesar de discreta, ainda observamos diminuição na contração tetânica, especialmente com a menor concentração estudada (3 $\mu\text{g/ml}$). As α -neurotoxinas α -bungarotoxina, cobratoxina e erabutoxina *b* também mostram este mesmo efeito em baixas concentrações. Dois mecanismos foram propostos para explicar como essas toxinas providas apenas de ação α -neurotóxica conseguem reduzir a contração tetânica: por causarem bloqueio dos receptores nicotínicos pré-sinápticos (estes receptores normalmente estimulam a liberação de ACh do terminal nervoso através de um mecanismo de *feedback* positivo; seu bloqueio atenua esta estimulação) e/ou uma redução progressiva na margem de segurança da neurotransmissão (pelo bloqueio dos receptores nicotínicos pós-sinápticos) [156, 157].

Peçonhas elapídicas podem exercer seus efeitos β -neurotóxicos através de uma ação direta no axolema e a clivagem de proteínas associadas à liberação de ACh estocada em vesículas pré-sinápticas [49]. Dendrotoxinas isoladas das peçonhas de *Dendroaspis asgusticeps* e *D. polylepis* bloqueiam correntes de K^+ em preparações triangularis sterni de camundongos [158]. Por outro lado, a peçonha de *M. surinamensis* não afetou o potencial de ação composto (PAC) de nervo ciático isolado de camundongos, indicando ausência de efeito bloqueador sobre canais de Na^+ e K^+ , já que estes íons são os principais envolvidos no potencial de ação deste nervo. A peçonha também não modificou a amplitude de PAC durante estímulos pareados com intervalos diferentes entre si, indicando que a peçonha não interferiu na cinética de fechamento e abertura dos canais iônicos.

5.1.3. A ação pós-sináptica mediada por α -neurotoxinas

O antagonismo de receptores nicotínicos pós-sinápticos através da ação de α -neurotoxinas [54] é o principal mecanismo envolvido no bloqueio neuromuscular causado por peçonhas ofídicas neurotóxicas [3]. Uma maneira simples de avaliar este antagonismo é através da capacidade de uma peçonha ou toxina de atenuar a ativação destes receptores pelo carbacol (CCh), agonista seletivo dos receptores nicotínicos pós-sinápticos. Conforme mostrado aqui, a

peçonha aboliu a despolarização da placa terminal causada pelo CCh, indicando assim a presença de α -neurotoxinas na peçonha. Este achado está de acordo com resultados semelhantes obtidos com outras peçonhas de *Micrurus* [6] e com α -neurotoxinas como a mipartoxina-I, isolada da peçonha de *M. mipartitus* [79].

O antagonismo que as α -neurotoxinas exercem sobre receptores nicotínicos pós-sinápticos é de natureza competitiva e, portanto, pode ser revertido através do aumento da oferta de ACh através da inibição da acetilcolinesterase presente na fenda sináptica usando substâncias como neostigmina (Neo) [155, 159]. Este princípio é empregado na clínica para reverter o bloqueio neuromuscular causado por envenenamento elapídico de ação predominantemente pós-sináptica [160, 161], inclusive de *Micrurus* spp. [4, 76].

Experimentalmente, a reversão do bloqueio neuromuscular produzido por peçonhas de *Micrurus* tem sido investigada usando principalmente Neo e 3,4-DAP, duas drogas que aumentam a oferta de ACh na fenda sináptica [6]. A reversão causada por estes compostos tem sido avaliada para peçonhas de diversas espécies de *Micrurus*, tais como *M. altirostris* [139], *M. corallinus* [74], *M. dumerilii carinicauda* [162], *M. frontalis* [67, 71], *M. fulvius* [138], *M. lemniscatus* [131], *M. nigrocinctus* [109], *M. pyrrhocryptus* [140] e *M. spixii* [75]. Na maioria dos casos, a reversão é apenas parcial e transitória, sendo seguida por bloqueio total. Conforme mostrado aqui, o tratamento das preparações NFD com Neo e 3,4-DAP também resultou em reversão transitória do bloqueio causado pela peçonha de *M. surinamensis*. A transitoriedade deste bloqueio talvez seja reflexo da difusão da ACh para fora da fenda sináptica, levando à redução da sua concentração local e permitindo que as α -neurotoxinas desloquem o agonista do receptor e se liguem novamente aos receptores, restaurando assim o bloqueio.

Ao contrário da reversão parcial observada com Neo e 3,4-DAP, a lavagem das preparações reverteu completamente o bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha, mesmo após incubação prolongada depois do bloqueio total. Esses resultados indicam que as α -neurotoxinas se ligam fracamente aos receptores nicotínicos pós-sinápticos e que o intervalo de tempo decorrido depois do bloqueio total afeta nesta resposta. Este achado contrasta com os resultados com outras espécies para as quais a lavagem causou apenas reversão parcial, e.g., *M.*

spixii [75], ou nenhuma reversão [131, 139, 140, 162]. A completa reversão por lavagem do bloqueio produzido pela peçonha de *M. surinamensis* também tem sido observada para α -neurotoxinas de *Micrurus* como a mipartoxina-I de *M. mipartitus* [79] e a NXH8 de *M. corallinus* [81]. Este conjunto de dados corrobora, mais uma vez, com a hipótese de que o bloqueio neuromuscular causado pela *M. surinamensis* é mediado quase que exclusivamente pela ação de α -neurotoxinas.

5.2. Efeitos sobre preparações de pintainho *in vitro*

Assim como em preparações NFD de camundongos, a peçonha de *M. surinamensis* também produziu bloqueio neuromuscular dependente de concentração e tempo em preparações BC de pintainho. Com a peçonha de *M. surinamensis* (10 μ g/ml), o bloqueio de 90% foi atingido após 9 ± 2 min de incubação, ao passo que as peçonhas de outras espécies demoraram mais tempo ou não causaram este grau de bloqueio; os tempos de bloqueio para algumas espécies foram (no mesmo modelo experimental e concentração de peçonha): *M. altirostris* (~14 min) [139], *M. dissoleucus* (não causou bloqueio após 180 min) [141], *M. fulvius* (67 ± 3 min) [143], *M. laticollaris* (~24 min) [142], *M. lemniscatus* (13 ± 1 min) [131], *M. mipartitus* (~95 min) [141], *M. pyrrhocryptus* (40 ± 3 min) [140] e *M. tener* (31 ± 3 min) [143]. Quando comparamos o tempo necessário para bloqueio de 50%, também constatamos maior potência da peçonha de *M. surinamensis*. Enquanto nossos experimentos com a peçonha de *M. surinamensis* (10 μ g/ml) mostraram que o bloqueio de 50% foi atingido em 5 ± 2 min, o tempo necessário para outras espécies foi (no mesmo modelo experimental e concentração de peçonha): *M. altirostris* (~6 min) [139], *M. dissoleucus* (~180 min) [141], *M. fulvius* (~53 min) [143], *M. laticollaris* (11 ± 1 min) [142], *M. lemniscatus* (7 ± 1 min) [131], *M. mipartitus* (48 ± 6 min) [141], *M. pyrrhocryptus* (~17 min) [140] e *M. tener* (~15 min) [143]. Assim, como nas preparações NFD, esta peçonha parece ser mais potente que outras peçonhas de *Micrurus*.

Assim como nas preparações NFD, não foi observada miotoxicidade nas preparações BC incubadas com a peçonha. Novamente: **(1)** não houve elevação da linha de base nos experimentos miográficos; **(2)** não houve bloqueio neuromuscular durante estimulação direta do músculo biventer cervicis; e **(3)** a análise histológica

não revelou sinais de lesão muscular. Além disso, não houve diminuição na amplitude das contraturas em resposta ao KCl. A contratura em resposta ao KCl está relacionada à integridade do sarcolema, uma vez que a lesão da membrana causada por miotoxinas impacta na permeabilidade seletiva, reduzindo a despolarização em resposta a concentrações extracelulares suprafisiológicas de K^+ e, assim, na amplitude de sua contratura [163]. A ausência de miotoxicidade na preparação BC está de acordo com outros estudos mostrando que nesta preparação diversas peçonhas de cobras corais também não causam miotoxicidade, e.g., *M. altirostris*, *M. fulvius*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. pyrrhocryptus*, *M. spixii* e *M. tener* [131, 139, 141, 143]. Por outro lado, a miotoxicidade tem sido observada nesta preparação para as peçonhas de *M. dissoleucus* [141] e *M. dumerilii carinicauda* [162].

O bloqueio causado pela peçonha em preparações BC foi revertido por Neo e 3,4-DAP, indicando sua natureza competitiva reversível; o envolvimento de α -neurotoxinas foi confirmado pela capacidade da peçonha de abolir as contraturas causadas pela ACh e CCh exógenas. Estas características também têm sido relatadas para peçonhas e α -neurotoxinas de outros gêneros ofídicos [159, 164-166]. O bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha foi parcialmente revertido por lavagem, indicando que parte dos efeitos em preparações BC é irreversível; a porção irreversível pode estar relacionada à presença de α -neurotoxinas com alta afinidade pelos receptores nicotínicos e que não são facilmente removidos por lavagens. De fato, α -neurotoxinas que produzem bloqueio irreversível ou parcialmente reversível por lavagem têm sido caracterizadas das peçonhas de outros gêneros [164, 167, 168].

A incubação com a peçonha não causou efeito trifásico clássico das β -neurotoxinas (facilitação da resposta contrátil seguido de bloqueio neuromuscular), como ocorre com a peçonha de *M. mipartitus* [141], o que aponta para a provável ausência de β -neurotoxinas nesta peçonha (ver Discussão na seção anterior sobre o bloqueio em preparações NFD). Entretanto, tais toxinas têm sido caracterizadas de outras peçonhas de *Micrurus* e produzem bloqueio que é irreversível por lavagem, e.g., a PLA₂ pré-sináptica MiDCA1 de *M. dumerilii carinicauda* [50, 51] e a MsPLA2-I de *M. spixii* [95].

As preparações BC foram mais sensíveis ao bloqueio que as preparações NFD, necessitando de quantidades menores de peçonha para produzir bloqueio neuromuscular equivalente àquele observado em NFD. De fato, variação na sensibilidade entre preparações neuromusculares de aves e mamíferos já foi relatada para outras peçonhas de *Micrurus* [113, 139, 140, 142]. Esta diferença de sensibilidade provavelmente esteja relacionada a diferenças no padrão de inervação das duas preparações (monofocal em mamíferos e multifocal em aves) [169], a diferenças na distribuição e constituição dos receptores nicotínicos (presença de receptores nicotínicos extra-juncionais em aves) [145, 170, 171], e à seletividade das toxinas por diferentes espécies animais [164, 168, 172, 173]. Para uma revisão mais detalhada sobre as diferenças entre as duas preparações neuromusculares, ver Floriano *et al.* [6, 131], Ginsborg e Warriner [133], Chang e Tang [174] e Harvey e Marshall [175].

Em estudo anterior, Heluany Sobrinho [120] investigou as ações da peçonha de *M. surinamensis* em preparações BC. Assim como observado aqui, a peçonha causou bloqueio neuromuscular mediado predominantemente por α -neurotoxinas, com inibição das contraturas causadas pela ACh e reversão parcial do bloqueio pela Neo; também não causou bloqueio em preparações estimuladas diretamente. A peçonha foi menos potente que a amostra estudada aqui (80% de bloqueio em 18 ± 2 min com 10 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha, comparada com bloqueio total em ~ 15 min com a nossa peçonha). Por outro lado, diferentemente daquilo que observamos, houve aumento na contratura em resposta ao KCl. Outro resultado diferente dos nossos foi a presença de elevação da linha de base (contratura muscular), clássico indicativo de mionecrose. Este efeito foi inibido pelo bloqueio dos canais de Ca^{2+} com Mg^{2+} e por altas concentrações de Ca^{2+} na solução nutritiva. À época, estas ações foram atribuídas à presença de cardiotoxinas e PLA_2 . Entretanto, sabemos hoje que esta peçonha não contém cardiotoxinas e possui baixa ou nenhuma atividade PLA_2 [36, 38, 115]. A discrepância entre os resultados destes dois estudos pode refletir a variabilidade geográfica na composição destas peçonhas, conforme já demonstrado em estudo transcriptômico desta espécie [36].

5.3. Efeitos sobre embriões e larvas de zebrafish *in vivo*

Diversos novos modelos animais vêm sendo propostos como alternativas para o uso de mamíferos na pesquisa. Dentre eles, o zebrafish (*Danio rerio*) tem ganhado destaque por um conjunto de fatores: as proporções pequenas dos animais (3 a 4 cm na vida adulta) reduz o espaço necessário para manutenção e representa menos gastos; possuem alta atividade reprodutiva, produzindo centenas de ovos por casal de animais, que ainda possuem desenvolvimento embrionário independente da mãe e, assim, possível de ser acompanhado desde seu início [176]. Embriões de zebrafish são utilizados em estudos pré-clínicos para novas drogas e *screening* toxicológico durante o desenvolvimento devido à rápida absorção de substâncias e à sensibilidade aos efeitos adversos de uma grande variedade de substâncias com atividades farmacológicas e características físico-químicas diversas [134, 177-179]. O modelo se destaca pela facilidade na manipulação de grandes grupos de animais, possibilitando o *screening* de diversas substâncias simultaneamente [180].

De forma geral, ainda são poucas as descrições dos efeitos de peçonhas e toxinas ofídicas em modelos de zebrafish. Já foi mostrado que a administração endovenosa da peçonha de *Bothrops alternatus* promove necrose e inflamação em zebrafish adultos, marcada por alterações histológicas no fígado, rins, intestinos e brânquias [181]. Já a mutacitina-1, uma proteína lectina-like tipo C da peçonha de *Lachesis muta muta*, apresentou ação cardiotoxica em larvas de zebrafish com 5 dpf [182]. Também já foi mostrado que a toxina crotamina (*Crotalus durissus terrificus*) conjugada com rodamina B causou a morte de embriões de zebrafish (3 dpf) dentro de 10 min de incubação com concentrações a partir de 4 μ M. Concentrações menores que 1 μ M causaram malformação, retardo na eclosão dos ovos, decréscimo na função cardíaca e diminuição na atividade locomotora [183]. Por fim, já foram avaliados os efeitos da α -bungarotoxina, uma α -neurotoxina de *Bungarus multicinctus*, em embriões a partir de 1 dpf. A toxina causa a imobilização prolongada dos animais, sem retardar o seu desenvolvimento, nem expressar outros efeitos tóxicos significativos [184]. Este resultado confirma que o modelo é suscetível às ações α -neurotóxicas e, portanto, pode ser útil na avaliação da neurotoxicidade de peçonhas de cobras corais. Em trabalhos anteriores, a peçonha de *M. surinamensis* já se mostrou letal em peixes adultos das espécies *Gymnotus*

carapo e *Synbranchus marmoratus* [14], e quatro de suas α -neurotoxinas isoladas (Ms1, Ms3, Ms4 e Ms5) foram letais em *D. rerio* (= *Brachydanios rerio*) adultos [116]. Assim como a peçonha de outras cobras corais, as ações da peçonha de *M. surinamensis* sobre o desenvolvimento de zebrafish ainda não foram descritas.

Os resultados do presente estudo mostraram que a incubação com a peçonha causou taxas de mortalidade significativas apenas com as maiores concentrações estudadas (300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$). Essas concentrações não apresentaram diferença significativa entre si em nenhum dos períodos avaliados, indicando que possivelmente a atividade máxima para o parâmetro foi atingida. Em estudo piloto, avaliamos também os efeitos de uma faixa mais ampla de concentrações (0,01 – 3000 $\mu\text{g/ml}$; dados não mostrados). Concentração superior a 1 mg/ml apresentou dificuldade na diluição e precipitação da peçonha, o que acreditamos que pode impactar na sua absorção pelo zebrafish e, por tanto, não foi avaliada neste estudo.

A morte causada por peçonhas elapídicas é comumente relacionada ao bloqueio neuromuscular dos músculos acessórios da respiração, levando à asfixia [4]. Porém, nos estágios de desenvolvimento utilizados neste estudo, os zebrafish ainda realizam sua troca gasosa pela pele [185]. O mecanismo difere daquele dos animais adultos, que dependem da contração dos músculos craniais esqueléticos para auxiliar na respiração [186]. Além do mais, os resultados anteriores com camundongo e pintainho mostram predominância de ação α -neurotóxica pela peçonha de *M. surinamensis*. Neste contexto, a α -bungarotoxina já foi expressa em zebrafish através da microinjeção com seu mRNA, mostrando que produz paralisia dos animais desde a formação da primeira célula até 85 hpf, sem causar a sua morte [184]. Assim, o bloqueio do receptor nicotínico muscular não pode ser relacionado diretamente à letalidade observada.

A maior taxa de letalidade causada pela peçonha ocorreu dentro de 24 h do início da exposição à peçonha, sem causar aumento significativo na taxa de letalidade com o prolongamento da exposição. Por outro lado, a 3,4-DCA promoveu efeito tempo-dependente com a perda de todos os peixes, como esperado pelo seu mecanismo teratogênico conhecido [134, 187, 188]. Propomos duas explicações para a diminuição das mortes após 1 dpf: as toxinas envolvidas no efeito podem ser

menos estáveis, perdendo sua atividade ao longo da incubação em temperatura ambiente, como já foi observado com outras peçonhas [151]; ou a peçonha pode causar morte por interferir em fases do desenvolvimento entre 2 hpf e 1 dpf, mas não em fases mais tardias, como foi mostrado com outras substâncias [189, 190].

Projeto paralelo do nosso grupo de pesquisa investiga as ações de peçonhas de diferentes cobras corais sobre os mesmos parâmetros. Curiosamente, em nossos resultados preliminares (dados não apresentados) observamos taxas de letalidade diferentes entre as espécies: *M. spixii* (1 mg/ml) causou morte de $92 \pm 12\%$ em 1 dpf e de 100% em 2 dpf; já *M. dumerilii carinicauda* (1 mg/ml) possui efeito mais tardio, com mortalidade de $29 \pm 6\%$ em 1 dpf, $46 \pm 6\%$ em 2 dpf, $91 \pm 6\%$ em 3 dpf e 100% em 4 dpf. Estes achados somados aos resultados obtidos com *M. surinamensis* demonstram a variedade dos efeitos das peçonhas de cobras corais neste modelo experimental, com mecanismos farmacológicos ainda a serem esclarecidos.

Assim como em preparações NFD e BC, a peçonha de *M. surinamensis* causou bloqueio neuromuscular nos zebrafish. Diferentes parâmetros mostraram o efeito: inibição do nado em resposta ao estímulo mecânico, redução na taxa de eclosão dos ovos e diminuição na atividade locomotora e dificuldade no equilíbrio. O bloqueio neuromuscular já foi descrito anteriormente em zebrafish com a α -bungarotoxina [184], corroborando com nossos resultados. Após a lavagem dos zebrafish e incubação em ambiente livre de peçonha, os efeitos não foram mais observados, o que indica a reversibilidade por lavagem, como também ocorre em preparações NFD. No entanto, mesmo após a lavagem, os peixes apresentaram curvatura da sua coluna. Diversos trabalhos já demonstraram a importância do funcionamento adequado das junções neuromusculares durante o desenvolvimento embrionário para a formação de unidades contráteis e sinapses funcionais [191-194]. Sugerimos que o bloqueio neuromuscular prolongado causado durante a fase embrionário do zebrafish também pode impactar seu desenvolvimento.

Os zebrafish incubados com a peçonha de *M. surinamensis* apresentaram microftalmia. O mesmo efeito já foi observado na incubação com etanol e é proposto que ocorra por um conjunto de fatores: retardo no desenvolvimento, anormalidades no cristalino e redução da diferenciação das

células da retina [195]. Ainda são necessários mais estudos para avaliar a causa da microftalmia durante a incubação com a peçonha.

Por fim, a incubação com a peçonha também impactou o equilíbrio das larvas de zebrafish. Distúrbios de equilíbrio em peixes podem ser associados a efeitos sobre a linha lateral. A linha lateral é um sistema sensorial que se estende do ouvido até a cauda do peixe, composto por células ciliadas que detectam diferentes padrões do fluxo de água, permitindo a localização espacial, equilíbrio durante o nado e identificação de presas ou predadores [196]. A neurotransmissão desse sistema é mediada por glutamato e pelos receptores ionotrópicos de AMPA, NMDA e cainato [197, 198]. Já foram isoladas duas 3FTx da peçonha de *M. lemniscatus carvalhoi* capazes de interagir com receptores pré-sinápticos AMPA/cainato, resultando em aumento na liberação de glutamato por neurônios hipocámpais de ratos neonatos [199]. Outra 3FTx isolada da peçonha de *M. l. carvalhoi* demonstrou aumentar a liberação de glutamato em sinaptossomas cerebrocorticais de rato [200]. Com a exceção destes estudos, nada se sabe da interação de toxinas de cobrais corais com o sistema glutamatérgico em vertebrados e invertebrados.

5.4. Efeitos sobre coração semi-isolado de barata

Vertebrados e invertebrados apresentam processos fisiológicos distintos, especialmente no que diz respeito àqueles de importância vital. Desta forma, os efeitos de peçonhas também tendem a apresentar efeitos divergentes e distintos entre vertebrados e invertebrados [201]. A toxicidade de peçonhas e toxinas isoladas de serpentes elapídicas já foi avaliada em diferentes modelos de insetos. As peçonhas de *Dendroaspis viridis*, *Ophiophagus hannah* e diferentes espécies de *Naja* são tóxicas para larvas de mosca [202, 203]. As toxinas isoladas da peçonha de *Bungarus multicinctus*, α - e κ -bungarotoxinas, bloqueiam receptores nicotínicos neuronais de neurônios motores [204, 205] e a cardiotoxina da peçonha de *Naja mossambica* causa despolarização da membrana das células do músculo extensor tibiae de gafanhotos [206]. Por fim, a peçonha de *Naja oxiana* e *Naja kaouthia*, assim como diversas toxinas isoladas dessas peçonhas, apresentaram ação tóxica sobre baratas *Gromphadorhina portentosa* [207].

O coração semi-isolado de barata é um modelo pouco usado na toxilogia, mas que fornece informações farmacológicas importantes sobre uma variedade de aminas biogênicas. Um efeito cronotrópico positivo é observado com a administração de serotonina (principal modulador), dopamina, triptamina, sinefrina, octopamina e ACh, sendo que a dopamina exerce sua função provavelmente por ação neurogênica. A frequência cardíaca é reduzida com um análogo da xilamidina (antagonista de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}), reforçando a importância da via serotoninérgica para o sistema [201].

A cardiotoxicidade de peçonha de alguns artrópodes já foi avaliada em baratas [208, 209], no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos de peçonhas ofídicas sobre este modelo. No único trabalho a avaliar a ação de uma toxina ofídica, foi demonstrado que uma cardiotoxina da peçonha de *Naja naja atra* reduziu de forma concentração-dependente a frequência cardíaca de baratas *Gromphadorhina portentosa*, causando completa parada com após 12 min com uma concentração de 0,5 mM [210]. Não há estudos sobre a ação das peçonhas de cobras corais neste modelo.

Os resultados apresentados aqui mostram que a peçonha de *M. surinamensis* não alterou a frequência cardíaca das baratas, indicando que seus componentes, que são predominantemente 3FTx [36, 38, 116], não interagem com os receptores envolvidos na regulação cardíaca destes insetos. Corroborando com nossos resultados, já foi mostrado que algumas 3FTx isoladas, tais como neurotoxina II (da peçonha de *Naja oxiana*), e α -cobratoxina e WTX (ambas de *Naja kaouthia*) não são letais em baratas *Gromphadorhina portentosa*, mesmo em concentrações mil vezes superior à DL₅₀ em camundongos [207].

O fato da peçonha de *M. surinamensis* não ter afetado a função cardíaca tem pelo menos três explicações: **(1)** Apesar da diversidade de 3FTx nesta peçonha, é possível que ela não tivesse toxinas capazes de interagir com receptores específicos. Neste sentido, é importante reconhecer a grande diversidade de toxinas que compõem a família 3FTx e o fato de que nenhuma peçonha contém representativas de todas os grupos ou subfamílias desta família [44-48] – mesmo entre as espécies de *Micrurus* há variabilidade no seu conteúdo de 3FTx [9]; **(2)** É possível que a peçonha tivesse toxinas capazes de interagir com os

receptores em questão, mas isso não aconteceu por causa de uma alteração ou diferença estrutural nos receptores de inseto comparado, por exemplo, com os de vertebrados, ou especificamente, mamíferos; e **(3)** É provável que a ação cardíaca não tivesse nada a ver com as 3FTx, mas que estivesse vinculada a outro(s) componente(s) da peçonha. Especificamente, sugerimos que este componente seja a PLA₂. Em apoio a esta conclusão, mostramos que a peçonha de *M. frontalis*, que é rica em PLA₂ (ver Fig. 10) e contém β -neurotoxinas [38, 211, 212] exerceu marcante efeito cronotrópico negativo. Postulamos que este efeito bradicárdico está relacionado à presença de PLA₂ nesta peçonha, e que a peçonha de *M. surinamensis* estudada aqui não afetou o funcionamento cardíaco por estar destituída desta enzima.

Independentemente da explicação pela ausência de atividade cardíaca desta peçonha, os resultados mostram que este ensaio pode ser útil para realizar um *screening* rápido de toxinas que interagem com o sistema cardíaco de baratas. Isso pode ser particularmente útil durante processos de purificação quando há necessidade de ensaios rápidos para avaliar a atividade biológica das frações cromatográficas.

5.5. Considerações gerais

A serpente *M. surinamensis* se destaca dentre as demais cobras corais brasileiras por ser semi-aquática e a única a se alimentar exclusivamente de peixes [144]. A alimentação desta serpente já mostrou importante correlação com a letalidade de sua peçonha em diferentes modelos animais, com maior atividade em peixes [14]. Por outro lado, os resultados da presente investigação sugerem que a sensibilidade ocorreu na seguinte escala: camundongo > pintainho > zebrafish > barata. No entanto, deve-se considerar que utilizamos modelos variados *in vitro* e *in vivo* e, portanto, não é possível fazer uma comparação direta entre os modelos e nem tirar grandes inferências sobre a especificidade da peçonha. Além do mais, vale lembrar que a alimentação normal da *M. surinamensis* é predominantemente de peixes fracamente elétricos, tais como *Callichthys callichtys*, *Gymnotus carapo* e *Symbranchus marmoratus* [213-217], sendo as duas últimas espécies as que apresentaram alta suscetibilidade à peçonha [14]. Soma-se a isso que utilizamos

zebrafish nos estágios iniciais de vida, onde o bloqueio neuromuscular pode não causar morte por asfixia, conforme discutido na seção 5.3.

A peçonha de *M. surinamensis* é predominantemente constituída por 3FTx que inclui α -neurotoxinas [36, 38, 116] e estas α -neurotoxinas devem ter exercido papel fundamental na maioria das atividades observadas aqui nas preparações neuromusculares de camundongo e pintainho. O bloqueio neuromuscular reversível também foi observado em larvas de zebrafish, o que pode estar relacionado à ação de α -neurotoxinas. Não foram observados efeitos sobre o coração semi-isolado de baratas, modelo que parece sensível à ação de PLA₂, mas não de 3FTx [218, 219].

Também foram observados alguns efeitos que sugerem o envolvimento de outras toxinas que não α -neurotoxinas – efeitos como a reversibilidade apenas parcial à lavagem do bloqueio neuromuscular em preparações BC, assim como a morte de aproximadamente metade dos zebrafish incubados com 300 e 1000 μ g/ml. Estes resultados podem estar relacionados à ação de 3FTx que não sejam α -neurotoxinas. De fato, a diversidade de 3FTx elapídicas é grande, já tendo sido demonstrada atividade sobre os sistemas adrenérgica [220-223], dopaminérgica [224], GABAérgica [225-228], glutamatérgica [199, 200], muscarínica [220] e nicotínica neuronal [205, 229-232]. Como a farmacologia das peçonhas de cobras corais e suas toxinas isoladas ainda é pouco conhecida, é possível que sejam detectados novos mecanismos de ação em pesquisas futuras, especialmente ao se empregar modelos diferentes das clássicas preparações neuromusculares de NFD e BC.

A facilidade da reversão do bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha em preparações NFD, tanto por lavagem quanto pela incubação com Neo e 3,4-DAP, fornece indícios da estrutura de suas α -neurotoxinas. As α -neurotoxinas encontradas na peçonha de *M. surinamensis* podem ser divididas em duas classes: as de cadeia curta (com 4 pontes dissulfeto) e cadeia longa (5 pontes dissulfeto) [116]. Ambas as classes são providas de ação α -neurotóxica, porém as α -neurotoxinas de cadeia curta possuem menos afinidade pelos receptores nicotínicos e demonstram maior facilidade na reversibilidade de seu bloqueio [36]. Este achado pode indicar que as principais α -neurotoxinas envolvidas nas ações em

camundongo são de cadeia curta. Por outro lado, em preparações BC a reversibilidade foi apenas parcial. Já foi demonstrado que as α -neurotoxinas da peçonha de *M. surinamensis* possuem letalidade variada em camundongos e peixes, indicando diferentes afinidades entre modelos animais [116]. Desta forma, sugerimos que mais α -neurotoxinas de cadeias longas participam do bloqueio observado em preparações BC que em NFD, o que pode explicar em parte a dificuldade na sua reversão por lavagem.

A variabilidade dos efeitos da peçonha entre diferentes modelos animais pode também estar relacionada às diferentes afinidades das α -neurotoxinas para os subtipos de receptores nicotínicos. Receptores nicotínicos encontrados no sistema nervoso central e periférico apresentam um arranjo de cinco subunidades, sendo que até o momento foi descrita a existência de um total de 17 subunidades: $\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ e ϵ [233-235]. As α -neurotoxinas isoladas de peçonhas elapídicas apresentam afinidades diferentes entre os subtipos do receptor, mostrando, por exemplo, não se ligar à maioria dos subtipos neuronais [86, 236, 237]. Das α -neurotoxinas de *Micrurus*, a fulditoxina, toxina dimérica composta de duas α -neurotoxinas da peçonha de *M. fulvius*, representa um caso interessante uma vez que interage com vários tipos de receptores nicotínicos neuronais ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$), além de receptores nicotínicos de músculo esquelético [41]. Sabe-se também que os modelos animais utilizados nesse trabalho expressam diferentes subtipos de receptores nicotínicos. O músculo esquelético de camundongos adultos expressa o receptor $\alpha 2\beta 1\epsilon\delta$ [238, 239], ao passo que os receptores expressados em pintainhos são mais semelhantes aos dos encontrados no órgão elétrico de raias do gênero *Torpedo* ($\alpha 1\beta 1\gamma\delta$) [240]. Por outro lado, zebrafish expressam os receptores nicotínicos neuronais $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 7$, assim como o muscular $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ [241]. Baratas da espécie *Periplaneta americana* expressam tanto receptores nicotínicos sensíveis como resistentes à α -bungarotoxinas, porém ainda sem subunidades caracterizadas [242-244]. Assim como ocorre com a α -bungarotoxina, propomos que as α -neurotoxinas da peçonha de *M. surinamensis* também apresentem sensibilidades diferentes entre os subtipos de receptores nicotínicos.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste trabalho, concluímos que:

- a) A peçonha de *M. surinamensis* produz bloqueio neuromuscular reversível em preparações neuromusculares NFD de camundongos e BC de pintainho, assim como diminuição da atividade locomotora em embriões e larvas de zebrafish.
- b) Este bloqueio neuromuscular em preparações NFD e BC é mediado quase que exclusivamente por α -neurotoxinas atuando em receptores nicotínicos pós-sinápticos, o que está de acordo com a composição predominante de 3FTx desta peçonha mostrada por estudos proteômicos.
- c) A falta de atividade PLA₂ pode explicar a ausência de neurotoxicidade pré-sináptica (β -neurotoxinas), de ação sobre canais neuronais de Na⁺ e K⁺, e de mionecrose e cardiotoxicidade (em baratas).
- d) Zebrafish e baratas podem servir de modelos alternativos e simples para avaliar a neurotoxicidade de peçonhas de *Micrurus*, por estarem mais próximos à presa natural destas serpentes. O modelo de zebrafish pode ser útil para estudar a embriotoxicidade e desenvolvimento larval. Já o modelo do coração semi-isolado de barata pode ser útil para mostrar a presença de PLA₂ em peçonhas e fazer *screening* rápido de toxinas ofídicas.

7. REFERÊNCIAS

1. Castoe TA, Smith EN, Brown RM, Parkinson CL. 2007. Higher-level phylogeny of Asian and American coralsnakes, their placement within the Elapidae (Squamata), and the systematic affinities of the enigmatic Asian coralsnake *Hemibungarus calligaster* (Wiegmann, 1834). Zool J Linn Soc. 151(4): 809–831. DOI: 10.1111/j.1096-3642.2007.00350.x.
2. Warrell DA. 2004. Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America. In: Campbell J, Lamar WW (eds.) Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Volume 2. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 709–761.
3. Ranawaka UK, Laloo DG, da Silva HJ. 2013. Neurotoxicity in snakebite – the limits of our knowledge. PLoS Negl Trop Dis. 7(10): e2302. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002302.
4. Bucarety F, Capitani EM, Vieira RJ, Rodrigues CK, Zannin M, Silva Jr NJ, Casais-e-Silva LL, Hyslop S. 2016. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. Clin Toxicol (Phila). 54(3): 222–234. DOI: 10.3109/15563650.2015.1135337.
5. da Silva AM, da Fonseca WL, Valente Neto EA, Ferreira Bisneto P, Contreras-Bernal J, Sachett J, Monteiro WM, Bernarde OS. 2019. Envenomation by *Micrurus annellatus bolivianus* (Peters, 1871) coral snake in the western Brazilian Amazon. Toxicon. 166: 34–38. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.05.008.
6. Floriano RS, Schezaro-Ramos R, Hyslop S. 2020. Neuropharmacology of coralsnake (*Micrurus*) venoms. In: Aird SD, Silva Jr NJ (eds) Advances in Coralsnake Biology: with an Emphasis on South America. Eagle Mountain Publishing PLC, Eagle Mountain, UT, USA. pp. 535–635.
7. Oliveira L, Buononato MA, Zaher H. 2016. Glândulas cefálicas e aparato de veneno das cobras-corais. In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 217–241.
8. Campbell JA, Lamar WW. 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 188–233.
9. Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, Bénard-Valle M, Sanz L, Corrêa-Netto C, Núñez V, Alape-Girón A, Alagón A, Gutiérrez JM, Calvete JJ. 2016. Venoms of *Micrurus* coral snakes: evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. Toxicon. 122: 7–25. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.09.008.
10. Silva Jr NJ, Buononato MA, Feitosa DT. 2016. As cobras corais do novo mundo. In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 49–77.
11. Silva Jr NJ, Pires MG, Feitosa DT. 2016. Diversidade das cobras-corais do Brasil. In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 79–167.
12. Carvalho AV, David CF, Pessoa AM, Silva Jr NJ. 2014. Um estudo do rendimento do veneno de cobras corais brasileiras e seu uso na avaliação do soro antielapídico. Sci Med. 24(2): 142–149. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica> (Acesso em 27/07/2020).

13. Bucaretychi F, Capitani EM, Hyslop S. 2016. Aspectos clínicos do envenenamento causado por cobras-corais no Brasil. *In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil*. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 347–379.
14. Silva Jr NJ, Aird SD. 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 128(3): 425–456. DOI: 10.1016/s1532-0456(00)00215-5.
15. SINAN. 2019. Sistema de Informação de Agravos e Notificações (SINAN). Ministério da Saúde. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso: 02 de dezembro de 2019.
16. Fonseca F. 1949. Animais Peçonhentos. Instituto Butantan, São Paulo, SP, pp. 147–203.
17. Rosenfeld G. 1971, Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. *In: Bücherl W, Buckley EE (eds.). Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press, New York, NY, pp. 345–384.
18. Bolaños R. 1982. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev Costarric Cienc Méd*. 3(2): 165–185.
19. Cardoso JLC, Brando RB. 1982. Acidentes por Animais Peçonhentos. Clínica e Tratamento. Editora Santos, São Paulo, SP, 24 p.
20. Risk JY, Cardoso JLC, Sueiro LR, Almeida-Santos SM. 2016. Acidentes com cobras-corais e o Instituto Butantan. *In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil*. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 381–415.
21. de Roodt AR, de Titto E, Dolab JA, Chippaux JP. 2013. Envenoming by coral snakes (*Micrurus*) in Argentina, during the period between 1979-2003. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 55(1): 13–18. DOI: 10.1590/S0036-46652013000100003.
22. Otero-Patino R. 2014. Snake bites in Colombia. *In: Gopalakrishnakone P, Vogel C-W, Seifert SA, Tambourgi DV (eds.), Clinical Toxicology in Australia, Europe and Americas*. Springer Science and Business Media, Dordrecht, Netherlands, pp. 1–43.
23. Walter FG, Stolz U, Shirazi F, McNally J. 2010. Temporal analyses of coral snakebite severity published in the American Association of Poison Control Centers' Annual Reports from 1983 through 2007. *Clin Toxicol (Phila)*. 48(1): 72–78. DOI: 10.3109/15563650903430944.
24. Melgarejo AR, Puerto G, Buononato MA, Silva Jr NJ. 2016. Cobras-corais de interesse médico no Brasil. *In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil*. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 331–345.
25. Bolaños R, Cerdas L, Abalos JW. 1978. Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): report on a multivalent antivenin for the Americas. *Bull Pan Am Health Organ*. 12(1): 23–37.
26. Wood A, Schauben J, Thundiyil J, Kunisaki T, Sollee D, Lewis-Younger C, Bernstein J, Weisman R. 2013. Review of Eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998-2010. *Clin Toxicol (Phila)*. 51(8): 783–788. DOI: 10.3109/15563650.2013.828841.
27. Norris RL, Dart RC. 1989. Apparent coral snake envenomation in a patient without visible fang marks. *Am J Emerg Med*. 7: 402–405. DOI: 10.1016/0735-6757(89)90047-8.
28. Manock SR, Suarez G, Graham D, Avila-Agüero ML, Warrell DA. 2008. Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus*

- helleri*): case report from eastern Ecuador and review. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(11): 1127–1132. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.03.026.
29. Corbett B, Clark RF. 2017. North American snake envenomation. *Emerg Med Clin North Am.* 35(2): 339–354. DOI: 10.1016/j.emc.2016.12.003.
 30. Bisneto PF, Araújo BS, Pereira HS, da Silva IM, Sachett JAG, Bernarde PS, Monteiro WM, Kaefer IL. 2020. Envenomations by coral snakes in an Amazonian metropolis: ecological, epidemiological and clinical aspects. *Toxicon.* In press. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.07.009.
 31. Cardoso DF, Yamaguchi IK, Moura da Silva AM. 2009. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. *In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad V Jr (eds.), Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.* Sarvier/FAPESP, São Paulo, pp. 419–431.
 32. Brasil. 2014. Protocolo Clínico. Acidente por serpente da família Elapidae, gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*. “Coral verdadeira”. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/13/Protocolo-clinico---Acidente-por-serpente-da-fam-ilia-Elapidae.pdf>. Acesso em: 02 de dezembro de 2019.
 33. Aird SD, Silva Jr NJ. 1991. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B.* 99(2): 287–294. DOI: 10.1016/0305-0491(91)90043-d.
 34. Alape-Girón A, Persson B, Cederlund E, Flores-Díaz M, Gutiérrez JM, Thelestam M, Bergman T, Jörnvall H. 1999. Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. *Eur J Biochem.* 259(1-2): 225–234. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00021.x.
 35. Aird SD, Silva Jr NJ. 2016. Química dos venenos de cobras-corais. *In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil.* Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 243–301.
 36. Aird S, Silva Jr NJ, Qiu L, Villar-Briones A, Sadii VA, Telles MPC, Grau ML, Mikheyev AS. 2017. Coralsnake venomomics: analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. *Toxins (Basel).* 9(6): 187. DOI: 10.3390/toxins9060187.
 37. Sanz L, Quesada-Bernat S, Ramos T, Casais-e-Silva LL, Corrêa-Netto C, Silva-Haad JJ, Sasa M, Lomonte B, Calvete JJ. 2019. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA₂ venom dicotomy across genus *Micrurus* in South America. *J Proteomics.* 200: 90–101. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.03.014
 38. Sanz L, de Freitas-Lima LN, Quesada-Bernat S, Graça-de-Souza VK, Soares AM, Calderón LA, Calvete JJ, Caldeira CAS. 2019. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. *Toxicon.* 166: 39–45. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.05.001.
 39. Lomonte B, Sasa M, Rey-Suárez P, Bryan W, Gutiérrez JM. 2016. Venom of the coral snake *Micrurus clarki*: proteomic profile, toxicity, immunological cross-neutralization, and characterization of a three-finger toxin. *Toxins (Basel).* 8(5): E138. DOI: 10.3390/toxins8050138.
 40. Guerrero-Garzón JF, Bénard-Valle M, Restano-Cassulini R, Zamudio F, Corzo G, Alagón A, Olvera-Rodríguez A. 2018. Cloning and sequencing of three-finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and

- heterologous expression of an alpha-neurotoxin from *Micrurus diastema*. *Biochimie*. 147: 114–121. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.01.006.
41. Foo CS, Jobichen C, Hassan-Puttaswamy V, Dekan Z, Tae HS, Bertrand D, Adams DJ, Alewood PF, Sivaraman J, Nirthanan S, Kini RM. 2020. Fulditoxin, representing a new class of dimeric snake toxins, defines novel pharmacology at nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol*. 177(8): 1822–1840. DOI: 10.1111/bph.14954.
 42. Rey-Suárez P, Saldarriaga-Córdoba M, Torres U, Marin-Villa M, Lomonte B, Núñez V. 2019. Novel three-finger toxins from *Micrurus dumerilii* and *Micrurus mipartitus* coral snake venoms: phylogenetic relationships and characterization of clarkitoxin-I-Mdum. *Toxicon*. 170: 85–93. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.09.017.
 43. Lomonte B, Camacho E, Fernández J, Salas M, Zavaleta A. 2019. Three-finger toxins from the venom of *Micrurus tschudii tschudii* (desert coral snake): isolation and characterization of tschuditoxin-I. *Toxicon*. 167: 144–151. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.06.023.
 44. Kessler P, Marchot P, Silva M, Servent D. 2017. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. *J Neurochem*. 2: 7–18. DOI: 10.1111/jnc.13975.
 45. Utkin YN. 2019. Last decade update for three-finger toxins: newly emerging structures and biological activities. *World J Biol Chem*. 10(1): 17–27. DOI: 10.4331/wjbc.v10.i1.17.
 46. Kini RM, Doley R. 2010. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*. 56(6): 855–867. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.07.010.
 47. Kini RM, Koh CY. 2020. Snake venom three-finger toxins and their potential in drug development targeting cardiovascular diseases. *Biochem Pharmacol*. 21: 114105. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114105
 48. Tsetlin VI, Kasheverov IE, Utkin YN. 2020. Three-finger proteins from snakes and humans acting on nicotinic receptors: old and new. *J Neurochem*. *In press*, DOI: 10.1111/jnc.15123.
 49. Gutiérrez JM, Lomonte B, Aird S, Silva Jr NJ. 2016. Mecanismo de ação dos venenos das cobras-corais. *In: Silva Jr NJ (org.). As Cobras-Corais do Brasil*. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 79–167.
 50. Dal Belo CA, Leite GB, Toyama MH, Marangoni S, Corrado AP, Fontana MD, Southan A, Rowan EG, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. 2005. Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A₂ from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom. *Toxicon* 46(7): 736–750. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.07.016.
 51. Schütter N, Barreto YC, Vardanyan V, Hornig S, Hyslop S, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L, Pongs O, Dal Belo CA. 2019. Inhibition of Kv2.1 potassium channels by MiDCA1, a presynaptically active PLA₂-type toxin from *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom. *Toxins (Basel)*. 11(6): 335. DOI: 10.3390/toxins11060335.
 52. Pungertar J, Križaj I. 2007. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂. *Toxicon*. 50(7): 871–892. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.07.025.
 53. Silva Jr NJ, Bucarechi F. 2009. Mecanismos de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. *In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Junior V. (eds.) Animais Peçonhentos no Brasil –*

- Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 2^a ed. São Paulo: Sarvier. pp. 116-124.
54. Barber CM, Isbister GK, Hodgson WC. 2013. Alpha neurotoxins. *Toxicon*. 66: 47-58. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.01.01.
 55. Šribar J, Oberčkal J, Križaj I. 2014. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂: an update. *Toxicon*. 89: 9–16. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.06.019.
 56. Südhof TC. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. 27: 509–547. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
 57. Südhof TC, Rothman JE. 2009. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 323(5913): 474–477. DOI: 10.1126/science.1161748.
 58. Haucke V, Neher E, Sigrist SJ. 2011. Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci*. 12(3): 127–138. DOI: 10.1038/nrn2948.
 59. Jahn R, Fasshauer D. 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*. 490(7419): 201–207. DOI: 10.1038/nature11320.
 60. Südhof TC. 2012. The presynaptic active zone. *Neuron*. 75(1): 11–25. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.012.
 61. Tougu V. 2001. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Curr Med Chem Nerv Syst Agents*. 1(2): 155–170. DOI: 10.2174/1568015013358536.
 62. Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA. 2006. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem*. 97(1): 1–12. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03695.
 63. Fagerlund MJ, Eriksson LI. 2009. Current concepts in neuromuscular transmission. *Br J Anaesth*. 103(1): 108–114. DOI: 10.1093/bja/aep150.
 64. Yamamoto T, Ikemoto N. 2002. T-tubule depolarization-induced local events in the ryanodine receptor, as monitored with the fluorescent conformational probe incorporated by mediation of peptide A. *J Biol Chem*. 277(2): 984–992. DOI: 10.1074/jbc.M102347200.
 65. Brazil V, Brazil Filho V. 1933. Do envenenamento elapineo, em confronto com o choque anafilático. *Bol Inst Vital Brazil*. 15: 1-49.
 66. Vital Brazil O, Barrio A. 1950. Accion curarizante de las ponzoñas de Elapidae. I. Fenomenos de inhibicion y facilitacion em la union neuromuscular. *La Prensa Med Arg*. 23: 1249–1256.
 67. Vital Brazil O, Barrio A. 1950. Accion curarizante de las ponzoñas de Elapidae. II. Efectos de algunos antagonistas del curare. *La Prensa Med Arg*. 24: 1313–1318.
 68. Vital Brazil O. 1965. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. *O Hosp*. 68: 909–950.
 69. Vital Brazil O. 1980. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev Assoc Méd Bras*. 26: 183–224.
 70. Vital Brazil O. 1987 Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 29: 119–126. DOI: 10.1590/s0036-46651987000300001.
 71. Vital Brazil O, Fontana MD, Pellegrini Filho A. 1976/1977. Physiopathologie et thérapeutique de l’envenemation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. *Mem. Inst. Butantan* 40/41, 221–133.
 72. Pellegrini A, Vital Brazil O. 1976. Origem da paralisia respiratória determinada pela peçonha de *Micrurus frontalis*. *Ciência Cultura* 28: 199–202.

73. Vital Brazil O, Pellegrini Filho A. 1978. Antagonistic effect produced by neostigmine upon the paralysis caused by *Micrurus frontalis* venom. In: Rosenberg P (ed.), Toxins, Animal, Plant and Microbial. Pergamon Press, Oxford. pp. 437–438.
74. Vital Brazil O, Fontana MD. 1983/1984. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. Mem Inst Butantan. 47/48: 13–26.
75. Vital Brazil O, Fontana MD, Heluany NF, Laure CJ. 1995. Mode of action of the coral snake *Micrurus spixii* venom at the neuromuscular junction. J Nat Toxins. 4: 19–33.
76. Vital Brazil O, Vieira RJ. 1996. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases. Rev Inst Med Trop São Paulo. 38(1): 61–67. DOI: 10.1590/s0036-46651996000100012.
77. Bénard-Valle M, Neri-Castro E, Yañez-Mendoza MF, Lomonte B, Olvera A, Zamudio F, Restano-Cassulini R, Possani LD, Jiménez-Ferrer E, Alagón A. 2020. Functional, proteomic and transcriptomic characterization of the venom from *Micrurus browni browni*: identification of the first lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom. J Proteomics. 225: 103863. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103863.
78. Moreira KG, Prates MV, Andrade FAC, Silva LP, Beirão PSL, Kushmerick C, Naves LA, Bloch Jr C. 2010. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. Toxicon. 56: 55–63. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.030.
79. Rey-Suárez P, Floriano RS, Rostelato-Ferreira S, Saldarriaga-Córdoba M, Núñez V, Rodrigues-Simioni L, Lomonte B. 2012. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). Toxicon. 60(5): 851–863. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.05.023.
80. Carbajal-Saucedo A, López-Vera E, Bénard-Valle M, Smith EN, Zamudio F, de Roodt AR, Olvera-Rodríguez A. 2013. Isolation, characterization, cloning and expression. of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). Toxicon. 66: 64–74. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.02.006.
81. Ramos HR, Dias L, Floriano RS, Schezaro-Ramos R, Mourier G, Servent D, Hyslop S, Ho PL. 2020. Neuromuscular blockade by NXH8, a chemically synthesized α -neurotoxin from *Micrurus corallinus* (coralsnake) venom. Toxicon. 177(Suppl.1): S25. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.12.016.
82. Alape-Girón A, Stiles B, Schmidt J, Girón-Cortes M, Thelestam M, Jörnvall H, Bergman T. 1996. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A₂ from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. FEBS Lett. 380(1-2): 29–32. DOI: 10.1016/0014-5793(95)01543-4.
83. Alape-Giron A, Stiles BG, Gutiérrez JM. 1996. Antibody-mediated neutralization and binding-reversal studies on alpha-neurotoxins from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* (coral snake) venom. Toxicon. 34(3): 369–380. DOI 10.1016/0041-0101(95)00126-3.
84. Rosso JP, Vargas-Rosso O, Gutiérrez JM, Rochat H, Bougis PE. 1996. Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-

- binding ability of the major alpha-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. Eur J Biochem. 238(1): 231-239. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0231q.x.
85. Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Pedraza-Escalona M, Restano-Cassulini R, Zamudio FZ, Benard-Valle M, de Roodt AR, Possani LD. 2018. New insights into the proteomic characterization of the coral snake *Micrurus pyrrhocryptus* venom. Toxicon. 153: 23–31. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.08.003.
 86. Nirthanan S, Gwee MC. 2004. Three-finger α -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. J Pharmacol Sci. 94(1): 1–17. DOI: 10.1254/jphs.94.1.
 87. Vergara I, Pedraza-Escalona M, Paniagua D, Restano-Cassulini R, Zamudio F, Batista CV, Possani LD, Alagón A. 2014. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A₂. J Proteomics. 105: 295-306. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.02.027.
 88. Lewin M, Samuel S, Merkel J, Bickler P. 2016. Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A₂ and a possible pre-referral treatment for envenomation. Toxins (Basel). 8(9): 248. DOI: 10.3390/toxins8090248.
 89. Lewin MR, Gilliam LL, Gilliam J, Samuel SP, Bulfone TC, Bickler PE, Gutiérrez JM. 2018. Delayed LY333013 (oral) and LY315920 (intravenous) reverse severe neurotoxicity and rescue juvenile pigs from lethal doses of *Micrurus fulvius* (Eastern coral snake) venom. Toxins (Basel). 10(11): 479. DOI: 10.3390/toxins10110479.
 90. Casais-e-Silva LL, Teixeira CF, Lebrun I, Lomonte B, Alape-Giron A, Gutiérrez JM. 2016. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A₂. Toxicol Lett. 257: 60–71. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.06.005.
 91. Rey-Suárez P, Núñez V, Saldarriaga-Córdoba M, Lomonte B. 2017. Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A₂ from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. Biochimie. 137: 88–98. DOI:10.1016/j.biochi.2017.03.008.
 92. Arce-Bejarano R, Lomonte B, Gutiérrez JM. 2014. Intravascular hemolysis induced by the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*, in a mouse model: identification of directly hemolytic phospholipases A₂. Toxicon. 90: 26–35. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.07.010.
 93. Fernández ML, Quartino PY, Arce-Bejarano R, Fernández J, Camacho LF, Gutiérrez JM, Kuemmel D, Fidelio G, Lomonte B. 2018. Intravascular hemolysis induced by phospholipases A₂ from the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*: functional profiles of hemolytic and non-hemolytic isoforms. Toxicol Lett. 286: 39–47. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.11.037.
 94. dos Santos RTF, Silva MFP, Porto RM, Lebrun I, Gonçalves LRC, Batista IFC, Sandoval MRL, Abdalla FMF. 2020. Effects of Mlx-8, a phospholipase A₂ from Brazilian coralsnake *Micrurus lemniscatus* venom, on muscarinic acetylcholine receptors in rat hippocampus. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 26: e20190041. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0041
 95. Terra AL, Moreira-Dill LS, Simões-Silva R, Monteiro JR, Cavalcante WL, Gallacci M, Barros NB, Nicolete R, Teles CB, Medeiros PS, Zanchi FB, Zuliani JP, Calderon LA, Stábeli RG, Soares AM. 2015. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: isolation of a new neurotoxic phospholipase A₂. Toxicon. 103: 1–11. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.06.011.

96. Oliveira DA, Harasawa C, Seibert CS, Casais-e-Silva LL, Pimenta DC, Lebrun I, Sandoval MR. 2008. Phospholipases A₂ isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. *Brain Res Bull.* 75(5): 629–639. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2007.10.007.
97. Carvalho ND, Garcia RCT, Ferreira AK, Batista RD, Cassola AC, Maria D, Lebrun I, Carneiro SM, Afeche SC, Marcourakis T, Sandoval MRL. 2014. Neurotoxicity of coral snake phospholipases A₂ in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1552: 1–16. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.01.008.
98. Rowan EG. 2001. What does β -bungarotoxin do at the neuromuscular junction. *Toxicon.* 39(1):107–118. DOI: 10.1016/s0041-0101(00)00159-8.
99. Bon C, Changeux JP. 1975. Ceruleotoxin: an acidic neurotoxin from the venom of *Bungarus caeruleus* which blocks the response to a cholinergic agonist without binding to the cholinergic receptor site. *FEBS Lett.* 59(2): 212–216. DOI: 10.1016/0014-5793(75)80377-2.
100. Bon C, Changeux JP, Jeng TW, Fraenkel-Conrat H. 1979. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur J Biochem.* 99(3): 471–481. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13278.x.
101. Vulfius CA, Gorbacheva EV, Starkov VG, Osipov AV, Kasheverov IE, Andreeva TV, Astashev ME, Tsetlin VI, Utkin YN. 2011. An unusual phospholipase A₂ from puff adder *Bitis arietans* venom – a novel blocker of nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon* 57(5): 787–793. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.02.013
102. Vulfius CA, Kasheverov IE, Starkov VG, Osipov AV, Andreeva TV, Filkin SY, Gorbacheva EV, Astashev ME, Tsetlin VI, Utkin YN. 2014. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a novel facet in the pleiotropic activities of snake venom phospholipases A₂. *PLoS One* 9(12): e115428. DOI: 10.1371/journal.pone.0115428.
103. Vulfius CA, Kasheverov IE, Kryukova EV, Spirova EM, Shelukhina IV, Starkov VG, Andreeva TV, Faure G, Zouridakis M, Tsetlin VI, Utkin YN. 2017. Pancreatic and snake venom presynaptically active phospholipases A₂ inhibit nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* 12(10): e0186206. DOI: 10.1371/journal.pone.0186206.
104. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* 65: 2897–2912. DOI: 10.1007/s00018-008-8113-3.
105. Gutiérrez JM, Arroyo O, Chaves F, Lomonte B, Cerdas L. 1986. Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. *Br J Exp Pathol.* 67(1): 1–12.
106. Gutiérrez JM, Lomonte B, Portilla E, Cerdas L, Rojas E. 1983. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculation of venoms from five species. *Toxicon.* 21(6): 777–783. DOI: 10.1016/0041-0101(83)90066-1.
107. Gutiérrez JM, Rojas G, Silva Jr NJ, Núñez J. 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snake) venoms. *Toxicon.* 30(10): 1299–1302. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90446-c.
108. Cruz-Hofling MA, Rodrigues-Simioni L, Vital Brazil O. 1983/1984. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem Inst Butantan* 47/48: 95–105.

109. Goularte FC, Cruz-Höfing MA, Cogo JC, Gutiérrez JM, RodriguesSimioni L. 1995. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon*. 33(5): 679–689. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.10.017.
110. Goularte FC, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. 1999. Electrophysiological and ultrastructural analysis of the neuromuscular blockade and myotoxicity induced by the *Micrurus nigrocinctus* snake venom. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 49: 291–298.
111. Silva Jr NJ, Griffin PR, Aird SD. 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B*. 100(1): 117–126.
112. de Roodt AR, Lago NR, Stock RP. 2012. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon*. 59(2): 356–364. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.11.009.
113. Cecchini AL, Marcussi S, Silveira LB, Borja-Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, Amara S, Stábeli RG, Giglio JR, Arantes EC, Soares AM. 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (coral) snake venoms. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 140(1): 125–134. DOI: 10.1016/j.cbpb.2004.11.012.
114. Tanaka GD, Furtado MF, Portaro FC, Sant’Anna OA, Tambourgi DV. 2010. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 4(3): e622. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000622.
115. Oliveira FR, Noronha MDN, Lozano JLL. 2017. Biological and molecular properties of yellow venom of the Amazonian coral snake *Micrurus surinamensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 50(3): 365–373. DOI: 10.1590/0037-8682-0408-2016.
116. Olamendi-Portugal T, Batista CV, Restano-Cassulini R, Pando V, Villa-Hernandez O, Zavaleta-Martínez-Vargas A, Salas-Arruz MC, Rodríguez de la Vega RC, Becerril B, Possani LD. 2008. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. 8(9): 1919–1932. DOI: 10.1002/pmic.200700668.
117. Castillo-Beltrán MC, Hurtado-Gómez JP, Corredor-Espinel V, Ruiz-Gómez FJ. 2019. A polyvalent coral snake antivenom with broad neutralization capacity. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(3): e0007250. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007250.
118. Barros AC, Fernandes DP, Ferreira LC, dos Santos MC. 1994. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes). *Toxicon*. 32(4): 445–452. DOI: 10.1016/0041-0101(94)90296-8.
119. Oliveira D. 2017. Caracterização bioquímica e imunoquímica do veneno da serpente *Micrurus surinamensis*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, 70 p.
120. Heluany Sobrinho NF. 2000. Ação da peçonha de *Micrurus surinamensis* na junção neuromuscular e no músculo esquelético. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP. 83 p.
121. Pardal PP, Pardal JS, Gadelha MA, Rodrigues LS, Feitosa DT, Prudente AL, Fan HW. 2010. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 52(6): 333–337. DOI: 10.1590/s0036-46652010000600009.

122. de Castro KLP, Lopes-de-Souza L, de Oliveira D, Machado-de-Ávila RA, Paiva ALB, de Freitas CF, Ho PL, Chávez-Olórtegui C, Guerra-Duarte C. 2019. A combined strategy to improve the development of a coral snake antivenom against *Micrurus* spp. *Front Immunol.* 10: 2422. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02422.
123. Tanaka GD, Sant'Anna OA, Marcelino JR, Lustoza da Luz AC, Rocha MMT, Tambourgi DV. 2016. *Micrurus* snake species: venom immunogenicity, antiserum cross-reactivity and neutralization potential. *Toxicon.* 117: 59–68. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.03.020.
124. Arce V, Rojas E, Ownby CL, Rojas G, Gutiérrez JM. 2003. Preclinical assessment of the ability of polyvalent (Crotalinae) and anticoral (Elapidae) antivenoms produced in Costa Rica to neutralize the venoms of North American snakes. *Toxicon.* 41(7): 851–860. DOI: 10.1016/s0041-0101(03)00043-6.
125. de Roodt AR, Lanari LC, Barragán J, Litwin S, Dokmetjian JC, Dolab JA, van Grootheest JH, Damin CF. 2020. Experimental neutralization of *Micrurus* venoms by an experimental polyvalent antivenom and therapeutic antivenoms based on North and South American *Micrurus* venoms. *Toxicon.* 177(Suppl 1): S51. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.12.108.
126. de Roodt AR, Paniagua-Solis JF, Dolab JA, Estévez-Ramírez J, Ramos-Cerrillo B, Litwin S, Dokmetjian JC, Alagón A. 2004. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* envenomations. *J Toxicol Clin Toxicol.* 42(2): 171–178. DOI: 10.1081/clt-120030943.
127. Westerfield M. 2000. *The Zebrafish Book: a Guide for the Laboratory Use of the Zebrafish (Danio rerio)*. 4th edition. Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, OR, USA.
128. Holzer M, Mackessy SP. 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon.* 34(10): 1149–1155. DOI: 10.1016/0041-0101(96)00057-8.
129. Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. 2002. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem.* 21(3): 131–136. DOI: 10.1023/A:1015332314389.
130. Bülbring E. 1946. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol Chemother.* 1(1): 38-61. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1946.tb00025.x.
131. Floriano RS, Schezaro-Ramos R, Silva Jr NJ, Bucarechi F, Rowan EG, Hyslop S. 2019. Neurotoxicity of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (South American coral snake) venom in vertebrate neuromuscular preparations *in vitro* and neutralization by antivenom. *Arch Toxicol.* 93(7): 2065–2086. DOI: 10.1007/s00204-019-02476-9.
132. Fatt P, Katz B. 1952. Spontaneous sub-threshold activity at motor nerve endings. *J Physiol.* 117: 109–128. DOI: 10.1113/jphysiol.1952.sp004735.
133. Ginsborg BL e Warriner J. 1960. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br J Pharmacol Chemother.* 15(3): 410–411. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1960.tb01264.x.
134. OECD. 2013. Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. *In: OECD* (ed). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris, França: OECD Publishing. DOI: 10.1787/9789264203709-en.

135. Braunbeck T, Lammer E. 2006. Detailed review paper “Fish embryo toxicity assays”. UBA report under contract no. 20385422. Berlin, Alemanha: German Federal Environment Agency. 298.
136. Dos Santos DS, Zanatta AP, Martinelli AHS, Rosa ME, de Oliveira RS, Pinto PM, Peigneur S, Tytgat J, Orchard I, Lange AB, Carlini CR, Dal Belo CA. 2019. Jaburetox, a natural insecticide derived from jack bean urease, activates voltage-gated sodium channels to modulate insect behavior. *Pestic Biochem Physiol.* 153: 67-76. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.11.003.
137. Scheil V, Kienle C, Osterauer R, Gerhardt A, Köhler HR. 2009. Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organization levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicology.* 18(3): 355–363. DOI: 10.1007/s10646-008-0291-0.
138. Weis R, McIsaac RJ. 1971. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. *Toxicon.* 9(3): 219–228. DOI: 10.1016/0041-0101(71)90073-0.
139. Abreu VA, Leite GB, Borja-Oliveira C, Hyslop S, Furtado MF, Rodrigues-Simioni L. 2008. Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. *Clin Toxicol (Phila).* 46(6): 519–527. DOI: 10.1080/15563650701647405.
140. Camargo TM, de Roodt AR, Cruz-Höfing MA, Rodrigues-Simioni L. 2011. The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrhocryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms. *J Venom Res.* 2: 24–31.
141. Renjifo C, Smith EN, Hodgson WC, Renjifo JM, Sanchez A, Acosta R, Maldonado JH, Riveros A. 2012. Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: an evolutionary perspective. *Toxicon.* 59(1): 132–142. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.10.017.
142. Carbajal-Saucedo A, Floriano RS, Dal Belo CA, Olvera-Rodríguez A, Alagón A, Rodrigues-Simioni L. 2014. Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae) venom *in vitro*. *Toxins (Basel).* 6(1): 359–370. DOI: 10.3390/toxins6010359.
143. Yang DC, Dobson J, Cochran C, Dashevsky D, Arbuckle K, Benard M, Boyer L, Alagón A, Hendriks I, Hodgson WC, Fry BG. 2017. The bold and the beautiful: a neurotoxicity comparison of New World coral snakes in the *Micruroides* and *Micrurus* genera and relative neutralization by antivenom. *Neurotox Res.* 32(3): 487–495. DOI: 10.1007/s12640-017-9771-4.
144. Almeida PCR, Prudente ALC, Curcio FF, Rodrigues MTU. 2016. Biologia e história natural das cobras-coraais. In: Silva Jr NJ (org.). *As Cobras-Coraais do Brasil*. Editora PUC-Goiás, Goiânia, GO, pp. 79–167.
145. Hodgson WC, Wickramaratna JC. 2001. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29: 807–814. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03740.x.
146. Silva A, Hodgson WC, Isbister GK. 2017. Antivenom for neuromuscular paralysis resulting from snake envenoming. *Toxins (Basel).* 9: 143. DOI: 10.3390/toxins9040143.
147. Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfing MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. 1993. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon.* 31: 1237–1347. DOI: 10.1016/0041-0101(93)90397-2.

148. Rodrigues-Simioni L, Zamunér SR, Cogo JC, Borja-Oliveira CR, Prado-Franceschi J, da Cruz-Höfling MA, Corrado AP. 2004. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon*. 43(6): 633–638. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.10.027.
149. Cavalcante WLG, Hernandez-Oliveira S, Galbiatti C, Randazzo-Moura P, Rocha T, Ponce-Soto L, Marangoni S, Pai-Silva MD, Gallacci M, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. 2011. Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom. *J Venom Res*. 2: 37–41.
150. Rodrigues-Simioni L, Floriano RS, Rostelato-Ferreira S, Sousa NC, Marangoni S, Ponce-Soto LA, Carregari VC, Hyslop S. 2011. Presynaptic action of *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom *in vitro*. *Toxicon*. 58(1): 140–145. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.05.002
151. Schezaro-Ramos R, Collaço RCO, Randazzo-Moura P, Rocha T, Cogo JC, Rodrigues-Simioni L. 2017. Influence of phospholipasic inhibition on neuromuscular activity of *Bothrops fonscai* snake venom. *Toxicon*. 130: 35–43. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.02.027.
152. Gutiérrez JM, Ownby C. 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 42(8): 915–931. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.11.005.
153. St Pierre L, Fischer H, Adams DJ, Schenning M, Lavidis N, de Jersey J, Masci PP, Lavin MF. 2007. Distinct activities of novel neurotoxins from Australian venomous snakes for nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 64(21): 2829–2840. DOI: 10.1007/s00018-007-7352-z.
154. Wilson HI, Nicholson GM. 1997. Presynaptic snake β -neurotoxins produce tetanic fade and endplate potential run-down during neuromuscular blockade in mouse diaphragm. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 356(5): 626–634. DOI: 10.1007/pl00005099.
155. Lee C, Chen D, Katz RL. 1977. Characteristics of nondepolarizing neuromuscular block: (I) post-junctional block by alpha-bungarotoxin. *Can Anaesth Soc J*. 24(2): 212–219. DOI: 10.1007/bf03006234.
156. Chang CC, Hong SJ. 1987. Dissociation of the end-plate potential run-down and the tetanic fade from the postsynaptic inhibition of acetylcholine receptor by alpha-neurotoxins. *Exp Neurol*. 98(3): 509–517. DOI: 10.1016/0014-4886(87)90260-3.
157. Hong SJ, Chang CC. 1991. Run-down of neuromuscular transmission during repetitive nerve activity by nicotinic antagonists is not due to desensitization of the postsynaptic receptor. *Br J Pharmacol*. 102(4): 817–822. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12258.x.
158. Anderson AJ, Harvey AL. 1988. Effects of the potassium channel blocking dendrotoxins on acetylcholine release and motor nerve terminal activity. *Br J Pharmacol*. 93(1): 215–221. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11424.x.
159. Nirthanan S, Charpentier E, Gopalakrishnakone P, Gwee MC, Khoo HE, Cheah LS, Kini RM, Bertrand D. 2003. Neuromuscular effects of candoxin, a novel toxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Br J Pharmacol*. 139(4): 832–844. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705299.
160. Watt G, Meade BD, Theakston RD, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP. 1989. Comparison of Tensilon and antivenom for the treatment of cobra-bite paralysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 83(4): 570–573. DOI: 10.1016/0035-9203(89)90301-5.

161. Watt G, Theakston RD, Hayes CG, Yambao ML, Sangalang R, Ranoa CP, Alquizalas E, Warrell DA. 1986. Positive response to edrophonium in patients with neurotoxic envenoming by cobras (*Naja naja philippinensis*). A placebo-controlled study. *N Engl J Med.* 315(23): 1444–1448. DOI: 10.1056/NEJM198612043152303
162. Serafim FG, Reali M, Cruz-Höfling MA, Fontana MD. 2002. Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon.* 40(2): 167–174. DOI: 10.1016/s0041-0101(01)00217-3.
163. Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, Harris JB. 1994. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. *Toxicon.* 32(3): 257–265. DOI: 10.1016/0041-0101(94)90078-7.
164. Pawlak J, Mackessy SP, Fry BG, Bhatia M, Mourier G, Fruchart-Gaillard C, Servent D, Ménez R, Stura E, Ménez A, Kini RM. 2006. Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) with bird-specific activity. *J Biol Chem.* 281(39): 29030–29041. DOI: 10.1074/jbc.M605850200.
165. Kuruppu S, Chaisakul J, Smith AI, Hodgson WC. 2014. Inhibition of presynaptic neurotoxins in taipan venom by suramin. *Neurotox Res.* 25(3): 305–310. DOI: 10.1007/s12640-013-9426-z.
166. Kuruppu S, Reeve S, Banerjee Y, Kini RM, Smith AI, Hodgson WC. 2005. Isolation and pharmacological characterization of cannitoxin, a presynaptic neurotoxin from the venom of the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *J Pharmacol Exp Ther.* 315(3): 1196–1202. DOI: 10.1124/jpet.105.093641.
167. Ho CL, Wu SH, Chen CJ. 1983. Reversible neuromuscular blocking action of carboxymethylated α -bungarotoxin. *Biochim Biophys Acta.* 755(2): 210–216. DOI: 10.1016/0304-4165(83)90205-2.
168. Pawlak J, Mackessy SP, Sixberry NM, Stura EA, Le Du MH, Ménez R, Foo CS, Ménez A, Nirthanan S, Kini RM. 2009. Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB J.* 23(2): 534–545. DOI: 10.1096/fj.08-113555.
169. Toutant JP, Rouaud T, le Douarin GH. 1981. Histochemical properties of the biventer cervicis muscle of the chick: a relationship between multiple innervation and slow-tonic fibre types. *Histochem J.* 13(3): 481–493. DOI: 10.1007/bf01005063.
170. Chang CC, Su MJ, Tung LH. 1977. Appearance of new acetylcholine receptors on the baby chick biventer cervicis and denervated rat diaphragm muscles after blockade with α -bungarotoxin. *J Physiol.* 268(2): 449–465. DOI: 10.1113/jphysiol.1977.sp011865.
171. Teichert RW, Garcia CC, Potian JG, Schmidt JJ, Witzemann V, Olivera BM, McArdle JJ. 2008. Peptide-toxin tools for probing the expression and function of fetal and adult subtypes of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1132: 61–70. DOI: 10.1196/annals.1405.015.
172. Wickramaratna JC, Hodgson WC. 2001. A pharmacological examination of venoms from three species of death adder (*Acanthophis antarcticus*, *Acanthophis praelongus* and *Acanthophis pyrrhus*). *Toxicon.* 39(2-3): 209–216. DOI: 10.1016/s0041-0101(00)00117-3.
173. Young GT, Broad LM, Zwart R, Astles PC, Bodkin M, Sher E, Millar NS. 2007. Species selectivity of a nicotinic acetylcholine receptor agonist is conferred by two adjacent extracellular β 4 amino acids that are implicated in the coupling of

- binding to channel gating. *Mol. Pharmacol.* 71(2): 389–397. DOI: 10.1124/mol.106.030809.
174. Chang CC e Tang SS. 1974. Differentiation between intrinsic and extrinsic acetylcholine receptors of the chick biventer cervicis muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 282: 379–388.
 175. Harvey A e I Marshall. 2000. Skeletal Muscle. *In: Whittow GC. Sturkie's Avian Physiology.* Academic Press, Cambridge, MA, EUA, pp. 461-469.
 176. Nasiadka A, Clark MD. 2012. Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR J.* 53(2): 161–168. DOI: 10.1093/ilar.53.2.161.
 177. Dooley K, Zon LI. 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev.* 10(3): 252–256. DOI: 10.1016/s0959-437x(00)00074-5.
 178. Lammer E, Carr GJ, Wendler K., Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck, T. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 149(2): 196–209. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.11.006.
 179. Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ. 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem.* 32(8): 1768–1783. DOI: 10.1002/etc.2244.
 180. Truong L, Reif DM, St Mary L, Geier MC, Truong HD, Tanguay RL. 2013. Multidimensional *in vivo* hazard assessment using zebrafish. *Toxicol Sci.* 137(1): 212–233. DOI: 10.1093/toxsci/kft235.
 181. Carvalho JCT, Keita H, Santana GR, de Souza GC, Dos Santos IVF, Amado JRR, Kourouma A, Prada AL, de Oliveira Carvalho H, Silva ML. 2018. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. *Inflammopharmacology.* 26(1): 273–284. DOI: 10.1007/s10787-017-0362-z.
 182. Zanotty Y, Álvarez M, Perdomo L, Sánchez EE, Giron ME, Jimenez JC, Suntravat M, Guerrero B, Ibarra C, Montero Y, Medina R, Navarrete LF, Rodríguez-Acosta A. 2019. Mutacytin-1, a new C-type lectin-like protein from the Venezuelan cuaima (*Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766) (Serpentes: Viperidae) snake venom inducing cardiotoxicity in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Zebrafish.* 16(4): 379–387. DOI: 10.1089/zeb.2019.1731.
 183. Chan JY, Zhou H, Kwan YW, Chan SW, Radis-Baptista G, Lee SM. 2017. Evaluation in zebrafish model of the toxicity of rhodamine B-conjugated crotamine, a peptide potentially useful for diagnostics and therapeutics. *J Biochem Mol Toxicol.* 31(11): e21964. DOI: 10.1002/jbt.21964.
 184. Swimburne IA, Mosaliganti KR, Green AA, Megason SG. 2015. Improved long-term imaging of embryos with genetically encoded α -bungarotoxin. *PLoS One.* 10(8): e0134005. DOI: 10.1371/journal.pone.0134005.
 185. Rombough PJ. 1988. Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life. *Fish Physiol.* 11(A): 59–161. DOI: 10.1016/S1546-5098(08)60199-5.
 186. Taylor EW, Leite CA, McKenzie DJ, Wang T. 2010. Control of respiration in fish, amphibians and reptiles. *Braz J Med Biol Res.* 43(5): 409–424. DOI: 10.1590/s0100-879x2010007500025.
 187. OECD. 2011. Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157. *In: OECD (ed). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.* Paris, France: OECD Publishing.

188. OECD. 2012. Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179. *In*: OECD (ed). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris, France: OECD Publishing.
189. Li H, Yu S, Cao F, Wang C, Zheng M, Li X, Qiu L. 2018. Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 151: 1–9. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.061.
190. Zhou Y, Chen X, Teng M, Zhang J, Wang C. 2019. Toxicity effects of captan on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol*. 69: 80–85. DOI: 10.1016/j.etap.2019.04.003.
191. Westerfield M, Liu DW, Kimmel CB, Walker C. 1990. Pathfinding and synapse formation in a zebrafish mutant lacking functional acetylcholine receptors. *Neuron*. 4(6): 867–874. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90139-7.
192. Ono F, Higashijima S, Shcherbatko A, Fetcho JR, Brehm P. 2001. Paralytic zebrafish lacking acetylcholine receptors fail to localize rapsyn clusters to the synapse. *J Neurosci*. 21(15): 5439–5448.
193. Downes GB, Granato M. 2004. Acetylcholinesterase function is dispensable for sensory neurite growth but is critical for neuromuscular synapse stability. *Dev Biol*. 270(1): 232–245. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.02.027.
194. Brennan C, Mangoli M, Dyer CE, Ashworth R. 2005. Acetylcholine and calcium signaling regulates muscle fibre formation in the zebrafish embryo. *J Cell Sci*. 118(22): 5181–5190. DOI: 10.1242/jcs.02625.
195. Kashyap B, Frederickson LC, Stenkamp DL. 2007. Mechanisms for persistent microphthalmia following ethanol exposure during retinal neurogenesis in zebrafish embryos. *Vis Neurosci*. 24(3): 409–421. DOI: 10.1017/S0952523807070423.
196. Chitnis AB, Nogare DD. 2015. Lessons from the zebrafish lateral line system. *In*: Moody SA (ed.), *Principles of Developmental Genetics*. 2nd edition. Academic Press, San Diego, CA, pp. 265–279. DOI: 10.1016/B978-0-12-405945-0.00015-6.
197. Sheets L. 2017. Excessive activation of ionotropic glutamate receptors induces apoptotic hair-cell death independent of afferent and efferent innervation. *Sci Rep*. 7: 41102. DOI: 10.1038/srep41102.
198. Pichler P, Lagnado L. 2019. The transfer characteristics of hair cells encoding mechanical stimuli in the lateral line of zebrafish. *J Neurosci*. 39(1): 112–124. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1472-18.2018.
199. Freire Donato M. 2014. Peçonha da serpente *Micrurus l. lemniscatus* (Roze, 1967) Caracterização Parcial das Propriedades Bioquímica e Farmacológicas: Neurotoxicidade e Atividade Pré-Sináptica de Toxinas Três-Dígitos. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. 155p.
200. Montandon AC. 2013. Avaliação da liberação de L-glutamato por sinaptosomas cérebro-corticais de rato pela ação da peçonha da serpente coral Sul-Americana, *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758), e por algumas de suas frações semi-purificadas. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 136 p.
201. Collins C, Miller T. 1977. Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. *J Exp Biol*. 67: 1–15.

202. Zlotkin E, Menashé M, Rochat H, Miranda F, Lissitzky S. 1975. Proteins toxic to arthropods in the venom of elapid snakes. *J Insect Physiol.* 21(9): 1605–1611. DOI: 10.1016/0022-1910(75)90198-5.
203. Ramaswamy R, Khole V. 1988. Toxicity of Central Asian cobra (*Naja naja oxiana* Eichwald) venom and its components to the larvae of blowfly *Parasarcophaga ruficornis* Fabr. *Indian J Exp Biol.* 26: 99–104.
204. Tornøe C, Bai D, Holden-Dye L, Abramson SN, Sattelle DB. 1995. Actions of neurotoxins (bungarotoxins, neosurugatoxin and lophotoxins) on insect and nematode nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon.* 33(4): 411–424. DOI: 10.1016/0041-0101(94)00163-3.
205. Pinnock RD, Lummis SC, Chiappinelli VA, Sattelle DB. 1988. Kappa-bungarotoxin blocks an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptor in the insect central nervous system. *Brain Res.* 458(1): 45–52. DOI: 10.1016/0006-8993(88)90494-5.
206. Deitmer JW, Primor N, Zlotkin E. 1977. The effect of cobra venom cardiotoxin on locust skeletal muscle. *J Invert Pathol.* 30(2): 232–236. DOI: 10.1016/0022-2011(77)90224-5.
207. Osipov AV, Starkov VG, Utkin YN. 2002. Toxicity of cobra venom components to cockroach *Gromphadorhina portentosa*. *Toxicon.* 40(10): 1507. DOI: 10.1016/s0041-0101(02)00161-7.
208. Babu S, Dass KP, Venkatachari SA. 1971. Effects of scorpion venom on some physiological processes in cockroach. *Toxicon.* 9(2): 119–124. DOI: 10.1016/0041-0101(71)90004-3.
209. Majori G, Bettini S, Casaglia O. 1972. Effect of black widow spider venom on the cockroach heart. *J Insect Physiol.* 18(5): 913–927. DOI: 10.1016/0022-1910(72)90029-7.
210. Klowden MJ, Vitale AJ, Trumble MJ, Wesson CR, Trumble WR. 1992. A bioassay for cobra cardiotoxin activity using semi-isolated cockroach heart. *Toxicon.* 30(3): 295–301. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90870-b.
211. Corrêa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo IL, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves ML, Sanz L, Foguel D, Zingali RB, Calvete JJ. 2011. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics.* 74(9): 1795–1809. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.04.003.
212. Ciscotto PH, Rates B, Silva DA, Richardson M, Silva LP, Andrade H, Donato MF, Cotta GA, Maria WS, Rodrigues RJ, Sanchez E, De Lima ME, Pimenta AM. 2011. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J Proteomics.* 74(9): 1810–1825. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.07.011.
213. Schmidt KP. 1952. The Surinam coral snake *Micrurus surinamensis*. *Fieldiana Zool.* 34: 25–34.
214. Greene HW. 1976. The food habits and feeding behavior of New World coral snakes. MSc dissertation, University of Texas at Arlington, Arlington, Texas. 132 p.
215. Cunha O, Nascimento FP. 1993. Ofídios da Amazônia. As cobras corais da região leste do Pará. *Bol Museu Paraense Emilio Goeldi.* 9: 1–191.
216. Silva Jr NJ. 1993. The snakes from Samuel hydroelectric power plant and vicinity, Rondônia, Brazil. *Herpetolog. Nat. Hist.* 1: 37–86.
217. Roze JA. 1996. Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification and Venoms. Krieger Publishing Co., Malabar, FL, USA, 340 p.

218. da SILVA DA. 2011. Atividades biológicas de peçonhas de vespa (*Polistes lani o lani*) e formiga (*Paraponera clavata*). Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 134 p.
219. SILVA EC. 2003. Caracterização de toxinas presentes em peçonhas de vespas. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 177 p.
220. Koivula K, Rondinelli S, Näsman J. 2010. The three-finger toxin MT α is a selective α_{2B} -adrenoceptor antagonist. *Toxicon*. 56(3): 440–447. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.05.001.
221. Quinton L, Girard E, Maiga A, Rekik M, Lluet P, Masuyer G, Larregola M, Marquer C, Ciolek J, Magnin T, Wagner R, Molgó J, Thai R, Fruchart-Gaillard C, Mourier G, Chamot-Rooke J, Ménez A, Palea S, Servent D, Gilles N. 2010. Isolation and pharmacological characterization of AdTx1, a natural peptide displaying specific insurmountable antagonism of the α_{1A} -adrenoceptor. *Br J Pharmacol*. 159(2): 316–325. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00532.x.
222. Rouget C, Quinton L, Maïga A, Gales C, Masuyer G, Malosse C, Chamot-Rooke J, Thai R, Mourier G, De Pauw E, Gilles N, Servent D. 2010. Identification of a novel snake peptide toxin displaying high affinity and antagonist behaviour for the α_2 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 161(6): 1361–1374. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00966.x.
223. Blanchet G, Upert G, Mourier G, Gilquin B, Gilles N, Servent D. 2013. New α -adrenergic property for synthetic MT β and CM-3 three-finger fold toxins from black mamba. *Toxicon*. 75: 160–167. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.04.017.
224. Blanchet G, Collet G, Mourier G, Gilles N, Fruchart-Gaillard C, Marcon E, Servent D. 2014. Polypharmacology profiles and phylogenetic analysis of three-finger toxins from mamba venom: case of aminergic toxins. *Biochimie*. 103: 109–117. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.04.009.
225. McCann CM, Bracamontes J, Steinbach JH, Sanes JR. 2006. The cholinergic antagonist α -bungarotoxin also binds and blocks a subset of GABA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(13): 5149–5154. DOI: 10.1073/pnas.0600847103.
226. Hannan S, Mortensen M, Smart TG. 2015. Snake neurotoxin α -bungarotoxin is an antagonist at native GABA $_A$ receptors. *Neuropharmacology*. 93: 28–40. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.01.001.
227. Kudryavtsev DS, Shelukhina IV, Son LV, Ojomoko LO, Kryukova EV, Lyukmanova EN, Zhmak MN, Dolgikh DA, Ivanov IA, Kasheverov IE, Starkov VG, Ramerstorfer J, Sieghart W, Tsetlin VI, Utkin YN. 2015. Neurotoxins from snake venoms and α -conotoxin Iml inhibit functionally active ionotropic γ -aminobutyric acid (GABA) receptors. *J Biol Chem*. 290(37): 22747–22758. DOI: 10.1074/jbc.M115.648824.
228. Rosso JP, Schwarz JR, Diaz-Bustamante M, Céard B, Gutiérrez JM, Kneussel M, Pongs O, Bosmans F, Bougis PE. 2015. MmTX1 and MmTX2 from coral snake venom potently modulate GABA $_A$ receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(8): 891–900. DOI: 10.1073/pnas.1415488112.
229. Luetje CW, Wada K, Rogers S, Abramson SN, Tsuji K, Heinemann S, Patrick J. 1990. Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. *J Neurochem*. 55(2): 632–640. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04180.x.

230. Servent D, Winckler-Dietrich V, Hu HY, Kessler P, Drevet P, Bertrand D, Ménéz A. 1997. Only snake curare-mimetic toxins with a fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *J Biol Chem.* 1997 272(39): 24279–24286. DOI: 10.1074/jbc.272.39.24279.
231. Roy A, Zhou X, Chong MZ, D'hoedt D, Foo CS, Rajagopalan N, Nirthanan S, Bertrand D, Sivaraman J, Kini RM. 2010. Structural and functional characterization of a novel homodimeric three-finger neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *J Biol Chem.* 285(11): 8302–8315. DOI: 10.1074/jbc.M109.074161.
232. Utkin YN, Kasheverov IE, Kudryavtsev DS, Andreeva TV, Starkov VG, Ziganshin RH, Kuznetsov DV, Anh HN, Thao NT, Khoa NC, Tsetlin VI. 2015. Nonconventional three-finger toxin BMLCL from krait *Bungarus multicinctus* venom with high affinity interacts with nicotinic acetylcholine receptors. *Dokl Biochem Biophys.* 464: 294–297. DOI: 10.1134/S1607672915050099.
233. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 89(1): 73–120. DOI: 10.1152/physrev.00015.2008
234. Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. 2018. Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol.* 16(4): 338–349. DOI: 10.2174/1570159X15666170912110450.
235. Papke RL, Lindstrom JM. 2020. Nicotinic acetylcholine receptors: conventional and unconventional ligands and signaling. *Neuropharmacology.* 168: 108021. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.108021.
236. Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux JP. 2000. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci.* 21(6): 211–217. DOI: 10.1016/s0165-6147(00)01489-9.
237. Lansdell SJ, Millar NS. 2000. The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology.* 39(4): 671–679. DOI: 10.1016/s0028-3908(99)00170-7.
238. Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B. 1986. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature.* 321(6068): 406–411. DOI: 10.1038/321406a0.
239. Liu Y, Sugiura Y, Padgett D, Lin W. 2010. Postsynaptic development of the neuromuscular junction in mice lacking the gamma-subunit of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J Mol Neurosci.* 40(1-2): 21–26. DOI: 10.1007/s12031-009-9248-x.
240. Whiting PJ, Lindstrom JM. 1986. Purification and characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from chick brain. *Biochemistry.* 25(8) :2082–2093.
241. Papke RL, Ono F, Stokes C, Urban JM, Boyd RT. 2012. The nicotinic acetylcholine receptors of zebrafish and an evaluation of pharmacological tools used for their study. *Biochem Pharmacol.* 84(3): 352–365. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.04.022.
242. Courjaret R, Lapied B. 2001. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal α -bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol.* 60(1): 80–91. DOI: 10.1124/mol.60.1.80.
243. Salgado VL, Saar R. 2004. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach

- neurons. J Insect Physiol. 50(10): 867–879. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2004.07.007.
244. Sun H, Liu Y, Li J, Cang X, Bao H, Liu Z. 2017. The potential subunits involved in two subtypes of α -Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. Insect Biochem Mol Biol. 81: 32–40. DOI: 10.1016/j.ibmb.2016.11.009.

ANEXO 1



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo comparativo da atividade neurotóxica de venenos de cobras-corais (*Micrurus spp.*) em zebrafish**, registrada com o nº **4478-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Stephen Hyslop e Raphael Schezaro Ramos**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **24 de fevereiro de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2017-31/12/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/03/2017-31/12/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Peixe / Zebrafish wild--type
No. de animais:	920
Peso / Idade:	indiferente
Sexo:	machos
Origem:	Biotério do Laboratório de Zebrafish, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 24 de fevereiro de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO 2



CERTIFICADO

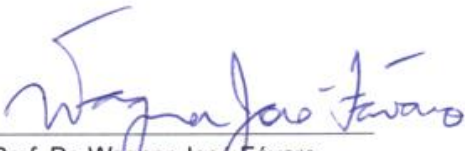
- Certificamos que a proposta intitulada **Estudos neurofarmacológicos e eletrofisiológicos da peçonha de *Micrurus surinamensis* (cobra coral aquática)**, registrada com o nº **5416-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Stephen Hyslop e Raphael Schezaro Ramos, Ananda Thalita Santa Fé Miguel**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **10/10/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	11/11/2019 a 30/11/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/10/2019 a 30/11/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	6
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Dias / 40.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	6
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas

Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	6
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	36
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	36 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	6
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	6
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Origem:	CEMIB/Unicamp - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Unicamp
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **14 de novembro de 2019**.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO 3



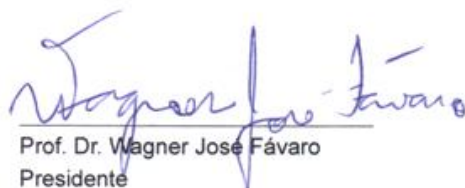
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudos neurofarmacológicos e eletrofisiológicos da peçonha de *Micrurus surinamensis* (cobra coral aquática)**, registrada com o nº **5433-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Stephen Hyslop e Raphael Schezaro Ramos, Ananda Thalita Santa Fé Miguel**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **14/11/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	21/10/2019 a 30/11/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 30/11/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Ave** / HY LINE W36
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Dias / 40.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Ave** / HY LINE W36
No. de animais:	36
Idade/Peso:	4.00 Dias / 40.00 Gramas
Sexo:	36 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Ave** / HY LINE W36
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Dias / 40.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Ave** / HY LINE W36
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Dias / 40.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Origem:	Granja Ito S/A
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **19 de novembro de 2019**.


Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO 4



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A7555B8

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A7555B8**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Micrurus surinamensis

Título da Atividade: **Neuromuscular Activity of Micrurus surinamensis (Aquatic Coral Snake) Venom in Avian and Mammalian Preparations In Vitro**

Equipe

Stephen Hyslop **UNICAMP**
Raphael Schezaro Ramos **UNICAMP**

Envios de Amostra

Espécie: **Micrurus surinamensis**
 Tipo do Patrimônio Genético: **-**
 Forma do Patrimônio Genético: **Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)**
 Instituição Destinatária: **University of Strathclyde**
 Sede da Instituição Destinatária: **161 Cathedral Street, Glasgow, Escócia, G4 0RE, Reino Unido**

Data do Cadastro: **02/10/2018 11:41:03**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:33** de **08/10/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO 5



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A95A470

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A95A470**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Micrurus surinamensis

Título da Atividade: **Neurotoxicidade, embriotoxicidade e cardiotoxicidade da peçonha de Micrurus surinamensis (cobra coral aquática)**

Equipe

Stephen Hyslop **UNICAMP**
Raphael Schezaro Ramos **UNICAMP**

Envios de Amostra

Espécie: **Micrurus surinamensis**
 Tipo do Patrimônio Genético: **-**
 Forma do Patrimônio Genético: **Amostra líquida em tubo de microcentrifuga (eppendorf)**
 Instituição Destinatária: **University of Strathclyde**
 Sede da Instituição Destinatária: **161 Cathedral Street, Glasgow, Escócia, G4 0RE, Reino Unido**

Data do Cadastro: **06/01/2020 18:46:02**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:30 de 08/10/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**