COINTER PDVS 2021

III CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS DA SAÚDE
Edição 100% virtual | 01 a 03 de dezembro

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

REVISIÓN INTEGRATIVA SOBRE LA ACTIVIDAD NEUROTÓXICA DE LAS FOSFOLIPASAS A2 DEL VENENO DE SERPIENTE

INTEGRATIVE REVIEW REGARDING THE NEUROTOXIC ACTIVITY OF PHOSPHOLIPASES A2 FROM SNAKE POISON

Apresentação: Comunicação Oral

Matheus Azevedo Bomfim¹; Wilson Antonio da Silva²; Juliana Mendes Correia³

DOI: <https://doi.org/10.31692/2526-7701.IIICOINTERPDVS.0027>

RESUMO

O ofidismo é responsável por cerca de 1,8 a 2,7 milhões de casos de envenenamentos ao ano, sendo a compreensão dos mecanismos biológicos responsáveis pela sua neurotoxicidade imprescindível para a elaboração de terapias diretamente ligadas à promoção da saúde pública. Entre a diversidade de moléculas que compõem o veneno de serpentes temos a fosfolipase A2, uma superfamília enzimática responsável pela produção de uma gama de quadros patológicos, que perpassam a miotoxicidade, cardiotoxicidade e neurotoxicidade. O presente trabalho visa identificar e indicar os principais avanços dos últimos 10 anos referentes à caracterização e entendimento da ação neurotóxica originada das fosfolipases A2 providas do veneno de serpentes, no que tange o campo do saber da toxicologia. Foi realizada a pesquisa por meio da metodologia de revisão integrativa de literatura, foram obtidos no total 18 artigos versando sobre o tema de pesquisa, dos quais 14 retratavam a ação neurotóxica de PLA2 específicas e 7 venenos com a presença de moléculas desse grupo enzimático. Os achados mais notáveis foi a possível identificação dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação neurotóxica da trimucrotoxina, a seletividade da MiDCA1 por canais de potássio específicos, constatação de que a ação neurotóxica da B. bilineata smargadina é fundamentada na ação da Bbil-TX e determinação da subunidade da crotoxina atuante como regulador do receptor GLIC. Apesar do avanço a respeito da ação neurotóxicas das PLA2 providas de ofídios a continuação e expansão de estudos sobre o tema se faz necessário, objetivando melhor compreensão do modo de ação biológica desse grupo enzimático e consequentemente possibilitando a elaboração de tratamentos a acidentes ofídicos e das mais diversas aplicações biotecnológicas e biomédicas.

Palavras-Chave: Venenos de Serpentes, Fosfolipases A2, Neurotoxicidade, Toxicologia.

¹ Biomedicina, UNISÃO MIGUEL, matheusbh@uol.com.br

² Licenciatura em Química, UFRPE, IIDV - PDVS, wilson.antonio98@hotmail.com

³ Doutora, UNISÃO MIGUEL, IIDV -PDVS, mendescorreia@yahoo.com.br

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

RESUMEN

Snakebite is responsible for about 1.8 to 2.7 million cases of poisoning a year, and the understanding of the biological mechanisms responsible for its neurotoxicity is essential for the preparation of therapies connected to the promotion of public health. Among the diversity of molecules that make up snake venom, there is a phospholipase A2, an enzymatic superfamily responsible for the production of a range of pathological conditions, which include myotoxicity, cardiotoxicity and neurotoxicity. The present work aims to identify and indicate the main advances of the last 10 years regarding the characterization and understanding of the neurotoxic action originating from the venom of A2 snakes, regarding the field of toxicology. The research was carried out through the methodology of integrative literature review, a total of 18 articles were selected dealing with the research topic, of which 14 portrayed the neurotoxic action of specific PLA2 and 7 poisons with the presence of molecules of the enzymatic group. The most notable findings were the possible identification of amino acid residues responsible for the neurotoxic action of trimucrotoxin, the selectivity of MiDCA1 for specific potassium channels, the finding that the neurotoxic action of *B. bilineata smargadina* is based on the action of Bbil -TX and determine the crotoxin subunit acting as a regulator of the GLIC receptor. Despite the advance regarding the neurotoxic action of PLA2 from snakes, the continuation and expansion of studies on the subject is necessary, aiming at a better understanding of the biological mode of action of this enzymatic group and consequently enabling the preparation of treatments for snake and other problems. diverse biotechnological and biomedical applications.

Palabras Clave: Venenos de serpente, fosfolipasas A2, neurotoxicidad, toxicología.

ABSTRACT

Snakebite is responsible for about 1.8 to 2.7 million cases of poisoning a year, and the understanding of the biological mechanisms responsible for its neurotoxicity is essential for the development of therapies directly linked to the promotion of public health. Among the diversity of molecules that make up snake venom, there is phospholipase A2, an enzymatic superfamily responsible for the production of a range of pathological conditions, which permeate myotoxicity, cardiotoxicity and neurotoxicity. The present work aims to identify and indicate the main advances of the last 10 years regarding the characterization and understanding of the neurotoxic action originated from phospholipases A2 from snake venom, in the field of toxicology knowledge. The research was carried out through the methodology of integrative literature review, a total of 18 articles were obtained dealing with the research topic, of which 14 portrayed the neurotoxic action of specific PLA2 and 7 poisons with the presence of molecules from this enzymatic group. The most notable findings were the possible identification of amino acid residues responsible for the neurotoxic action of trimucrotoxin, the selectivity of MiDCA1 for specific potassium channels, the finding that the neurotoxic action of *B. bilineata smargadina* is based on the action of Bbil-TX and determination of the crotoxin subunit acting as a regulator of the GLIC receptor. Despite the advance regarding the neurotoxic action of PLA2 from snakes, the continuation and expansion of studies on the subject is necessary, aiming at a better understanding of the biological mode of action of this enzymatic group and consequently enabling the development of treatments for snake and other accidents. diverse biotechnological and biomedical applications.

Key words: Snake Venoms, Phospholipases A2, Neurotoxicity, Toxicology.

INTRODUÇÃO

O ofidismo é um problema de saúde pública negligenciado, que afeta principalmente países tropicais e subtropicais, localizados na África, Ásia e América Latina. Cerca de 5,4 milhões de acidentes ocorrem a cada ano, resultando em 1,8 a 2,7 milhões de casos de envenenamentos por acidentes ofídicos ao ano (WHO, 2021). As peçonhas de serpentes são uma complexa mistura de constituintes, da qual cerca de 95% do seu peso seco são proteínas e polipeptídeos, sendo as fosfolipases A2 (PLA2) uma das substâncias mais abundantes em determinadas espécies (HIU e YAP, 2020).

As PLA2 compreendem um extenso grupo de enzimas, responsável por uma diversidade de atividades farmacológicas e toxicológicas caracterizadas pela sua ação biológica de hidrólise da ligação éster e produção de lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2013; HIU e YAP, 2020). A produção da toxina PLA2 ocorre na região das glândulas das serpentes, sendo as famílias Colubridae (*sensu lato*), Viperidae e Elapidaeas os principais grupos de ofídios fonte de fosfolipídios A2 (FRY e WÜSTER, 2004).

A inoculação dessas toxinas geralmente ocorre via muscular ou subcutânea, promovendo efeitos biológicos que englobam a miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos anticoagulantes, hemolíticos, convulsionantes, indução de edemas, neurotoxicidade entre outras alterações fisiológicas (MACKESSY, 2009). O conhecimento sobre as PLA2, diante da vasta literatura, perpassa por diversos campos de estudos, objetivando a compreensão da sua estrutura, composição, imunogenicidade, toxicidade e aplicação biotecnológica (LOMONTE et al., 2016; FRANGIEH et al., 2021; DHANANJAYA e SIVASHANKARI, 2015), que datam da década de 40 (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2013).

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo indicar os principais avanços dos últimos 10 anos referentes à caracterização e entendimento da ação neurotóxica resultante das PLA2 originadas das peçonhas de serpentes, delimitando o seu campo de interesse a estudos provindos da esfera da toxicologia.

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O principal evento neurotóxico desencadeado por acidentes ofídicos é o bloqueio da transmissão neuromuscular, o qual ocorre basicamente em duas regiões, a pré-sináptica, por meio de proteínas vesiculares sinápticas, canais de cálcio, potássio, membranas e receptores pré-sinápticos e/ou via pós-sináptica, por meio de receptores pós-sinápticos e canais de sódio. As neurotoxinas de ação pré-sináptica, como as fosfolipases A2, atuantes na região das membranas pré-sinápticas, se ligam aos terminais do nervos motores, promovendo o esgotamento da acetilcolina das vesículas sinápticas e/ou sua liberação prejudicada, seguido da degeneração do terminal do nervo motor (RANAWAKA et al., 2013).

As fosfolipases A2 constituem uma superfamília enzimática composta por mais de 50 moléculas distintas, as quais apresentam baixa massa molecular, dependência de Ca^{2+} para sua ação biológica e são estruturalmente subdivididos nos grupos I, II, III, V, X e XII (ZHOU et al., 2009; MURAKAMI et al., 2020).

As PLA2s são constituídas de três hélices principais e duas folhas β antiparalelas reticuladas por ligações do tipo dissulfeto, contendo na sua estrutura temos um loop de ligação altamente conservado. Os quatro principais sítios ativos são os His48, Asp49 e Asp99, os quais coordenam o processo com o Ca^{2+} via formação e interação de acoplamento com o hidrogênio (HIU e YAP, 2020).

Baseada na sequência de aminoácidos, estrutura tridimensional e o padrão de ligações dissulfeto as enzimas tóxicas provenientes de serpentes se enquadram nos grupos I ou II. O grupo I tem na sua maioria de 115 a 120 resíduos de aminoácidos, com sete pontes dissulfeto e ligação dissulfeto entre o 11º e o 77º resíduos cys, enquanto o grupo II contém em sua maioria 120 a 125 resíduos de aminoácidos, 7 pontes dissulfetos e diferem do grupo I pela presença de uma cauda C-terminal estendida (ZHOU et al., 2009).

A grande diversidade de atividades farmacológicas e toxicológicas dessas fosfolipases é provavelmente originada pela “evolução acelerada”, processo responsável pela incorporação de aminoácidos à estrutura dessas moléculas (KINI e CHAN, 1999). Porém, parece não haver uma clara relação entre o quantitativo da atividade enzimática e a hidrólise lipídica com a ação farmacológica das PLA2s *in vivo* (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2013).

Na perspectiva clínica, a ação neurotóxica na região pré-sináptica é a atividade

biológica de maior relevância para a maioria das mortes ocasionadas pelo envenenamento por ofídios (CRUZ et al., 2009). A atividade de neurotoxicidade periférica é ocasionada por α -neurotoxinas, substâncias não enzimáticas do grupo de “três dedos” e pelas β -neurotoxinas, responsáveis pelo bloqueio do sistema de transmissão neuromuscular. Chen-Yuan Lee e colaboradores foram os responsáveis por isolar a β -bungarotoxina (β -BT), uma das primeiras moléculas da família PLA2 com ação neurotóxica pré-sináptica relatada na literatura. Além disso propuseram que o mecanismo de ação dessa molécula consistia na interferência do sistema de acoplamento excitação-secreção (CHANG e LEE, 1963).

Vários componentes do aparelho neuromuscular, incluindo organelas intracelulares do terminal nervoso motor são afetados pela ação das PLA2. A ação dessas enzimas na região pré-sináptica foi evidenciado no sítio no nervo terminal, através da ligação inicial de maneira rápida, permitindo o aumento da liberação de neurotransmissores e por fim o bloqueio de maneira irreversível ao nervo pré-sináptico. Com fortes indicativos de que o principal local de ação dessas moléculas é na camada externa da membrana plasmática (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2013).

A ação das PLA2 na região pós-sináptica ativa a proteína quinase C (PKC), os fosforilatos do PKC atuam nos receptores nicotínicos, aumentando sua atividade, contribuindo para a alteração do estado conformacional da proteína receptora, a tornando menos capaz de ativação por acetilcolina. Além disso, o estágio de inativação do receptor ocorre com a sua desfosforilação por fosfatases sensíveis ao cálcio, resultando na internalização dos receptores nicotínicos agora inativados (BICKLER, 2020).

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão integrativa da literatura realizada de acordo com as seguintes etapas: elaboração do problema de pesquisa, levantamento na literatura, coleta de dados, análise crítica dos estudos incluídos, discussão dos resultados extraídos e apresentação do material produzido (ERCOLE et al., 2014).

A amostragem da pesquisa foi obtida de artigos científicos publicados no PubMed Central (PMC), PubMed, Science Direct e Biblioteca Virtual de Saúde (BVS). Para delimitação da amostra foram utilizados para a pesquisa os descritores em inglês (“pla2”, “Phospholipases A2”, “Snake Venom”, “Neurotoxicity”), sendo utilizado o operador booleano “AND” e “OR” entre os descritores. Foi adicionado na amostra artigos que no título ou “abstract” versassem sobre a temática, disponíveis na íntegra, originais, nos idiomas inglês e português, publicados nos últimos 10 anos (2011 a 2021). Foram excluídos artigos não contemplados nos critérios de inclusão, artigos de reflexão e editoriais.

Para a categorização foi elaborado um quadro sinóptico abrangendo aspectos pertinentes como o título da pesquisa, autores, data, síntese metodológica, objetivo, resultados e por fim conclusões. Os estudos selecionados foram organizados obedecendo uma ordem cronológica crescente de acordo com a data de publicação.

A discussão dos dados foi realizada de forma descritiva, possibilitando observar, contar e classificar os dados com intuito de reunir o conhecimento produzido sobre o tema explorado na revisão.

Não foi necessária apresentação deste estudo ao comitê de ética, pois os dados utilizados na pesquisa são de domínio público.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da pesquisa realizada com os respectivos descritores e operadores booleanos indicados na figura 01, foram encontrados um amostral de 1148 artigos. Posteriormente à exclusão dos artigos em duplicata, que não contemplassem os critérios de inclusão e o escopo do trabalho, obteve-se o amostral final com um total de 18 artigos.

Figura 01: Fluxograma referente a seleção dos artigos inclusos.

Fonte: Própria (2021).

Os artigos selecionados, versando sobre os avanços obtidos referentes ao isolamento e caracterização da ação neurotóxica das fosfolipases A2, provenientes de ofídios, foram inseridos na tabela abaixo no intuito de facilitar a discussão e compreensão sobre o amostral obtido, condizentes com o objetivo de pesquisa.

Tabela 01: Referente ao amostral de artigos inclusos.

Título	Autor(es) e ano de publicação	Objetivo	Síntese metodológica	Resultados	Conclusões
--------	-------------------------------	----------	----------------------	------------	------------

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

Mutagenesis analyses explore residues responsible for the neurotoxic and anticoagulant activities of Trimucrotoxin, a pit-viper venom Asn6-phospholipase A2	(TSAI, WANG E HSEU, 2011)	A Trimucrotoxin (TmCT) é uma fosfolipase A2, proveniente de <i>Protobothrops mucrosquamatus</i> . O presente estudo visa caracterizar os resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação neurotóxica e anticoagulante dessa molécula.	Expressão das proteínas recombinantes com resíduos de aminoácidos do TmCT e do tipo selvagem em <i>Escherichia coli</i> , administradas em preparação de músculo-nervoso de bívter cervicis.	Todos os resíduos os 37 TmCT mutantes promoveram a neurotoxicidade, sendo 8 deles vitais para essa ação biológica. Além de apresentar resíduos responsáveis pela ação anticoagulante.	Os resíduos Asn1, Asn6, Lys7, Ile11, Met12, Gly53, Thr79, His108 e Met118 são essenciais para a neurotoxicidade mediada por TmCT.
Identification of presynaptic neurotoxic complexes in the venoms of three Australian copperheads (<i>Austrelaps spp.</i>) and the efficacy of tiger snake antivenom to prevent or reverse neurotoxicity	(MARCON E NICHOLSON, 2011)	Identificar a presença de neurotoxicidade pré ou pós sináptica em venenos provenientes das serpentes <i>Austrelaps superbus</i> , <i>Austrelaps labialis</i> e <i>Austrelaps ramsayi</i> .	Após a purificação e exclusão por tamanho foram administradas frações do veneno em preparações de músculo-nervoso de bívter cervicis de pinto estimulado indiretamente, avaliando a reversibilidade e do antiveneno e estipulação da massa das moléculas analisadas.	Todos os venenos produziram um bloqueio rápido da estimulação evocada pelo músculo. Foram encontrados indícios de neurotoxinas pré-sinápticas em todos os venenos, porém baixa neurotoxicidade mediada pela PLA2.	Percebeu-se uma diferença da atividade enzimática dos venenos analisados, porém a atividade de PLA2s presente nos venenos foram baixas, possivelmente devido às frações de alto peso molecular formadas, as quais dificultam a identificação por espectrometria de massa.
Toxinology of Venoms from Five	(PYCROFT et al., 2012)	Caracterizar o veneno originado das	Após a obtenção dos venenos foi realizada a	Os venenos apresentaram atividade das PLA2 em	A neurotoxicidade visualizada

Australian Lesser Known Elapid Snakes		serpentes <i>Cryptophis boschmai</i> , <i>Denisonia devisi</i> , <i>Echiopsis curta</i> , <i>Hemiaspis signata</i> e <i>Vermicella annulata</i> .	estipulação de massa das amostras, administração em preparação de músculo-nervoso de bíventer cervicis de pinto e em modelos <i>in vivo</i> de rato.	níveis variados e com possível presença de neurotoxinas pré-sinápticas tardias. A ação enzimática nas preparações músculo-nervoso foram significativas.	na preparação corrobora com a falta de quadros severos pelo envenenamento por esses ofídios, além de ocorrer na região pós-sináptica não foi possível a identificação dos agentes por essa ação biológica.
Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes <i>Micrurus dissoleucus</i> and <i>Micrurus mipartitus</i> : An evolutionary perspective	(RENJIFO et al., 2012)	Investigar o bloqueio neuromuscular do veneno proveniente de <i>Micrurus mipartitus</i> e <i>Micrurus dissoleucus</i> e análise filogenética de ambas espécies.	Os venenos foram administrados em preparações músculo-nervoso de bíventer cervicis de pinto, em contrações mediadas por nervos evocadas por estimulação elétrica, seguido da análise histológica e filogenética.	O veneno de ambas espécies inibiram as contrações indiretas nas preparações BCP, com abolição da contração para acetilcolina externa. A preparação não teve a atividade alterada pelo tempo e potência das PLA2.	Ambos venenos apresentaram quadro sugestivo de ação pós-sináptica, com atividade de PLA2 dispensável para promoção de neurotoxicidade.
The neuromuscular activity of <i>Micrurus pyrrhocryptus</i> venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenom	(CAMARGO et al., 2011)	Avaliar o efeito do veneno de <i>Micrurus pyrrhocryptus</i> em preparações neuromusculares de aves e mamíferos e a neutralização da neurotoxicidade por antiveneno e anti-soro.	O veneno foi administrado em preparações de músculo-nervoso de bíventer cervicis de pinto e diafragma frênico de camundongo, seguido da incubação com neostigmina, avaliação da	O veneno bloqueou a resposta contrátil dependente do tempo e concentração nos dois modelos, com inibição progressiva da acetilcolina exógena. A intervenção com Sr^{2+} não afetou	Foi relatada ação neurotóxica na região pós-sináptica, o bloqueio das PLA2 não teve efeitos consideráveis na potência dos venenos, indicando atuação irrelevante dessas moléculas no

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

ms			ação de PLA2, creatina quinase e do dano muscular.	consideravelmente a potência do veneno e o tratamento com neostigmina produziu reversão transitória.	quadro neurotóxico.
Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A2 (Bbil-TX) isolated from <i>Bothriopsis bilineata smargadina</i> (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations	(FLORIANO et al., 2013)	Avaliação da atividade neuromuscular da Bbil-TX, PLA2 isolada de <i>Bothriopsis bilineata smargadina</i> .	Purificação seguida da administração da Bbil-TX em preparações de BCP e diafragma frênico de camundongo (DFC) e a análise de achados intracelulares e morfológicos.	Foi relatado bloqueio neuro-muscular dependente da concentração e tempo, e mionecrose nas preparações BCP e DFC. Sem mudanças significativas nas contrações com acetilcolina e cloreto de potássio.	Os achados sugerem ação pré-sináptica dependente do tempo e concentração em ambas preparações, indicando ação predominante da Bbil-TX no quadro neurotóxico.
Neurotoxicity of coral snake phospholipases A2 in cultured rat hippocampal neurons	(DE CARVALHO et al., 2014)	O trabalho teve como objetivo investigar os efeitos neurotóxicos das PLA2 Mlx-8 e Mlx-9 isoladas de <i>Micrurus lemniscatus</i> em culturas de neurônios hipocámpais primários cultivados.	Purificação, determinação de massa e da atividade das PLA2 via inserção em culturas celulares de neurônios hipocámpais de camundongo. A lesão foi avaliada pela mensuração via biomarcadores, entre eles a lactato desidrogenase e (LDH). A avaliação do potencial	As Mlx-8 e Mlx-9 apresentaram neurotoxicidade dependente do tempo, redução da LDH com aumento da quantidade de Ca ²⁺ citosólico livre, redução do potencial mitocondrial transmembrana, diminuição da atividade metabólica mitocondrial, danos	O aumento de Ca ²⁺ , alterações morfológicas e diminuição da LDH e do potencial transmembrana são indicativos da ação dessas moléculas na morte celular, apoptose, necrose e autofagia. Indicando a participação da Mlx-8 e Mlx-9 na morte celular induzida por

			mitocondrial transmembrana ocorreu via Rodamina 123, seguido da análise da concentração de cálcio intracelular e análise morfológica.	degenerativas visíveis por meio de alterações na morfologia celular. As alterações mais severas ocorreram pela ação da Mlx-9.	neurotoxicidade.
Eastern coral snake <i>Micrurus fulvius</i> venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2	(VERGARA et al., 2014)	Estudo proteômico, bioquímico e das atividades biológicas do veneno extraído da <i>Micrurus Fulvius</i> .	O veneno foi administrado em ratos, verificando o LD50, a atividade da PLA2 e da hialuronidase. Seguido da mensuração de massa, fracionamento, teste de letalidade e sequenciamento genético.	O veneno de <i>M. fulvius</i> é composto por cerca de 33% de fosfolipases do tipo A2, sendo altamente letais nos modelos <i>in vivo</i> utilizados no estudo.	A neurotoxicidade do veneno analisado é altamente letal e tem como seu principal agente fosfolipases da família A2.
PhTX-II a Basic Myotoxic Phospholipase A2 from Porthidium hyoprora Snake Venom, Pharmacological Characterization and Amino Acid Sequence by Mass Spectrometry	(HUANCA HUIRE-VEGA, PONCE-SOTO e MARANGONI, 2014)	Análise de PhTX-II, PLA2 miotóxica proveniente do veneno de <i>Porthidium hyoprora</i> , avaliando sua estrutura genética, bioquímica e farmacológica.	Após a identificação, isolamento, determinação de massa e sequenciamento dos aminoácidos ocorreu a avaliação da atividade das PLA2 em substrato sintético de Ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico e em preparação indiretamente estimulada de músculo-nervo de bívter cervicis de pinto.	A PhTX-II produziu bloqueio neuromuscular irreversível dependente do tempo, concentração e presença de cálcio. Sem mudanças significativas nas contrações para a acetilcolina exógena e cloreto de potássio.	A molécula promoveu o bloqueio neuromuscular na preparação, além de sugestivo de dano na região da membrana muscular e neurotoxicidade pós-sináptica na região dos receptores nicotínicos. Sendo o bloqueio neuromuscular envolvido na miotoxicidade e edema local.

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

Bp-13 PLA2: Purification and Neuromuscular Activity of a New Asp49 Toxin Isolated from Bothrops pauloensis Snake Venom	(SUCASAC A-MONZÓN et al., 2015)	O trabalho descreve o isolamento e caracterização da Bp-13, PLA2 isolada do veneno de <i>Bothrops pauloensis</i> .	Após a purificação, estimação da massa molecular, análise dos aminoácidos presentes foi avaliado a atividade da Bp-13 em substrato sintético e em preparações do hemidiafragma, músculos extensor longo dos dedos de rato e isolado de de biverter cervicis de pinto.	A Bp-13 atua na indução do bloqueio da tensão de contração dependente da concentração, tempo e cálcio, além de apresentar resistência ao calor. As preparações em modelos de aves apresentaram maior sensibilidade em relação aos modelos de mamíferos, os quais apresentaram menos de 30%.	Por conta do baixo bloqueio neuromuscular na preparação, a possível ação dessa molécula é preponderantemente muscular, com proeminência nas fibras do sarcolema, sendo seu efeito neuromuscular mínimo.
Biochemical and pharmacological characterization of three toxic phospholipase A2s from Daboia russelii snake venom	(KUMAR et al., 2015)	O isolamento e caracterização das isoenzimas VRV PL-IIIc, VRV-PL-VII e VRV-PL-IX. Fosfolipases A2 extraídas do veneno de <i>Daboia russelii</i> e que compõem o complexo "reprotoxina" foram administradas em cultura celular de neurônios do hipocampo.	Após a estimativa proteica, purificação, determinação de massa, LD50 utilizando ratos como modelo <i>in vivo</i> , avaliação da atividade anticoagulante, histopatológica, foi realizada a análise eletrofisiológica de célula inteira em cultura de células primárias do hipocampo.	A VRV PL-VII e a VRV PL-IX causaram dificuldade respiratória, paralisia do membro posterior e letalidade. Enquanto a VRV PL-IIIc não promoveu a letalidade, porém induziu necrose hepática severa.	O estudo permitiu a identificação dos sítios de ação das fosfolipases A2, relatando atividade letal da VRV PL-VII e VRV-PL-IX. A molécula VRV-PL-VII exibiu neurotoxicidade de pré e pós-sináptica, enquanto VRV-PL-IX apenas pré-sináptica.
Biological	(TERRA et al., 2015)	O objetivo deste estudo	Ocorreu a caracterização	O veneno de <i>M. spixii</i>	A MsPLA2-I isolada

characterization of the Amazon coral Micrurus spixii snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A2		é realizar a caracterização da atividade bioquímica, funcional, neurotóxica e microbicida do veneno extraído da <i>Micrurus spixii</i> , incluindo da fosfolipase A2, MsPLA2-I.	o da atividade edematogênica, miotóxica pela avaliação da creatina quinase e estudo miográfico em ratos. A análise da ação da PLA2 ocorreu via reação colorimétrica comparada ao veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> , além de avaliar o efeito citotóxico, anti-leishmanial e antiplasmodial. E por fim a purificação, quantificação, determinação de massa e da sequência de aminoácidos.	apresentou alta atividade fosfolipídica quando comparada com o veneno de B. jararacussu, com alta liberação de creatina quinase, atividade citotóxica e microbicida. A molécula MsPLA2-I induziu o bloqueio de contrações musculares indiretas e diretas e dano miotóxico via desestabilização da membrana da fibra muscular, levando a despolarização celular e inexcitabilidade.	apresentou alta concentração de fosfolipases, efeitos neurotóxicos e indução do bloqueio de contrações musculares.
Neurotoxic phospholipase A2 from rattlesnake as a new ligand and new regulator of prokaryotic receptor GLIC (proton-gated ion channel from G.	(OSTROWSKI et al. 2016)	Investigação do potencial de interação entre a subunidade CB da crotoxina, PLA2 proveniente do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> com o receptor celular GLIC.	Expressão e purificação da GLIC recombinante, seguido da interação com a PLA2 purificada. A avaliação ocorreu via Dicroísmo circular, estudo eletrofisiológico e Espectrofluorométrico.	Identificação da GLIC como um novo alvo da proteína PLA2, por meio de ligação envolvendo o domínio extracelular.	A PLA2 é um regulador do receptor GLIC, que quando ligados ocorre o aprimoramento da atividade enzimática da fosfolipase A2.

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

violaceus)					
Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A2, AplTx-I, purified from <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> a snake venom	(RESENDE et al. 2017)	Purificação e caracterização da PLA2 ácida AplTx-I, proveniente do veneno de <i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i> .	Purificação, seguida da caracterização bioquímica, estrutural e farmacológica. A avaliação da neurotoxicidade ocorreu em modelo biventor de pinto nervo-músculo cervicais (<i>in vivo</i>) e frênica de camundongo nervo-diafragma (<i>ex vivo</i>).	A preparação <i>in vivo</i> não inibiu a resposta de contração da acetilcolina, carbacol e/ou potássio significativa, porém no modelo <i>ex vivo</i> ocorreu o bloqueio neuromuscular de forma irreversível após a lavagem.	A AplTx-I apresenta uma possível ação seletiva em aves, sem neurotoxicidade em mamíferos. Além de sua ação ocorrer provavelmente nos nervos pré-sinápticos.
Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A2 subunit of crotoxin from <i>Crotalus durissus terrificus</i> snake venom needs its acid chaperone to concurrently inhibit acetylcholine release and produce muscle blockage	(CAVALCANTE et al. 2017)	Verificação do efeito de bloqueio da Crotoxina (CTX), fosfolipase A2, heterodimérica na liberação do transmissor evocado pelo nervo. A CTX é uma molécula proveniente da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> .	Os experimentos foram realizados com preparações de diafragma frênico de camundongos. A detecção da exocitose do transmissor e a acetilcolina evocada pelo nervo e sua liberação ocorreu via microscopia de vídeo fluorescente e espectrometria de cintilação líquida.	A CTX e a subunidade que promoveu a exocitose no transmissor evocado pelo nervo, caracterizado pela facilitação inicial transitória. Ocorreu a redução da liberação de acetilcolina e diminuição da amplitude nos nervos evocados.	Os dados demonstram que CTX exerce uma ação inibitória pré-sináptica sobre a liberação de acetilcolina, que é altamente dependente da atividade da PLA2. A CTX de forma isolada é incapaz de causar paralisia muscular.
Inhibition of Kv2.1	(SCHÜTTE R et al.	Investigar o efeito da	Após a purificação e	Foi identificado	Essa toxina mostrou

Potassium Channels by MiDCA1, A Pre-Synaptically Active PLA2-Type Toxin from <i>Micrurus dumerilii</i> carinicauda Coral Snake Snake Venom	2019)	MiDCA1 em canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) e em um sistema de expressão heterólogo. A MiDCA1 é uma PLA2 neurotóxica isolada do veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> .	quantificação da MiDCA1 ocorreu a expressão em canais de potássio dependentes de voltagem em células primárias de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongo e em oócitos de <i>Xenopus oocytes</i> .	que essa fosfolipase inibiu o canal de potássio Kv2.1.	seletividade por canais de Kv2.1, permitindo a especulação de que o bloqueio desse canal pela MiDCA1 está implícito na ação de liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares.
Variations in neurotoxicity and proteome profile of Malayan krait (<i>Bungarus candidus</i>) venoms	(RUSMILI et al. 2019)	Investigar a variação geográfica da ação neurotóxica e composição do veneno de <i>Bungarus candidus</i> das regiões da Indonésia, Malásia e Tailândia	Após a preparação, avaliação da concentração proteica, o veneno foi adicionado a preparações de músculo do nervo de pinto biventre cervicis.	Foi identificado variação da neurotoxicidade do veneno dependente das suas localizações, sendo a de atividade mais tóxica proveniente de peçonha da tailândia	A variação da atividade neurotóxica dependente da região pode ser resultado de diferenças geográficas, do tipo de presa, ecológicas ou climáticas.
In Vitro Neurotoxicity of Chinese Krait (<i>Bungarus multicinctus</i>) Venom and Neutralization by Antivenoms	(LIANG et al. 2021)	O estudo busca avaliar a neurotoxicidade <i>in vitro</i> do veneno de <i>Bungarus multicinctus</i> e a eficácia do antiveneno	O veneno foi administrado em preparação BCP, avaliando a inibição de contrações musculares e respostas de agonistas exógenos dependente da concentração e avaliação da atividade do antiveneno pré e pós administração das toxinas de <i>B. multicinctus</i>	O veneno apresentou ação dependente da concentração e tempo, induzindo respostas contráteis atenuadas para agonistas do receptor de acetilcolina nicotínico, com inibição da resposta da acetilcolina, quadro revertido pelo antiveneno.	O veneno promoveu neurotoxicidade de pós-sináptica, sem reversão após a administração do antiveneno. Os achados se assemelham a clínica causada pelo envenenamento por <i>B. multicinctus</i> , apoiando a hipótese de que a neurotoxicidade de resistente a antiveneno

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

			s	Foi relatada falha respiratória no modelo <i>in vivo</i> .	promovida por <i>B. multicinctus</i> é resultante das PLA2.
--	--	--	---	--	---

Fonte: Própria (2021).

Entre os 18 artigos selecionados foi possível perceber uma diversidade de intervenções correlacionadas à neurotoxicidade resultante de acidentes ofídicos. Foram caracterizadas fosfolipases da superfamília A2 provindas de serpentes dos gêneros *Protobothrops*, *Austrelaps*, *Cryptophis*, *Denisonia*, *Echiopsis*, *Hemiaspis*, *Vermicella*, *Micrurus*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Agkistrodon*, *Crotalus* e *Bungarus*. A maioria das espécies investigadas eram da família *elapidae*, grupo de ofídios caracterizado pelo veneno composto em abundância por PLA2, peculiaridade decorrente de uma gama de eventos evolutivos independentes (FRYE WÜSTER, 2004).

55,5% dos artigos selecionados utilizaram como método de avaliação toxicológica a inserção da molécula de interesse em preparações de biventer cervicis de pinto (BCP) (TSAI, WANG, e HSEU, 2011; MARCON e NICHOLSON, 2011; PYCROFT et al., 2012; RENJIFO et al., 2012; CAMARGO, DE ROODT, DA CRUZ-HÖFLING e RODRIGUES-SIMIONI, 2011; FLORIANO et al., 2013; HUANCHAHUIRE-VEGA, PONCE-SOTO, e MARANGONI, 2014; RESENDE et al. 2017; RUSMILI et al. 2019; LIANG et al. 2021), método fundamentado na avaliação da interação entre a molécula alvo com o tecido isolado da região BCP, o qual se encontra estimulado por meio de eletrodos. Essa preparação permite a distinção entre agentes promotores ou não de bloqueios neuromusculares de maneira simples. Também foi possível perceber a utilização de preparações de diafragma frênico de camundongo (FLORIANO et al., 2013; RESENDE et al. 2017; CAVALCANTE et al. 2017), utilizando o mesmo conceito base. Além do uso da cultura de células (DE CARVALHO et al., 2014; KUMAR et al., 2015; SCHÜTTER et al. 2019), comparação do perfil toxicológico via reação colorimétrica (Terra et al., 2015), expressão em sistemas modelos (SCHÜTTER et al. 2019) e *in vivo* para a avaliação toxicológica (VERGARA et al., 2014; KUMAR et al., 2015; TERRA et al., 2015; RESENDE et al. 2017).

Foram avaliadas e caracterizadas as ações neurotóxicas das moléculas Bbil-TX, Mlx-8, Mlx-9, PhTX-II, Bp-13, isoenzimas VRV PL, MsPLA2-I, AplTx-I e ocorreu a identificação dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação neurotóxica da

trimucrotoxina, a seletividade da MiDCA1 por canais de potássio Kv2.1, constatação de que a ação neurotóxica da *B. bilineata smargadina* é fundamentada na ação da Bbil-TX e determinação da atuação da subunidade CB da crotoxina como regulador do receptor GLIC.

Os últimos 10 anos de pesquisas referente a ação neurotóxica do veneno de ofídios corrobora com aspectos previamente retratados na literatura, como a associação da constituição do veneno com variação geográfica da serpente e por consequência variação da neurotoxicidade, dependência de Ca^{2+} para o funcionamento enzimático ideal das PLA2 e relatos de moléculas com ação pré-sináptica (RANAWAKA et al., 2013). Além disso foi possível encontrar moléculas que tem sua ação biológica pautada em sítios que diferem do funcionamento padrão desse grupo enzimático, as PLA2 provindas de *B. multicinctus* e as moléculas VRV-PL-IX e PhTX-II tiveram sua ação biológica na região pós-sináptica.

CONCLUSÕES

O presente trabalho evidencia os principais achados dos últimos 10 anos de estudos inclusos no campo da toxicologia sobre a ação das fosfolipases A2 neurotóxicas provenientes do veneno de ofídios. Foram encontradas evidências a respeito do mecanismo e/ou sítio de ação de 14 moléculas distintas e a identificação da presença de PLA2 promotoras de reações neurotóxicas no veneno de 7 diferentes ofídios. Apesar dos avanços, a continuação e expansão de estudos sobre o tema se faz necessário para a elucidação dos determinantes moleculares e eventos intracelulares responsáveis pela ação biológica desse grupo enzimático, possibilitando aplicações biotecnológicas e biomédicas dessas moléculas.

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

REFERÊNCIAS

BICKLER, Philip E. Amplification of snake venom toxicity by endogenous signaling pathways. *Toxins*, v. 12, n. 2, p. 68, 2020.

CAMARGO, Thiago Magalhães et al. The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrhocryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms. **Journal of venom research**, v. 2, p. 24–31, 2011.

CAVALCANTE, Walter L. G. et al. Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom needs its acid chaperone to concurrently inhibit acetylcholine release and produce muscle blockage. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 334, p. 8–17, 2017.

CHANG, C. C. e LEE, C. Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 144, p. 241–257, 1963.

CRUZ, Luzia S. e VARGAS, Roberto e LOPES, Antônio Alberto. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & disease**, v. 19, n. 1 Suppl 1, p. S1-42–6, Spring 2009.

DE CARVALHO, Nathalia Delazeri et al. Neurotoxicity of coral snake phospholipases A2 in cultured rat hippocampal neurons. **Brain research**, v. 1552, p. 1–16, 2014.

DHANANJAYA, B. L. e SIVASHANKARI, P. R. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 7, p. 649–657, 2015.

ERCOLE, Flávia Falci e MELO, Laís Samara De e ALCOFORADO, Carla Lúcia Goulart Constant. Revisão integrativa versus revisão sistemática. **REME rev. min. enferm**, p. 09–11, 2014.

FLORIANO, Rafael Stuari et al. Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A(2) (Bbil-TX) isolated from *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 69, p. 191–199, 2013.

FRANGIEH, Jacinthe et al. Snake venom components: Tools and cures to target cardiovascular diseases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 8, p. 2223, 2021.

FRY, B. G. e WÜSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 5, p. 870–883, 2004.

GUTIÉRREZ, José María e LOMONTE, Bruno. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon: official**

Journal of the International Society on Toxinology, v. 62, p. 27–39, 2013.

HIU, Jia Jin e YAP, Michelle Khai Khun. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A₂ and l-amino acid oxidase. **Biochemical Society transactions**, v. 48, n. 2, p. 719–731, 2020.

HUANCAHUIRE-VEGA, Salomón e PONCE-SOTO, Luis Alberto e MARANGONI, Sergio. PhTX-II a basic myotoxic phospholipase A₂ from Porthidium hyoprora snake venom, pharmacological characterization and amino acid sequence by mass spectrometry. **Toxins**, v. 6, n. 11, p. 3077–3097, 2014. Acesso em: 31 aug. 2021.

KINI, R. M. e CHAN, Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A₂ enzymes. **Journal of molecular evolution**, v. 48, n. 2, p. 125–132, 1999.

KUMAR, J. R. et al. Biochemical and pharmacological characterization of three toxic phospholipase A₂s from Daboia russelii snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 168, p. 28–38, 2015.

LIANG, Qing et al. In vitro neurotoxicity of Chinese krait (Bungarus multicinctus) venom and neutralization by antivenoms. **Toxins**, v. 13, n. 1, p. 49, 2021. Acesso em: 19 aug. 2021.

LOMONTE, Bruno et al. Venoms of Micrurus coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 122, p. 7–25, 2016.

MACKESSY, Stephen P. Handbook of venoms and toxins of reptiles. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 2009.

MARCON, Francesca e NICHOLSON, Graham M. Identification of presynaptic neurotoxin complexes in the venoms of three Australian copperheads (Austrelaps spp.) and the efficacy of tiger snake antivenom to prevent or reverse neurotoxicity. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 58, n. 5, p. 439–452, 2011.

MURAKAMI, Makoto e SATO, Hiroyasu e TAKETOMI, Yoshitaka. Updating phospholipase A₂ biology. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1457, 2020.

OSTROWSKI, Maciej et al. Neurotoxic phospholipase A₂ from rattlesnake as a new ligand and new regulator of prokaryotic receptor GLIC (proton-gated ion channel from G. violaceus). **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 116, p. 63–71, 2016.

PYCROFT, Kyle et al. Toxinology of venoms from five Australian lesser known elapid snakes. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 111, n. 4, p. 268–274, 2012.

RANAWAKA, Udaya K. e LALLOO, David G. e DE SILVA, H. Janaka. Neurotoxicity in snakebite--the limits of our knowledge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7,

REVISÃO INTEGRATIVA A RESPEITO DA ATIVIDADE NEUROTÓXICA DAS FOSFOLIPASES A2 PROVENIENTES DO VENENO DE SERPENTES

n. 10, p. e2302, 2013.

RENJIFO, Camila et al. Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: an evolutionary perspective. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 1, p. 132–142, 2012.

RESENDE, L. M. et al. Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A2, AplTx-I, purified from *Agkistrodon piscivorus leucostoma* snake venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 127, p. 22–36, 2017.

RUSMILI, Muhamad Rusdi Ahmad et al. Variations in neurotoxicity and proteome profile of Malayan krait (*Bungarus candidus*) venoms. **PloS one**, v. 14, n. 12, p. e0227122, 2019.

SCHÜTTER, Niklas et al. Inhibition of Kv2.1 potassium channels by MiDCA1, A pre-synaptically active PLA2-type toxin from *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 335, 2019.

Snakebite envenoming. **World Health Organization** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>. 2021.

SUCASACA-MONZÓN, Georgina et al. Bp-13 PLA2: Purification and neuromuscular activity of a new Asp49 toxin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochemistry research international**, v. 2015, p. 826059, 2015.

TAN, Choo Hock et al. Venom proteome of spine-bellied sea snake (*Hydrophis curtus*) from Penang, Malaysia: Toxicity correlation, immunoprofiling and cross-neutralization by Sea Snake Antivenom. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 3, 2018.

TERRA, Angelo L. C. et al. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A2. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 103, p. 1–11, 2015.

TSAI, Inn-Ho e WANG, Ying-Ming e HSEU, Ming-Jhy. Mutagenesis analyses explore residues responsible for the neurotoxic and anticoagulant activities of Trimucrotoxin, a pit-viper venom Asn6-phospholipase A2. **Biochimie**, v. 93, n. 2, p. 277–285, 2011.

VERGARA, Irene et al. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. **Journal of proteomics**, v. 105, p. 295–306, 2014.

ZHOU, Xingding e MANJUNATHA KINI, R. e DOLEY, Robin. Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press, 2009. p. 173–205.