



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

POLIANA DE JESUS DEMICO

**INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GEOGRÁFICA SOBRE O POTENCIAL
NEUROTÓXICO E REATIVIDADE CRUZADA COM ANTIVENENO COMERCIAL
DE VENENOS DE SUBESPÉCIES DE *Crotalus durissus* (VIPERIDAE:
CROTALINAE) DISTRIBUÍDAS NO BRASIL**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

POLIANA DE JESUS DEMICO

**INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GEOGRÁFICA SOBRE O POTENCIAL
NEUROTÓXICO E REATIVIDADE CRUZADA COM ANTIVENENO COMERCIAL
DE VENENOS DE SUBESPÉCIES DE *Crotalus durissus* (VIPERIDAE:
CROTALINAE) DISTRIBUÍDAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre – Área de concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano

636.089

D378i

Demico, Poliana de Jesus.

Influência da variabilidade geográfica sobre o potencial neurotóxico e reatividade cruzada com antiveneno comercial de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* (Viperidae: Crotalinae) distribuídas no Brasil / Poliana de Jesus Demico. – Presidente Prudente, 2026.

39 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2026.

Bibliografia.

Orientador: Rafael Stuari Floriano.

1. Variabilidade geográfica. 2. Ação neuromuscular.
3. Antiveneno. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GEOGRÁFICA SOBRE O POTENCIAL NEUROTÓXICO E REATIVIDADE CRUZADA COM ANTIVENENO COMERCIAL DE VENENOS DE SUBESPÉCIES DE *Crotalus durissus* (VIPERIDAE: CROTALINAE) DISTRIBUÍDAS NO BRASIL"

AUTOR(A): POLIANA DE JESUS DEMICO

ORIENTADOR(A): Prof. Dr. RAFAEL STUANI FLORIANO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE(A) em CIÊNCIA ANIMAL

Área de Concentração FISIOPATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

RAFAEL STUANI FLORIANO (orientador)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

KRISTIAN ALBERTO TORRES BONILLA

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas (SP)

ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 23 de Fevereiro de 2026.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 25/02/2026 15:00
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 3
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6438190)

Signatários do documento

RAFAEL STUANI FLORIANO (PROFESSOR)

rafael@unoeste.br
Recebido em 25/02/2026 15:00
Assinado em 26/02/2026 08:35
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.32.97
ID da assinatura: 6359318

KRISTIAN ALBERTO TORRES BONILLA (SIGNATÁRIO EXTERNO)

kristiantorres19@gmail.com
Recebido em 25/02/2026 15:00
Assinado em 25/02/2026 15:56
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 2801:8a:c811:1:b149:5467:785d:4633
ID da assinatura: 6359319

ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (COORDENADOR DE CURSO)

rosa@unoeste.br
Recebido em 25/02/2026 15:00
Assinado em 25/02/2026 15:01
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.32.97
ID da assinatura: 6359320

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/e8363408>

Assinatura digital do documento: 6f3963d3b2707862410827af1bce2cdd0ae15436696b061860b80b372d9a109d

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela EPEC - Empresa Prudentina de Educação e Cultura SA

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano, pela dedicação, paciência e confiança, que me inspiraram a crescer academicamente e pessoalmente. Sua forma de ensinar e incentivar foi fundamental para que este trabalho se tornasse possível, e seus conselhos certamente ecoarão muito além das páginas desta dissertação.

À minha amiga Geovanna Cristina Lima Oliveira, pelas palavras de incentivo, por celebrar comigo cada pequena vitória ao longo dessa jornada e pelas partilhas de alegrias e desafios que a tornaram mais leve.

Aos colegas e colaboradores do Laboratório de Toxinologia da UNOESTE, pela amizade sincera, pela troca de conhecimentos, pela ajuda nos momentos difíceis e risadas que se transformaram em memoráveis lembranças.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil, protocolo no. 88887.952349/2024-00), pela bolsa de estudo que viabilizou a minha dedicação exclusiva ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

Influência da variabilidade geográfica sobre o potencial neurotóxico e reatividade cruzada com antiveneno comercial de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* (Viperidae: Crotalinae) distribuídas no Brasil

Os acidentes crotálicos caracterizam-se por induzir potente efeito neurotóxico e miotóxico, majoritariamente mediados pela crototoxina, uma fosfolipase A₂ (PLA₂) que representa 70–90% da composição desses venenos. Estudos recentes evidenciaram a influência da variabilidade geográfica no perfil composicional de PLA₂ nos venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *C. d. collilineatus*, indicando maior complexidade de isoformas em espécimes das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Neste estudo, avaliamos a influência da variabilidade geográfica sobre a atividade neuromuscular dos venenos das serpentes *Crotalus durissus cascavella* (CDV), *C. d. collilineatus* (CDC), *C. d. ruruima* (CDR) e *C. d. terrificus* (CDT), bem como sua reatividade cruzada com o antiveneno comercial anti-*Crotalus* (AV) e inibição PLA₂ pelo varespladib (VPL). A atividade de PLA₂ foi determinada por espectrofotometria, utilizando ácido 3-octanoiloxibenzoico como substrato artificial. A preparação nervo frênico-diafragma de camundongo foi montada em sistema miográfico Ugo Basile SRL sob tensão de 1 g, com respostas contráteis evocadas via nervo motor por estímulos supra máximos (0,1 Hz, 0,2 ms, ~6 V) e registradas por meio de transdutor DY1 acoplado a um DataCapsule-Evo e ao software LabScribe4. Os resultados foram expressos como média ± D.P.M. (n=3–4). O veneno de CDR apresentou a maior atividade de PLA₂ (75,5±2 ΔA425 nm/min, n=3), enquanto o de CDV mostrou-se mais sensível ao VPL (0,3 mM), com inibição de aproximadamente 97% da atividade enzimática (p<0,05 em relação ao veneno isolado, n=3). O veneno de CDC (10–100 µg/ml) produziu acentuada facilitação neuromuscular seguida de bloqueio completo em até 120 min de incubação; o veneno de CDV (10–100 µg/ml) foi o mais ativo na junção neuromuscular, bloqueando completamente as respostas contráteis em todas as concentrações testadas entre 80–110 min, enquanto o veneno de CDR promoveu bloqueio completo apenas na maior concentração (100 µg/ml) após ~110 min de incubação. O AV (razão antiveneno:veneno 1:1,5 v/w) proporcionou proteção parcial contra os venenos de CDT e CDV (30 µg/ml), impedindo 90% do bloqueio para ambos, mas apresentou baixa reatividade cruzada frente aos venenos de CDC

e CDR (30 µg/ml). O VPL (0,3 mM) foi efetivo em prevenir 90% do bloqueio induzido pelos venenos de CDT e CDV (30 µg/ml) e 50% do bloqueio causado por CDC (30 µg/ml). A imunorreatividade com o antiveneno revelou os principais grupos enzimáticos nos venenos analisados, com apenas os venenos de *C. d. cascavella* e *C. d. ruruima* sendo crotamina positiva. Em conclusão, os venenos das subespécies avaliadas revelaram considerável variação quanto ao efeito neuromuscular. A inibição da atividade PLA₂ por VPL resultou em significativa atenuação do bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos, sendo o VPL mais eficaz que o antiveneno na prevenção dos efeitos de CDC, CDT e CDV.

Palavras-chave: *C. durissus* spp.; variabilidade geográfica; ação neuromuscular; fosfolipase A₂; antiveneno; varespladib.

ABSTRACT

Influence of the geographical variability on the neurotoxic potential and cross-reactivity with commercial antivenom of venoms from *Crotalus durissus* subspecies (Viperidae: Crotalinae) distributed in Brazil

Envenomation by *Crotalus* snakes are known for causing significant neurotoxic and myotoxic effects, primarily attributed to crotoxin, a phospholipase A₂ (PLA₂) toxin that constitutes 70–90% of these venoms. Recent studies have demonstrated that geographic variability affects the PLA₂ compositional profile of *C. d. terrificus* and *C. d. collilineatus* venoms, revealing a greater complexity of isoforms in specimens from the central-west and southeastern regions of Brazil. In this study, we assessed how geographic variability affects the neuromuscular activity of venoms from *Crotalus durissus cascavella* (CDV), *C. d. collilineatus* (CDC), *C. d. ruruima* (CDR), and *C. d. terrificus* (CDT), including the cross-reactivity of these venoms with commercial anti-*Crotalus* antivenom (AV) and PLA₂ inhibition by varespladib (VPL). PLA₂ activity was measured through spectrophotometry using 3-octanoyloxy benzoic acid as an artificial substrate. The mouse phrenic nerve-diaphragm preparation was set up in an Ugo Basile SRL myographic system under a tension of 1 g. Twitches were induced through supramaximal stimuli (0.1 Hz, 0.2 ms, ~6 V) and recorded with a DY1 force displacement transducer connected to a DataCapsule-Evo and LabScribe4 software. Results are expressed as mean ± SD (n=3–4). The CDR venom exhibited the highest PLA₂ activity (75.5±2 ΔA425nm/min, n=3), while the CDV venom demonstrated greater sensitivity to VPL (0.3 mM), resulting in a ~97% inhibition of its PLA₂ activity (p<0.05 compared to venom alone, n=3). CDC venom (10–100 μg/ml) induced significant neuromuscular facilitation, followed by a complete blockade within a 120 min incubation period. In contrast, CDV venom (10–100 μg/ml) exhibited greater potency at the neuromuscular junction, fully blocking twitch responses at all concentrations within 80–110 min. CDR venom resulted in a complete blockade only at the highest concentration of 100 μg/ml, which occurred within approximately 110 minutes. AV (antivenom:venom ratio 1:1.5 v/w) demonstrated partial efficacy against the venoms of both CDT and CDV (30 μg/ml), avoiding the occurrence of 90% blockade for each. However, it exhibited limited cross-reactivity when tested against

CDC and CDR (30 µg/ml) venoms. In contrast, VPL at a concentration of 0.3 mM effectively inhibited the 90% blockade induced by both CDT and CDV (30 µg/ml) venoms, as well as avoiding the 50% blockade for CDC (30 µg/ml). The immunoreactivity with antivenom revealed the major enzymatic groups in these venoms, with *C. d. cascavella* and *C. d. ruruima* venoms being positive for crotamina. In conclusion, the venoms of these subspecies exhibit significant variability in their neuromuscular effects observed. Inhibition of PLA₂ activity by VPL resulted in a marked reduction of the neuromuscular blockade induced by these venoms. Furthermore, VPL demonstrated greater efficacy than AV in mitigating the neuromuscular actions associated with CDC, CDT, and CDV venoms.

Keywords: *C. durissus* spp.; geographic variability; neuromuscular action; phospholipase A₂; antivenom; varespladib.

LISTA DE SIGLAS

AV	– Antiveneno
CaCl ₂	– Cloreto de Cálcio
CDC	– <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
CDR	– <i>Crotalus durissus ruruima</i>
CDT	– <i>Crotalus durissus terrificus</i>
CDV	– <i>Crotalus durissus cascavella</i>
CEMIB	– Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	– Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
KCl	– Cloreto de Potássio
MgCl ₂	– Cloreto de Magnésio
Mm	– Milimolar
µg	– Micrograma
NaCl	– Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	– Bicarbonato de Sódio
NaH ₂ PO ₄	– Fosfato monossódico
NFD	– Nervo Frênico Diafragma
PLA ₂	– Fosfolipase A ₂
SBCAL	– Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SDS-PAGE	– Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
VPL	– Varespladib

SUMÁRIO

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA.....	13
ARTIGO CIENTÍFICO.....	14
ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO: JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES.....	38

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

A pesquisa desenvolvida demonstra que a variabilidade geográfica entre as subespécies de *Crotalus durissus* no Brasil influencia diretamente o potencial neurotóxico dos venenos e a reatividade cruzada com o antiveneno comercial, evidenciando uma contribuição direta para o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 – Saúde e Bem-Estar, especialmente para a meta 3.3, que visa combater doenças negligenciadas, uma vez que os acidentes ofídicos são reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde como doenças tropicais negligenciadas; ao revelar que diferenças bioquímicas entre os venenos podem afetar a eficácia do tratamento, o estudo fornece subsídios científicos essenciais para o aprimoramento dos protocolos terapêuticos, a redução da morbimortalidade e a melhoria dos desfechos clínicos dos pacientes, particularmente em áreas rurais e remotas, ao mesmo tempo em que, ao integrar aspectos ecológicos, toxicológicos e imunológicos, amplia a compreensão da dinâmica evolutiva dos venenos e orienta estratégias de saúde pública voltadas ao desenvolvimento e à atualização de antivenenos mais eficazes e alinhados à diversidade de serpentes presente no país.

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Influência da variabilidade geográfica sobre o potencial neurotóxico e reatividade cruzada com antiveneno comercial de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* (Viperidae: Crotalinae) distribuídas no Brasil

Poliana J. Demico¹, Sofia N. S. Azevedo¹, Isabella G. Gonçalves de Lima¹,
Enzo Paulinesí², Sávio S. Sant'Anna³, Karen de Moraes-Zani^{2,3}, Rafael S. Floriano^{1*}

¹Laboratório de Toxinologia e Estudos Cardiovasculares, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

²Laboratório de Patofisiologia, Instituto Butantan (IB), São Paulo, SP, Brasil

³Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan (IB), São Paulo, SP, Brasil

Os acidentes crotálicos caracterizam-se por provocar efeitos neurotóxicos e miotóxicos intensos, atribuídos principalmente à crotoxina, uma fosfolipase A₂ (PLA₂) que compõe 70–90% desses venenos. Estudos recentes indicam que a variabilidade geográfica influencia o perfil de isoformas de PLA₂ em *Crotalus durissus terrificus* e *C. d. collilineatus*, sugerindo maior complexidade em espécimes das regiões Centro-Oeste e Sudeste. Neste estudo, investigamos como essa variabilidade afeta a atividade neuromuscular dos venenos de *C. d. cascavella* (CDV), *C. d. collilineatus* (CDC), *C. d. ruruima* (CDR) e *C. d. terrificus* (CDT), bem como sua reatividade com o antiveneno comercial anti-*Crotalus* (AV) e a inibição de PLA₂ pelo varespladib (VPL). A atividade de PLA₂ foi determinada por espectrofotometria usando ácido 3-octanoiloxibenzoico como substrato. Para a atividade neuromuscular, a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo foi montada em sistema miográfico Ugo Basile SRL e estimulada por impulsos supramáximos (0,1 Hz, 0,2 ms). Os dados foram expressos como média ± D.P.M. (n=3–4). O veneno de CDR apresentou a maior atividade de PLA₂ (75,5±2 ΔA425 nm/min), enquanto o de CDV foi o mais sensível ao VPL (0,3 mM), exibindo cerca de 97% de inibição. CDC (10–100 µg/ml) induziu facilitação seguida de bloqueio total em até 120 min; CDV produziu o bloqueio mais rápido (80–110 min em todas as concentrações), e CDR causou bloqueio completo apenas em 100 µg/ml (~110 min). O AV (1:1,5 v/w) protegeu parcialmente contra CDT e CDV (30 µg/ml), impedindo 90% do bloqueio, mas mostrou baixa reatividade cruzada frente a CDC e CDR. O VPL preveniu 90% do bloqueio causado por CDT e CDV e 50% daquele produzido por CDC. A imunoreatividade revelou os principais grupos enzimáticos, com CDV e CDR sendo crotamina positivos. Em síntese, a variabilidade geográfica afeta o potencial neurotóxico dos venenos de *C. durissus*, ao passo que o VPL mostrou-se mais eficaz do que o antiveneno na prevenção do efeito neuromuscular induzido pelos venenos de CDC, CDT e CDV.

*Autor correspondente: R. S. Floriano (rafael@unoeste.br)

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, Percentil: 87.0% (A1).

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o gênero *Crotalus* está representado por uma única espécie de serpente, a cascavel *Crotalus durissus*, sendo reconhecidas quatro subespécies neste clado, e.g., *C. d. durissus* e *C. d. ruruima* (distribuídas na região norte), *C. d. marajoensis* (encontrada na Ilha de Marajó) e *C. d. terrificus* (distribuída nas regiões centro-oeste, sudeste e sul), segundo a última atualização sancionada pela Sociedade Brasileira de Herpetologia [1]. Previamente à esta atualização, duas outras subespécies de *C. durissus* eram descritas no país, e.g., *C. d. collilineatus* (distribuída nas regiões centro-oeste e sudeste) e *C. d. cascavella* (presente na região nordeste), agora consideradas sinônimos de *C. d. terrificus* com base em estudos que evidenciaram sua proximidade filogenética a partir de análises moleculares [2, 3] e bioquímicas [4], embora Echeverrigaray et al. (2001) [5] haviam apoiado a manutenção da subespécie *C. d. collilineatus* após análises de DNA polimórfico. No entanto, as correlações entre variações nos venenos e níveis de divergência filogenética entre espécies carecem de investigações sistemáticas do ponto de vista composicional e fisiopatológico.



Figura 1. Distribuição geográfica das subespécies de *Crotalus durissus* nos diferentes biomas do Brasil. Mapa: Nelson Jorge da Silva Jr.

O envenenamento crotálico correspondeu à 12,5% dos acidentes ocorridos em 2025, totalizando 2.836 casos ocorridos no Brasil, com letalidade de 1% [6]. O veneno de *C. durissus* induz alterações sistêmicas importantes como neurotoxicidade e miotoxicidade que progridem para insuficiência respiratória e renal, respectivamente, além de alterações hemostáticas [7–11]. A paralisia neuromuscular causada pelos venenos de *Crotalus* ocorre pela interrupção da liberação de acetilcolina por ação da crotoxina, uma PLA₂ heterodimérica pré-sinápticamente ativa que representa aproximadamente 70–90% das toxinas presentes nos venenos de *C. durissus* spp. [12–15]. A crotoxina também está associada ao efeito miotóxico sistêmico causado por estes venenos, além da crotamina, uma toxina de proporções variáveis nos venenos e que age causando lesão muscular [16, 17]. Os venenos de *C. durissus* ssp. contém outras toxinas em menor representatividade como serino proteases (SVSPs) e metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs), além de L-aminoácido oxidases e lectinas [18].

Recentes estudos têm demonstrado que variações geográficas podem influenciar o perfil individual dos venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* encontradas nas regiões centro-oeste e sudeste, especialmente com relação à composição de suas PLA₂, evidenciando maior complexidade das isoformas de PLA₂ nos venenos dos exemplares de *C. durissus* distribuídas na região sudeste [4]. Em adição, Boldrini-França et al. (2010) [2] evidenciaram que variações geográficas podem influenciar no aumento do potencial neurotóxico dos venenos de *C. durissus* spp. ao longo da rota de dispersão norte-sul desses táxons. As isoformas de PLA₂ presentes no veneno de *C. d. terrificus* foram identificadas em meados da década de 80 [19, 20]. Nestes estudos, foram isoladas quatro isoformas de PLA₂, que diferiram apenas pela substituição de poucos resíduos de aminoácidos, mas que apresentaram diferentes propriedades farmacológicas. Estes achados podem representar uma tendência de maior complexidade das isoformas de PLA₂ nos venenos das subespécies sulistas (= *C. d. terrificus*) em relação às demais subespécies distribuídas em outras regiões do país.

As variabilidades intraespecíficas dos venenos ofídicos associadas à diversidade composicional e funcional destes mostram-se particularmente críticas quando consideramos sua reatividade com o antiveneno [21, 22]. Nesse contexto, existe a preocupação a respeito da eficiência dos antivenenos comerciais no

tratamento de envenenamentos por espécies e subespécies de serpentes não envolvidas no processo de produção destes imunobiológicos [23]. Em adição, esta questão estende-se também para as espécies que compõem o *pool* de venenos na produção de antivenenos, mas que possuem ampla distribuição geográfica. Conseqüentemente, como a composição dos venenos varia consideravelmente entre espécies e entre populações, a eficácia do antiveneno também pode variar em função das variações intra e interespecíficas [24–26].

Desta forma, estamos propondo comparar sistematicamente o perfil de ação neuromuscular dos venenos das subespécies que hoje compõem o complexo *C. d. terrificus* (= *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*), incluindo a subespécie *C. d. ruruima* da região norte, e avaliar a eficácia do soro anticrotálico em diferentes abordagens usando a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Em adição, considerando a separação geográfica destas subespécies, também estamos propondo avaliar o nível de influência da atividade PLA₂ destes venenos sobre o bloqueio neuromuscular usando um antagonista seletivo deste grupo enzimático (varespladib).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Camundongos machos da linhagem Unib:SW (45 dias, ~20 g) foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e mantidos no Biotério de Experimentação da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) em caixas de polipropileno convencionais abertas (tampa gradeada) com cama de maravalha (10–15 camundongos/caixa), sob ciclo de luz/escuro de 12 h a 23–25 °C. Os animais tiveram livre acesso à comida (Supralab[®]) e água, até o momento dos experimentos. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNOESTE (CEUA no. 8798/2024) e executados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e Lei Federal No. 11,794, 8 de outubro de 2008, em conjunto com as diretrizes para experimentação animal estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e ARRIVE Guidelines 2.0 [27].

2.2 Reagentes e venenos

O antiveneno comercial anti-*Crotalus* foi fornecido pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil) e mantido sob refrigeração até ser utilizado nos protocolos experimentais (razão antiveneno:veneno 1:1,5 v/w). A droga varespladib foi obtida de Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, EUA), cuja concentração utilizada foi de 0,3 mM para os venenos de subespécies *C. d. cascavella*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* e 0,75 mM para *C. d. collilineatus*. Os venenos das quatro subespécies de *Crotalus durissus* foram fornecidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil) na forma liofilizada e estocado a -20 °C; os venenos foram reconstituídos em água ultrapura imediatamente antes da execução dos protocolos experimentais.

2.3. Desenho experimental

O estudo foi conduzido obedecendo a seguinte sequência: (1) Os venenos liofilizados das subespécies *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* foram reconstituídos e inicialmente caracterizados quanto à atividade fosfolipase A₂ (PLA₂) por ensaio colorimétrico. (2) Em seguida, avaliou-se o efeito concentração–resposta desses venenos (10–100 µg/ml) sobre a junção neuromuscular utilizando a preparação nervo frênico–diafragma de camundongo sob estimulação indireta. (3) A menor concentração capaz de induzir bloqueio neuromuscular completo foi então selecionada para ensaios de neutralização, nos quais os venenos foram pré-incubados com antiveneno comercial anti-*Crotalus* ou com o inibidor seletivo de PLA₂ varespladib, e a atividade neuromuscular residual foi monitorada. (4) Por fim, a imunorreatividade cruzada entre os venenos e o antiveneno comercial foi avaliada por *Western blotting*, permitindo correlacionar os efeitos funcionais observados com o reconhecimento imunológico das principais toxinas presentes nos venenos.

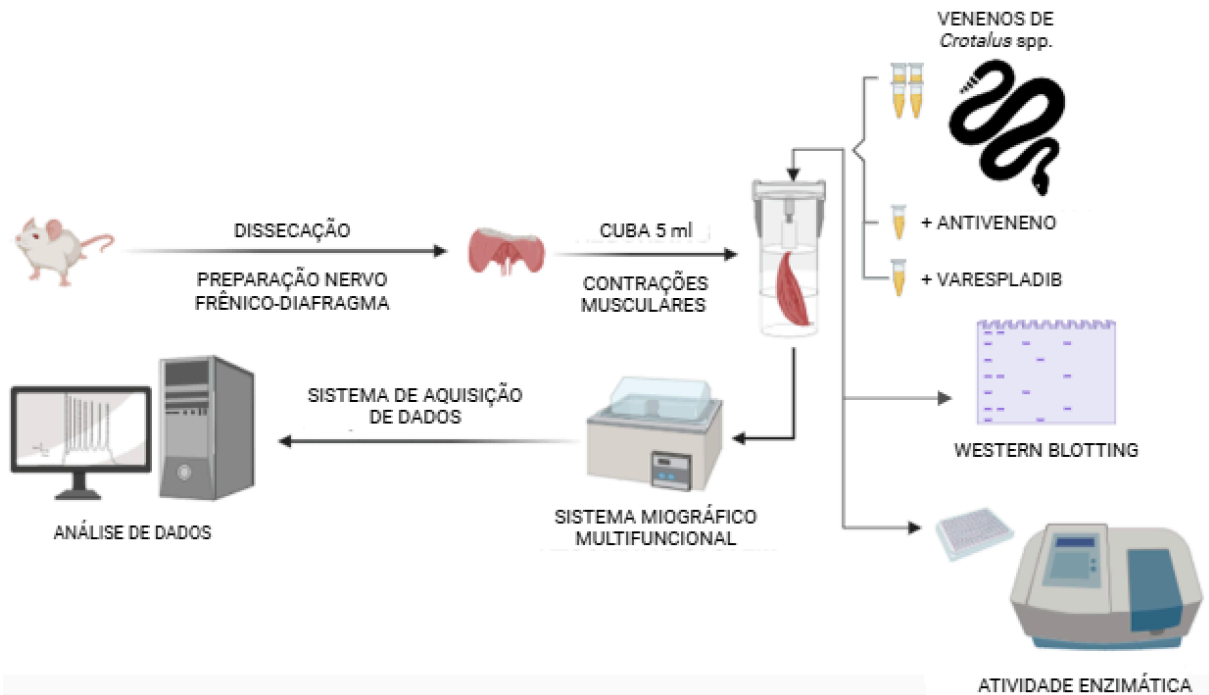


Figura 2. Resumo gráfico do desenho experimental do estudo.

2.4 Ensaio enzimático: atividade fosfolipase A₂ (PLA₂)

A determinação da atividade PLA₂ foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) [28] e Holzer e Mackessy (1996) [29]. Foram utilizadas amostras dos venenos das subespécies de *C. durissus* ressuspendidas em água ultrapura, imediatamente antes de se iniciarem os ensaios, em uma concentração de 0,1 mg/ml. Alíquotas (20 µl) de cada veneno foram então incubadas com o substrato [ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico] (20 µl) e tampão de reação (Tris-HCl 0,1 M, pH 8, contendo Ca²⁺ 0,01 M) (200 µl), com as reações sendo lidas em espectrofotômetro SpectraMax i3 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) a 425 nm de absorvância a cada 1 min durante 30 min à 37 °C.

2.5 Atividade neuromuscular em preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo

Camundongos machos de linhagem Unib:SW foram eutanasiados com isoflurano (atmosfera saturada) e em seguida ensanguinhados (corte das artérias carótidas). A dissecação consistiu em isolar os hemidiafragmas e seus nervos frênicos correspondentes, como essencialmente descrito por Floriano et al. (2015) [30] e adaptado por Couceiro et al. (2023) [31]. As preparações foram montadas em

uma unidade miográfica multifuncional (Ugo Basile SRL, Varese, Itália) em cubas de 5 ml contendo solução Tyrode (composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1) sob aeração constante por carbogênio, sendo realizados os ensaios em banho a 37 °C. Cada hemidiafragma isolado foi tensionado a 1 g/cm por transdutores isométricos DY1 e submetido a estímulos supra maximais indiretos (0,1 Hz; 0,2 ms; 6V) através de eletrodos bipolares posicionados sobre seu respectivo nervo frênico e conectados a um estimulador. As preparações foram estimuladas por 10 min para estabilização das respostas contráteis antes dos protocolos experimentais. Após adição do veneno (ver protocolos abaixo), as respostas contráteis foram monitoradas por 120 min ou até a ocorrência de bloqueio completo. As respostas contráteis foram registradas em software LabScribe4 por meio de transdutores isométricos DY1 acoplados ao sistema digitalizador de sinais compostos por um *New DataCapsule-Evo* e um *Multiplexing Pulse Booster* (Ugo Basile S.R.L., Varese, Itália).

2.5.1 Protocolo 1: curva concentração-resposta

As preparações NFD de camundongo, após período de estabilização das respostas contráteis, foram expostas aos venenos das subespécies de *C. durissus* em diferentes concentrações (10, 30 e 100 µg/ml) para determinar o perfil de ação neuromuscular de cada veneno por curva concentração-reposta. As respostas contráteis foram monitoradas por 120 min ou até a ocorrência do bloqueio neuromuscular completo.

2.5.2 Protocolo 2: inibição da atividade PLA₂ com varespladib

Os venenos das subespécies de *C. durissus* (30 µg/ml, menor concentração que produz bloqueio neuromuscular completo) foram pré-incubados com a concentração desejada de varespladib (0,3 mM, concentração que produz inibição acima de 80% da atividade PLA₂, excepcionalmente para o veneno *C. d. collilineatus*) a 37 °C por 20 min antes de avaliar a atividade neuromuscular residual em preparação NFD de camundongo previamente estabilizada.

2.5.3 Protocolo 3: neutralização com antiveneno comercial

Os venenos das subespécies de *C. durissus* (30 µg/ml, menor concentração que produz bloqueio neuromuscular completo) foram pré-incubados com o volume de antiveneno recomendado pelo fabricante (razão antiveneno:veneno 1:1,5) a 37 °C por 20 min antes de avaliar a atividade neuromuscular residual em preparação NFD de camundongo previamente estabilizada.

2.6 Western blotting

A imunorreatividade entre os venenos de *Crotalus durissus* e o antiveneno anti-*Crotalus* produzido pelo Instituto Butantan (lote no. 2300181/01) foi avaliada por meio de *Western blotting* [32]. Para isso, os venenos em estudo foram submetidos ao SDS-PAGE 15% e em seguida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-P (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) em sistema de transferência Semi-Dry (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) por 90 minutos com voltagem constante (15 V) [33]. As membranas foram então incubadas com solução bloqueadora (leite Mólico 5%) contendo Tween 20 (0,1%) por 15 horas a 4 °C, para bloquear os sítios reativos não-específicos. Em seguida, as membranas foram incubadas com o soro anticrotálico (1:1.000) (v/v) em solução bloqueadora por 2 horas a temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com o conjugado imuno enzimático (anti-IgG de cavalo conjugada com peroxidase) (Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd., St. Louis, MO, EUA) diluído 1:10.000 por 2 horas a temperatura ambiente. A reação foi revelada adicionando-se substrato cromógeno, composto por 3,3-diaminobenzidina(tetra-hidrocloro) (DAB), tampão imidazol 0,1 M, CoCl₂ 0,2 M e H₂O₂ 30%. A reação foi interrompida pela adição de água.

2.7 Análise estatística

Todos os dados numéricos foram expressos como média ± D.P.M. (n = 4, correspondendo ao número de preparações por protocolo para a atividade neuromuscular, totalizando 52 animais; n = 3 correspondendo ao número de reações para os ensaios de atividade PLA₂), com a normalidade dos dados sendo inicialmente verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk, garantindo a adequação da aplicação de testes paramétricos. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste *t* de Student pareado ou não pareado, conforme aplicável. Quando mais de dois grupos foram comparados, os dados foram analisados por análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey,

para múltiplas comparações. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism v.4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), e os gráficos foram gerados na mesma plataforma. O número de repetições biológicas (n) foi especificado nas legendas das figuras e tabelas correspondentes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, para os ensaios enzimáticos, e pelo menos quatro repetições independentes, para os ensaios biológicos, a fim de garantir a reprodutibilidade dos dados.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade fosfolipase A₂ (PLA₂) dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus*

O veneno de *C. d. ruruima* (CDR) apresentou maior atividade PLA₂ ($75,5 \pm 2 \Delta A_{425\text{nm}}/\text{min}$, n = 3), enquanto os venenos das demais subespécies variaram de $25,3 \pm 2$ a $35,2 \pm 1,7 \Delta A_{425\text{nm}}/\text{min}$. Varespladib (0,03 mM) causou ~82% de inibição da atividade PLA₂ do veneno de CDR e ~61 do veneno de *C. d. cascavella* (CDV) ($p < 0,05$ comparado com veneno sozinho, n =3). Para os venenos de *C. d. collilineatus* (CDC) e *C. d. terrificus* (CDT), a concentração mais efetiva de VPL foi 0.3 mM que produziu ~55 e ~81 de inibição, respectivamente ($p < 0,05$ comparado com veneno sozinho, n = 3). O veneno de CDV mostrou ser mais sensível ao VPL (0,3 mM), tendo sua atividade PLA₂ inibida em ~97% ($p < 0,05$ comparado com veneno sozinho, n = 3) (Figura 3).

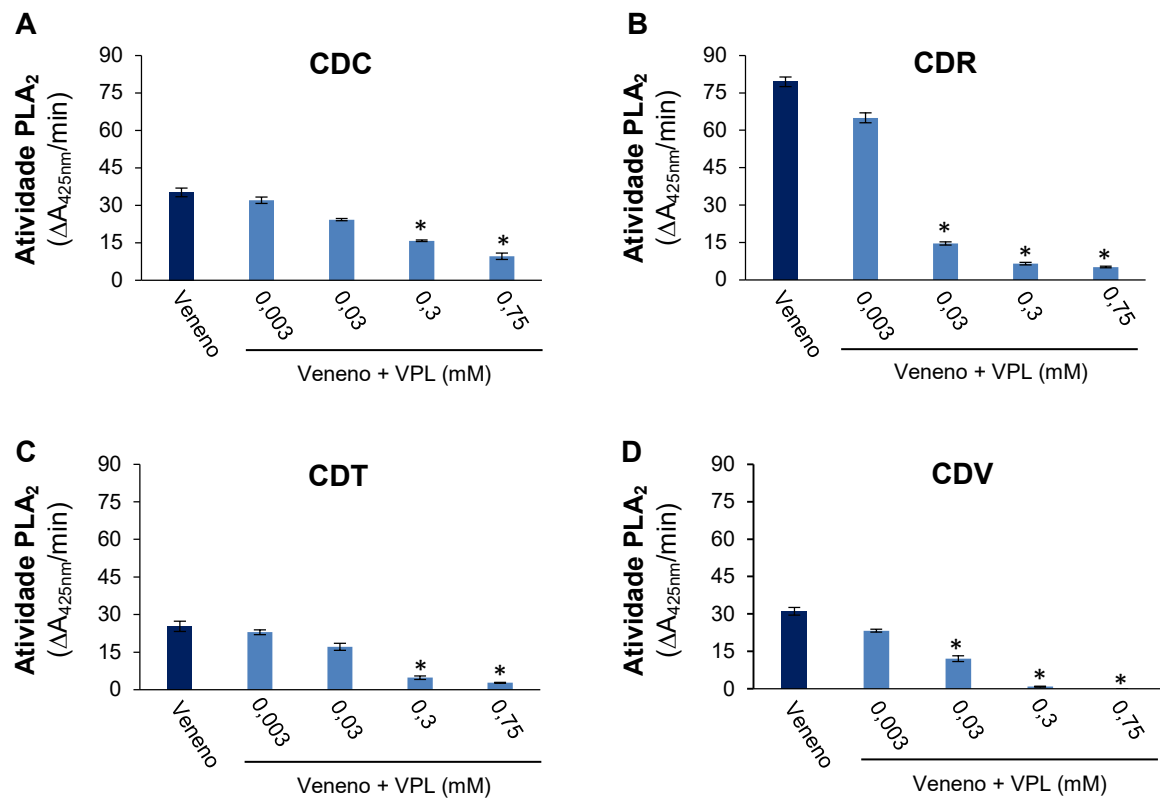


Figura 3. Atividade PLA₂ dos venenos de *Crotalus durissus collilineatus* (CDC - **A**), *C. d. ruruima* (CDR - **B**), *C. d. terrificus* (CDT - **C**), e *C. d. cascavella* (CDV - **D**) e inibição com varespladib (VPL). As barras são a média ± D.P.M. (n = 3, reação), com (*) indicando $p < 0,05$ comparado ao veneno sozinho.

3.2 Efeito concentração-resposta dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* sobre a resposta contrátil em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

O veneno de *C. d. collilineatus* (CDC) produziu facilitação neuromuscular nos primeiros 30 min de incubação, com as maiores concentrações (30 e 100 µg/ml) progredindo para bloqueio completo. O veneno de *C. d. cascavella* (CDV) exibiu discreta facilitação neuromuscular com a maior concentração (100 µg/ml), sendo o veneno mais ativo na junção neuromuscular por produzir bloqueio completo com todas as concentrações testadas. O veneno de *C. d. terrificus* (CDT) também mostrou ser muito ativo, produzindo bloqueio neuromuscular completo com as maiores concentrações (30 e 100 µg/ml), com a concentração de 10 µg de veneno/ml alcançando 90% de bloqueio em 120 min de incubação. O veneno de *C. d. ruruima* (CDR) mostrou ser o menos potente, com apenas a maior concentração

(100 $\mu\text{g/ml}$) alcançando bloqueio completo, porém mais lentamente do que as maiores concentrações dos demais venenos (Figura 4).

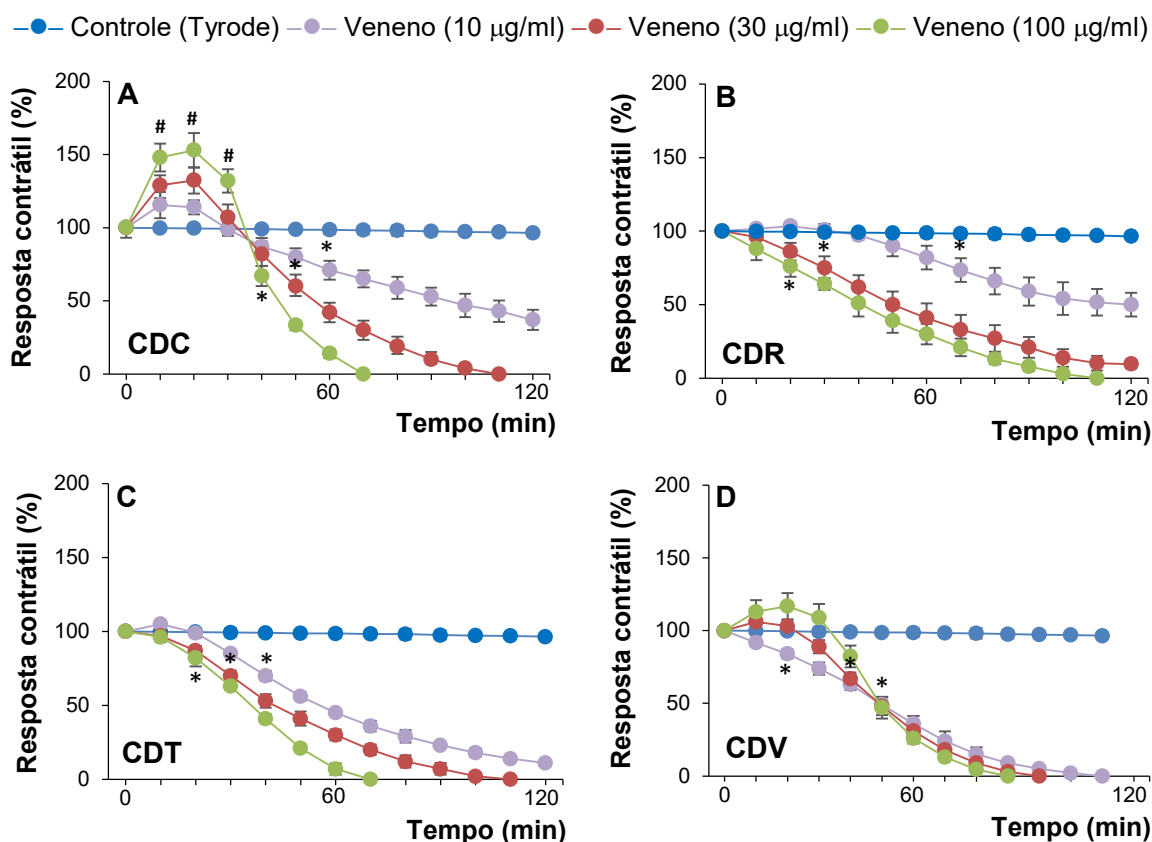


Figura 4. Efeito concentração-resposta dos venenos de *Crotalus durissus collilineatus* (CDC - **A**), *C. d. ruruima* (CDR - **B**), *C. d. terrificus* (CDT - **C**), e *C. d. cascavella* (CDV - **D**) em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Os pontos são a média \pm D.P.M. ($n = 4$), com (*) indicando $p < 0,05$ comparado ao controle (solução Tyrode sozinha) do ponto marcado em diante, e (#) indicando $p < 0,05$ comparado ao controle (solução Tyrode sozinha) exclusivamente para os pontos marcados.

3.3. Atividade neuromuscular residual dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo após neutralização com antiveneno e varespladib

Após a determinação do efeito concentração-resposta dos venenos, a concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$ foi escolhida para os tratamentos com antiveneno e varespladib por ser a menor concentração a produzir bloqueio completo, excepcionalmente para o veneno de *C. d. ruruima* (CDR) que alcançou 90% de bloqueio em 120 min de incubação. Pré-incubação com antiveneno (razão antiveneno:veneno 1:1,5 v/w) produziu parcial proteção contra os venenos de *C. d.*

cascavella (CDV) e *C. d. terrificus* (CDT), impedindo a ocorrência de 90% de bloqueio para ambos os venenos. No entanto, os venenos de *C. d. collilineatus* (CDC) e *C. d. ruruima* (CDR) apresentaram baixa reatividade-cruzada com antiveneno. Pré-incubação com varespladib (0,3 mM), concentração que produziu significativa inibição da atividade PLA₂ em todos os venenos, foi efetivo em prevenir 90% de bloqueio induzido pelos venenos de CDT e CDV e 50% de bloqueio induzido pelo veneno de CDC, sendo mais eficiente do que o próprio antiveneno para estas três subespécies. Já para o veneno de CDR, o varespladib não preveniu a ocorrência de 50% de bloqueio e diferenciou-se do antiveneno apenas nos 100 min finais de incubação (Figura 3). Excepcionalmente para o veneno de CDC, avaliamos a atividade neuromuscular residual após pré-incubação com varespladib (0.75 mM), visto que a concentração de 0,3 mM da droga produziu ~55% de inibição e 0,75 mM aumentou para ~73% de inibição da atividade PLA₂ (Fig. 3); varespladib (0,75 mM) também evitou 50% de bloqueio por CDC e não diferiu do nível de proteção visto com a concentração 0,3 mM (Figura 5).

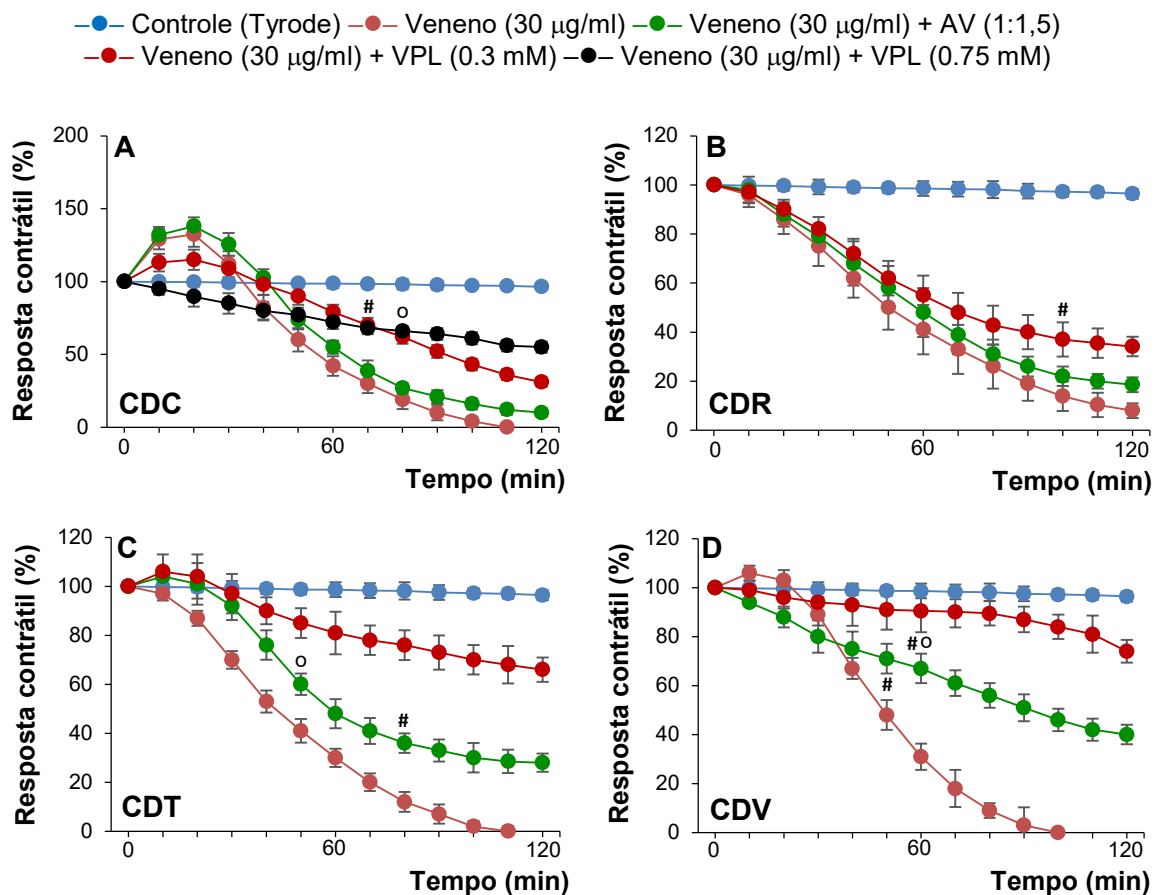


Figura 5. Neutralização por antiveneno (AV) e varespladib (VPL) do bloqueio neuromuscular induzido por *Crotalus durissus collilineatus* (CDC - A), *C. d. ruruima* (CDR - B), *C. d. terrificus* (CDT - C), e *C.*

d. cascavella (CDV - D) em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Os pontos são a média \pm D.P.M. (n = 4), (#) indicando $p < 0,05$ comparado ao veneno (30 $\mu\text{g/ml}$) sozinho do ponto marcado em diante, e (o) indicando $p < 0,05$ entre antiveneno e varespladib do ponto marcado em diante.

3.4 Western blotting dos venenos de *Crotalus durissus cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* e imunorreatividade com antiveneno

A avaliação da imunorreatividade dos venenos de *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* pelo soro anticrotálico evidenciou o reconhecimento das principais famílias de toxinas que compõem o veneno destas subespécies. Nota-se o imunorreconhecimento da isoformas de PLA₂ (~14 kDa), giroxina (~28 kDa) e convulxina (~110 kDa) em todos os venenos, enquanto o imunorreconhecimento de crotamina (~5 kDa) foi positivo apenas nos venenos de *C. d. cascavella* e *C. d. ruruima* (Figura 6).

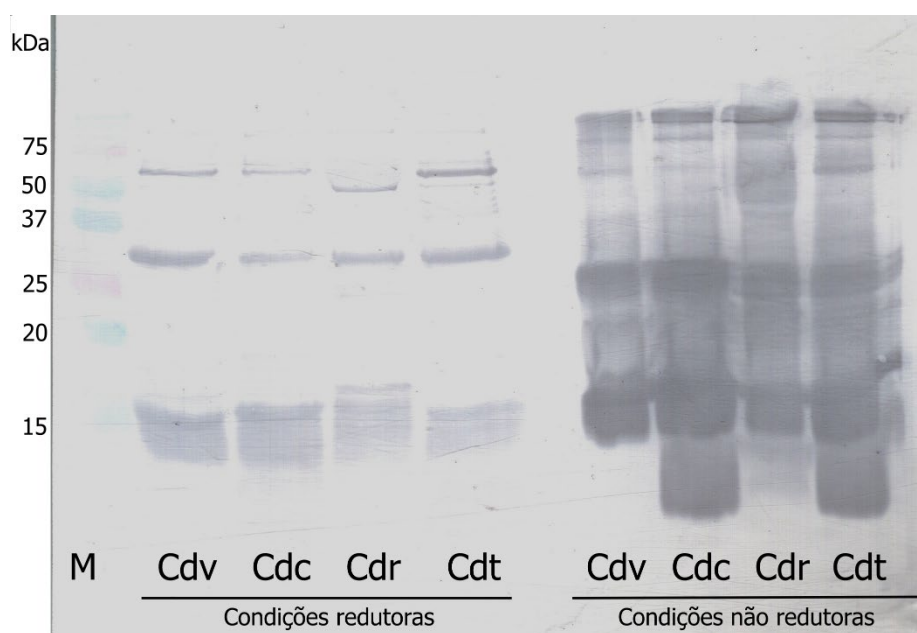


Figura 6. Western blotting dos venenos de *Crotalus durissus cascavella* (CDV), *C. d. collilineatus* (CDC), *C. d. ruruima* (CDR) e *C. d. terrificus* (CDT). As proteínas do veneno, depois de submetidas à SDS-PAGE (15%), foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas sequencialmente com antiveneno anti-*Crotalus* produzido em cavalo e anti-horse conjugado com peroxidase. A revelação foi realizada utilizando-se DAB como substrato cromogênico. (M) marcador de massa molecular Dual Color Precision Plus (BioRad).

3 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a variabilidade geográfica exerce influência direta sobre o potencial neurotóxico e a reatividade cruzada dos venenos de diferentes subespécies de *Crotalus durissus* distribuídas no Brasil. A análise integrada dos dados revelou marcadas diferenças na atividade neuromuscular, na atividade fosfolipase A₂ (PLA₂) e na eficácia de neutralização pelo antiveneno comercial e pelo inibidor seletivo varespladib. De forma geral, o veneno de *C. d. cascavella* destacou-se pelo maior potencial neurotóxico na preparação nervo frênico-diafragma, promovendo bloqueio neuromuscular completo em todas as concentrações testadas, enquanto *C. d. ruruima*, apesar de apresentar a maior atividade PLA₂, exibiu menor potência neuromuscular e baixa responsividade tanto ao antiveneno quanto ao varespladib. Adicionalmente, observamos que o antiveneno comercial apresentou proteção parcial apenas frente aos venenos de *C. d. cascavella* e *C. d. terrificus*, ao passo que o varespladib foi mais eficaz na atenuação do bloqueio neuromuscular induzido pela maioria dos venenos analisados. Em conjunto, esses achados reforçam evidências prévias de que subespécies de *C. durissus* provenientes de diferentes regiões geográficas apresentam variações expressivas na composição e na ação funcional de seus venenos [2, 4], com implicações diretas para a compreensão da neurotoxicidade e para a eficácia terapêutica do tratamento anticrotálico.

O veneno de *C. d. ruruima* apresentou maiores níveis de atividade PLA₂ em comparação às demais subespécies, sendo também o veneno mais sensível à inibição por varespladib, seguido por *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*. Esses achados corroboram com o estudo de Tasima et al. (2025) [34], que identificaram uma maior atividade enzimática no veneno de *C. d. ruruima* em comparação ao de *C. d. collilineatus*, embora os picos cromatográficos correspondentes às isoformas de PLA₂ deste último fossem mais intensos. Resultados semelhantes foram reportados por Colombini et al. (2025) [35], que, a partir de análises proteômicas de dezenove amostras de *C. d. ruruima*, distinguiram três fenótipos, caracterizados por maior abundância de SVMPS classe P-III, maior proporção de PLA₂ ou um perfil intermediário com altos níveis de ambas as classes. Tal diversidade fenotípica dentro de uma mesma subespécie pode explicar a elevada atividade enzimática observada em nosso estudo. Complementarmente, Demico et al. (2025) [36] relataram que o veneno de *C. d. terrificus* apresentou maior

atividade PLA₂ que a variação amarela do veneno de *C. d. ruruima*, embora inferior à da variação branca.

Em preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo, observamos marcada variabilidade na atividade neuromuscular entre os venenos analisados. O veneno de *C. d. cascavella* induziu uma discreta facilitação, exceto na concentração mais elevada (100 µg/ml), seguida de bloqueio completo em todas as concentrações testadas (10–100 µg/ml), comportamento também descrito por Carvalho et al. (2019) [37] utilizando concentrações menores (1 e 5 µg/ml); contudo, nossos resultados diferiram quanto ao potencial neurotóxico desse veneno, que aqui se mostrou mais potente quando comparada aos venenos de *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*. Por outro lado, *C. d. ruruima* mostrou a menor atividade neuromuscular entre os venenos estudados, produzindo bloqueio completo apenas na maior concentração. Tal achado contrasta com Demico et al. (2025) [36], que reportaram maior atividade neuromuscular dos venenos de duas variações (amarela e branca) de *C. d. ruruima* em comparação ao veneno de *C. d. terrificus*. Além disso, Valério-Souza et al. (2025) [38] relataram variações significativas na atividade neuromuscular de amostras de *C. d. terrificus* provenientes de diferentes regiões de Minas Gerais (municípios de Carrancas – Sul, Patos de Minas – Centro-Oeste, Nova Ponte – Oeste, e Nazareno – Centro-Sul), bem como diferenças no efeito neurotóxico da crotoxina isolada desses espécimes. Essa variabilidade intraespecífica, mesmo entre populações geograficamente próximas, provavelmente reflete diferenças na composição e proporção das isoformas de crotoxina, influenciadas por fatores genéticos, ambientais e ecológicos, como já proposto por Boldrini-França et al. (2010) [2] e Calvete et al. (2010) [13]. De fato, Boldrini-França et al. (2010) [2] demonstraram que populações de *C. d. terrificus* do sul do Brasil tendem a produzir maior proporção de crotoxina, ao passo que aquelas mais ao norte apresentam maiores teores de isoformas de PLA₂.

A atividade neuromuscular residual dos venenos foi avaliada após pré-incubação com antiveneno ou varespladib, utilizando para cada veneno a menor concentração capaz de induzir bloqueio completo em até 120 minutos (30 µg/ml). O antiveneno atrasou parcialmente o bloqueio induzido pelos venenos de *C. d. cascavella* e *C. d. terrificus*, enquanto o varespladib retardou de forma mais consistente o bloqueio causado por esses mesmos venenos. Conforme relatado por Souza et al. (2022) [39], a razão recomendada de antiveneno anti-*Crotalus*

promoveu cerca de 70% de inibição do bloqueio induzido por *C. d. terrificus* após 120 minutos, valor superior ao observado no presente estudo (~30%); além disso, Souza et al. (2022) [39] também reportaram que concentrações baixas de varespladib (0,03–0,08 mM) alcançaram cerca de 80% de inibição, enquanto observamos 65% de inibição utilizando a concentração inibitória mínima de varespladib (0,3 mM), conforme determinado nos ensaios enzimáticos. Em adição, embora o veneno de *C. d. ruruima* tenha exibido a maior atividade de PLA₂ entre os analisados, sua inibição por varespladib foi relativamente baixa (~35%), resultado possivelmente relacionado à diversidade e distribuição diferencial das isoformas de PLA₂ [34]. Maciel et al. (2021) [40] avaliaram a ação de varespladib sobre as subunidades isoladas de crotoxina do veneno de *C. d. terrificus*, com a droga (1.25–5 µg/ml) exercendo significativa atividade inibitória dependente de concentração sobre o bloqueio neuromuscular induzido pela subunidade PLA₂, além de também prevenir as alterações morfológicas induzidas pela toxina em preparação NFD de camundongo; embora menos ativo do que a subunidade PLA₂, a subunidade crotapotina produziu bloqueio neuromuscular parcial, sendo evitado por concentrações maiores (5–20 µg/ml) de varespladib.

A avaliação do imunorreconhecimento dos venenos pelo soro anticrotálico evidenciou o reconhecimento das principais famílias de toxinas, PLA₂ (14 kDa), giroxina (28 kDa) e convulxina (110 kDa), conforme previamente relatado [2]. A crotamina (5 kDa), quando presente, também foi reconhecida pelo soro. Neste estudo, a crotamina não foi detectada nos venenos de *C. d. cascavella* e *C. d. ruruima*, o que é consistente com outros autores [41, 42], embora análises proteômicas de Calvete et al. (2010) [13] tenham identificado crotamina em *C. d. ruruima*. Estudos comparativos do complexo *C. durissus* na América do Sul indicam um gradiente Norte–Sul na concentração relativa de crotoxina e crotamina [2, 13].

A variabilidade geográfica observada entre as subespécies de *Crotalus durissus* neste estudo possui implicações diretas para o manejo clínico dos envenenamentos crotálicos no Brasil. As diferenças no potencial neurotóxico e na eficácia de neutralização pelo antiveneno indicam que a resposta terapêutica pode variar conforme a subespécie envolvida, podendo contribuir para a persistência de sinais clínicos de neurotoxicidade [2, 39]. A proteção limitada do antiveneno frente aos venenos de *C. d. collilineatus* e *C. d. ruruima* reforça a necessidade de

monitoramento clínico rigoroso, especialmente da função respiratória. Nesse contexto, a maior eficácia do varespladib na atenuação do bloqueio neuromuscular induzido pela maioria dos venenos avaliados destaca seu potencial como estratégia terapêutica adjuvante direcionada à inibição de PLA₂, conforme demonstrado em modelos experimentais [2, 39, 40].

5 CONCLUSÃO

Os venenos de *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* apresentaram níveis semelhantes de atividade PLA₂, enquanto o veneno de *C. d. ruruima* mostrou-se significativamente mais ativo. Apesar dessa similaridade enzimática entre algumas subespécies, observou-se ampla variabilidade em seus efeitos sobre a junção neuromuscular, destacando-se o veneno de *C. d. cascavella* como o mais neurotóxico. O antiveneno comercial anti-*Crotalus* demonstrou eficácia limitada na neutralização dos efeitos neuromusculares dos venenos de *C. d. collilineatus* e *C. d. ruruima*, sendo mais eficiente apenas frente ao veneno de *C. d. cascavella*. A inibição da atividade PLA₂ pelo varespladib promoveu expressiva redução do bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos avaliados, exceto pelo de *C. d. ruruima*, que apresentou baixa responsividade ao inibidor. Além disso, o varespladib mostrou-se mais eficaz do que o antiveneno comercial em retardar o bloqueio neuromuscular provocado por esses venenos. Assim, a variabilidade geográfica observada entre as subespécies de *C. durissus* exerce impacto direto sobre seu potencial neurotóxico, bem como sobre a eficácia da neutralização pelo antiveneno comercial.

Abreviações

µg: micrograma, AV: antiveneno, CDC: *Crotalus durissus collilineatus*, CDR: *Crotalus durissus ruruima*, CDT: *Crotalus durissus terrificus*, CDV: *Crotalus durissus cascavella*, CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais, CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, mM: milimolar, PLA₂: fosfolipase A₂, SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, VPL: varespladib.

Disponibilidade dos dados

Os dados serão disponibilizados quando devidamente solicitados.

Apoio financeiro

Este trabalho foi apoiado com recursos institucionais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, SP, Brasil – processo no. 2020/04287-6). SNSA foi apoiada com bolsa de iniciação científica da FAPESP (processo no. 2024/01800-5). PJD foi apoiada com bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil – processo no. 88887.952349/2024-00). KMZ é apoiada com bolsas de produtividade científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brasil – processos no. 309995/2022-1).

Declaração de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Contribuições dos autores

PJD, KMZ e RSF conceberam a pesquisa e delinearam os experimentos. SSS contribuiu para o delineamento e para a interpretação dos dados. PJD, SNSA, IGGL e EP realizaram os experimentos e conduziram as análises. RSF e KMZ redigiram o manuscrito e participaram de suas revisões. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Aprovação ética

As diretrizes nacionais e/ou institucionais relevantes para o cuidado e uso de animais foram seguidas neste trabalho, conforme indicado no item "Animais" da seção Materiais e Métodos.

Referências

1. Guedes TB, Entiauspe-Neto OM, Costa HC. Lista de répteis do Brasil: atualização de 2022. *Herpetologia Brasileira*. 2023 Jun 12;12(1):56–161. doi: 10.5281/zenodo.7829013.
2. Boldrini-França J, Corrêa-Netto C, Silva MM, Rodrigues RS, De La Torre P, Pérez A, Soares AM, Zingali RB, Nogueira RA, Rodrigues VM, Sanz L, Calvete

- JJ. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J Proteomics*. 2010 Aug 5;73(9):1758-76. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.001.
3. Wüster W, Ferguson JE, Quijada-Mascareñas JA, Pook CE, Salomão Mda G, Thorpe RS. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol Ecol*. 2005 Apr;14(4):1095-108. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02471.x.
 4. Silva-Júnior LN, Abreu LS, Rodrigues CFB, Galizio NDC, Aguiar WDS, Serino-Silva C, Dos Santos VS, Costa IA, Oliveira LVF, Sant'Anna SS, Grego KF, Tanaka-Azevedo AM, Rodrigues LNDS, de Moraes-Zani K. Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020 Aug 26;26:e20200016. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0016.
 5. Echeverrigaray S, Grazziotin G, Grazziotin F, Agostini G. Random amplified polymorphisms between two South American subspecies of rattlesnakes (*Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*). *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2001;44(3):313–317. doi: 10.1590/S1516-89132001000300014.
 6. SINAN, 2026. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Ministério da Saúde, Brasil. <https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan>. Acesso em 03.01.2026.
 7. Asato MS, Cruz Carbonell RC, Martins AG, Mendonça de Moraes C, Chávez-Olórtegui C, Apolonia da Costa Gadelha M, Pereira de Oliveira Pardal P. Envenoming by the rattlesnake *Crotalus durissus ruruima* in the state of Roraima, Brazil. *Toxicon* X. 2020 Oct 22;8:100061. doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100061.
 8. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*. 1985;23(4):631-6. doi: 10.1016/0041-0101(85)90367-8.
 9. Campbell, J.A., Lamar, W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock Books in Herpetology. Cornell University Press: Ithaca, NY, USA.

10. Frare BT, Silva Resende YK, Dornelas BC, Jorge MT, Souza Ricarte VA, Alves LM, Izidoro LFM. Clinical, laboratory, and therapeutic aspects of *Crotalus durissus* (South American Rattlesnake) victims: a literature review. *Biomed Res Int*. 2019 Aug 5;2019:1345923. doi: 10.1155/2019/1345923.
11. Sano-Martins IS, Tomy SC, Campolina D, Dias MB, de Castro SC, de Sousa-e-Silva MC, Amaral CF, Rezende NA, Kamiguti AS, Warrell DA, Theakston RD. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *QJM*. 2001 Oct;94(10):551-9. doi: 10.1093/qjmed/94.10.551.
12. Boldrini-França J, Rodrigues RS, Fonseca FP, Menaldo DL, Ferreira FB, Henrique-Silva F, Soares AM, Hamaguchi A, Rodrigues VM, Otaviano AR, Homs-Brandeburgo MI. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. *Biochimie*. 2009 May;91(5):586-95. doi: 10.1016/j.biochi.2009.02.001.
13. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, de la Torre P, Flores-Díaz M, Dos Santos MC, Borges A, Bremó A, Angulo Y, Lomonte B, Alape-Girón A, Gutiérrez JM. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J Proteome Res*. 2010 Jan;9(1):528-44. doi: 10.1021/pr9008749.
14. Fernandes CA, Pazin WM, Dreyer TR, Bicev RN, Cavalcante WL, Fortes-Dias CL, Ito AS, Oliveira CL, Fernandez RM, Fontes MR. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Sci Rep*. 2017 Mar 3;7:43885. doi: 10.1038/srep43885.
15. Sampaio SC, Hyslop S, Fontes MR, Prado-Franceschi J, Zambelli VO, Magro AJ, Brigatte P, Gutierrez VP, Cury Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon*. 2010 Jun 1;55(6):1045-60. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.01.011.
16. Chang CC, Tseng KH. Effect of crotoxin, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br J Pharmacol*. 1978 Jul;63(3):551-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.1978.tb07811.x.
17. Oguiura N, Boni-Mitake M, Rádis-Baptista G. New view on crotoxin, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon*. 2005 Sep 15;46(4):363-70. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.06.009.

18. Wiesel GA, Shibao PYT, Cologna CT, Morandi Filho R, Ueira-Vieira C, De Pauw E, Quinton L, Arantes EC. In-depth venome of the Brazilian Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: an integrative approach combining its venom gland transcriptome and venom proteome. *J Proteome Res.* 2018 Nov 2;17(11):3941-3958. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00610.
19. Faure G, Bon C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon.* 1987;25(2):229-34. doi: 10.1016/0041-0101(87)90246-7.
20. Faure G, Bon C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry.* 1988 Jan 26;27(2):730-8. doi: 10.1021/bi00402a036.
21. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama MY Jr, Amazonas DR, Freitas-de-Sousa LA, Mourão RH, Chalkidis HM, Valente RH, Moura-da-Silva AM. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J Proteomics.* 2017 Apr 21;159:32-46. doi: 10.1016/j.jprot.2017.03.003.
22. Sousa LF, Zdenek CN, Dobson JS, Op den Brouw B, Coimbra F, Gillett A, Del-Rei THM, Chalkidis HM, Sant'Anna S, Teixeira-da-Rocha MM, Grego K, Travaglia Cardoso SR, Moura da Silva AM, Fry BG. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) venoms from Brazil: differential biochemistry and antivenom efficacy resulting from prey-driven venom variation. *Toxins (Basel).* 2018 Oct 11;10(10):411. doi: 10.3390/toxins10100411.
23. Sousa LF, Nicolau CA, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, Mourão RH, Lima-dos-Santos I, Sano-Martins IS, Chalkidis HM, Valente RH, Moura-da-Silva AM. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Sep 12;7(9):e2442. doi: 10.1371/journal.pntd.0002442.
24. Rogalski A, Soerensen C, Op den Brouw B, Lister C, Dashevsky D, Arbuckle K, Gloria A, Zdenek CN, Casewell NR, Gutiérrez JM, Wüster W, Ali SA, Masci P, Rowley P, Frank N, Fry BG. Differential procoagulant effects of saw-scaled viper (Serpentes: Viperidae: Echis) snake venoms on human plasma and the narrow taxonomic ranges of antivenom efficacies. *Toxicol Lett.* 2017 Oct 5;280:159-170. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.08.020.

25. Amazonas DR, Portes-Junior JA, Nishiyama-Jr MY, Nicolau CA, Chalkidis HM, Mourão RHV, Grazziotin FG, Rokyta DR, Gibbs HL, Valente RH, Junqueira-de-Azevedo ILM, Moura-da-Silva AM. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. *J Proteomics*. 2018 Jun 15;181:60-72. doi: 10.1016/j.jprot.2018.03.032.
26. Lomonte B, Tsai WC, Ureña-Díaz JM, Sanz L, Mora-Obando D, Sánchez EE, Fry BG, Gutiérrez JM, Gibbs HL, Sovic MG, Calvete JJ. Venomics of New World pit vipers: genus-wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. *J Proteomics*. 2014 Jan 16;96:103-16. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.036.
27. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020 Jul 14;18(7):e3000411. doi: 10.1371/journal.pbio.3000411. PMID: 32663221; PMCID: PMC7360025.
28. Cho W, Kézdy FJ. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymol*. 1991;197:75-9. doi: 10.1016/0076-6879(91)97134-k.
29. Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon*. 1996 Oct;34(10):1149-55. doi: 10.1016/0041-0101(96)00057-8.
30. Floriano RS, Rocha T, Carregari VC, Marangoni S, da Cruz-Höfling MA, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L, Rowan EG. The neuromuscular activity of *Bothriopsis bilineata smaragdina* (forest viper) venom and its toxin Bbil-TX (Asp49 phospholipase A₂) on isolated mouse nerve-muscle preparations. *Toxicon*. 2015 Mar;96:24-37. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.01.001.
31. Couceiro FYGM, Demico PJ, Dias SR, Oliveira IN, Pacagnelli FL, Silva EO, Sant'Anna SS, Grego KF, Morais-Zani K, Torres-Bonilla KA, Hyslop S, Floriano RS. Involvement of phospholipase A₂ in the neuromuscular blockade caused by coralsnake (*Micrurus* spp.) venoms in mouse phrenic nerve-diaphragm preparations in vitro. *Toxicon*. 2023 Oct;234:107263. doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107263.
32. Harlow E. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed. by Edward A. Greenfield.

- Second edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014. Print.
33. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
 34. Tasima LJ, Lima EO, Kavazoi VK, Silveira GPM, Vidueiros JP, Grego KF, Tanaka-Azevedo AM. Ontogenetic influence in *Crotalus durissus ruruima* snake venom: an intermediate between north and south venom pattern of rattlesnake. *Toxicon*. 2025 Oct;265:108467. doi: 10.1016/j.toxicon.2025.108467.
 35. Colombini M, Rocha AM, Freitas-de-Sousa LA, Chaves AFA, Serrano SMT, Souza VC, Viala VL, Junqueira-Azevedo ILM, Cerni FA, Sartim MA, Sachett JAG, Monteiro WM, Grazziotin FG, Wen FH, Pucca MB, Moura-da-Silva AM. Phenotypic dichotomy in *Crotalus durissus ruruima* venom and potential consequences for clinical management of snakebite envenomations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2025 Aug 1;19(8):e0013296. doi: 10.1371/journal.pntd.0013296.
 36. Demico PJ, Oliveira IN, Proença-Hirata VS, Dias SR, Ghirelli HA, Silva EO, Giometti IC, Pacagnelli FL, Torres-Bonilla KA, Hyslop S, Galizio NC, de Moraes-Zani K, Pucca MB, Rocha AM, Maciel JB, Sartim MA, Monteiro WM, Floriano RS. Comparative analysis of the enzymatic, coagulant, and neuromuscular activities of two variants of *Crotalus durissus ruruima* venom and antivenom efficacy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2025 Jan 6;18(1):54. doi: 10.3390/ph18010054.
 37. Carvalho LH, Teixeira LF, Zaqueo KD, Bastos JF, Nery NM, Setúbal SS, Pontes AS, Butzke D, Cavalcante W, Gallacci M, Fernandes CFC, Stabeli RG, Soares AM, Zuliani JP. Local and systemic effects caused by *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, and *Crotalus durissus cascavella* snake venoms in swiss mice. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019 Sep 5;52:e20180526. doi: 10.1590/0037-8682-0526-2018.
 38. Valério-Souza NM, Ramos Pinto ÊK, Maciel FV, de Abreu TAG, Ortolani PL, Fortes-Dias CL, Cavalcante WLG. Comparative analysis of paralytic and myotoxic effects of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin from different regions of Minas Gerais, Brazil. *Toxicon*. 2025 Oct;265:108490. doi: 10.1016/j.toxicon.2025.108490.
 39. Souza J, Oliveira ICF, Yoshida EH, Cantuaria NM, Cogo JC, Torres-Bonilla KA,

- Hyslop S, Silva Junior NJ, Floriano RS, Gutiérrez JM, Oshima-Franco Y. Effect of the phospholipase A₂ inhibitor Varespladib, and its synergism with crotalic antivenom, on the neuromuscular blockade induced by *Crotalus durissus terrificus* venom (with and without crostamine) in mouse neuromuscular preparations. *Toxicon*. 2022 Jul 30;214:54-61. doi: 10.1016/j.toxicon.2022.05.001.
40. Maciel FV, Ramos Pinto ÊK, Valério Souza NM, Gonçalves de Abreu TA, Ortolani PL, Fortes-Dias CL, Garrido Cavalcante WL. Varespladib (LY315920) prevents neuromuscular blockage and myotoxicity induced by crostoxin on mouse neuromuscular preparations. *Toxicon*. 2021 Oct 30;202:40-45. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.09.009.
41. Muniz EG, Sano-Martins IS, Saraiva MDGG, Magno ES, Oliveira SS. Ability of brazilian *Bothrops-Lachesis-Crotalus* antivenom in neutralizing some biological activities of *Crotalus durissus ruruima* rattlesnake venom. *Toxicon*. 2025 Jan;254:108211. doi: 10.1016/j.toxicon.2024.108211.
42. Tasima LJ, Serino-Silva C, Hatakeyama DM, Nishiduka ES, Tashima AK, Sant'Anna SS, Grego KF, de Moraes-Zani K, Tanaka-Azevedo AM. Crostamine in *Crotalus durissus*: distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020 Apr 6;26:e20190053. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0053.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO: JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES

Guia para autores

<https://jvat.org.br/guide-for-authors>

Aims and scope

Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD) is an academic open access publication dedicated to publish research on all aspects of toxinology, venomous animals and tropical diseases. Its interdisciplinary content includes original scientific articles covering research on toxins derived from animals, plants and microorganisms. Topics of interest include, but are not limited to:

- systematics and morphology of venomous animals;
- physiology, biochemistry, pharmacology and immunology of toxins;
- epidemiology, clinical aspects and treatment of envenoming by different animals, plants and microorganisms;
- development and evaluation of antivenoms and toxin-derivative products;
- epidemiology, clinical aspects and treatment of tropical diseases (caused by virus, bacteria, algae, fungi and parasites) including the neglected tropical diseases (NTDs) defined by the World Health Organization.

JVATiTD is published by the Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), a unit of the [São Paulo State University \(UNESP\)](#) whose main research field is toxinology.

ISSN: 1678-9199

Open access

All articles published by the *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers. As authors of articles published in *JVATiTD* you are the copyright holders of your article and have granted to any third party, in advance and in perpetuity, the right to use, reproduce or disseminate your article, according to the SciELO license agreement.

Article-processing charge

All articles published by *JVATiTD* are open access and freely available online. This is made possible by an article-processing charge (APC) that covers the publishing services including provision of online tools for editors and authors, article production and hosting, and liaison with abstracting and indexing services. Therefore, an APC of USD 900 (American dollar) applies to papers accepted for publication after peer review. Authors based in Brazil have a discount and pay BRL 2750 (Brazilian real) per accepted manuscript. Authors (first, last or corresponding) affiliated with São Paulo State University (Universidade Estadual Paulista – UNESP), Brazil, will receive a full article-processing charge waiver upon request.

Indexing services

All articles published in *JVATiTD* are included in: Biological Abstracts, BIOSIS, CABI, CAS, CSA, DOAJ, EBSCO, Embase, Europe PubMed, Global Health, Google Scholar, ProQuest, PubMed, PubMed

Central, SciELO, Scopus – Scimago, Web of Science – Science Citation Index Expanded, Zoological Record.

The full text of all articles is deposited in digital archives to guarantee long-term digital preservation. You can also access all articles published by JVATiTD in [SciELO library](#).

How to cite

Articles in *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* should be cited in the same way as articles in a traditional journal. Because articles are not printed, they do not have page numbers; instead, they have an elocation-id.

Article citations follow this format:
Authors. Title. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. [date];[volume number]:[elocation-id]. PMID; PMCID.

Example: Bezerra PHA, Ferreira IM, Franceschi BT, Bianchini F, Ambrósio L, Cintra ACO, et al. BthTX-I from *Bothrops jararacussu* induces apoptosis in human breast cancer cell lines and decreases cancer stem cell subpopulation. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019 Jul 29;25:e20190010. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0010. PubMed PMID: 31384244; PubMed Central PMCID: PMC6665320.