

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNISO

***TRABALHO COMPLETO CONTENDO ARTIGOS CIENTÍFICOS. AGUARDANDO A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS**

RESUMO

Frente à questão global de saúde pública envolvendo os acidentes ofídicos e alinhado à proposta da Organização Mundial de Saúde em reduzir a 50% até 2030 as consequências nefastas do envenenamento, este trabalho avaliou a eficácia do Varespladib (VPL) como proposta alternativa e, indiretamente reforçar através de evidências experimentais o seu redirecionamento. O VPL é um inibidor de fosfolipases (PLA2) e tem se mostrado eficaz contra as atividades tóxicas de diferentes venenos ofídicos ricos em PLA2. Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* são conhecidos por apresentar potente atividade neurotóxica, podendo levar ao óbito por paralisia respiratória grave. Existem duas principais neurotoxinas presentes nesses venenos, com variações nas concentrações e atividades, entre as diversas espécies. A *Micrurus spixii* (*M. spixii*) é uma cobra coral que habita a região amazônica no Brasil, conhecida como coral amazônica. O estado da arte sobre a composição deste veneno é a existência de toxinas que atuam tanto em nível pré- como pós-sináptico. No primeiro, atua através do conteúdo de PLA2 que inibe a liberação de acetilcolina pelo neurônio motor; no segundo, através da ação sobre receptores nicotínicos, a exemplo das toxinas de três dígitos (3FTxs) ou α -neurotoxinas, o veneno leva à paralisia neuromuscular por esses dois principais mecanismos. Dessa forma estabeleceu-se o racional teórico deste estudo pela associação de Varespladib à Neostigmina (um agente anticolinesterásico), para avaliar a sua eficácia sobre esses dois alvos moleculares. Foram realizados ensaios para caracterização bioquímica do veneno (quantificação de proteínas totais e eletroforese em SDS-PAGE), tromboelastometria in vitro para averiguar a atividade anticoagulante sobre plasma humano, ensaios in vivo para avaliar as atividades letais e miotóxicas e ensaios ex vivo em preparações neuromusculares de ave. Soro antielapídico comercial foi utilizado em todo o estudo como referência. O teor proteico do veneno foi de $1,59 \pm 0,09$ mg/mL. Duas bandas majoritárias foram encontradas na eletroforese em SDS-PAGE, indicando a presença de PLA2 e 3FTx. O veneno apresentou potente atividade anticoagulante sobre o plasma humano in vitro, assim como apresentou alta atividade miotóxica,

e elevada letalidade in vivo. Também foi observado o bloqueio neuromuscular em preparações ex vivo, além do bloqueio das respostas contraturantes sobre ACh e KCl exógenos. O soro antielapídico foi totalmente eficaz contra a letalidade, mas nas demais atividades a eficácia foi parcial. Os resultados mostraram que o VPL foi mais eficaz nas atividades que dependiam da ação da PLA2, como nas atividades anticoagulante e miotóxica. Houve um efeito sinérgico entre o VPL e o soro potencializando a eficácia de ambos. O VPL não apresentou eficiência contra a atividade letal do veneno de *M. spixii*, e, apresentou eficácia parcial contra o bloqueio neuromuscular nos ensaios miográficos. Esses dois resultados interpretados em conjunto indicam que essas atividades dependem exclusiva ou preponderantemente da ação de α -neurotoxinas pós-sinápticas. A Neostigmina não apresentou eficácia no ensaio de letalidade, nas condições utilizadas, e sugere-se que sua indicação seja revista. Os resultados do presente estudo mostram que o VPL pode ser utilizado como uma alternativa complementar à soroterapia.

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

ABSTRACT

In the view of the global public health issue involving snakebites and in accordance to the World Health Organization's proposal to reduce the harmful consequences of poisoning by 50% until 2030, this work have evaluated the effectiveness of Varespladib (VPL) as an alternative proposal and, indirectly, reinforce its repurposing, through experimental evidences. VPL is a phospholipase (PLA2) inhibitor and is effective against the toxic activities of different PLA2-rich snake venoms. The venoms of snakes of the genus *Micrurus* are known to have potent neurotoxic activity, which can lead to death due to severe respiratory paralysis. There are two main neurotoxins present in these venoms, with variations in concentrations and activities between different species. *Micrurus spixii* (*M. spixii*) is a coral snake that inhabits the Amazon region in Brazil, known as the Amazon coral. The state of the art regarding the composition of this poison is the existence of toxins that act at both pre-and post-synaptic levels. In the first, it acts through the PLA2 content that inhibits the release of acetylcholine by the motor neuron; in the second, through action on nicotinic receptors, such as three-digit toxins (3FTxs) or α -neurotoxins, the venom leads to neuromuscular paralysis through these two main mechanisms. Thus, the theoretical rationale for this study was established by the association of Varespladib with Neostigmine (an anticholinesterase agent), to evaluate its effectiveness on these two molecular

targets. Assays were carried out to biochemically characterize the venom (quantification of total proteins and electrophoresis in SDS-PAGE), in vitro rotational thromboelastometry to investigate the anticoagulant activity on human plasma, in vivo assays to evaluate the lethal and myotoxic activities and ex vivo assays on avian neuromuscular preparations. Commercial antielapidic serum was used throughout the study as a reference. The protein content of the venom was $1,59 \pm 0,09$ mg/mL. Two major bands were found in SDS-PAGE electrophoresis, indicating the presence of PLA2 and 3FTx. The venom showed potent anticoagulant activity on human plasma in vitro, as well as high myotoxic activity and high lethality in vivo. Neuromuscular blockade was also observed in ex vivo preparations, in addition to the blockade of contracture responses to exogenous ACh and KCl. The antielapidic serum was completely effective against lethality, but in other activities it was partially effective. The results showed that VPL was more effective in activities that depended on the action of PLA2, such as anticoagulant and myotoxic activities. There was a synergistic effect between VPL and antielapidic serum, enhancing the effectiveness of both. The VPL was not effective against the lethal activity of *M. spixii* venom, as well as being partially effective against the neuromuscular blockade in myographic tests. These two results interpreted together indicate that these activities depend exclusively or preponderantly on the action of postsynaptic α -neurotoxins. Neostigmine was not effective in the lethality test, under the conditions used, and it is suggested that its indication be reviewed. The results of the present study show that VPL can be used as a complementary alternative to serotherapy.

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