

Fosfolipases A2 de peçonhas ofídicas: Atualização sobre purificação, caracterização biológica e aplicação biotecnológica

Phospholipases A2 from ofidic venoms: Update on purification, biological characterization and biotechnological application

Fosfolipasas A2 de venenos de ofidios: Actualización sobre la purificación, la caracterización biológica y la aplicación biotecnológica

Recebido: 13/05/2022 | Revisado: 22/05/2022 | Aceito: 26/05/2022 | Publicado: 02/06/2022

Matheus Azevedo Bomfim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9073-0530>
Centro Universitário São Miguel, Brasil
E-mail: matheusbh@uol.com.br

Wilson Antonio da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4174-3962>
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brasil
E-mail: wilson.antonio98@hotmail.com

Juliana Mendes Correia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0093-9558>
Centro Universitário São Miguel, Brasil
E-mail: mendescorre@yahoo.com.br

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 o manejo terapêutico. Entre a diversidade de moléculas que compõem a peçonha das serpentes existem as fosfolipase A2, família enzimática responsável pela produção de uma gama de quadros patológicos, incluindo a miotoxicidade, cardiotoxicidade e neurotoxicidade. O presente trabalho, realizado por meio da metodologia de revisão integrativa de literatura, visa identificar e indicar os principais avanços dos últimos 10 anos referentes à caracterização e o entendimento da ação neurotóxica originada das fosfolipases A2 provindas da peçonha de serpentes, no que tange o campo da toxicologia. Os principais progressos identificados corresponderam a compreensão de que a atividade neurotóxica da *B. bilineata smargadina* é fundamentada na ação da PLA2 Bbil-TX, comprovação da dependência da PhTX-II por cálcio para sua ação, identificação da ocorrência da ação neurotóxica muscular da BP-13 na região do sarcolema, determinação da subunidade da crotoxina atuante como regulador do receptor GLIC e identificação da seletividade da MiDCA1 por canais específicos de potássio. O avanço na compreensão desse grupo enzimático corresponde a parte do percurso necessário para o desenvolvimento de terapêuticas tendo como alvo as PLA2 e possíveis aplicações biotecnológicas dessas biomoléculas.

Palavras-chave: Toxinas de serpente; Fosfolipases A2; Neurotoxicidade; Toxicologia; Ensino em saúde.

Abstract

Ophidism is responsible for about 1.8 to 2.7 million cases of poisoning every year, and understanding the biological mechanisms responsible for its neurotoxicity is essential for therapeutic management. Among the diversity of molecules that compose snake venom there are the phospholipase A2, an enzyme family responsible for the production of a range of pathological conditions, including myotoxicity, cardiotoxicity, and neurotoxicity. The present work, carried out through the methodology of integrative literature review, aims to identify and indicate the main advances in the last 10 years regarding the characterization and understanding of the neurotoxic action of phospholipases A2 originating from snake venom, in the field of toxicology. The main progress identified corresponded to the understanding that the neurotoxic activity of *B. bilineata smargadina* is based on the action of PLA2 Bbil-TX, proof of the dependence of PhTX-II by calcium for its action, identification of the occurrence of the muscular neurotoxic action of BP-13 in the sarcolemma region, determination of the subunit of crotoxin acting as a regulator of the GLIC receptor, and identification of the selectivity of MiDCA1 by specific potassium channels. The advance in the understanding of this enzymatic group corresponds to part of the pathway necessary for the development of therapeutics targeting PLA2 and possible biotechnological applications of these biomolecules.

Keywords: Snake venoms; Phospholipases A2; Neurotoxicity; Toxicology; Health teaching.

Resumen

El ofidismo es responsable de entre 1,8 y 2,7 millones de casos de intoxicación cada año, y la comprensión de los mecanismos biológicos responsables de su neurotoxicidad es esencial para el manejo terapéutico. Entre la diversidad de moléculas que componen el veneno de serpiente se encuentra la fosfolipasa A2, una familia de enzimas responsable de la producción de una serie de condiciones patológicas, como la miotoxicidad, la cardiotoxicidad y la neurotoxicidad. El presente trabajo, realizado a través de la metodología de revisión bibliográfica integradora, tiene como objetivo identificar e indicar los principales avances en los últimos 10 años respecto a la caracterización y comprensión de la acción neurotóxica de las fosfolipasas A2 del veneno de serpiente, en el ámbito de la toxicología. Los principales avances identificados correspondieron a la comprensión de que la actividad neurotóxica de *B. bilineata smargadine* se basa en la acción de PLA2 Bbil-TX, la prueba de la dependencia de PhTX-II por el calcio para su acción, la identificación de la ocurrencia de la acción neurotóxica muscular de BP-13 en la región del sarcolema, la determinación de la subunidad de crotoxina que actúa como regulador del receptor GLIC y la identificación de la selectividad de MiDCA1 por canales de potasio específicos. El avance en el conocimiento de este grupo enzimático corresponde a parte de la ruta necesaria para el desarrollo de terapias dirigidas a PLA2 y a posibles aplicaciones biotecnológicas de estas biomoléculas.

Palabras clave: Venenos de serpiente; Fosfolipasas A2; Neurotoxicidad; Toxicología; Enseñanza en salud.

1. Introdução

O acidente ofídico é considerado um problema de saúde pública atualmente negligenciado que afeta principalmente países tropicais e subtropicais. Cerca de 5,4 milhões de acidentes ocorrem a cada ano, resultando em 1,8 a 2,7 milhões de casos de envenenamentos ao ano (World Health Organization [WHO], 2021). Os envenenamentos advêm da complexa mistura dos constituintes das peçonhas, onde cerca de 95% do seu peso seco são proteínas e polipeptídeos. Dentre estas, o presente estudo destaca as fosfolipasas A2 (PLA2) (Hiu & Yap, 2020).

As PLA2 compreendem um amplo grupo de enzimas, responsáveis por diversas atividades farmacológicas e toxicológicas caracterizadas pela ação hidrolítica da ligação éster e produção de lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (Gutiérrez & Lomonte, 2013; Hiu e Yap, 2020). Até o presente momento foram encontradas PLA2 nas peçonhas dos ofídios das famílias Colubridae (sensu lato), Viperidae e Elapidae (Tasoulis & Isbister, 2017).

A inoculação dessas toxinas geralmente ocorre via muscular ou subcutânea, promovendo efeitos biológicos que englobam a miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos anticoagulantes, neurotoxicidade tanto pré-sináptica quanto pós-sináptica 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 & Sivashankari, 2015),

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo indicar os principais avanços dos últimos 10 anos referentes à caracterização e o 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.

2. Metodologia

O presente estudo trata-se de uma revisão integrativa da literatura seguindo as etapas de elaboração do problema de pesquisa, levantamento na literatura, coleta de dados, análise crítica dos estudos incluídos e discussão dos resultados de acordo com o problema da pesquisa (Ercole et al., 2014).

Os artigos científicos analisados foram 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 a amostra artigos cujo 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 a ordem cronológica crescente de acordo com a data de publicação.

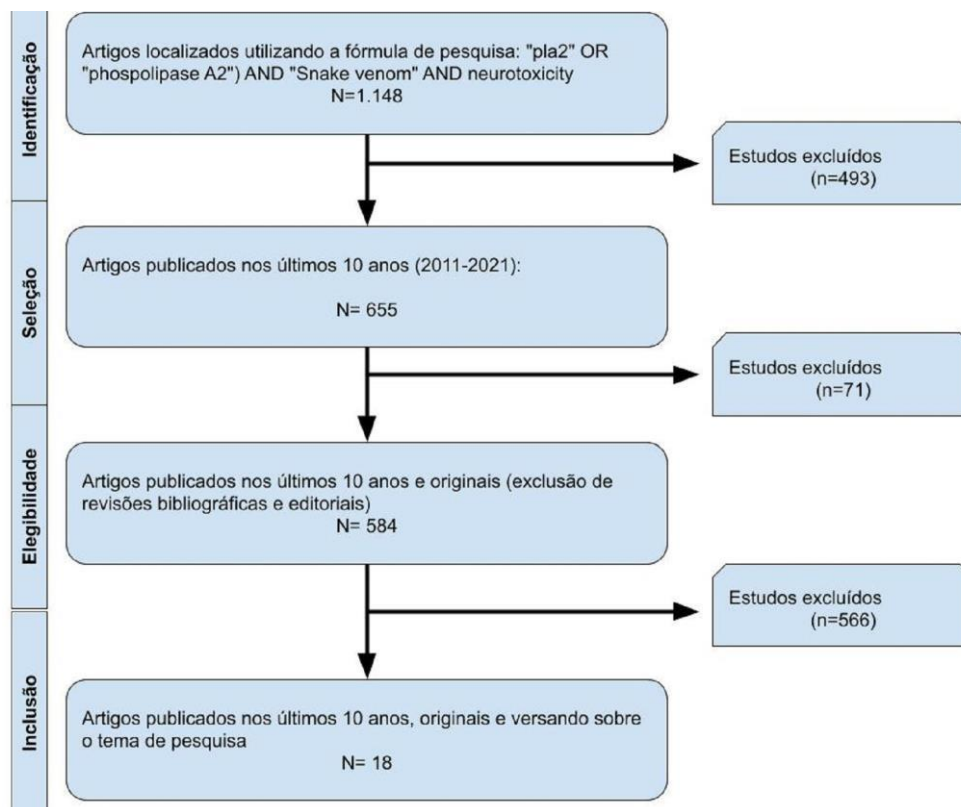
A discussão dos dados foi realizada de forma descritiva, possibilitando observar, contar e classificar os dados com intuito de reunir o conhecimento produzido sobre o tema explorado na revisão.

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

3. Resultados e Discussão

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

Figura 1: Fluxograma referente a seleção dos artigos inclusos.



Fonte: Autores (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 1 com o intuito de facilitar a discussão e compreensão sobre o amostral obtido, condizentes com o objetivo de pesquisa.

Tabela 1: Amostral de artigos incluídos.

Título	Autor(es) e ano de publicação	Objetivo	Síntese metodológica	Resultados	Conclusões
Mutagenesis analyses explore residues responsible for the neurotoxic and anticoagulant activities of Trimucrotoxin, a pit-viper venom Asn6-phospholipase A2	(Tsai, Wang, & Hseu, 2011)	Caracterizar os resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação neurotóxica e anticoagulante da Trimucrotoxina (TmCT) proveniente da <i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	Expressão das proteínas recombinantes com resíduos de aminoácidos do TmCT e do tipo selvagem em <i>Escherichia coli</i> , administrados em preparação de músculo-nervo de <i>biventer cervicis</i> .	Todos 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 neurotoxin 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 & Nicholson, 2011)	Identificar a presença de neurotoxicidade pré ou pós sináptica no tóxico proveniente das serpentes <i>Austrelaps superbis</i> , <i>Austrelaps labialis</i> e <i>Austrelaps ramsayi</i> .	Após a purificação e exclusão por tamanho foram inoculadas frações da peçonha em preparações de músculo-nervo de <i>biventer cervicis</i> de pinto estimulado indiretamente 0,(BCP), avaliando a reversibilidade do antiveneno e estipulação da massa das moléculas.	Todos os tóxicos produziram um bloqueio rápido da estimulação evocada pelo músculo. Foram encontrados indícios de neurotoxinas pré-sinápticas em todos os tóxicos, porém baixa neurotoxicidade mediada pela PLA2.	Percebeu-se uma diferença da atividade enzimática das peçonhas, porém a atividade das PLA2s presentes nos tóxicos foram baixas, possivelmente devido às frações de alto peso molecular as quais dificultam a identificação das mesmas via espectrometria de massa.
Toxinology of Venoms from Five Australian Lesser Known Elapid Snakes	(Pycroft et al., 2012)	Caracterizar a veneno originado das serpentes <i>Cryptophis boschmai</i> , <i>Denisonia devisi</i> , <i>Echiopsis curta</i> , <i>Hemiaspis signata</i> e <i>Vermicella annulata</i> .	Após a obtenção dos venenos foi realizada a estipulação de massa das amostras, administração em preparação de músculo-nervo de <i>biventer cervicis</i> de pinto e em modelos in vivo de rato.	Os venenos apresentaram atividade a níveis variados e com possível presença de neurotoxinas pré-sinápticas tardias. A ação enzimática nas preparações músculo-nervo foram significativa.	A neurotoxicidade visualizada corrobora com a falta de quadros severos pelo envenenamento por esses ofídios. Ação biológica ocorreu na região pós-sináptica, não sendo possível a identificação dos agentes responsáveis.
Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes <i>Micrurus dissoleucus</i> and <i>Micrurus mipartitus</i> : An evolutionary perspective	(Renjifo, Smith, Hodgson, Renjifo, Sanchez, Maldonado, & Riveros, 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 de músculo-nervo de <i>biventer cervicis</i> 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	(Camargo, Roodt, Cruz-Höfling, & Rodrigues-Simioni, 2011)	Avaliar o efeito do veneno de <i>Micrurus pyrrhocryptus</i> em preparações neuromusculares de aves e	O veneno foi administrado em preparações de músculo-nervo de <i>biventer cervicis</i> de pinto e diafragma frênico de	O veneno bloqueou a resposta contrátil dependente do tempo e concentração nos dois modelos, com inibição progressiva da acetilcolina exógena. A	Foi relatada ação neurotóxica na região pós-sináptica, o bloqueio das PLA2 não teve efeitos consideráveis na potência dos venenos,

commercial and specific coral snake antivenoms		mamíferos e a neutralização da neurotoxicidade por antiveneno e anti-soro.	camundongo, seguido da incubação com neostigmina, avaliação da ação de PLA2, da creatina quinase e do dano muscular.	Intervenção com Sr ²⁺ não afetou consideravelmente a potência do veneno e a neostigmina produziu reversão transitória.	indicando atuação irrelevante dessas moléculas no 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)	Investigar os efeitos neurotóxicos das PLA2 Mlx-8 e Mlx-9 isoladas de <i>Micrurus lemniscatus</i> em culturas de neurônios hipocâmpais primários cultivados.	Purificação, determinação de massa e da atividade via inserção em culturas celulares de neurônios hipocâmpais de camundongos. A lesão foi avaliada pela mensuração de biomarcadores, entre eles a lactato desidrogenase (LDH). A avaliação do potencial mitocondrial transmembrana ocorreu via Rodamina123, seguido da avaliação da concentração de cálcio intracelular e análise morfológica.	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 degenerativos visíveis por meio de alterações na morfologia celular. As alterações mais severas ocorreram pela ação da Mlx-9.	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 morte celular induzida por 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 in vivo 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 <i>Porthidium hyoprora</i> Snake Venom, Pharmacological	(Huancahuire-Vega, Ponce-Soto, & Marangoni, 2014)	Análise de PhTX-II, PLA2 miotóxica proveniente do veneno de <i>Porthidium hyoprora</i> ,	Após a identificação, isolamento, determinação de massa e sequenciamento dos aminoácidos ocorreu	A PhTX-II produziu bloqueio neuromuscular irreversível dependente do tempo, concentração e presença de cálcio. Sem mudanças significativas nas	A molécula promoveu o bloqueio neuromuscular na preparação, além de sugestivo de dano na membrana muscular e neurotoxicidade pós-

Characterization and Amino Acid Sequence by Mass Spectrometry		avaliando sua estrutura genética, bioquímica e farmacológica.	a avaliação da atividade em substrato sintético de Ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico e em BPC	contraturas para a acetilcolina exógena e cloreto de potássio.	sináptica nos receptores nicotínicos. Além do bloqueio neuromuscular envolvido na miotoxicidade e edema local
Bp-13 PLA2: Purification and Neuromuscular Activity of a New Asp49 Toxin Isolated from <i>Bothrops pauloensis</i> Snake Venom	(Sucasaca-Monzón et al., 2015)	O trabalho descreve o isolamento e caracterização enzimática 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 BPC	A Bp-13 atua no bloqueio da tensão de contração dependente da concentração, tempo e cálcio. 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 <i>Daboia russelii</i> snake venom	(Kumar, Basavarajappa., Vishwanath, & Gowda, 2015)	O isolamento e caracterização das isoenzimas VRV PL-IIIc, VRV-PL-VII e VRV-PL-IX. Foram extraídas do veneno de <i>Daboia russelii</i> e administradas em cultura celular de neurônios do hipocampo de ratos.	Após a estimação proteica, purificação, determinação de massa, LD50 em modelo in vivo, 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 moléculas VRV-PL-VII exibiu neurotoxicidade pré e pós-sináptica, enquanto VRV-PL-IX apenas pré-sináptica.
Biological characterization of the Amazon coral <i>Micrurus spixii</i> snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A2	(Terra et al., 2015)	Caracterização da atividade bioquímica, funcional, neurotóxica e microbicida do veneno extraído da <i>Micrurus spixii</i> , incluindo da fosfolipase A2, MsPLA2-I.	Caracterização da atividade edematogênica, miotóxica pela 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-leishmania e antiplasmodial. E por fim a purificação, quantificação, determinação de massa e da sequência de aminoácidos.	O veneno de <i>M. spixii</i> apresentou alta atividade fosfolipídica quando comparada com o veneno de <i>B. jararacussu</i> , com alta liberação de creatino quinase, atividade citotóxica e microbicida. A 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.	A MsPLA2-I isolada apresentou alta concentração de fosfolipases, efeitos neurotóxicos e indução do bloqueio de contrações musculares.
Neurotoxic phospholipase A2 from rattlesnake as a new ligand and	(Ostrowski et al., 2016)	Investigação do potencial de interação entre a subunidade CB	Expressão e purificação da GLIC recombinante, seguido da interação	Identificação da GLIC como um novo alvo da proteína PLA2, por meio	A PLA2 é um regulador do receptor GLIC, que quando ligados ocorre o

new regulator of prokaryotic receptor GLIC (proton-gated ion channel from <i>G. violaceus</i>)		da crotoxina, PLA2 proveniente do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> com o receptor celular GLIC	com a PLA2 purificada. A avaliação ocorreu via Dicroísmo circular, estudo eletrofisiológico e Espectrofluorometria.	de ligação envolvendo o domínio extracelular	aprimoramento da atividade enzimática da fosfolipase A2
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> 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 biventro de pinto nervo-músculo cervicis (in vivo) e frênica de camundongo nervo-diafragma (ex vivo).	A preparação in vivo não inibiu a resposta de contração da acetilcolina, carbacol e/ou potássio significativa, porém no modelo ex vivo 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 Potassium Channels by MiDCA1, A Pre-Synaptically Active PLA2-Type Toxin from <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> Coral Snake Venom	(Schütter et al., 2019)	Investigar o efeito da 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> .	Após a purificação e 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> .	Foi identificado que essa fosfolipase inibiu o canal de potássio Kv2.1.	Essa toxina mostrou 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	(Rusmili et al., 2019)	Investigar a variação geográfica da ação neurotóxica e composição do	Após a preparação, avaliação da concentração proteica, o veneno foi adicionado a	Foi identificado variação da neurotoxicidade do veneno dependente das suas localizações, sendo a de atividade mais	A variação da atividade neurotóxica dependente da região pode ser resultado de diferenças

(<i>Bungarus candidus</i>) venoms		veneno de <i>Bungarus candidus</i> das regiões da Indonésia, Malásia e Tailândia.	preparações de músculo do nervo de pinto <i>biventer cervicis</i> .	tóxica proveniente de peçonha da Tailândia.	geográficas, do tipo de presa, ecológicas ou climáticas.
In Vitro Neurotoxicity of Chinese Krait (<i>Bungarus multicinctus</i>) Venom and Neutralization by Antivenoms	(Liang, Huynh, Ng, Isbister, & Hodgson, 2021)	O estudo busca avaliar a neurotoxicidade in vitro 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 para agonistas do receptor de acetilcolina nicotínico, com inibição da resposta da acetilcolina, quadro revertido pelo antiveneno. Foi relatada falha respiratória no modelo in vivo.	O veneno promoveu neurotoxicidade pós-sináptica, sem reversão pelo antiveneno. Os achados se assemelham a clínica causada pelo envenenamento por <i>B. multicinctus</i> , apoiando a hipótese de que a neurotoxicidade resistente a antiveneno promovida por <i>B. multicinctus</i> é resultante das PLA2.

Fonte: Autores (2022).

Entre os 18 artigos selecionados foi possível perceber uma diversidade de estudos relacionadas à neurotoxicidade resultante de acidentes ofídicos, bem como a purificação e caracterização de novas fosfolipases da superfamília A2 oriundas das 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 pela peçonha composta em abundância por PLA2, resultantes de uma gama de eventos evolutivos independentes como demonstrado por Fry e Wüster (2004).

A maioria dos artigos selecionados (55,5%) utilizaram como método de avaliação toxicológica a inserção da molécula de interesse em preparações de *biventer cervicis* de pinto (BCP) (Tsai, et al., 2011; Marcon & Nicholson, 2011; Pycroft et al., 2012; Renjifo et al., 2012; Camargo, et al., 2011; Floriano et al., 2013; Huancahuire-Vega et al., 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 caracterizadas as ações neurotóxicas das moléculas Bbil-TX, Mlx-8, Mlx-9, PhTX-II, Bp-13, isoenzimas VRV PL, MsPLA2-I, AplTx-I, MiDCA1, identificação dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação neurotóxica da trimicrotoxina (TmCT), constatação de que a ação neurotóxica da *B. bilineata smargadina* é fundamentada na atividade da molécula Bbil-TX e determinação da atuação da subunidade CB da crotoxina como regulador do receptor GLIC (Floriano et al., 2013; De Carvalho et al., 2014; Huancahuire-Vega et al., 2014; Sucasaca-Monzón et al., 2015; Kumar et al., 2015; Terra et al., 2015; Resende et al., 2017; Schütter et al., 2019; Tsai et al., 2011; Ostrowski et al., 2016).

No que tange a purificação das enzimas, foram isoladas PLA2 na peçonha do gênero *Austrelaps*, das espécies *A. superbus*, *A. ramsayi*, *A. labialis*, com possível ação pautada no bloqueio dos agonistas nicotínicos pós-sinápticos das respectivas

espécies (Marcon & Nicholson, 2011). Identificação de uma grande quantidade de PLA2 (33%) associada à alta toxicidade na peçonha de *Micrurus fulvius* (Vergara et al., 2014), possível ação pós-sináptica nos receptores nicotínicos de acetilcolina pelas peçonhas de *Bungarus multicinctus*, *Micrurus dissoleucus* e *Micrurus mipartitus* (Liang et al., 2021; Renjifo et al., 2012). A baixa atividade de PLA2 na peçonha de *Micrurus pyrrhocryptus*, corroborando em pequena parcela com a parada neuromuscular promovida pela espécie (Camargo et al., 2011), melhor compreensão da neurotoxicidade mediada pelos venenos provindos da *C. boschmai*, *D. devisi*, *E. curta*, *H. signata* e *V. annulata*, caracterizada pela sua pós-sináptica significativa em células de aves (Pycroft et al., 2012) e Identificação do papel não significativo da quantidade de PLA2 com o grau de neurotoxicidade da peçonha de *Bungarus candidus* (Rusmili et al., 2019).

Visando a descrição de maneira didática sobre quais moléculas do grupo das PLA2 obteve se o relato da presença de atividade neurotóxica, nos últimos 10 anos, elaboramos a Tabela 2, dissertando sobre as moléculas identificada na literatura, as quais apresentaram atividade neurotóxica, contado com a descrição da sua ação biológica e o seu sítio de ação.

Tabela 2: Moléculas com neurotoxicidade relatada.

PLA2	Possível sítio de ação	Atividade neurotóxica relatada	Referência
Resíduos de aminoácidos TmCT	Não se aplica ao presente trabalho.	Neurotoxicidade promovida em BPC, especialmente dos resíduos Asn1, Asn6, Lys7, Ile11, Met12, Gly53, Thr79, His108 e Met118.	(Tsai et al., 2011)
Bbil-TX	Pré-sináptico.	Bloqueio neuro-muscular sem alterações significativas nas concentrações de acetilcolina e cloreto de potássio em preparações BCP e DFC.	(Floriano et al., 2013)
Mlx-8	O trabalho não apresentou indicativos do local de ação da molécula.	Neurotoxicidade acompanhada da redução da LDH e aumento da quantidade de Ca ²⁺ citosólico livre, redução do potencial mitocondrial transmembrana, diminuição da atividade metabólica mitocondrial e danos morfo-degenerativos.	(De Carvalho et al., 2014)
Mlx-9	O trabalho não apresentou indicativos do local de ação da molécula.	Redução da LDH, aumento de Ca ²⁺ citosólico livre, redução do potencial mitocondrial transmembrana, diminuição da atividade metabólica mitocondrial e danos degenerativos incompatíveis com a viabilidade celular.	(De Carvalho et al., 2014)
PhTX-II	Pós-sináptico.	Bloqueio neuromuscular irreversível, cálcio dependente. Sem mudanças significativas nas contraturas para a acetilcolina exógena e cloreto de potássio.	(Huancahuire-Vega et al., 2014)
VRV-PL-IIIc	Não foi identificada neurotoxicidade associada a molécula.	Danos hepáticos e renais, associada a baixa letalidade e sem neurotoxicidade relatada.	(Kumar et al., 2015)
VRV-PL-VII	Pré e pós-sináptico.	Desconforto respiratório e paralisia do membro posterior, neurotoxicidade possivelmente mediada por proteínas subjacentes à maquinaria da liberação vesicular.	(Kumar et al., 2015)

VRV-PL-IX	Pré-sináptico.	Desconforto respiratório e paralisia do membro posterior.	(Kumar et al., 2015)
VRV PL-V	Pré e pós-sináptico.	Neurotoxicidade possivelmente mediada por proteínas subjacentes à maquinaria da liberação vesicular.	(Kumar et al., 2015)
MsPLA2-I	Pré-sináptica.	Indução do bloqueio de contrações musculares indiretas e diretas.	(Terra et al., 2015)
Subunidade CB	Domínio extracelular.	Subunidade CB atua como regulador do receptor GLIC, atividade a qual permite o aprimoramento da neurotoxicidade mediada.	(Ostrowski et al. 2016)
AplTx-I	Pré-sináptica.	Não inibição da resposta a acetilcolina, carbacol e/ou potássio significativa <i>in vivo</i> , porém no modelo <i>ex vivo</i> ocorreu o bloqueio neuromuscular de forma irreversível.	(Resende et al., 2017)
MiDCA1	O trabalho não apresentou indicativos do local de ação da molécula.	Seletividade por canais de Kv2.1, permitindo a especulação de que a molécula está relacionada a ação de liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares	(Schütter et al., 2019)

Fonte: Autores (2022).

Os artigos encontrados demonstraram importantes avanços no que tange a compreensão a respeito da ação e do sítio de interação dessas biomoléculas, como a identificação da ação pós-sináptica das isoenzimas VRV PL (Kumar et al., 2015), ação pré-sináptica da MsPLA2-I (Terra et al., 2015), ação neuromuscular na região do sarcolema da Bp-13 (Sucasaca-Monzón et al., 2015), toxicidade neuromuscular com possível seletividade por aves da AplTx-I (Resende et al., 2017), seletividade da MiDCA1 por canais de potássio Kv2.1 com ação nas junções neuromusculares (Schütter et al., 2019), identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na neurotoxicidade mediada por TmCT. Além da compreensão do papel inibitório da CTX na liberação de ACh, o qual é insuficiente para paralisia muscular (Tsai et al., 2011); determinação do papel exercido pela subunidade CB como regulador do receptor GLIC (Ostrowski et al., 2016); aumento do Ca²⁺ citosólico livre e comprometimento da função mitocondrial pela Mlx-8 e Mlx-9, ação pré-sináptica promotora a parada neuromuscular pela da Bbil-TX (Floriano et al., 2013), dependência da PhTX-II por cálcio e identificação da sua ação no músculo esquelético (Huancahuire-Vega et al., 2014).

A determinação do mecanismo de ação das fosfolipases A2 permite o avanço científico além da biologia molecular, respaldando em ganhos a diferentes campos de pesquisa, como no estudo de Marcon e Nicholson, o qual forneceu os primeiros dados para validação do quadro clínico atual de recomendações para o uso do anti-veneno monovalente de cobra tigre, conhecido pelo acrônimo de TSAV, no tratamento de indivíduos envenenados pela serpente de copperhead australiano (Marcon & Nicholson, 2011). Os avanços referente aos mecanismos responsáveis pela ação biológica da família enzimática A2, incluindo a identificação dos aminoácidos envolvidos na neurotoxicidade da trimicrotoxina (Tsai et al., 2011), seletividade da molécula MiDCA1 por determinados canais de potássio, possivelmente relacionados a liberação da acetilcolina (Schütter et al., 2019) e a determinação da subunidade da crotoxina responsável pela regulação do seu respectivo receptor celular (Cavalcante et al., 2017).

Destarte, os últimos 10 anos de pesquisas referente a ação neurotóxica da peçonha de ofídios corrobora com aspectos previamente retratados na literatura, como a associação da constituição da peçonha com variação geográfica da serpente e por

consequência variação da neurotoxicidade (Rusmili et al., 2019), dependência de Ca²⁺ para o funcionamento enzimático ideal das PLA2 (De Carvalho et al., 2014) 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* (Liang et al., 2021) e as moléculas VRV-PL-IX e PhTX-II tiveram sua ação biológica na região pós-sináptica (Kumar et al., 2015; Huancahuire-Vega et al., 2014). 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.

4. Conclusões

Em síntese, nos últimos 10 anos de estudos no que tange a compreensão das fosfolipases A2, no campo da toxicologia, foram encontradas evidências a respeito do mecanismo e/ou sítio de ação de 14 moléculas distintas e do envolvimento desse grupo de moléculas nas reações neurotóxicas de sete espécies de peçonhas diferentes. Os achados mais notáveis corresponderam a constatação de que a ação neurotóxica da *B. bilineata smargadina* é fundamentada na ação da PLA2 Bbil-TX, comprovação da dependência da PhTX-II por cálcio para sua ação no músculo esquelético, identificação da ação neurotóxica muscular promovido pela BP-13 na região do sarcolema, determinação da subunidade da crotoxina atuante como regulador do receptor GLIC e identificação da seletividade da MiDCA1 por canais específicos de potássio. Apesar dos avanços, ainda há necessidade de expansão dos estudos sobre o tema. A elucidação dos mecanismos moleculares e eventos intracelulares responsáveis pela ação biológica das PLA2 possibilitará uma gama de aplicações biotecnológicas, em razão das atividades antimicrobiana, antibacteriana, angiogênica e hipotensiva já caracterizadas.

Referências

- Camargo, T. M., de Roodt, A. R., da Cruz-Höfling, M. A., & Rodrigues-Simioni, L. (2011). The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrochryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms. *Journal of venom research*, 2, 24–31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21858249/>
- Cavalcante, W. L. G., Noronha-Matos, J. B., Timóteo, M. A., Fontes, M. R. M., Gallacci, M., & Correia-de-Sá, P. (2017). Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A 2 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*, 334, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.08.021>
- de Carvalho, N. D., Garcia, R. C., Ferreira, A. K., Batista, D. R., Cassola, A. C., Maria, D., Lebrun, I., Carneiro, S. M., Afeche, S. C., Marcourakis, T., & Sandoval, M. R. (2014). Neurotoxicity of coral snake phospholipases A2 in cultured rat hippocampal neurons. *Brain research*, 1552, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.008>
- Dhananjaya, B. L., & Sivashankari, P. R. (2015). Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(7), 649–657. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150225113402>
- Ercole, F. F., Melo, L. S. de, & Alcoforado, C. L. G. C. (2014). Integrative review versus systematic review. *Revista Mineira de Enfermagem*, 18(1), 9–12. <https://doi.org/10.5935/1415-2762.20140001>
- Floriano, R. S., Carregari, V. C., de Abreu, V. A., Kenzo-Kagawa, B., Ponce-Soto, L. A., da Cruz-Höfling, M. A., Hyslop, S., Marangoni, S., & Rodrigues-Simioni, L. (2013). 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*, 69, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.006>
- Frangieh, J., Rima, M., Fajloun, Z., Henrion, D., Sabatier, J.-M., Legros, C., & Mattei, C. (2021). Snake venom components: Tools and cures to target cardiovascular diseases. *Molecules*, 26(8), 2223. <https://doi.org/10.3390/molecules26082223>
- Fry, B. G., & Wüster, W. (2004). Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Molecular biology and evolution*, 21(5), 870–883. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh091>
- Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2013). Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 62, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>
- Hiu, J. J., & Yap, M. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. *Biochemical Society transactions*, 48(2), 719–731. <https://doi.org/10.1042/BST20200110>

- Huancahuire-Vega, S., Ponce-Soto, L. A., & Marangoni, S. (2014). PhTX-II a basic myotoxic phospholipase A₂ from Porthidium hyporrora snake venom, pharmacological characterization and amino acid sequence by mass spectrometry. *Toxins*, 6(11), 3077–3097. <https://doi.org/10.3390/toxins6113077>
- Kumar, J. R., Basavarajappa, B. S., Vishwanath, B. S., & Gowda, T. V. (2015). Biochemical and pharmacological characterization of three toxic phospholipase A₂s from Daboia russelii snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 168, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.11.005>
- Liang, Q., Huynh, T. M., Ng, Y. Z., Isbister, G. K., & Hodgson, W. C. (2021). In Vitro Neurotoxicity of Chinese Krait (Bungarus multicinctus) Venom and Neutralization by Antivenoms. *Toxins*, 13(1), 49. <https://doi.org/10.3390/toxins13010049>
- 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, J. M., & Calvete, J. J. (2016). Venoms of Micrurus coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 122, 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.008>
- Marcon, F., & Nicholson, G. M. (2011). 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*, 58(5), 439–452. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.003>
- Ostrowski, M., Porowinska, D., Prochnicki, T., Prevost, M., Raynal, B., Baron, B., Sauguet, L., Corringier, P. J., & Faure, G. (2016). 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*, 116, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.02.002>
- Pycroft, K., Fry, B. G., Isbister, G. K., Kuruppu, S., Lawrence, J., Ian Smith, A., & Hodgson, W. C. (2012). Toxinology of venoms from five Australian lesser known elapid snakes. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 111(4), 268–274. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00907.x>
- Renjifo, C., Smith, E. N., Hodgson, W. C., Renjifo, J. M., Sanchez, A., Acosta, R., Maldonado, J. H., & Riveros, A. (2012). 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*, 59(1), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.017>
- Resende, L. M., Almeida, J. R., Schezaro-Ramos, R., Collaço, R. C. O., Simioni, L. R., Ramírez, D., González, W., Soares, A. M., Calderon, L. A., Marangoni, S., & da Silva, S. L. (2017). 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*, 127, 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.002>
- Rusmili, M. R. A., Othman, I., Abidin, S. A. Z., Yusof, F. A., Ratanabanangkoon, K., Chanhom, L., Hodgson, W. C., & Chaisakul, J. (2019). Variations in neurotoxicity and proteome profile of Malayan krait (Bungarus candidus) venoms. *PloS One*, 14(12), e0227122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227122>
- Schütter, N., Barreto, Y. C., Vardanyan, V., Hornig, S., Hyslop, S., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L., Pongs, O., & Dal Belo, C. A. (2019). Inhibition of Kv2.1 potassium channels by MiDCA1, A pre-synaptically active PLA₂-type toxin from Micrurus dumerillii carinicauda coral snake venom. *Toxins*, 11(6), 335. <https://doi.org/10.3390/toxins11060335>
- World Health Organization. (mai. 2017). *Snakebite envenoming*. Recuperado de maio de 2022, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
- Sucasaca-Monzón, G., Randazzo-Moura, P., Rocha, T., Torres-Huaco, F. D., Vilca-Quispe, A., Ponce-Soto, L. A., Marangoni, S., da Cruz-Höfling, M. A., & Rodrigues-Simioni, L. (2015). Bp-13 PLA₂: Purification and Neuromuscular Activity of a New Asp49 Toxin Isolated from Bothrops pauloensis Snake Venom. *Biochemistry research international*, 2015, 826059. <https://doi.org/10.1155/2015/826059>
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(9), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Terra, A. L., Moreira-Dill, L. S., Simões-Silva, R., Monteiro, J. R., Cavalcante, W. L., Gallacci, M., Barros, N. B., Nicolette, R., Teles, C. B., Medeiros, P. S., Zanchi, F. B., Zuliani, J. P., Calderon, L. A., Stábeli, R. G., & Soares, A. M. (2015). 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*, 103, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.011>
- Tsai, I. H., Wang, Y. M., & Hseu, M. J. (2011). Mutagenesis analyses explore residues responsible for the neurotoxic and anticoagulant activities of Trimicrotoxin, a pit-viper venom Asn6-phospholipase A₂. *Biochimie*, 93(2), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.021>
- Vergara, I., Pedraza-Escalona, M., Paniagua, D., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Batista, C. V., Possani, L. D., & Alagón, A. (2014). Eastern coral snake Micrurus fulvius venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A₂. *Journal of proteomics*, 105, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.027>