

Josiane Cristina Barros

Purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de uma

Fosfolipase A₂ neurotóxica presente no veneno de

Bothrops alternatus

UNICAMP – 2005

Josiane Cristina Barros

Purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de uma
Fosfolipase A₂ neurotóxica presente no veneno de
Bothrops alternatus

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós – Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.

UNICAMP – 2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B278p Barros, Josiane Cristina
Purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de uma fosfolipase A2 neurotóxica presente no veneno de *Bothrops alternatus* / Josiane Cristina Barros. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Lea Rodrigues Simioni
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fosfolipase A2. 2 Junção neuromuscular. 3. Camundongo.
4. Ave. 5. Eletrofisiologia. 6. Histologia. I. Simioni, Léa Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Slp/fcm)

Título em inglês: Isolation and characterization biochemistry and pharmacological of a neurotoxic phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* venom

Keywords: • Phospholipase A2

- Neuromuscular junction
- Chick
- Electrophysiology
- Histology

Área de concentração : Farmacologia

Titulação: Mestrado

Banca examinadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Profa. Dra. Caroline Ribeiro Borja de Oliveira

Data da defesa:31/08/2005



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Profa. Dra. Caroline Ribeiro Borja de Oliveira

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

Data: 31/08/2005

*Mais complicado do que dar algo à alguém é dedicar algo a alguém, principalmente quando este alguém representa para você o que há de mais importante e especial, dentro do livro incomensurável que é a vida de cada ser humano. Desta forma quero dedicar não só este complexo trabalho, mas sim o aprendizado de toda a minha vida aos meus amáveis e admiráveis pais obrigada, pelo amor, carinho e assistência incondicional que vocês sempre me deram.
Obrigada pelos dois irmãos lindos que vocês me deram (Beto, Graicy).*

*Ao Reges Cavini, por juntos termos vivido momentos tão inesquecíveis, que me fizeram crescer em todos os sentidos da vida. E ainda aos seus pais Ramiro Cavini e Teresa Cavini e sua irmã Marla por tão bem assumir o papel de minha “segunda família, me deixando assim completamente segura.
Espero ter vocês como amigos para o resto de minha vida.
Meu muito obrigada!!!*

Agradeço...

À Profª. Drª. Léa, para você eu não sei o que dizer ... sei apenas que é enorme o prazer de dizer que tenho você como minha orientadora (obrigada pela confiança em mim depositada). As vezes acho que Deus foi muito camarada comigo, quando deu você de presente para mim. Obrigada pelo que você fez por mim. O respeito e admiração que tenho por você é algo tridimensional.

Ao Biólogo Gildo, que grande braço direito o nosso laboratório possui, que pessoa linda é você, humilde, paciente, dedicado, ético. Obrigada pelos ensinamentos e pela sua amizade.

Profº. Dr. Luiz Ponce Soto, meu co-orientador você foi uma peça fundamental, espécie de cheque mate, para a execução deste trabalho. Como foi legal associar amizade, com trabalho.

Ao Profº. Dr. Sérgio Marangoni, pelo trabalho de cooperação entre os dois laboratórios.

À Luciana Santis pelo competente trabalho da histologia.

À Saraguaci Hernandez (Sarinha), como é bom saber que ainda existem pessoas tão puras como você... tão desprovida de maiores interesses... sua ajuda durante todo o meu mestrado foi algo indispensável. Obrigada!!! Amo você.

Profª. Drª. Caroline B. Oliveira, quem me ajudou no meu primeiro passo... me auxiliando no meu primeiro projeto... como você é doce.

À Profª Drª Yoko, quanta inteligência, sabedoria e disciplina em uma mesma pessoa... sinônimo de perfeição você.

Ao mestre Ricardo, meu amigo... quantas gargalhadas trocamos juntos, quanto conselho bom você me deu. Obrigada.

Ao Profº Valdemir um exemplo típico do que é viver um dia de cada vez, admiro sua paciência.

Ao Profº. Dr. Chariston Dal Belo, exemplo de ética profissional, obrigada pelas grandes dicas que sempre me deu.

Emílio, meu colega de profissão, como é bom ter você por perto, sua alegria é algo contagiante... adoro você.

À Profª. Priscila quanto entusiasmo, quanta força, quanta disciplina....

Lílian minha grande amiga, que delícia é estar com você, quanta humildade, quanto carisma....

Aline e Cê, como foi bom morar com vocês, como foi bom conhecer vocês como é bom saber que tenho amigas como vocês ... tão assim ... para o que der e vier... Obrigada pela nossa amizade...

Carlitos, meu grande e melhor amigo... Que lindo é o respeito da nossa amizade... que dom você tem de ouvir e opinar... quero você presente em toda a minha vida.

Meus ex-professores (graduação) como eu aprendi com vocês, hoje vejo que inconscientemente, hajo de forma muito parecida com meus alunos, obrigada pela nossa amizade.

Vanderley, obrigada por estar sempre de sorriso aberto, quando precisei dos serviços da secretaria, valeu!!!

A todos os docentes do departamento, obrigada pelos ensinamentos...

Ao doutor Marcos é muito bom ver o compromisso que você tinha consigo mesmo, de aparecer em nosso laboratório todos os dias para simplesmente nos dar bom dia....(in memorian)

Ao Prof Dr Alexandre, quanta inteligência, quanta disponibilidade, quanta energia; que delícia foi apreender com você....Obrigada por tudo.

À prof^a Dra. Angélica pelas importantes dicas que deu durante minha qualificação, como você tem o dom de nos corrigir, sem nos dizer que estamos errados.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pelos ensinamentos e Prof^a Dra. Albetiza pelas importantes observações bioquímicas do meu trabalho.

A minha família... obrigada por ser a minha família...

A Capes pelo apoio financeiro....

VIVA à VIDA

Nós nos convencemos de que a vida ficará melhor algum dia ... quando tivermos um filho e, depois, outro, então, ficamos frustrados, porque nossos filhos não tem idade suficiente e seria muito melhor se tivessem.

Depois, nos frustramos porque temos filhos adolescentes e temos de lidar com eles. Certamente seremos mais felizes quando nossos filhos tiverem ultrapassado essa fase.

Dizemos que a nossa vida só será completa quando nosso cônjuge conseguir o que busca. Quando tivermos comprado um carro melhor, ou tivermos condições de fazer uma viagem longa, quando tivermos aposentados.

A verdade é que não há melhor época para ser feliz do que agora mesmo!!! Se não, quando? Sua vida será sempre cheia de desafios. Melhor admitir isto para você mesmo e decidir ser feliz de qualquer modo.

Uma das minhas “frases” favoritas é de Alfred D. Sousa, quando diz: “Por muito tempo eu pensei que a minha vida fosse tornar uma vida de verdade”

Mas sempre havia um obstáculo no caminho algo a ser ultrapassado antes e começar a viver- um trabalho não terminado, uma conta a ser paga. Aí sim, a vida de verdade começaria. Por fim, cheguei a conclusão que esses obstáculos eram a minha vida de verdade.

Essa perspectiva tem me ajudado a ver que não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho ! Assim, aproveite todos os momentos que você tem. E aproveite-os mais se você tem alguém especial para compartilhar, especial o suficiente para passar seu tempo... e lembre-se que o tempo não espera ninguém.

*Portanto, pare de esperar até que você termine a faculdade; até que você volte para a faculdade; até que você perca 5 quilos; até que você tenha tido filhos; até que seus filhos tenham saído de casa; até que você se case; até que você se divorcie; até sexta á noite; até segunda de manhã; até que você tenha comprado um carro ou uma casa novos; até que seu carro ou sua casa tenham sido pagos; até o próximo verão, primavera, outono, inverno; até que você esteja sóbrio de novo; até que você morra, e decida que não há hora melhor para ser feliz do que **AGORA MESMO...***

Felicidade é uma viagem, não um destino. Por isso...

Trabalhe como se você não precisasse de dinheiro.

Ame como se você nunca tivesse machucado.

Ajude ao próximo como se fosse rotina.

Não coma e beba como se fosse a última vez.

Brinque como se fosse criança.

Perdoe como gostaria que fosse perdoado.

E dance como se ninguém estivesse olhando!!!

(Autor desconhecido)

Sumário

RESUMO	xxix
ABSTRACT	xxiii
1-INTRODUÇÃO	37
1.1- Considerações gerais.....	39
1.2- Venenos botrópicos.....	41
1.3- <i>Botrops alternatus</i>	43
1.4- Fosfolipase A ₂ - PLA ₂	45
2-OBJETIVOS	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Veneno.....	53
3.2. Animais.....	53
3.3. Ensaio bioquímico.....	53
3.3.1. HPLC de exclusão molecular.....	53
3.3.2. Determinação de atividade PLA ₂	54
3.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina.....	54
3.4. Ensaio biológico.....	55
3.4.1. Preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	55
3.4.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.....	57
3.4.3 Técnica histológica.....	57
3.5. Análise estatística.....	58
4. RESULTADOS	59

4.1 Purificação da fração neurotóxica Bt II a partir do veneno total de *Bothrops alternatus*, em
coluna de exclusão molecular Superdex G-75 (Waters) em LC..... 60

4.2 Purificação da fração neurotóxica Bt II-2 a partir do veneno total de <i>Bothrops alternatus</i> , em coluna μ -Boundapack C18 (0.78 X 30 cm) (Waters) em HPLC de fase reversa.....	61
4.3 Análises de aminoácidos das frações neurotóxicas Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i>	63
4.4 Sequencia da região N-terminal da PLA ₂ Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i> e estudo de homologia sequencial.....	65
4.5 Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	66
4.6 Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.....	72
4.7 Estudo morfológicos das alterações causadas pelo veneno e fração de <i>B. alternatus</i>	75
4.7.1 Controle solução Krebs.....	75
4.7.2 Veneno <i>Botrops alternatus</i>	77
4.7.3 BT 11-2 PLA ₂ 0,1 μ g/ml.....	80
4.7.4 BT 11-2 PLA ₂ 0,5 μ g/ml.....	81
4.7.5 BT 11-2 PLA ₂ 1 μ g/ml.....	82
4.7.6 BT 11-2 PLA ₂ 10 μ g/ml.....	84
4.7.7 BT 11-2 PLA ₂ 20 μ g/ml.....	85
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÃO	91
8. BIBLIOGRAFIA	95

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh Acetilcolina
Asp-49 Aspartato 49
Bt I Bothropsotoxina-I
Bt II Bothropsotoxina-II
Bt III Bothropsotoxina-III
Bt II-2 Bothropsotoxina-II 2
BthTX Bothropsotoxina
BthTX I Bothropsotoxina I
C₆H₁₂O₆ Glicose
Ca⁺² íon cálcio
CaCl₂ Cloreto de Cálcio
g grama
HPLC High performance liquid Chromatography
Hz hertz
K⁺ íon potássio
KCL cloreto de potássio
KDa. Quilo Dalton
KH₂PO₄ Fosfato de Potássio
Lys-49 Lisina 49
Mg miligramas
Mg magnésio
MgSO₄ sulfato de magnésio
mL/min Mililitros por minuto
min Minuto
Ms Milissegundo
Myotoxin III Miotoxina III
nmol/min/mg. nanomol por minuto por grama
NaCl cloreto de sódio
NaHCO₃ Bicarbonato de Sódio
Ph Potencial hidrogeniônico
PLA₂. fosfolipase A₂
PrTX I Pirotoxina I
PrTX II Pirotoxina II
PSA Persulfato de Amônio
Rpm rotações por minuto
SDS Sodium dodecyl sulfate
TFA acido trifluoroacético
TNF α acido trifluoroacético α
V Volume
VT volume total
v/v Porcentagem ou proporção volumen/volumen
 μ l microlitro
 μ g/ml micrograma por mlilitro

Lista de abreviações de aminoácidos

Asx	Aspartato
Glx	Glicina
Ser	Serina
Gly	Glicina
His	Histidina
Arg	Arginina
Thr	Treonina
Ala	Alanina
Pro	Prolina
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Met	Metionina
Cys	Cisteína
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Phe	Fenilalanina
Lys	Lisina
Trp	Triptofano

TABELA 1 - Composição de aminoácidos da neurotoxina
PLA₂ Bt II-2 de *Bothrops alternatus*.....54

FIGURA 10- Gráfico da resposta contraturante à adição exógena de ACh e KCL, VT (50 e 100 µg/ml).....58

FIGURA 11- Registro miográfico do efeito induzido pelo VT de *B. alternatus* sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta.....59

FIGURA 12- Registro miográfico do efeito induzido pela fração BTII-2, sobre a preparação músculo *nervo frenico diafragna* de camundongo , sob estimulação elétrica indireta.....61

FIGURA 13 - Registro miográfico do efeito induzido pela fração Bt II-2, sobre a preparação músculo *frenico diafragna* de camundongo, sob estimulação elétrica indireta e direta, (pulsos supramaximais de 0,2 ms e 0,1 Hz).....63

FIGURA 14- Registro miográfico do efeito induzido pela da fração BTII-2 , sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, (estimulação elétrica indireta e direta).....64

FIGURA 15- Fotomicrografia de cortes longitudinais dos músculos *biventer cervicis* de pintainho controle.....65

FIGURA 16 Fotomicrografia de cortes longitudinais dos músculos *biventer cervicis* de pintainho, contendo veneno total de *Bothrops alternatus*, na concentração de 50µg/ml.....67

FIGURA 1-	A serpente de <i>Bothrops alternatus</i>	31
FIGURA 2-	Nervo-Músculo <i>Biventer cervicis</i> de Pintainho	48
FIGURA 3 –	Cromatografia de exclusão molecular em LC.....	50
FIGURA 4 -	Perfil cromatográfico da fração Bt II em HPLC de fase reversa	52
FIGURA 5-	Perfil cromatográfico de re-purificação da fração Bt II-2 em HPLC de fase reversa	52
FIGURA 6-	Estudo comparativo de homologia seqüencial da região N-terminal da PLA ₂ Bt II-2	55
FIGURA 7-	Gráfico da resposta contrátil da fração Bt II-2	57
FIGURA 8-	Gráfico da resposta contraturante à adição exógena de ACh e KCL	57
FIGURA 9-	Gráfico representativo da taxa de bloqueio (50% e 90%).....	58

- FIGURA 17 Fotomicrografia de cortes longitudinais dos
músculos *biventer cervicis* de pintainho contendo veneno
total de *Bothrops alternatus* na concentração de 100µg/ml.....68
- FIGURA 18- Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos
biventer cervicis de pintainho contendo
0,1µg/ml de Pla2.....69
- FIGURA 19- Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos
biventer cervicis de pintainho contendo 0,5µg/ml de Pla2.....70
- FIGURA 20- Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos
biventer cervicis de pintainho contendo 1µg/ml de Pla2.....72
- FIGURA 21- Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos
biventer cervicis de pintainho contendo 10µg/ml de Pla2.....73
- FIGURA 22- Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos
biventer cervicis de pintainho contendo 20µg/ml de Pla2.....74

RESUMO

O veneno total de *Bothrops alternatus* (10 mg) foi fracionado por meio de coluna μ -Bondapak C18 e HPLC de fase reversa resultando em um pico ativo denominado BT II 2. Em SDS-PAGE, a toxina originou uma banda única, isolada de 14 KDa.

A fração BT II 2 (0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$ n=7) induziu um bloqueio irreversível da resposta contrátil, em preparações músculo *biventer cervicis* de pintainho, sendo esse dose-dependente.

As respostas contraturantes a adição exógena de acetilcolina e cloreto de potássio não foram significativamente diferentes do controle. Os tempos necessários para se obter bloqueio neuromuscular de 50 e 90% foram de 66 ± 10 para 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 44 ± 3 para 0,5 $\mu\text{g/mL}$, para 1 $\mu\text{g/mL}$ foi de 38 ± 4 , 54 ± 5 para 5 $\mu\text{g/mL}$ o tempo foi de 24 ± 1 , 34 ± 1 , para 10 $\mu\text{g/mL}$ foi de 22 ± 2 , 35 ± 2 e para 20 $\mu\text{g/mL}$ foi de 24 ± 5 , 33 ± 6 respectivamente. Fig. 9.

Alterações morfológicas foram observadas nas fibras musculares. Entretanto, a concentração da fração BTII2, 1 $\mu\text{g/mL}$, foi mais potente para induzir a hipercontração e desorganização fibrilar que o veneno bruto (100 $\mu\text{g/ml}$). Isto se deve provavelmente ao fato de que a fração está totalmente desprovida de algumas impurezas (elementos) que pudessem eventualmente inibir este efeito no veneno total.

Estes resultados sugerem que a fração BT II 2 do veneno de *B. alternatus* tem um importante fator neurotóxico e uma ação predominantemente pré-sináptica.

ABSTRACT

7. ABSTRACT

Crude venom from *Bothrops alternatus* (10 mg) was fractionated by reverse-phase HPLC by a C-18 μ -bondapack column resulting in an active peak called BT II 2. In SDS-PAGE, the toxin migrates as a single band with a 14 kDa. In the chick biventer cervicis preparation, BT II 2 (0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 and 20.0 μ g/mL, n=7) induced a concentration-dependent and irreversible twitch-tension blockade without causing any effect on the muscle responses to ACh and KCl. The time (in min) required for producing 50% neuromuscular blockade was 65 ± 0.9 ; 41 ± 0.4 ; 35 ± 0.6 ; 24 ± 0.3 ; 22 ± 0.4 and 20 ± 0.8 respectively after a 120 min incubation.

Morphological alterations was seen in muscle fibers. However, BT II 2 (1 μ g/ml) was more potent in inducing hyprecontraction and myofibril desorganization than was the crude venom (100 μ g/ml) in the same experimental conditions.

Taking together, these results suggest that BT II 2 is a neurotoxic factor of the venom of *B. alternatus* with a preponderant presynaptic action.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1- Características gerais dos venenos ofídicos



Figura 1 - Indivíduo adulto de Butiá, RS. Fotografado em cativeiro. Copyright by Ivan Sazima.

O estudo das peçonhas teve como precursor em nosso país JOÃO BATISTA DE LACERDA que, no século XIX, realizou no Museu Nacional pesquisas pioneiras de reconhecida importância sobre a farmacologia do veneno de serpentes brasileiras. Entretanto, deve-se a BRAZIL o grande desenvolvimento que alcançaram no Brasil as investigações sobre as peçonhas em geral, envolvendo o estudo de animais peçonhentos, a profilaxia e tratamento dos acidentes causados por serpentes, escorpiões e aranhas (VITAL-

BRAZIL, 1982).

Segundo BARRAVIEIRA (1993), animal peçonhento é aquele que produz toxina(s) que, de alguma forma, prejudica (m) a saúde da vítima. Para VITAL BRAZIL (in : BARRAVIEIRA, 1993), são considerados peçonhentos os animais capazes de injetar veneno através de presas inoculadoras, com o objetivo de capturar alimento ou de auto defesa. A função da peçonha está intimamente relacionada com a sobrevivência e evolução da espécie (VITAL- BRAZIL, 1982).

O veneno secretado pelas serpentes, é representado por uma mistura de substâncias de natureza química simples e, principalmente, complexas, pois 90 a 95% de seu peso seco é constituído de proteínas além de componentes orgânicos não protéicos, representados por aminoácidos livres e pequenos peptídeos, carboidratos, lipídios, amins biogênicas, e fundamentalmente enzimas, tais como: fosfolipases, fosfodiesterases, exonuclease fosfomonoesterases, além de reduzida quantidade de elementos inorgânicos, representados pelo zinco, cálcio, magnésio, potássio, sódio, sulfatos, cloretos e fosfatos (VITAL- BRAZIL, 1982; BARRAVIEIRA, 1993).

Foram descritas no Brasil, aproximadamente duzentos e cinquenta espécies de serpentes distribuídas em nove famílias, das quais somente duas englobam os quatro gêneros peçonhentos:

- (a) família **Elapidae**, da qual ocorre no país somente o gênero *Micrurus*, cujas serpentes são conhecidas como **corais**;
- (b) família **Viperidae**, subfamília **Crotalinae**, que inclui os gêneros peçonhentos: (1)

Bothrops envolvendo, as **jararacas**, (2) *Crotalus*, representadas pelas **cascavéis**, e (3) *Lachesis*, as **surucucus** (Ministério da Saúde, 2001).

1.2 Venenos botrópicos

As serpentes do gênero *Bothrops* vivem, geralmente , em locais úmidos, podendo ser encontradas também em zonas rurais e na periferia de grandes cidades, possuem hábitos noturnos e certa agressividade, elas são conhecidas vulgarmente por denominações populares, tais como: **jararaca, jararacussu, urutu, cotiara, jararaca-do-rabo-branco, boca de sapo** e outros (VITAL-BRAZIL, 1982), como caíçara, cotiara, cruzeira.

Em recente levantamento realizado pelo Ministério da Saúde (2001), dentre os casos em que o gênero da serpente foi informado, as serpentes do gênero *Bothrops* foram responsáveis por 90,5% dos casos dos acidentes ofídicos.

Os efeitos fundamentais que caracterizam os envenenamentos botrópicos, são: as alterações induzidas no sistema de coagulação sangüínea, o efeito proteolítico ou necrosante e os efeitos sobre os vasos.

Efeito coagulante: As proteínas e os peptídeos biologicamente ativos dos venenos botrópicos interagem com os componentes do sistema hemostático humano, afetando a

coagulação sangüínea, as células endoteliais e as plaquetas (MARKLAND, 1998). A formação de trombos é quase instantânea na proximidade da área de inoculação, chegando até a bloquear a difusão do veneno por via sangüínea embora exista a difusão linfática e a formação de microtrombos de fibrina, especialmente em capilares pulmonares. O consumo de fibrinogênio pode produzir coagulação intravascular disseminada com o aparecimento de hemorragias difusas.

Efeito proteolítico ou necrosante: Decorre da ação citotóxica direta nos tecidos, por frações proteolíticas do veneno. Este efeito está relacionado com a quantidade de veneno inoculado, podendo haver liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares. Os efeitos proteolíticos, proporcionam a formação e/ou liberação de aminas e peptídeos vasoativos, tais como bradicinina, histamina e serotonina, que causam lesão nos vasos capilares, fenômeno que se traduz através do aparecimento, hematúria, epistaxis e hemorragias viscerais.

Ação vascular: Esta ação, quando sistêmica, é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Estas, agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e conseqüentemente, causando sua posterior ruptura. A ação das hemorraginas, explica os casos de hemorragias sistêmicas, às vezes fatais, principalmente as que ocorrem no cérebro, afetando o funcionamento do sistema nervoso central, ou em outros locais, com o aparecimento de púrpura, sangramento extrateciduals (gengivorragia), insuficiência renal (glomerulonefrite aguda), septicemia (oriunda da região da picada) e choque podem levar ao óbito (RIBEIRO & JORGE, 1990).

Além dos assinalados, mais recentemente foram descritos principalmente pelo nosso grupo efeitos neurotóxicos induzidos pelos venenos botrópicos, cujos estudos iniciaram-se na década de oitenta do século recém findo, envolvendo algumas espécies do gênero *Bothrops*. Dentre estas, destaca-se a *B. jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983; QUEIROZ *et al.*, 1985), cujos estudos pioneiros em termos de neurotoxicidade, revelaram valiosas informações a respeito do bloqueio neuromuscular, em preparação nervo-músculo de rã, através de estudos miográficos e eletrofisiológicos. Posteriormente, foi processada a purificação do veneno bruto, obtendo-se a fração responsável pelos efeitos induzidos na junção neuromuscular esquelética. Esta fração, denominada Bothropstoxina (**BthTX**), foi purificada usando-se dois processos cromatográficos, com a obtenção, na primeira etapa, da **fração III** e, no segundo processo, a **fração S_{III}-SP_{IV}** sendo esta última caracterizada e seqüenciada por CINTRA *et al.*, (1993) como uma fosfolipase A₂ Lys490(HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988).

Após estes trabalhos pioneiros, seguiram-se trabalhos análogos envolvendo outras espécies, tais como, a *B. atrox*, *B. insularis*, *B. moojeni* e *B. jararacussu* (ROSENFELD, 1971, FURTADO *et al.*, 1991; De ROODT *et al.*, 1998).

1.3 *Bothrops alternatus*

Esta serpente é encontrada no centro, norte e nordeste da Argentina, sul do Paraguai e nas regiões sul, sudeste e parte do centro oeste do Brasil (CAMPBELL *et al.*, 1989), sendo o

seu hábitat próprio o das regiões úmidas de florestas tropicais, subtropicais e temperadas. Seu tamanho médio é em torno de 1 metro de comprimento, podendo chegar perto de dois metros.

Pela elevada quantidade de veneno secretado por esta serpente, pode-se explicar, em parte pelo menos, a gravidade do envenenamento causado pelo mesmo. O rendimento máximo de peçonha, está acima de 200 mg (peso seco) por espécime em relação a *B. atrox*, *B. insularis*, *B. moojeni*, e *B. jararacussu* (ROSENFELD 1971; FURTADO, *et al.*, 1991; De ROODT *et al.*, 1998).

Por outro lado, embora a *B. alternatus* seja uma espécie agressiva e perigosa, seu veneno foi pouco estudado quando comparado às peçonhas de outras espécies botrópicas, principalmente em relação a *B. jararaca*, amplamente estudada pela importância clínica que tem em termos de incidência de acidentes ofídicos.

De fato, os efeitos locais, observados no envenenamento de *B. alternatus*, segundo os casos clínicos, assim como os trabalhos experimentais reportados (BAUAB *et al.*, 1994) referem-se, fundamentalmente, ao aparecimento de **edema** (MARUNAK *et al.*, 1999), **hemorragia** (MARUNAK *et al.*, 1999; De ROODT *et al.*, 2000) e **necrose** (QUEIROZ *et al.*, 1984; MARUNAK *et al.*, 1999).

A resposta inflamatória, poderia estar sendo mediada pela presença de metaloproteinases (GUTIERREZ *et al.*, 2000), como consequência da liberação do ácido araquidônico convertido em outros mediadores do processo inflamatório, tais como leucotrienos via lipoxigenase ou pela liberação de mediadores endógenos, como a

histamina e citocinas, tal como a TNF α (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1995; PETRICEVICH *et al.*, 2000).

A peçonha de *B. alternatus* também causa distúrbios na cascata de coagulação sangüínea em humanos (BAUAB *et al.*, 1994) e em animais como o cão.

Segundo dados clínicos, cerca de 97% dos acidentes causados por *Bothrops alternatus* apresentam alterações nos tempos de coagulação (BAUAB *et al.*, 1994).

A peçonha apresenta uma atividade pró-agregante, precedida por uma baixa atividade anti-agregante (FRANCISCHETTI *et al.*, 1998), a qual é mediada por um inibidor de trombina. O estado de incoagulabilidade pode agravar o quadro de hemorragia interna causado pela presença de proteases na peçonha. No entanto, pouco tem sido assinalado sobre a presença de algumas metaloproteases no veneno de *B. alternatus*, permanecendo ainda obscuro o desencadeamento da hemorragia sistêmica quando comparada com a causada pelas hemorraginas, como a **jararagina** de *B. jararaca* (KAMIGUTI *et al.*, 1996); essa hemorragia interna pode resultar em hipovolemia e choque circulatório, o qual, em conjunto com a Insuficiência Renal Aguda (IRA), provocada pela peçonha, pode evoluir para o êxito letal (ROSENFELD, 1971; FAN *et al.*, 1998).

1.4 Fosfolipase A₂ (PLA₂)

Os venenos ofídicos são constituídos por diversas substâncias cuja função é **imobilizar, matar e digerir a presa**. Alguns desses constituintes apresenta atividade PLA₂ isto é a

capacidade de hidrolizar glicerofosfolipídios. (KINI, 1997).

As PLA₂ extracelulares possuem baixo peso molecular (13000- 15000), ocorrem abundantemente na natureza e requerem Ca⁺² para manifestar sua atividade enzimática. O suco pancreático dos mamíferos e os venenos de serpentes estão entre as fontes mais ricas em PLA₂ extracelulares, que por sua vez podem produzir vários efeitos farmacológicos, tais como: neurotoxicidade pré e/ou pós sináptica, miotoxicidade local e sistêmica, cardiotoxicidade, efeito anticoagulante, efeito inibidor ou iniciador de agregação plaquetária, atividade hemolítica, hemorragia interna, atividade anti-hemorrágica, atividade convulsivante, atividade hipotensora, atividade edematogênica, lesão de órgãos e tecidos.

VITAL-BRAZIL (1982), afirma que peçonha neurotóxica é aquela que produz efeitos aparentemente decorrentes de ações sobre o sistema nervoso. Aparentemente porque alguns efeitos (paralisia , perturbações visuais) podem decorrer da ação da peçonha nos receptores colinérgicos nas placas terminais .

De acordo com seu modo de ação, as neurotoxinas podem ser divididas em dois grupos: **(a)** as que agem em nível pós-sináptico por prevenir a ligação da acetilcolina com seu receptor, há tempos conhecidas por **α -neurotoxinas** (CHANGEUX *et al.*, 1970); **(b)** as que atuam a nível pré-sináptico, interferindo na liberação do neurotransmissor, como vimos anteriormente, denominadas **β -neurotoxinas**. Dentre estas últimas, dois subtipos de neurotoxinas foram reconhecidas: (1) as facilitadoras da neurotransmissão, que são destituídas de atividade enzimática e que bloqueiam o canal de K⁺ voltagem-dependente as **dendrotoxinas** (HARVEY *et al.*, 1984) ou inibem a acetilcolinesterase as **fasciculinas**,

(KARLSSON *et al.*, 1984), e (2) as β -neurotoxinas propriamente ditas, que se caracterizam por sua atividade enzimática tipo **PLA₂**.

As α -neurotoxinas ligam-se especificamente aos receptores nicotínicos da placa motora, impedindo, portanto que a acetilcolina medie a neurotransmissão do impulso nervoso ao nível da junção neuromuscular. Todas elas são estruturalmente homólogas, pois têm em comum um número invariável de aminoácidos em sua seqüência que são importantes para a conservação e conformação molecular. A presença e a localização constante de pontes dissulfeto contribuem consideravelmente para a estabilidade da molécula; a potência letal da toxina é reduzida quando ocorre a ruptura dessas pontes (MEBS, 1989). Comumente encontradas em proteínas extracelulares, as pontes dissulfeto são ligações covalentes formadas entre dois resíduos de cisteína, através de uma reação de oxidação, que estabilizam os dobramentos de uma cadeia polipeptídica.

Do veneno da serpente *Bungarus multinctus* (CHANG & LEE, 1963), foram isoladas neurotoxinas com atividade específica em sítio pré-sináptico, tais como a **β -bungarotoxina**, e em sítio pós-sináptico, a **α -bungarotoxina**. A denominação β -bungarotoxina deu origem ao nome que identifica a classe de neurotoxinas pré-sinápticas, isto é as β -neurotoxinas (KRIZAJ *et al.*, 2000; ANDERLUH *et al.*, 1997), que são caracterizadas por sua atividade PLA₂. A estrutura quaternária destas últimas é heterogênea, pois algumas consistem em um único polipeptídio (**β -neurotoxinas monoméricas**), enquanto outras consistem em várias subunidades, nas quais, pelo menos uma delas é responsável pela atividade PLA₂ da toxina (**β -neurotoxinas multiméricas**).

Posteriormente, várias isotoxinas foram purificadas a partir do mesmo veneno (ABE *et al.*, 1977; KONDO *et al.*, 1982a; 1982b) e de outras espécies do gênero *Bungarus*. As β -bungarotoxinas são formadas pela associação covalente de dois diferentes polipeptídios através de uma ponte dissulfeto. O polipeptídio A é homólogo à classe I de PLA₂ (KONDO *et al.*, 1982b), enquanto que o polipeptídio B é homólogo aos inibidores de proteases, tais como os de pâncreas de mamíferos (KONDO *et al.*, 1982a).

Algumas β -neurotoxinas, tais como a notexina e a crotoxina, exibem também considerável miotoxicidade, apesar de seu efeito neurotóxico pré-sináptico ser predominante em termos de potência letal.

Miotoxinas são componentes de venenos que atuam especificamente sobre o músculo esquelético, preservando outras estruturas, como os tecidos conjuntivo e o nervoso (MEBS & OWNBY, 1990).

Embora todas as miotoxinas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* possuam estrutura química de PLA₂, algumas delas não apresentam atividade catalítica devido a substituições de aminoácidos no local de ligação do Ca²⁺, especialmente a da Asp-49 pela Lys-49 (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995).

O termo miotoxicidade local pode ser aplicado a toxinas que produzem degeneração do músculo no local da injeção ou após a incubação com preparações neuromusculares isoladas (GOPALAKRISHNAKONE, 1997).

Várias PLA₂ miotóxicas foram isoladas de venenos botrópicos, revelando-se todas básicas. Entretanto, os venenos botrópicos podem também conter PLA₂ ácidas (VIDAL *et*

al., 1971; ALAGON *et al.*, 1980; NISENBOM *et al.*, 1986a, 1986b; NISENBOM *et al.*, 1988;; VALIENTE *et al.*, 1992; MACHADO *et al.*, 1993; DANIELE *et al.*, 1995).

Até agora não se têm conhecimento de estudos a respeito de fator(es) neurotóxico(s) na peçonha de *B. alternatus*, provavelmente por não levar em consideração os sintomas característicos de cada um dos envenenamento causados por serpentes botrópicas, crotálicas ou elapídicas.

Nossos estudos iniciais, ao revelarem a presença de fator neurotóxico, altamente potente e capaz de causar a diminuição progressiva da resposta contrátil, a estímulos elétricos de baixa frequência, de preparações isoladas de músculo esquelético, induziu-nos ao presente estudo que envolveu o **isolamento, purificação e caracterização bioquímica e farmacológica** desse fator, o qual, analogamente ao sugerido com a maioria dos demais venenos botrópicos estudados, aventou-se a possibilidade de tratar-se de uma **PLA₂** com efeito neurotóxico.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

► Estudar os efeitos farmacológicos do veneno da *Bothrops alternatus* bem como avaliar o papel de uma de suas frações, a BT II 2, que apresenta atividade PLA₂.

2.2. Objetivos específicos

1. Isolar e purificar uma neurotoxina do veneno total de *Bothrops alternatus* através de cromatografia em HPLC.

2. Caracterizar bioquimicamente o veneno total, e a fração de BT II 2, através de eletroforese e determinação da atividade PLA₂.

3. Estudar os efeitos da fração BT II 2, sobre preparações neuromusculares esqueléticas isoladas, através do registro miográfico, em músculo *biventer cervicis* de pintainho.

4. Estudar os efeitos da fração BT II 2, sobre preparações neuromusculares esqueléticas isoladas, através do registro miográfico, em músculo nervo *frênico diafragma* de camundongo.

5. Estudar as alterações histológicas provocadas pela fração PLA₂ nas suas diversas concentrações bem como as induzidas pelo veneno total.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Veneno

O lote de veneno de *Bothrops alternatus* utilizado neste trabalho foi resultante de um ‘pool’ de venenos de serpentes da mesma espécie, procedentes de São Paulo-SP, e foi gentilmente fornecido pelo Instituto Butantan.

3.2. Animais

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4 a 8 dias), fornecidos pela Granja Ito S/A, e camundongos machos da linhagem SWISS, com peso entre 18 e 30 g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 sem luz).

3.3. Ensaio bioquímicos

3.3.1. HPLC de exclusão molecular

O veneno total foi adicionado em uma coluna (Protein Pack 300SW – 0,78 cm x 30 cm) sob um fluxo constante de 0,3 ml/min. As amostras foram eluídas usando como tampão bicarbonato de amônio, pH 7,9, 0,25 M, e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. As frações foram liofilizadas e armazenadas à -20°C.

As frações parcialmente purificadas por HPLC de exclusão molecular foram dissolvidas em 0,1 ml de ácido trifluoroacético (TFA 0,1%, v/v). A solução resultante foi

clarificada por centrifugação a 10.000 rpm por 1 min e o sobrenadante aplicado a uma coluna C-18 μ -Bondapak (0,78 x 30 cm) (Waters 991-PDA system). A coluna foi equilibrada em solução de TFA 0,1% em água obtida por sistema Milli Q. A coluna foi eluída com um gradiente linear de acetonitrila 66% (0-100%, v/v) a um fluxo de 2,0 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações coletadas foram liofilizadas e estocadas a -20°C.

3.3.2. Determinação de atividade PLA₂

A atividade PLA₂ foi medida através do método descrito por HOLZER & MACKESSY (1996) e modificado por PONCE-SOTO et al., 2002. A mistura padrão continha 200 μ l de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), 20 μ l de substrato, 20 μ l de água deionizada e 20 μ l de amostra, em um volume final de 260 μ l. Após a adição da amostra (20 μ g), à 37°C, a atividade enzimática foi calculada pelo aumento da absorbância após 20 min a 425 nm e expressa em nmol/min/mg.

3.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina

O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo com a metodologia descrita por SCHAGGER & VON JAGOW (1987), a partir de uma solução estoque de acrilamida-bisacrilamida e tampão para gel (Gel Buffer). O gel de corrida compõe-se de 4,0 g de glicerol 89%, em 10 ml de tampão para gel (Tris-HCl 3M, SDS 0,3%, pH 8,43), PSA 0,025% (100 mg/ml), 6,1 ml de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida e Temed 0,05%, em volume final de 30 ml para cada gel. O gel de separação (“spacer gel”) foi preparado com tampão gel 10 ml, solução estoque de acrilamida 10 ml para um volume final de 30 ml com água Milli Q. Os géis foram adicionados simultaneamente entre duas placas de vidro (sistema duplo de placas SE 250 Might Small – Hoefer Scientific

Instruments, San Francisco, USA). O gel superior foi confeccionado usando 1,0 ml de solução estoque de acrilamida em 3,1 ml de gel buffer, 100 µl de PSA (100 mg/ml) e 0,1% de Temed, em um volume final de 12,5 ml.

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra comercial (“sample buffer, Laemmli” – Sigma). Para as amostras reduzidas, foi empregado DTT no mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram aplicadas no volume máximo de 15 µl. A corrida eletroforética foi desenvolvida em temperatura ambiente, tampão cátodo Tris-HCl 0,1 M, SDS 0,1%, pH 8,25, e tampão para ânodo Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9, com duração aproximada de 7 horas sob uma corrente de 25 mA. Após a corrida, o gel foi retirado das placas e colocado em uma solução contendo Coomassie blue R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v), para coloração das bandas de proteínas. A descoloração do gel, para remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, foi efetuada por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v).

3.4. Ensaio biológicos

3.4.1. Preparação *biventer cervicis* de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método preconizado por GINSBORG & WARRINER (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88;

KH_2PO_4 1,17; MgSO_4 1,17; NaHCO_3 25,0 e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11,65. A solução foi arejada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O_2 e 5% CO_2) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1.0 g/cm e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo).

Foram aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximas e as contraturas em resposta à adição de KCl (20mM) e acetilcolina (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. Os registros das contraturas para o potássio e para a acetilcolina foram obtidos na ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno ou fração) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ ou fração nas concentrações de 0,1;0,5;1,0;5,0;10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ ou após o bloqueio neuromuscular total da preparação).



Nervo – Músculo *Biventer Cervicis* de pintainho

3.4.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946). Os animais foram sacrificados por meio de secção e sangria dos vasos do pescoço, depois de serem anestesiados com cloral hidratado. Após a retirada do diafragma, juntamente com o nervo frênico correspondente, o mesmo foi fixado em cuba contendo 5 ml da solução nutritiva Tyrode, com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9; C₆H₁₂O₆ 11,1. A solução foi aerada constantemente com carbogênio e mantida a 37°C. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 2 g/cm. A preparação foi exposta a estimulação (estimulador Grass S48) indireta, com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, ou direta, com pulsos de 50 V, 2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. As contrações musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM.

3.4.3- Técnica histológica (microscopia óptica)

Para se avaliar a miotoxicidade de uma substância tem-se utilizado exame histológico do tecido muscular.

As preparações *Biventer Cervicis* de pintainho foram incubadas com solução nutritiva krebs (controle) seguido de adição de BTII-₂ (0,1;0,5;1,0;5,0;10 e 20µg/ml) ou do veneno total (50 e 100µg/ml),foram fixadas com solução de Bouin, após o término do experimento (120min) e processada para posterior análise histológica.após fixação, os músculos foram desidratados e incluídos em historesina Leika (NuBloch/ Heidelberg,

Alemanha); em seguida foram confeccionados os blocos. Estes foram cortados em micrótomo Leika RM 2035 e as secções (2 μ m de espessura) foram montadas em lâminas e coradas com uma mistura de azul de toluidina 0,5% (Vetec, São Paulo) e Bórax 5% (Quimesp, São Paulo). O dano morfológico foi considerado pela análise das células lesadas que apresentavam considerações como: regiões da fibra muscular lesada na sua extensão, mionecrose caracterizadas por vacúolos, aglutinação condensada de miofibrilas, fibras sem estriações e intumescidas e perda de material nuclear; as células normais apresentavam-se íntegras, sem nenhum comprometimento no mecanismo contrátil, pelo parâmetro miográfico, fibras com estriações, perfil poligonal das células e núcleo periférico. Este procedimento foi usado em todos experimentos-controle e preparações tratadas com as respectivas concentrações do veneno total e da fração estudadas.

3.5. Análise estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos \pm erro padrão. A significância foi obtida através do teste não-pareado *t*-Student, estabelecendo-se o nível de significância em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Purificação da fração neurotóxica Bt II a partir do veneno total de *Bothrops alternatus*, em coluna de exclusão molecular Superdex G-75 (Waters) em LC.

Trinta e cinco mg do veneno foram aplicados a uma coluna de exclusão molecular Superdex G-75 acoplado a um sistema LC (“Waters”), monitorado a 280 nm, a um fluxo constante de 0,3 mL/min. Nesta condições, foram registrados três frações denominadas de Bt I, Bt II e Bt III. A fração com atividade neurotóxica, corresponde ao pico Bt II (Figura 2).

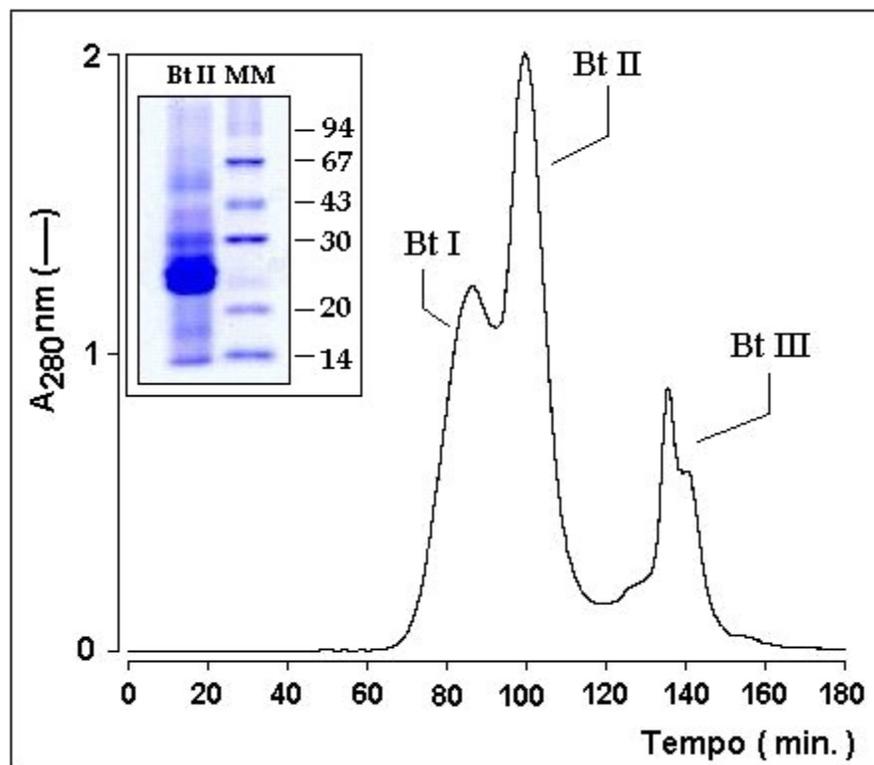


Figura 2 - Cromatografia de exclusão molecular em LC, utilizando uma coluna Superdex G-75 (100 X 0.60cm) (Waters) do veneno total de *Bothrops alternatus*. A corrida foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,2M pH 7.9), fluxo constante 0,3 mL/min. Monitorado a uma absorbância de 280 nm. As frações eluídas foram Bt I, Bt II e Bt III.

4.2 Purificação da fração neurotóxica Bt II-2 a partir do veneno total de *Bothrops alternatus*, em coluna μ -Bondapack C18 (0.78 X 30 cm) (Waters) em HPLC de fase reversa.

A figura 3 mostra o perfil cromatográfico da fração Bt II, em uma coluna μ -Bondapck C18 (0.78 X 30cm) preparativa (Waters) acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa, A fração Bt II, previamente obtida em exclusão molecular, mostra a presença de quatro frações Bt II-1, Bt II-2, Bt II-3 e Bt II-4, sendo a fração Bt II-2 a responsável do efeito neurotóxico, A fração mostra um alto grau de pureza e homogeneidade molecular (figura inserida no perfil cromatográfico).

Posteriormente, a amostra foi submetida a mais uma etapa de re-purificação em HPLC de fase reversa para confirmar seu grau de pureza (Figura 4). O tempo de retenção foi de $16,36 \pm 0,31$ minutos. O perfil cromatográfico da amostras Bt II-2 mostrou a presença de um único pico de eluição. As análises em HPLC de fase reversa mostraram também que a fração BT II-2 apresenta um grau de homogeneidade molecular ao redor de 95% de pureza.

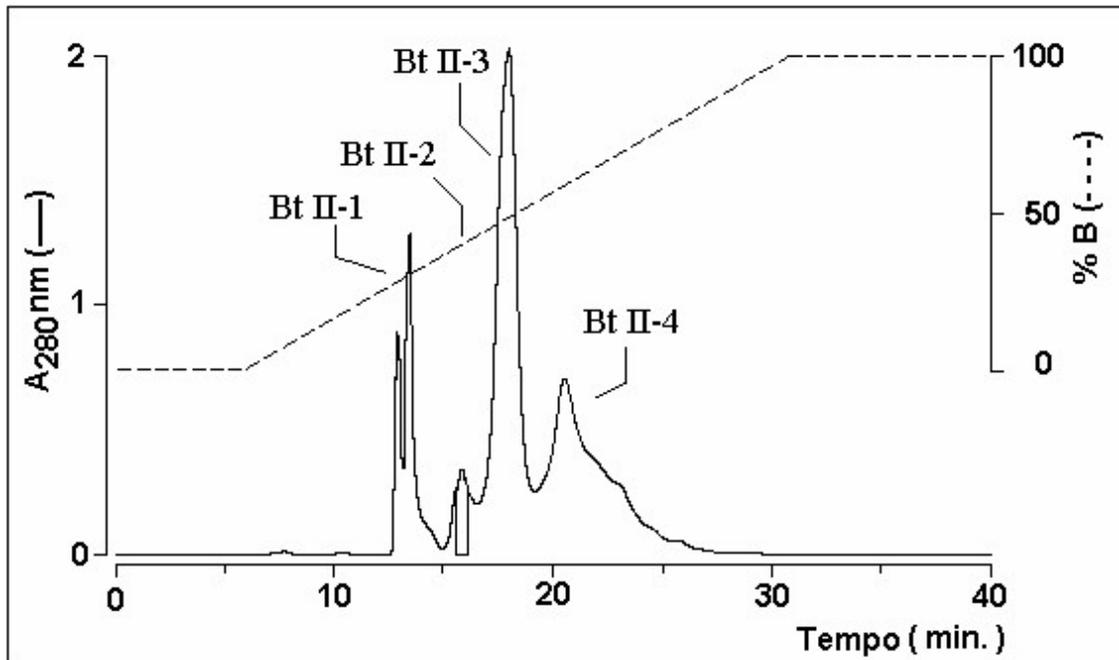


Figura 3 - Perfil cromatográfico da fração Bt II em HPLC de fase reversa usando uma coluna μ -Bondapck C18 (Waters). A eluição da amostra é realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo é mantido constante a 2mL/min. O monitoramento da corrida cromatográfica é realizado a 280 nm de absorvância. As frações obtidas foram Bt II-1, Bt II-2, Bt II-3 e Bt II-4.

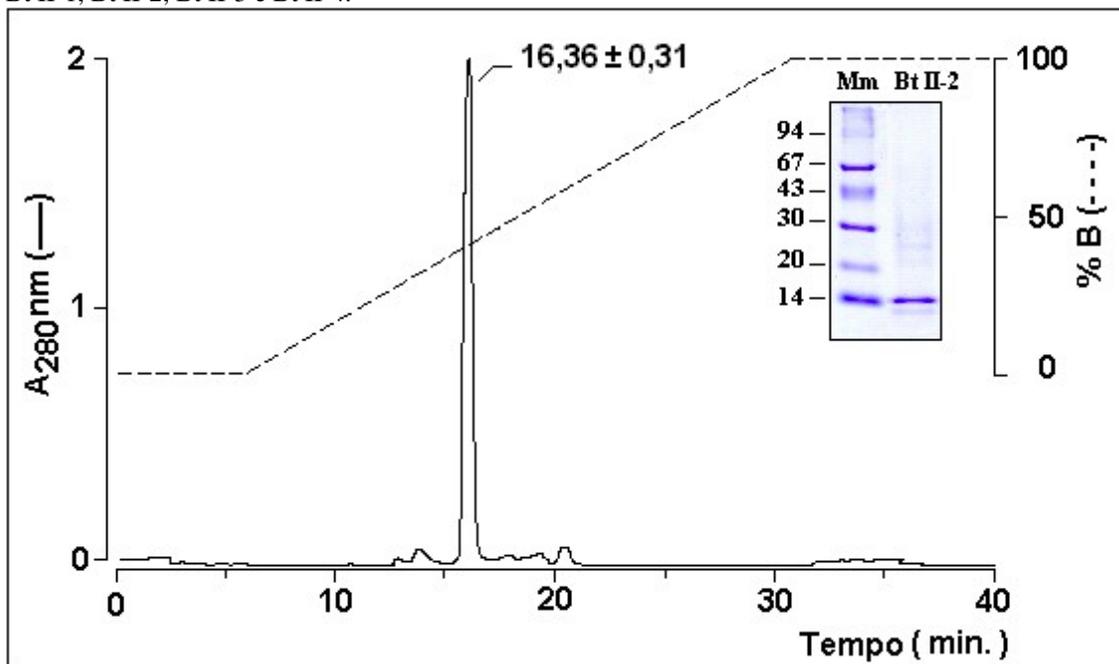


Figura 4 - Perfil cromatográfico de re-purificação da fração Bt II-2 em HPLC de fase reversa usando uma coluna μ -Bondapck C18 (Waters). A eluição da amostra é realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo é mantido constante a 2mL/min. O monitoramento da corrida cromatográfica é realizado a 280 nm de absorvância.

4.3 Análises de aminoácidos das frações neurotóxicas Bt II-2 de *Bothrops alternatus*.

Em relação a análises de composição de aminoácidos da fração neurotóxica PLA₂ Bt II-2 de *Bothrops alternatus* (Tabela 1).

A análise de composição global de aminoácidos, mostra que se trata de proteínas homólogas entre as PLA₂ básicas isoladas de veneno de serpentes. A presença de 14 cisteínas, sugere a presença provável de 7 pontes disulfeto.

<i>Aminoácido</i>	Bt II-2
Asx	10
Glx	6
Ser	5
Gly	9
His	7
Arg	6
Thr	7
Ala	5
Pro	5
Tyr	9
Val	5
Met	1
Cys	14
Ile	3
Leu	9
Phe	2
Lys	19
Trp	*ND
Total	122

Tabela 1 Composição de aminoácidos da neurotoxina PLA₂ Bt II-2 de *Bothrops alternatus* * Não determinado

4.4 Sequência da região N-terminal da PLA₂ Bt II-2 de *Bothrops alternatus* e estudo de homologia seqüencial.

A proteína Bt II-2, após seqüenciada até o resíduo 29 da região N-terminal, revela uma alta homologia seqüencial quando comparada com outras PLA₂ procedentes de veneno de serpentes. Como a Myotoxin II 96%, BthTX I 96%, PrTX II 96%, PrTX I 96%, MjTX I 93%, PLA₂ Bnp 89%, Pgo K49 83%, Myotoxin III 86% e PLA₂ Dac 82%. conforme o ilustrado na Figura 5.

	1	5	10	15	20	25	%																							
Bt II-2	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	A	K	S	Y	G	A	F	Y	G	C	
Myotoxin II	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	A	K	S	Y	G	A	-	Y	G	C	96
BthTX I	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	A	K	S	Y	G	A	-	Y	G	C	96
PrTX II	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	A	K	S	Y	G	A	-	Y	G	C	96
PrTX I	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	A	K	S	Y	G	A	-	Y	G	C	96
MjTX II	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	A	K	S	Y	G	V	-	Y	G	C	93
PLA ₂ Bnp		F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	A	K	S	Y	G	A	-	Y	G	C	89	
Pgo K49	S	V	Y	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	A	A	T	S	Y	G	-	F	Y	G	C	83
Myotoxin III	S	L	V	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	V	T	S	Y	G	A	-	Y	G	C	86
PLA ₂ Dac	S	L	F	E	L	G	K	M	I	W	Q	E	T	G	K	-	-	N	P	V	K	N	Y	G	-	L	Y	G	C	82

Figura 5 - Estudo comparativo de homologia seqüencial da região N-terminal da PLA₂ Bt II-2 com outras PLA₂ provenientes de veneno de serpentes. Myotoxin II de *Bothrops asper* K49 (Lomonte e Gutierrez, 1989), BthTX I de *Bothrops jararacussu* K49 (Homs-Brandeburgo, *et al.*, 1988; Cintra, *et al.*, 1993), PrTX II de *Bothrops pirajai* (Lee, *et al.*, 2001), PrTX I de *Bothrops pirajai* (Toyama, *et al.*, 1998), MjTX II Myotoxin II de *Bothrops moojeni* (Soares, *et al.*, 1998), PLA₂ Bnp de *Bothrops neuwiedi paulensis*, Pgo K49 de *Cerrophidion godmani* (Tsai, *et al.*, 2001), Myotoxin III de *Bothrops asper* (Kaiser, *et al.*, 1990), e PLA₂ Dac de *Deignakistrodon acutus* (Tsai, *et al.*, 2000).

4.5. Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

O veneno de *Bothrops alternatus* incubado com preparações neuromuscular isoladas, na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, determinou uma diminuição da resposta contrátil sob estimulação elétrica indireta em 120 min de incubação. Fig. 6 e 10 (A e B) Sem, no entanto, inibir totalmente a resposta contraturante a ACh e ao potássio. A ocorrência de contratura foi dependente da concentração. Fig. 10

O bloqueio neuromuscular mostrou-se dependente das concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (n=6-8) da fração PLA₂ (Bt II-2). A figura 11 (A; B; C e D), representam os diversos níveis de bloqueio neuromuscular obtidos com as diferentes concentrações estudadas. Porém, sem afetar a resposta contraturante a adição exógena de ACh e ao potássio para todos experimentos da fração Bt II-2. Fig. 7.

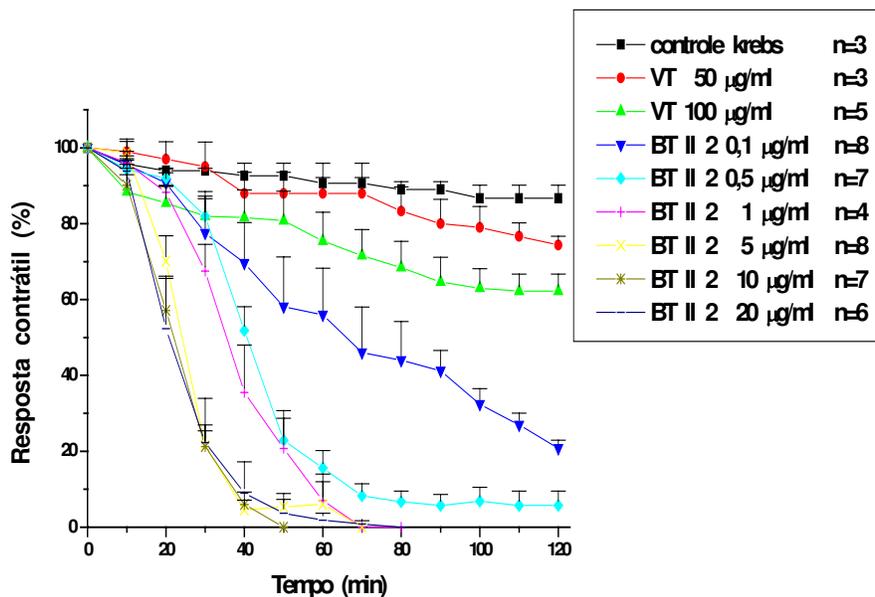


Figura 6 - Efeito do veneno *B. alternatus* e da fração Bt II-2 sobre a resposta contrátil em preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta. No gráfico estão indicados, o controle, veneno (50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as concentrações de Bt II-2 de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro padrão (n = 3 – 8).

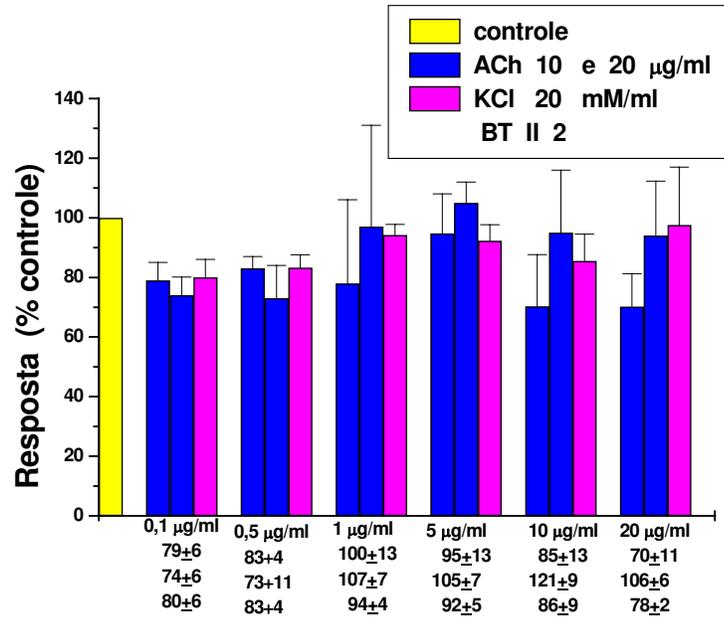


Figura 7. Efeito da fração BTII-₂ em diferentes concentrações sobre a ação contraturante da ACh e KCl

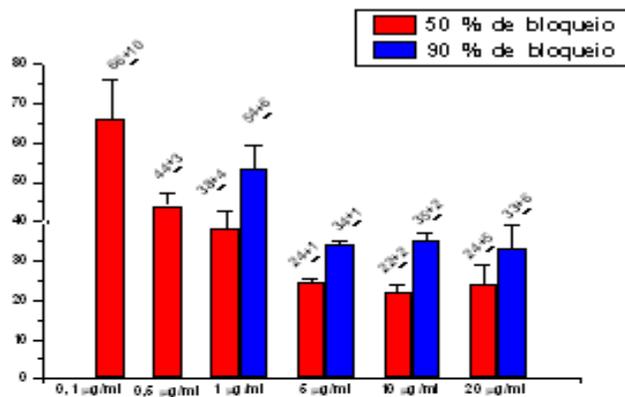


Figura 8 – Representação gráfica para 50 e 90% de bloqueio da resposta contrátil em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, incubado com a fração Bt II-2 nas concentrações de 01; 05; 1; 5; 10; 20 µg/ml.

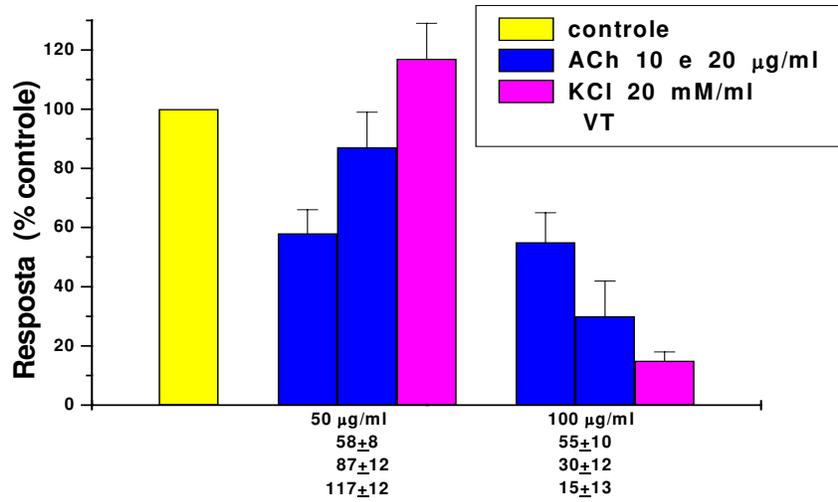


Figura 9. efeitos do veneto total (50 e 100µg/ml) sobre a ação contraturante da ACh e KCl

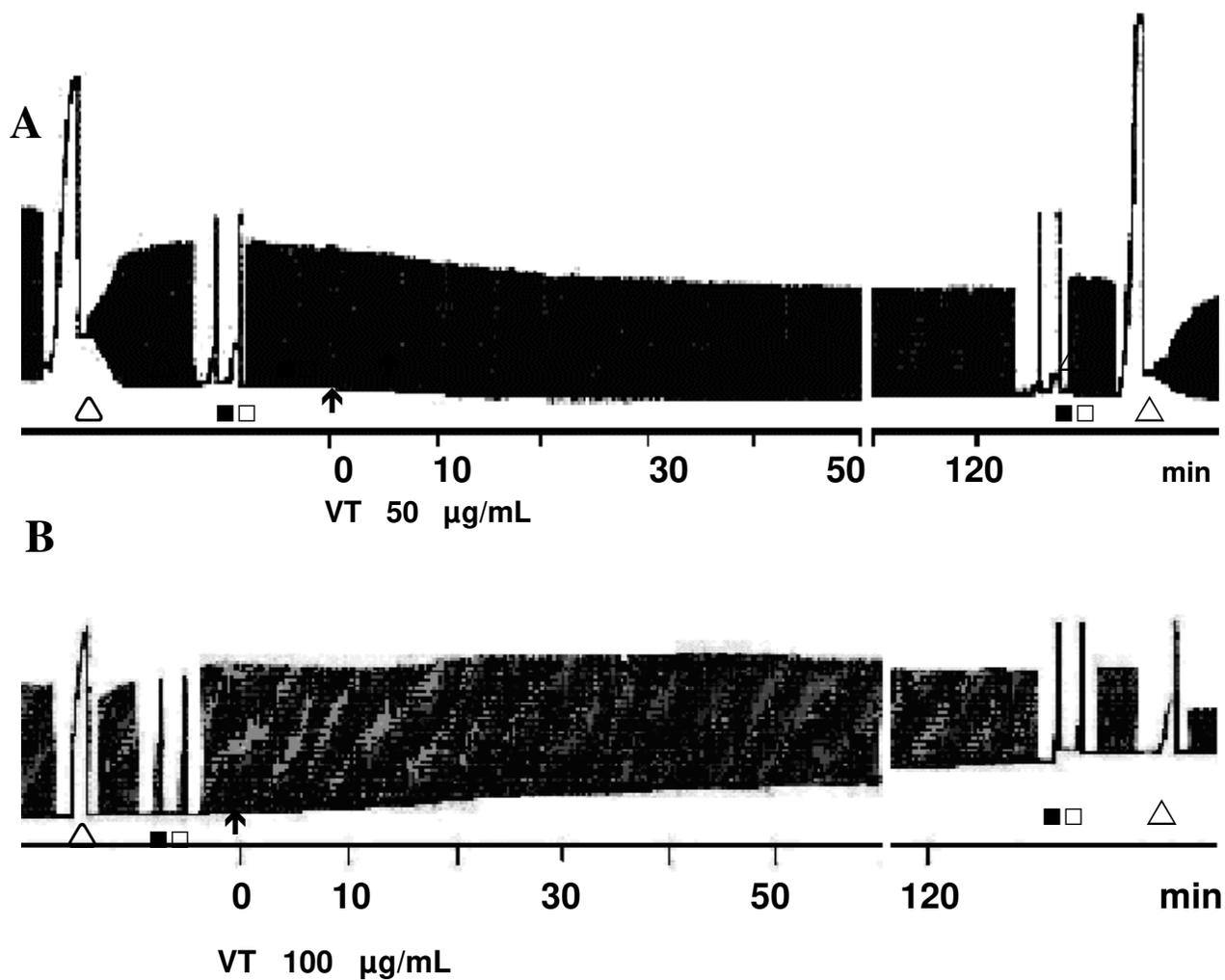
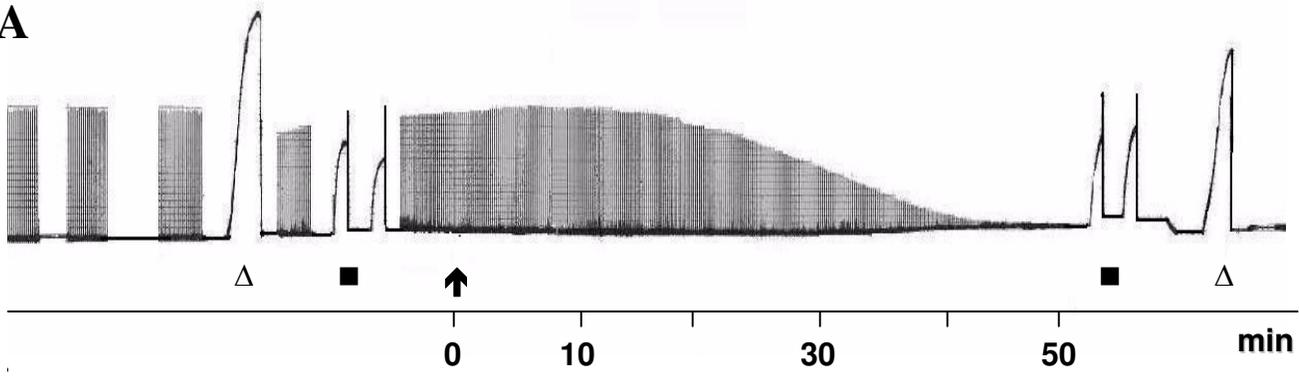


Figura 10. Efeito do veneno total *B. alternatus*, sobre perfil miográfico da preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação indireta. A seta indica adição do veneno no tempo zero. A e B, efeito do veneno nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A resposta contraturante da KCl (Δ) e ACh (\blacksquare \square) foi registrado no início e após a adição do veneno.

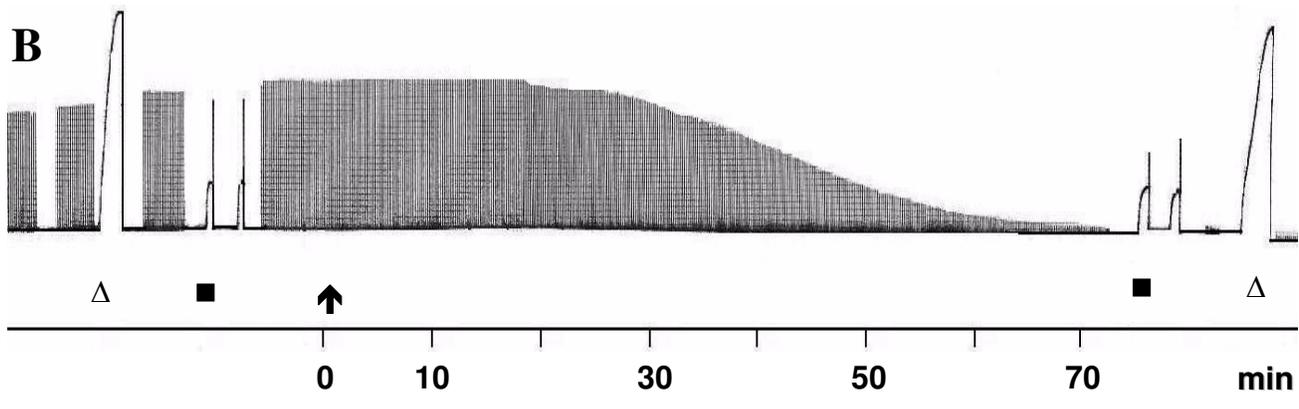
1 g

A



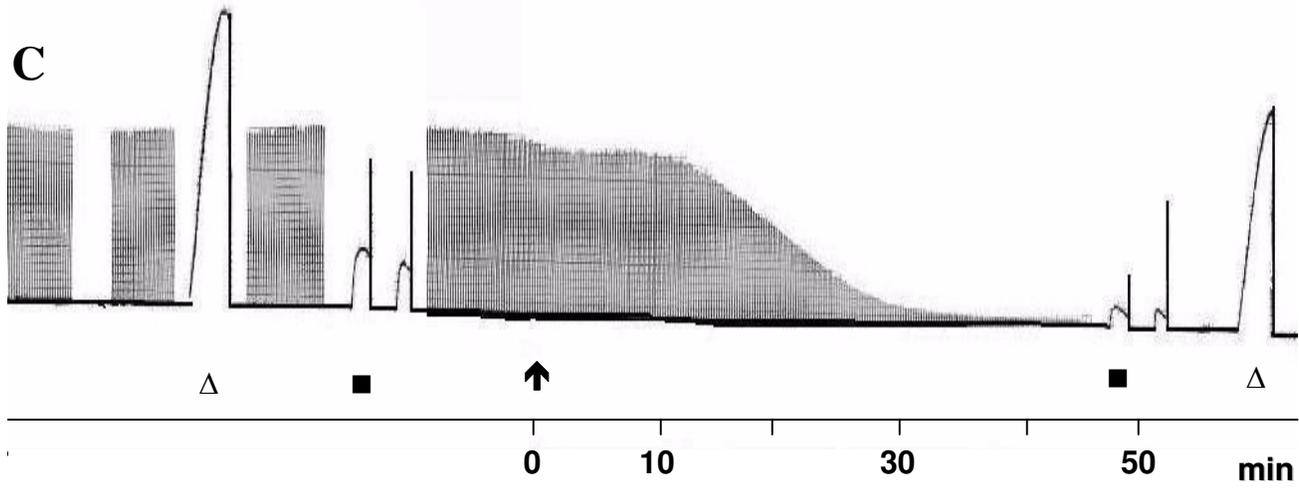
BT II-2 1 μ g/ml

B



BT II-2 5 μ g/ml

C



BT II-2 10 μ g/ml
70

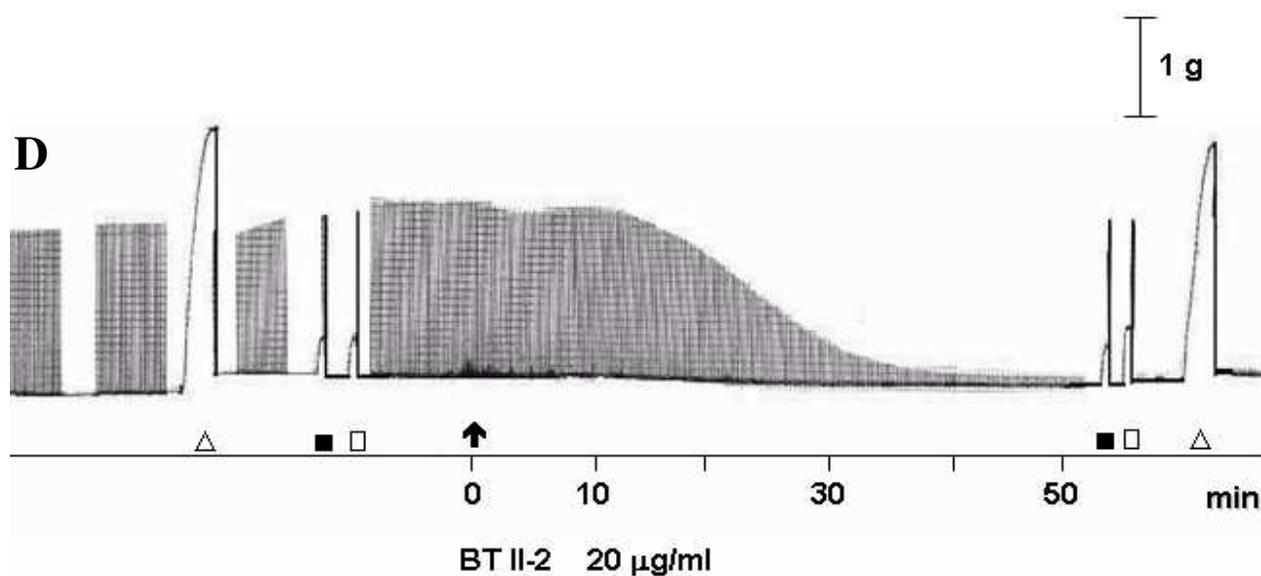


Figura 11. Efeito da fração Bt II-2, sobre perfil miografico da preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta . A seta indica adição do veneno no tempo zero. A; B; C e D, efeito da toxina nas concentrações indicadas. A resposta contraturante da KCl (Δ) e ACh (\blacksquare \square) foi registrado no inicio e após a adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica calibração utilizada nas preparações (1g)

4.6 Preparação nervo *frênico diafragma* de camundongo

4.6.1 Estimulação elétrica indireta e direta

A incubação da preparação nervo *frênico diafragma* de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, com a fração Bt II-2 nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, determinou um bloqueio irreversível da resposta contrátil. O bloqueio neuromuscular mostrou-se dependente da dose nestas concentrações. Fig. 12 e 13 (A e B).

O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% foi 46 ± 1 (1 $\mu\text{g/mL}$) e 40 ± 2 min (10 $\mu\text{g/mL}$) .

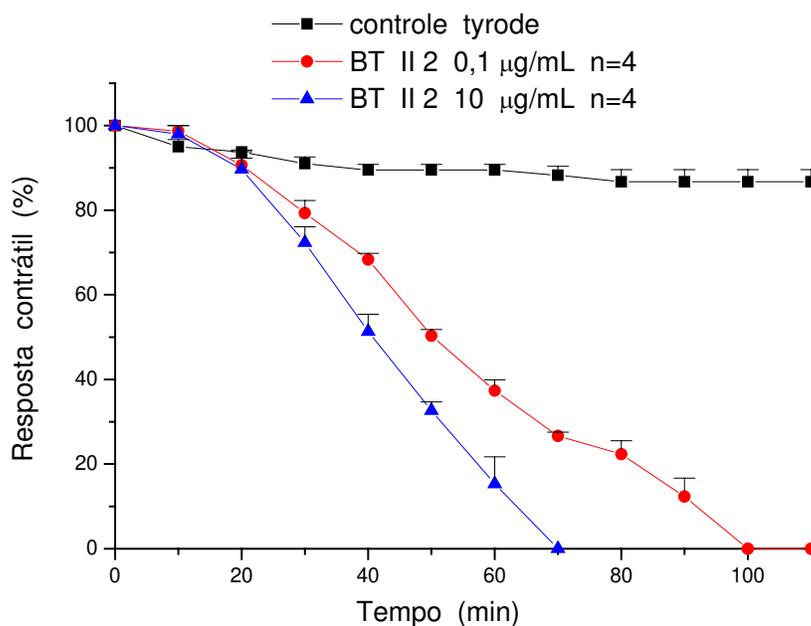
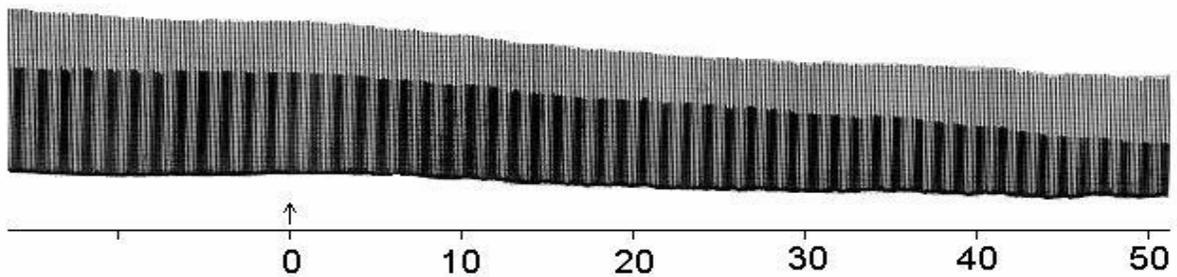


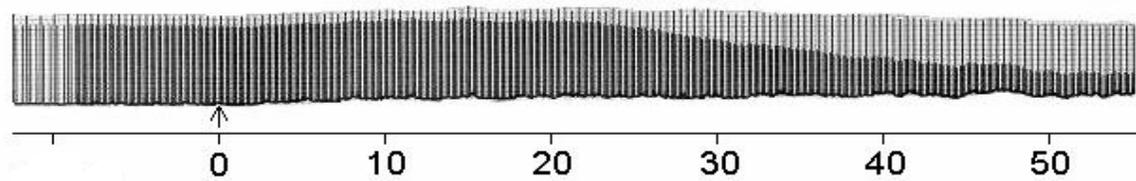
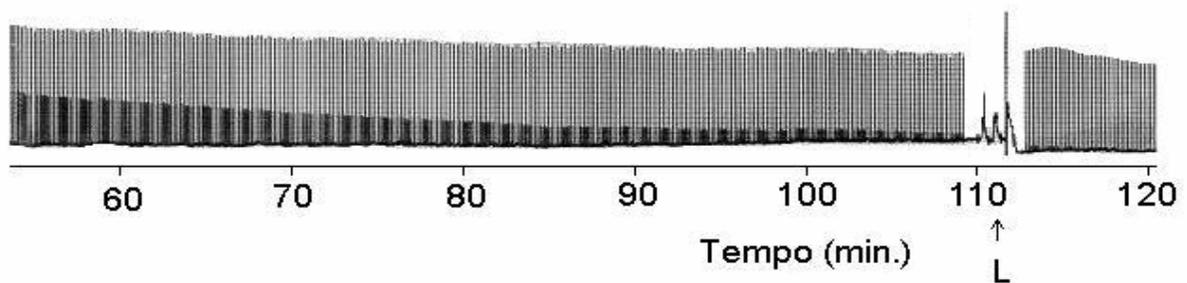
Figura. 12. Efeito da fração Bt II-2 sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação nervo *frênico diafragma* de camundongo, sob estimulação indireta. No gráfico estão indicados os experimentos controle e a fração Bt II-2 nas concentrações 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa amédia de experimentos \pm erro padrão.

Estímulo alternado Nervo frênico diafragma de camundongo-BtII-2

Controle



Dose: 1 $\mu\text{g/mL}$.



Dose: 10 $\mu\text{g/mL}$.

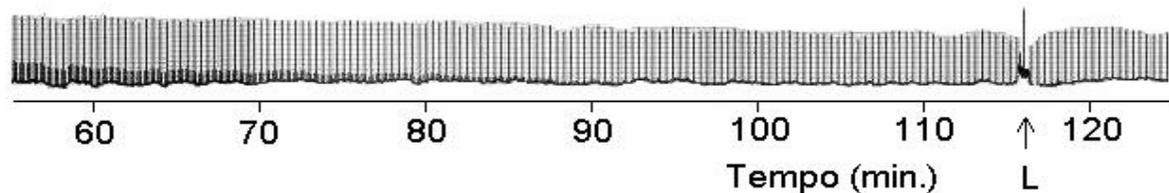


Fig. 13. Registro miográfico do efeito induzido pela fração Bt- II-2 sobre a preparação nervofrenico diafragma de camundogos, são estimulados sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongos, são estimulados dieta e indiretamente (pulsos supra-maximais de 0,2 ms e 0,1 Hz). O Septo foi mantido a 37 C. Em A e B, o efeito concentração-dependente da fração que foi adicionada no tempo zero(indicado pelo fluxo), nas concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

⇒ Curva Cumulativa de ACh

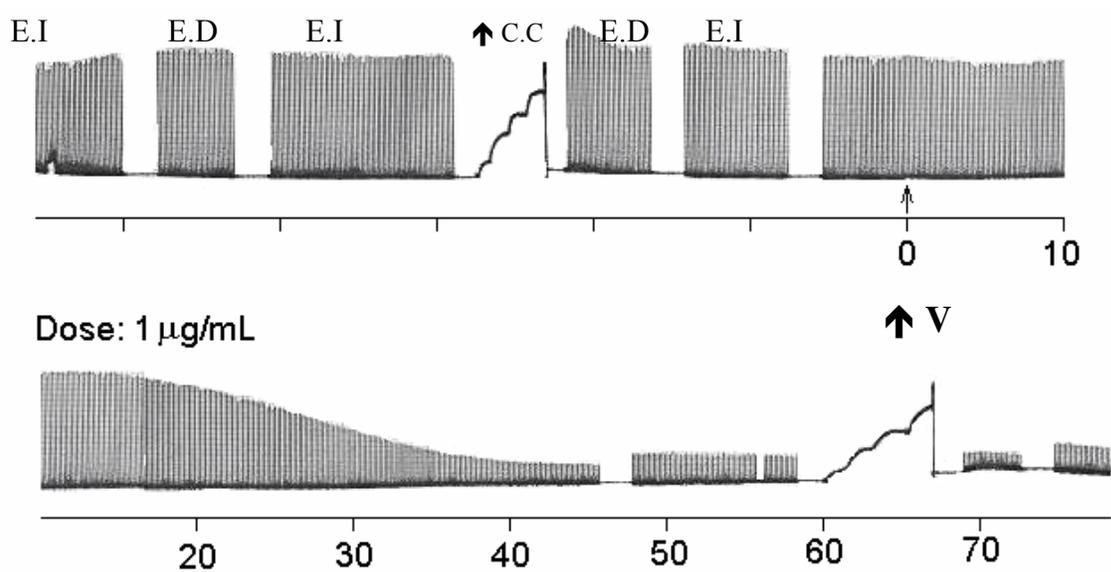


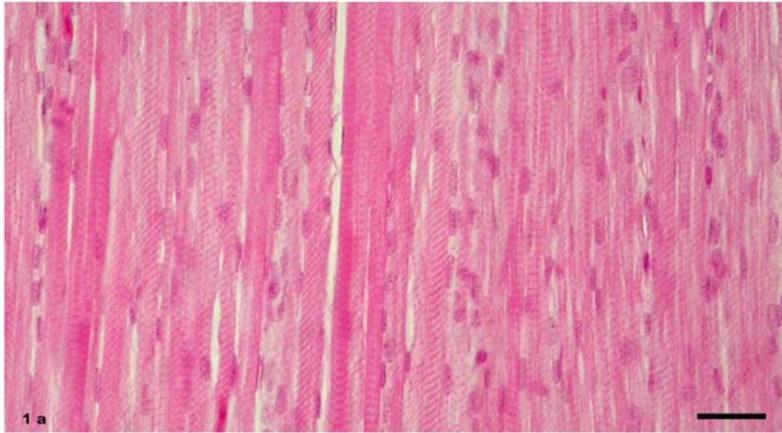
Figura 14 - Registro miográfico do efeito induzido pela fração Bt II-2, sobre a preparação biverter cervicis de pintainho, sob estimulação elétrica indireta e direta, (pulsos supramaximais de 0,2 ms e 0,1 Hz). O banho foi mantido a 37^o C. Em C , o efeito da fração, que foi adicionada no tempo zero (indicado pela flecha), na concentração de 1µg/ml, ainda a representação da dose cumulativa de ACh. Note que demonstrando que esta fração PLA₂ é pré-sináptica
↑ indica Estímulo Indireto e Direto (E. I. e E. D.). ↑ concentração cumulativa (C.C). No tempo zero adição da fração.

4.7 Estudo morfológicos das alterações causadas pelo veneno e fração de *B. alternatus*

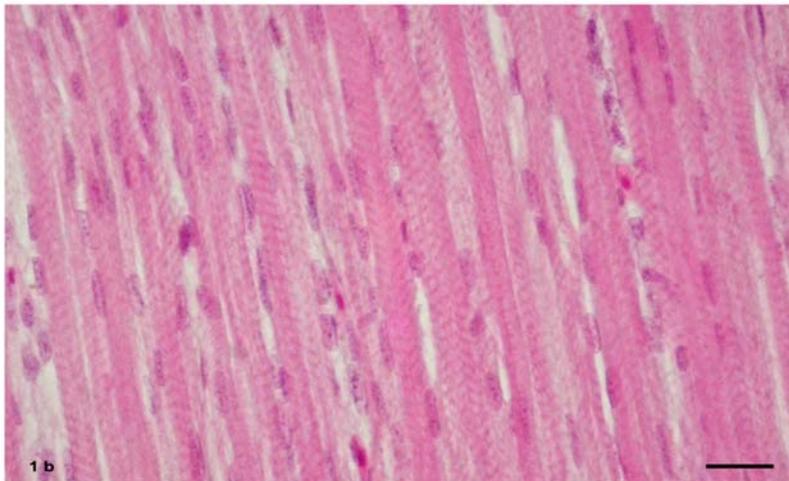
4.7.1 Controle (solução de Krebs)

A Figura 15 mostra secção histológica do músculo biventer cervicis de pintainho, após 120 min de incubação com solução de Krebs, podendo observar cortes longitudinais do músculos *biventer cervicis* de pintainho. As fibras musculares apresentaram estrias transversais normais, e núcleos periféricos com cromatina frouxa.

A



B



C

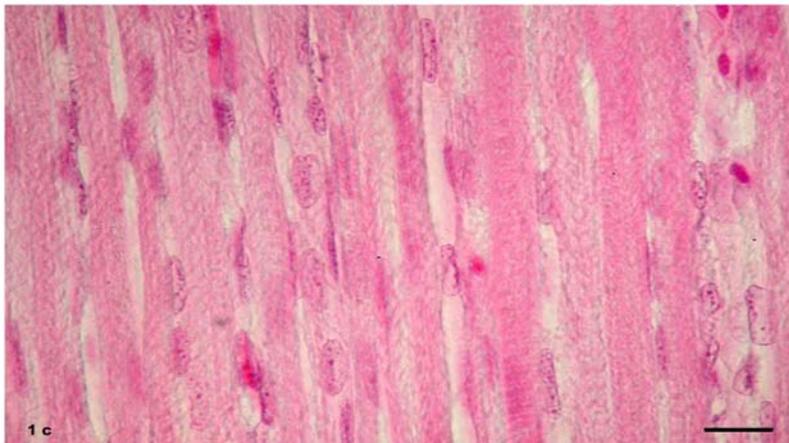


Figura 15 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculo *biverter cervicis* de pintainho incubado com solução de Krebs durante 120 min. A; B; e C. Em A; B e C secção longitudinal, mostrando o aspecto normal das fibras musculares, as estriações transversais e os núcleos periféricos grandes com cromatina frouxa. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala das barras: a:25 µm; b:16 µm e c:10 µm.

4.7.2 Veneno *Bothrops alternatus*

O músculo *biventer cervicis* de pintainho foi pré incubado com veneno total de *Bothrops alternatus* nas concentrações de 50 e 100 µg/mL a fotomicrografia mostra cortes longitudinais das fibras musculares apresentando hipercontração das extremidades truncadas (cabeça de seta) e regiões de destruição de fibras (d), fibras hialinas (*), com aspecto amorfo e sem estriações aparentes. Há alterações do volume ao longo da mesma fibra. Figura 15 e 16.

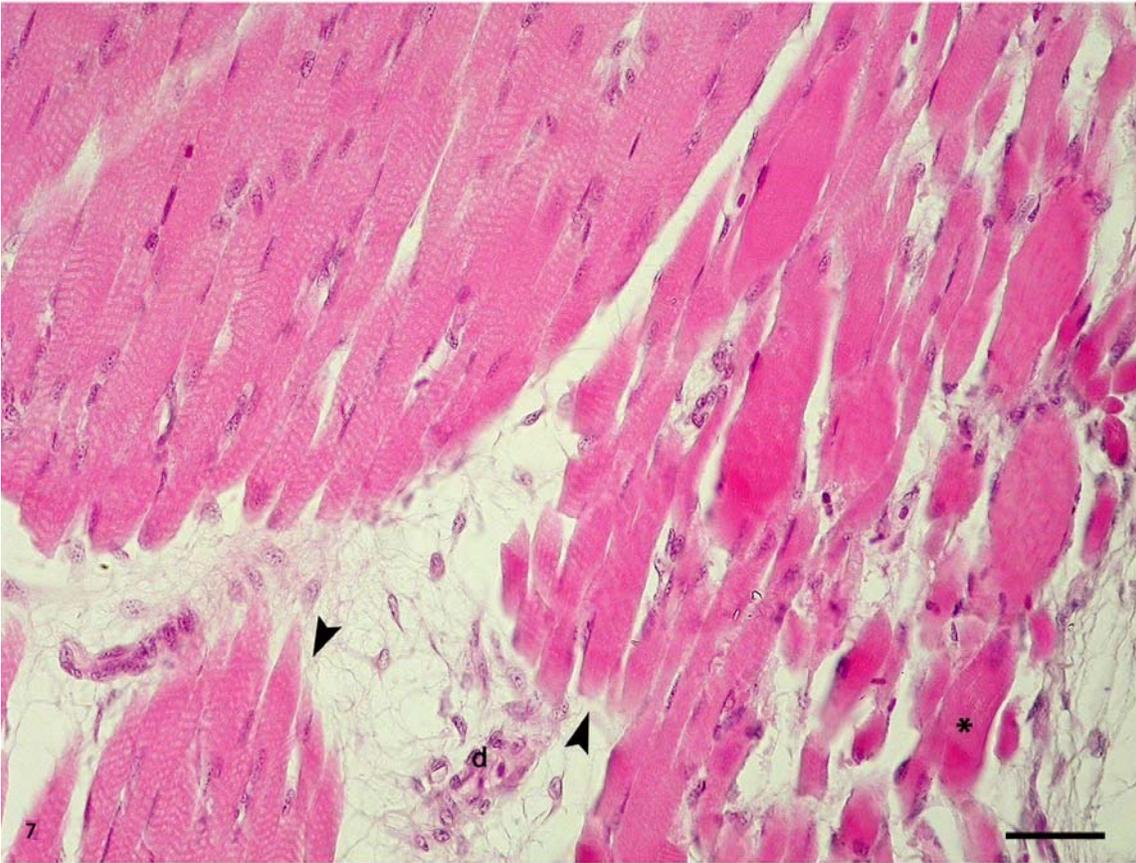


Figura 16 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução nutritiva de Krebs contendo veneno total de *Bothrops alternatus*, na concentração de 50µg/mL. Note que as fibras musculares apresentam hipercontração das extremidades truncadas (cabeça de seta). Observe regiões de destruição de fibras (d), fibras hialinas (*), com aspecto amorfo e sem estriações aparentes. Note alterações do volume ao longo da mesma fibra. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala da barra: 21µm

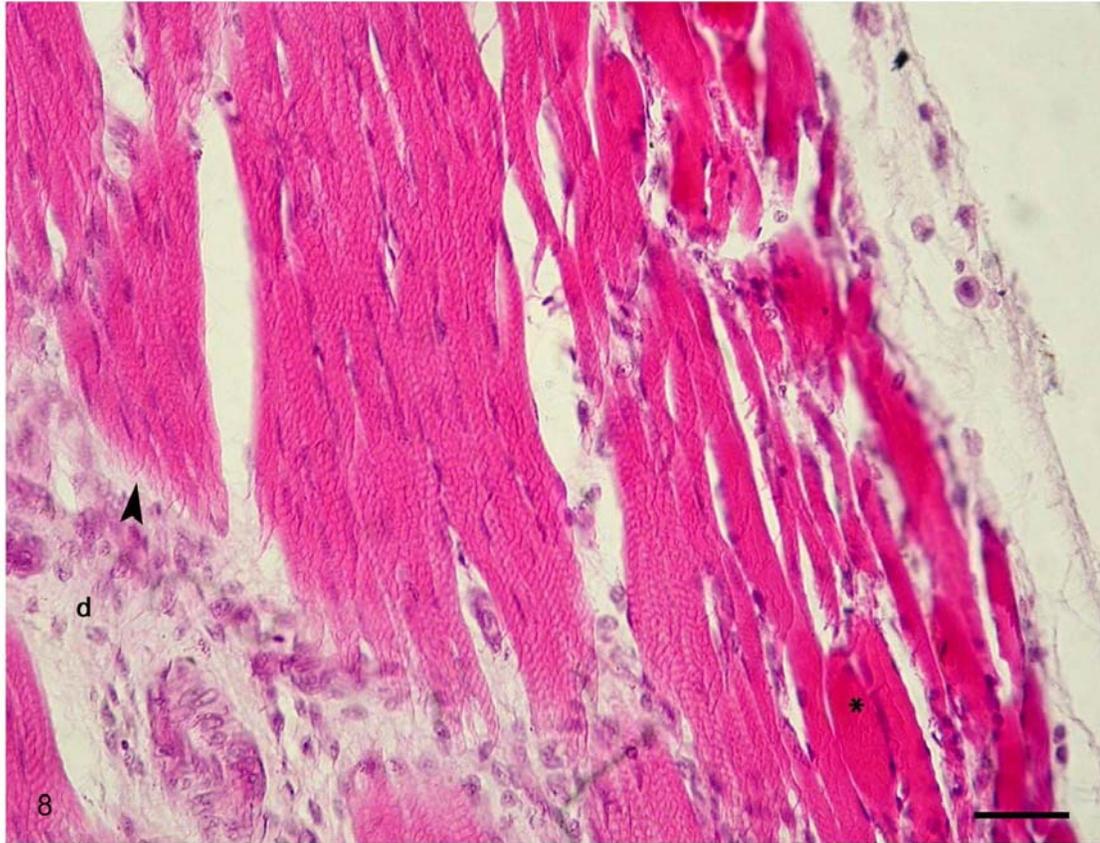


Figura 17 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução nutritiva de Krebs contendo veneno total de *Bothrops alternatus* na concentração de 100µg/mL. As alterações histológicas das fibras musculares são semelhantes aquelas descritas para a incubação na concentração de 50µg/mL de BTII₂. Note que as fibras musculares apresentam hipercontração das extremidades truncadas (cabeça de seta). Observe regiões de destruição de fibras (d), fibras hialinas (*), com aspecto amorfo e sem estriações aparentes. Note alterações do volume ao longo da mesma fibra. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala da barra: 21µm.

4.7.3 Bt II-2 (PLA₂) 0,1µg/mL

Na Figura 17 é demonstrado a fotomicrografia de cortes longitudinais, incubados com PLA₂ na concentração 0,1µg/mL, as fibras musculares apresentaram hipercontração das extremidades truncadas das fibras (cabeça de seta).

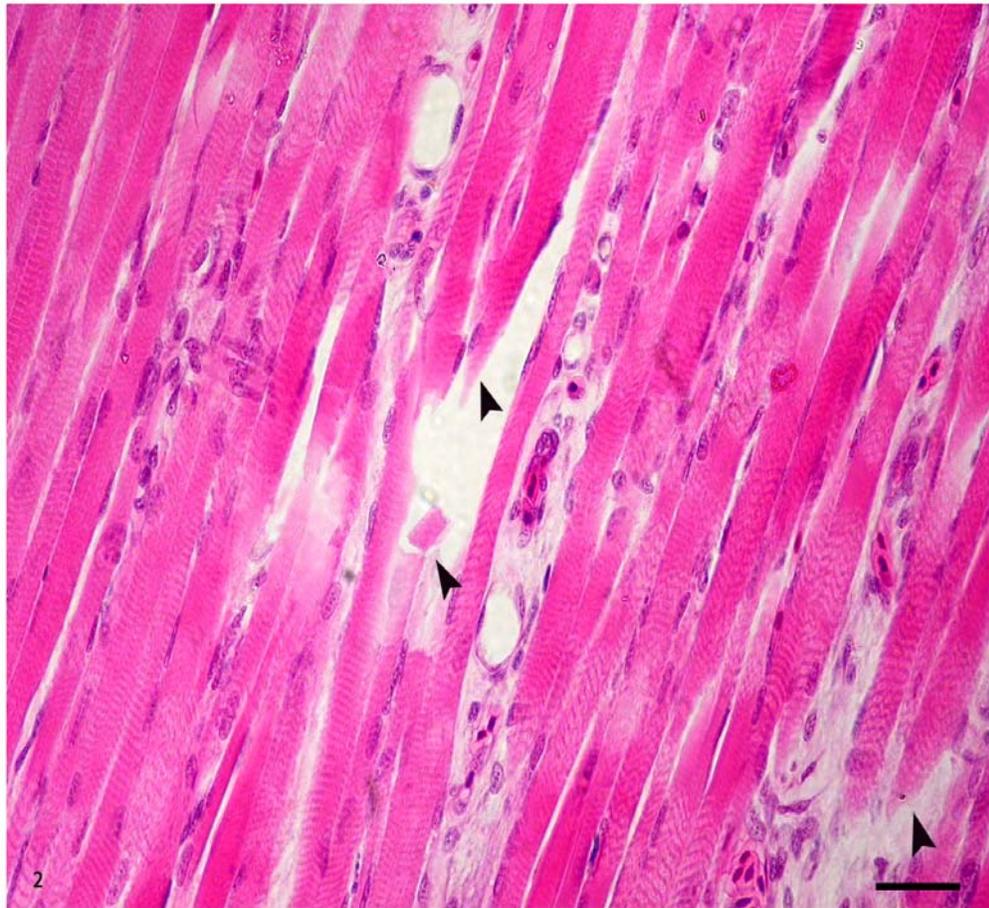


Figura 18 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução nutritiva de Krebs contendo 0,1µg/mL de BTII₂. A hipercontração das extremidades das fibras (cabeça de seta) aumentaram. Observe porções onde as fibras parecem estar destruídas (d). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala da barra: 21µm.

4.7.4 Bt II 2 (PLA₂) 0,5 µg/mL

PLA₂ Na concentração de 0,5 µg/mL de PLA₂ a Figura 18 demonstra fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos *biventer cervicis* de pintainho, mostrando a hipercontração das extremidades das fibras (cabeça de seta) aumentando em relação às concentrações menores de PLA₂. Há porções onde as fibras parecem estar destruídas (d).

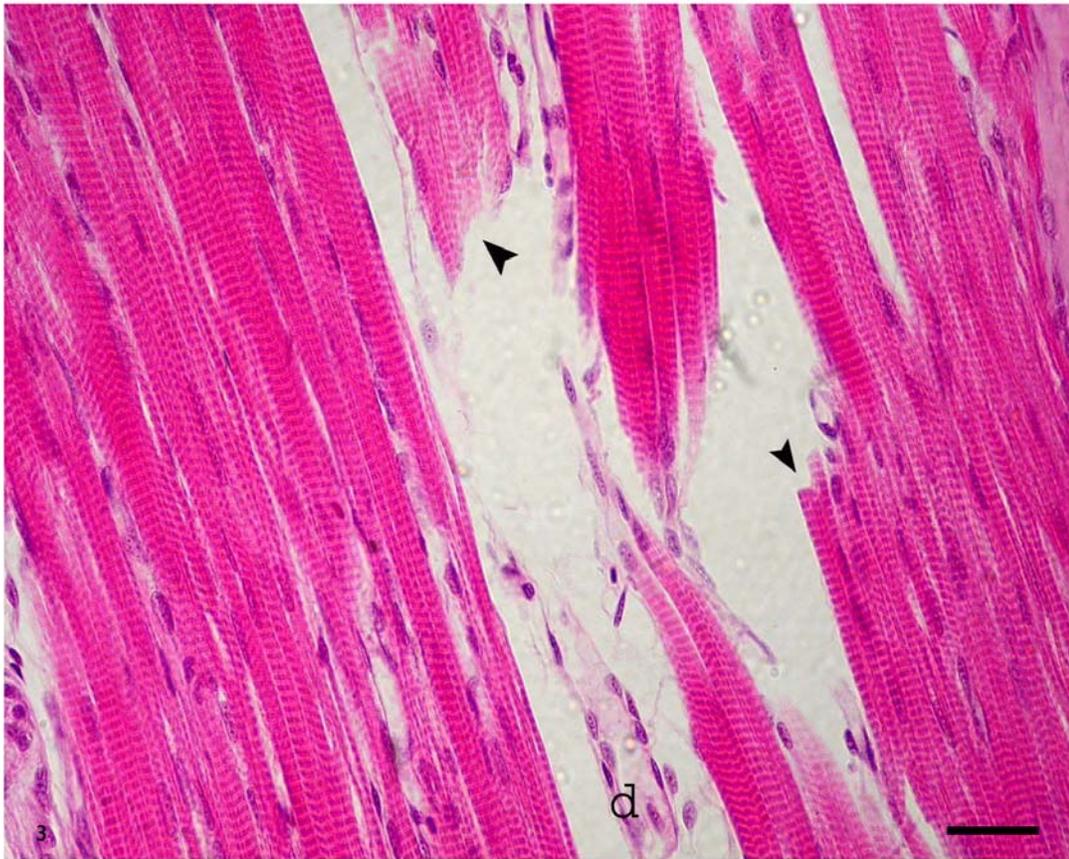


Figura 19 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução nutritiva de Krebs contendo 0,5µg/mL de BTII₂. A hipercontração das extremidades das fibras (cabeça de seta) aumentaram em relação às concentrações menores de Pla₂. Observe porções onde as fibras parecem estar destruídas (d). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala da barra: 21µm.

4.7.5 Bt II 2 (PLA₂) 1 µg/mL

Na figura 19 músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com 1 µg/mL PLA₂, os cortes longitudinais demonstram número de fibras musculares em hipercontração (cabeça de seta) e as regiões de destruição das fibras (d) aumentaram em relação às concentrações menores de PLA₂. Tem-se alterações do volume ao longo da mesma fibra e fibras hialinas (*) com aspecto amorfo e sem estriações aparentes.

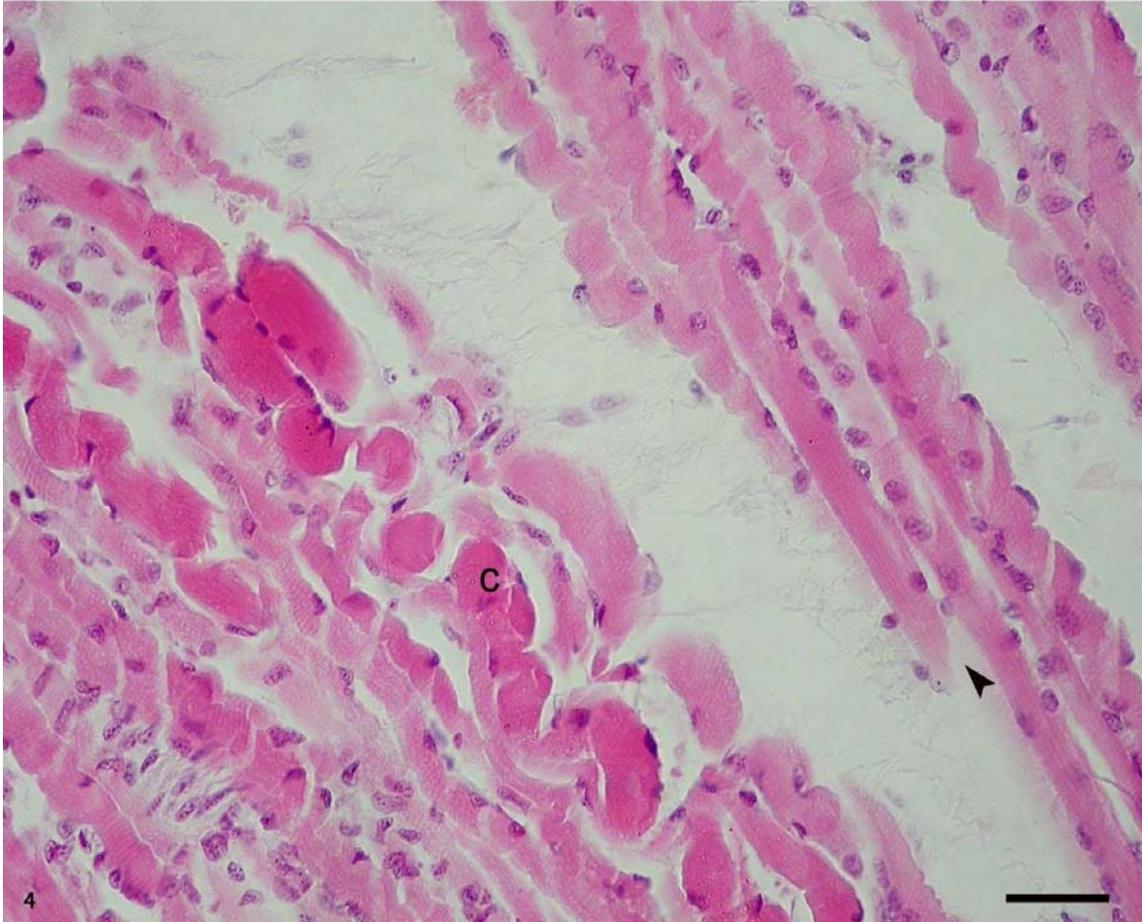


Figura 20 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução nutritiva de Krebs contendo 1 $\mu\text{g/mL}$ de BTII₂. As fibras musculares apresentam heterogeneidade quanto ao diâmetro e grau de contratura (c). Note os espaços aumentados entre as fibras, hipercontração das extremidades truncadas (cabeça de seta) e redução das estriações. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala da barra: 21 μm .

4.7.6 Bt II 2 (PLA₂) 10 µg/ml

Na Figura 20 o músculo foi pré incubado com PLA₂ na concentração de 10 µg/mL na fotomicrografia aparecem cortes longitudinais com alterações histológicas das fibras musculares. O número de fibras musculares em hipercontração (cabeça de seta) e as regiões de destruição das fibras (d) aumentaram em relação às concentrações menores de PLA₂. Há alterações do volume ao longo da mesma fibra e o grau de contratura (c).

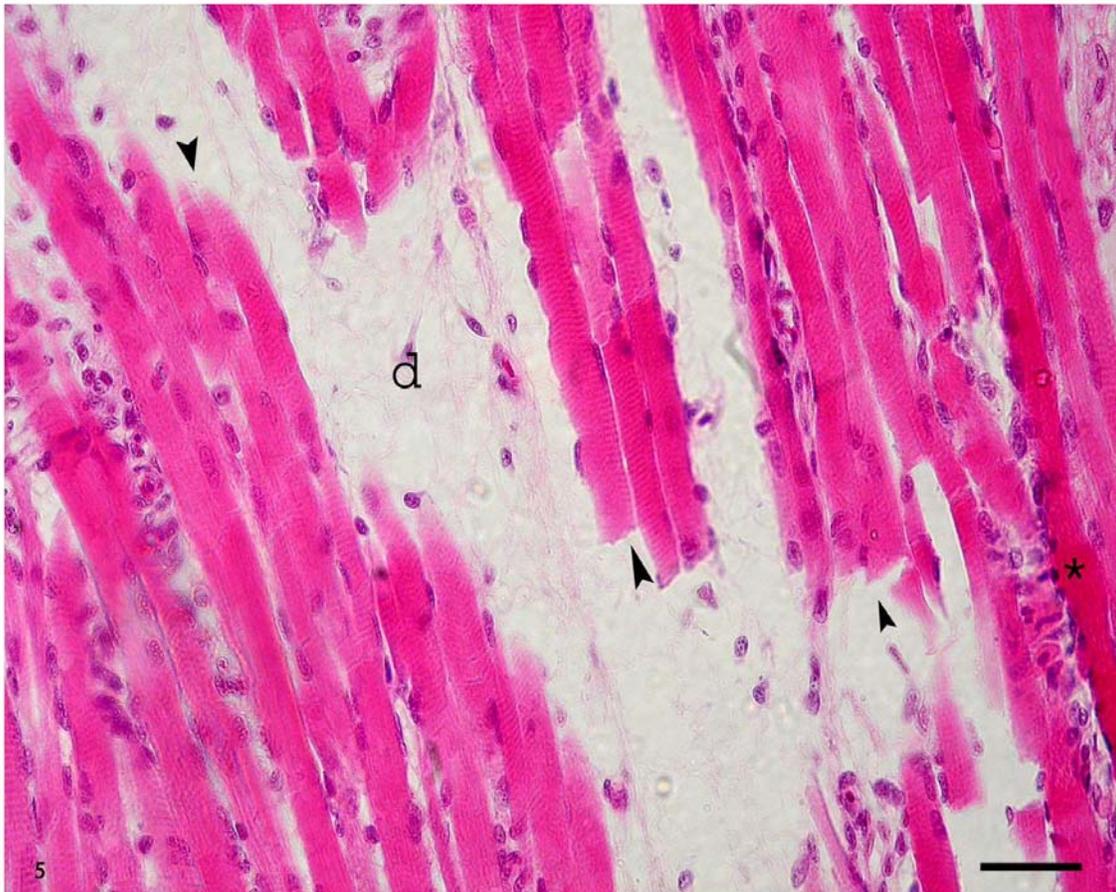


Figura 21 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculos *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução nutritiva de Krebs contendo 10 µg/mL de BTII₂. O número de fibras musculares em hipercontração (cabeça de seta) e as regiões de destruição das fibras (d) aumentaram em relação às concentrações menores de Pla₂. Note alterações do volume ao longo da mesma fibra e fibras hialinas (*) com aspecto amorfo e sem estriações aparentes. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala da barra: 21µm.

47.7 Bt II 2 (PLA₂) 20 µg/mL

Na Figura 21 o músculo foi pré incubado com PLA₂ na concentração de 20 µg/mL na fotomicrografia aparecem cortes longitudinais com alterações histológicas das fibras musculares sendo semelhantes àquelas descritas para a incubação com 10 µg/mL de PLA₂. O número de fibras musculares em hipercontração (cabeça de seta) e as regiões de destruição das fibras (d) aumentaram em relação às concentrações menores de PLA₂. Há alterações do volume ao longo da mesma fibra e o grau de contratura (c).

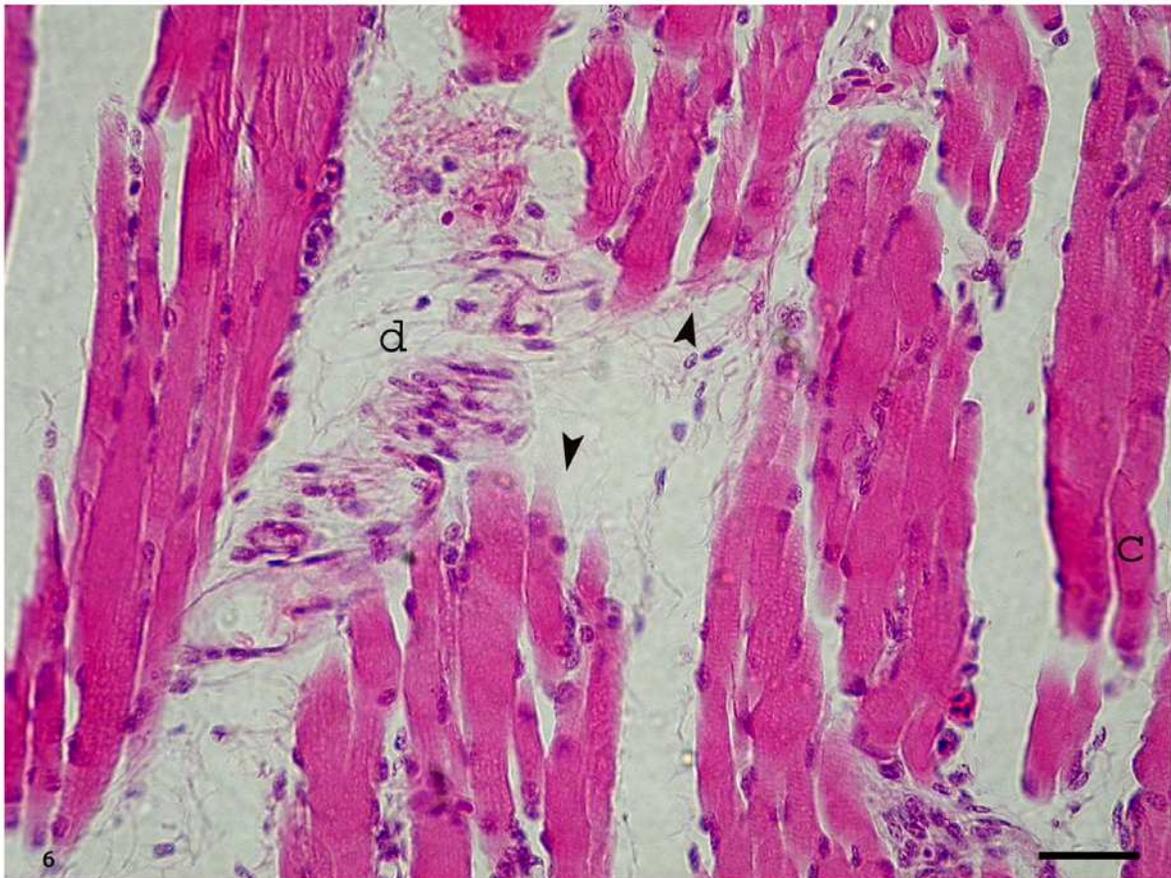


Figura 22 - Fotomicrografia de cortes longitudinais do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução nutritiva de Krebs contendo 20µg/ml de BTH₂. As alterações histológicas das fibras musculares são semelhantes àquelas descritas para a incubação com contendo 10 µg/mL de Pla₂. O número de fibras musculares em hipercontração (cabeça de seta) e as regiões de destruição das fibras (d) aumentaram em relação às concentrações menores de Pla₂. Note alterações do volume ao longo da mesma fibra e o grau de contratura (c). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Escala da barra: 21µm.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A purificação e o conhecimento do mecanismo de ação das toxinas tem sido de grande importância na área biológica. As toxinas têm sido utilizadas, como instrumento de pesquisa em diversos processos como a inflamação e ativação celular, no estudo dos canais de sódio, na marcação e classificação de tipos de receptores, processos de exocitose e no estudo do metabolismo de lipídios, através da utilização específica de fosfolipases.

As metodologias de purificação e caracterização bioquímica do veneno *B. alternatus* empregadas neste trabalho, foram descritas por Ponce-Soto (2005 submetidos). De acordo com nossos resultados, conseguimos uma redução dos passos cromatográficos descritos na literatura, otimização do material e recuperação da fração sem perda da atividade biológica.

Analisados globalmente, nossos resultados experimentais revelam que o veneno bruto da *B. alternatus* e a sua correspondente fração ativa, a Bt II-2 (PLA₂), causam efeitos evidentes sobre a junção neuromuscular de músculos esqueléticos de aves e mamíferos.

Em termos miográficos a fração Bt II-2 destaca-se com bloqueio neuromuscular progressivo a partir da concentração 0,5 µg/mL, apresentando-se concentração-dependente conforme dados estatísticos, na vigência do qual não parece estarem envolvidos os componentes sub e pós-sináptico do sarcolema desses músculos. Isto se afigura particularmente evidente, nas preparações isoladas de *biventer cervicis* de pintainho, cuja maioria de suas fibras musculares, sendo do tipo multinervadas, apresenta respostas

contraturantes, em seguida á adição ao banho da acetilcolina, que ativa os receptores nicotínicos tipo N₁.

A literaratura descreve PLA₂ neurotóxicas pré-sinápticas isoladas de veneno ofídicos, chamadas β-neurotoxinas, as quais apresentam invariavelmente certas características, como as de atuarem pré-sinápticamente, possuírem atividade enzimática e, ainda, a de ter sua ação neurotóxica dependente da enzimática. Além disso, é característica da maioria dessas toxinas apresentar miotoxicidade quando em concentrações mais altas.

ZAMUNER *et al.*,2004, ao testarem o veneno de *B. neuwied*, em altas concentrações (200 µg/mL), observaram o aumento da liberação de creatino-quinase, avaliada através de dosagem da solução nutritiva que banhava o músculo isolado de ave incubado com o veneno.

RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 2004 descreveram em seu trabalho que os venenos botrópicos tem apenas efeitos pós-sináptico e muscular. Entretanto, em seus estudos também sugeriram uma ação pré-sináptica destes venenos, usando preparação *biventer cervicis* para comparar a atividade pré-sináptica de dois venenos botrópicos: *B. insularis* e *B. neuwiedi* com o veneno da *C. d. terrificus*. OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2004, também referiram a atividade pós-sináptica e pré-sináptica da bothropstoxina-I.

As concentrações estudadas do veneno desta serpente (50-100 µg/mL) não promoveram bloqueio da resposta contrátil, os mesmos resultados não foram encontrados por BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2003, para o veneno da serpente *Bothrops neuwiedii pauluenses* que promoveu um bloqueio completo em baixas concentrações (5-10 µg/ml) .

Esta variação nos resultados encontrados no veneno botrópico, segundo PRIANTI *et al.*, 2003, dá-se por conta de diferentes preparações utilizadas tais como *biventer cervicis* de pintainho, nervo frênico diafragma de camundongo, cutâneo pectoris de rã, extensor

digitorum longus de camundongo entre outros. Estes músculos apresentam características particulares, tanto bioquímicas quanto fisiológicas das suas fibras musculares, tornando-se mais ou menos sensíveis a determinados venenos. Também deve-se levar em consideração que a sensibilidade da preparação pode estar associada a preferência alimentar da espécie de serpente em estudo.

HARVEY *et al.*, (1994), afirmaram que a preparação biventer cervicis de pintainho é melhor para estimar a neurotoxicidade de venenos de serpentes, além de usar poucos animais, pouco veneno, da preparação ser de fácil dissecação, fornece rápidos resultados e detecta-se efeitos pré e pós sinápticos e efeitos diretos sobre o músculo.

Nossos resultados corroboram com os achados de Harvey e colaboradores uma vez que nas preparações nervo frênico diafragma de camundongo os resultados foram diferentes tanto para o veneno como para fração Bt II-2. Os resultados obtidos com a fração Bt II-2 (1 µg/mL) mostra que em em mamíferos o tempo de incubação para se obter bloqueio total da resposta contrátil foi de 110 min, enquanto que na preparação de ave o tempo foi de 70 min.

Em termos de potência, os nossos resultados demonstram que a peçonha da serpente *B.alternatus* se como o menos tóxico, no entanto sua fração ativa dentre os demais venenos botrópicos estudadosao compará-lo com os demais, a fração Bt II-2 produz um bloqueio neuromuscular total, num tempo marcadamente inferior aos descritos para os venenos de *B. jararacussu*; *B jararaca*; *B. moogeni*; *B. newwied*; (BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2003, ZAMUNER *et al.*, 2004).

A este propósito, correlacionando-se essa potência, com a acentuada secreção e conseqüente elevada inoculação do veneno decorrente da picada pela *B. alternatus*, poderia explicar a gravidade do envenenamento causado por essa serpente.

Neste trabalho dados histológicos demonstram que o veneno e a fração *B. alternatus*, possuem ação miotóxica, determinando mionecrose em diferentes graus, caracterizadas por hipercontração das miofibrilas, fibras musculares abruptamente interrompidas, espaços vazios entre os feixes de fibras e alguns núcleos soltos no citoplasma desprovidos de miofibrilas. O grau de lesão foi maior no veneno e nas frações de Bt II-2 nas concentrações 10 e 20 µg/mL.

As alterações morfológicas causadas tanto por toxinas isoladas dos venenos elapídeos (notexina, taipoxina, crotoxina) e de serpentes do gênero *Bothrops* (miotoxina de *B. asper*), quanto por veneno bruto, tem indicado que o tipo de mionecrose que determinam é devido à atividade de miotoxinas com ação fosfolipásica (GUTIERREZ et al, 1984). A fosfolipase atuaria diretamente degradando os fosfolipídios, afetando portanto, a membrana sarcolemal (GUTIERREZ et al, 1984). Todavia, GUTIERREZ et al., (1989) isolaram uma miotoxina do veneno de *Bothrops nummifer* que apresenta ação semelhante às anteriores, sem apresentar atividade fosfolipásica.

Embora, a fração Bt II-2 tenha apresentado alterações qualitativas mionecróticas não houve correlação com os estímulos elétricos diretos que demonstram que esta toxina é eminentemente pré-sináptica por não apresentar diminuição da resposta contrátil em preparações nervo-frênico diafragma de camundongo.

Os resultados obtidos na presente pesquisa são estimulantes e somados ao grau de pureza, observado nas purificações e caracterizações bioquímicas, justificam um estudo mais detalhado quanto a atividade biológica não só no registro miográfico como também na eletrofisiologia.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

* Os métodos de purificação apresentados foram eficientes em manter a integridade da proteína sem perder atividade biológica.

* A preparação nervo frênico diafragma de camundongo mostrou-se menos sensível a ação bloqueadora neuromuscular da fração Bt II-2 na concentração de 1 µg/mL quando comparado com a preparação biventer cervicis de pintainho.

* A fração Bt II-2, mostrou uma ação pré-sináptica, pois após o bloqueio neuromuscular total, foram mantidas as respostas contraturantes à ACh e ao KCL.

* A análise miográfica da fração Bt II-2 testada em preparações isoladas de biventer cervicis de pintainho demonstrou potente atividade neurotóxica causando uma inibição da amplitude da contração neuromuscular, sendo concentração dependente.

* As alterações histopatológicas vistas no músculo esquelético demonstraram uma complexa série de eventos degenerativos, incluindo hipercontração e desorganização das miofibrilas. Bt II-2 (1µg/ml) mostrou-se mais potente ,em relação, á degeneração e desorganização, do que o veneno bruto da *Bothrops alternatus* numa dose de 100µg/ml .

* Todos estes resultados sugerem que a fração Bt II-2 tem um potente efeito neurotóxico pré-sináptico que ela exibe também um efeito mitotóxico em elevadas concentrações.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; ALEMA, S.; MILEDI, R.; Phospholipase activity in beta-bungarotoxin action [proceedings] **J Physiol.** 270 (1): p.55-56, 1977.
- ALAGON, A.C.; MOLINAR, R.R.; POSSANI, L.D.; FLETCHER, P.L. JR.; CRONAN, J.E. JR.; JULIA, J.Z. Venom from the snake *Bothrops asper* Garman. Purification and characterization of three phospholipases A₂. **Biochem J.** 185 (3): p. 695-704, 1980.
- ANDERLUH, G.; PUNGERCAR, J.; KRIZAJ, I.; STRUKELJ, B.; GUBENSEK, F.; MACEK, P. N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*. **Protein Eng.** 10 (7): p.751-755, 1997
- BARRAVIERA, B. – Estudo clínico dos Acidentes ofídicos. Revisão – **JBM** , 65. nº (4): 1993.
- BAUAB, F.; A.; JUNQUEIRA, G.; R.; CORRADINI, M.; C.; SILVEIRA, P.; V.; NISHIOKA, S.; DE A. Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. **Trop Med Parasitol.**;45(3): p. 243-245, 1994.
- BORJA-OLIVEIRA, C.;R.; DURIGON, A.; M.; VALLIN, A.;C.;C.; TOYAMA, M.; H.; SOUCCAR, C.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Braz J Med Biol Res**, 36 (5): p. 617-624, 2003.
- BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.** 1, p. 38-61, 1946.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. – The venoms reptiles of Latin America. **Ithaca London**, p.425, 1989.
- CHANG, C.C.; LEE, C. Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 144, p. 241-257, 1963.
- CHANGEUX, J.P.; KASAI, M.; LEE, C.Y. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 67 (3): p. 1241-1247, 1970.
- CINTRA, A.; C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem.** 12(1):57-64. 1993.
- DANIELE, J.J.; BIANCO, I.D.; FIDELIO, G.D. Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. **Arch**

- Biochem Biophys.**1; 318 (1): p. 65-70, 1995.
- DE ROODT, A.; R.; DOLAB, J.; A.; GALARCE, P.; P.; GOULD, E.; LITWIN, S.; DOKMETJIAN, J.; C.; SEGRE, L.; VIDAL, J.; C. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. **Toxicon.**;36(12): p.1949-57. 1998.
- DE ROODT, A.; R.; DOLAB, J.; A.; DOKMETIJIAN, L.; C.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J.; C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of Bothrops venoms. **Toxicon.**38(6): p. 865-873, 2000.
- FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.; OLMOS, R.D.; ALMEIDA, F.J.; VIANA R.P.; MARTINEZ, A.P. Hemorrhagic syndrome and acute renal failure in a pregnant woman after contact with *Lonomia* caterpillars: a case report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 40 (2): p.119-120. 1998.
- FRANCISCHETTI, I.; M.; CASTRO, H.; C.; ZINGALI, R.; B.; CARLIN, I.; C.;R.; GUIMARAES, J.; A. Bothrops sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions.**Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.** 119 (1): 21-29, 1998.
- FURTADO, M.F.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; ANTONIO, L.C. - Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, 29(2): p. 219-26, 1991.
- GINSBORG, B.L.; WARRINER, J.,. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. **Brit. J. Pharmacol.**, 15, p. 410-411. 1960.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. Toxinology resources on the Internet: Virtual Venom and Toxin Research and Information Centre. **Toxicon.** 35 (12): p.1675-1681, 1997.
- GUTIERREZ, J.; M.; CHAVES, F.; GENE, J.;A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon.** 27, (7): p. 735-45. 1989.
- GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. . **Toxicon.**33 (11): p.1405-1424. 1995.
- GUTIERREZ, J.; M. RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage.**Biochimie.**82 (9-10): p. 841-50. 2000.
- HARVEY, A.L.; ANDERSON, A.J.; KARLSSON, E. Facilitation of transmitter release by neurotoxins from snake venoms. **J Physiol.** 79 (4): p.222-227, 1984.
- HARVEY AL, BARFARAZ A, THOMSON E, FAIZ A, PRESTON S, HARRIS JB. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. **Toxicon.** 32 (3): p. 257-65. 1994.

- HOMSI-BRANDEBURGO, M.; I.; QUEIROZ, L.; S.; SANTO NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.; R. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26 (7); p. 615-627, 1988.
- HOLZER, M.; MACKESSY, S.; P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**. 34 (10): p.1149-1155. 1996
- KAMIGUTI, A.; S.; HAY, C.; R.; THEAKSTON, R.; D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, 34(6): p. 627-642. 1996.
- KARLSSON, E.; MBUGUA, P.M.; RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D. Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. **J Physiol.** 79 (4): p. 232-240, 1984.
- KRIZAJ, I.; GUBENSEK, F. Neuronal receptors for phospholipases A₂ and beta-neurotoxicity. **Biochimie.** 82 (9-10): p. 807-814, 2000.
- KINI, R. M. Venom phospholipase A₂ enzymes – Structure, Function and Mechanism. (Ed) R.Manjunatha Kini, 1997.
- KONDO K, TODA H, NARITA K, LEE CY. Amino acid sequence of beta 2-bungarotoxin from Bungarus multicinctus venom. The amino acid substitutions in the B chains. **J Biochem.** 91 (5): p. 1519-1530, 1982a.
- KONDO K, TODA H, NARITA K, LEE CY Amino acid sequences of three beta-bungarotoxins (beta 3-, beta 4-, and beta 5- bungarotoxins) from Bungarus multicinctus venom. Amino acid substitutions in the A chains. **J Biochem.** 91 (5): p. 1531-1548, 1982b.
- MACHADO, O.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R. Purification, physicochemical characterization and N-terminal-amino acid sequence of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* venom. **Braz J Med Biol Res.** 26 (2): p.163-166, 1993.
- MARKLAND, F.; S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb Haemost.** 79 (3) p. 668-674, 1998.
- MARUNAK, S.; L.; ACOSTA DE PEREZ, O.; RUIZ DE TORRENT, R.; M.; TEIBLER, G.; P.; KOSCINCZUK, P.; SANCHEZ NEGRETTE, M. Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz). **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.**;49(3): p. 149-54, 1999.
- MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther.**48 (2): p. 223-36, 1990.

- MEBS, D. Snake venoms: toolbox of the neurobiologist. **Endeavour**.13 (4): p.157-161, 1989.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.
- MOURA DA SILVA, A.; M.; PAINE, M.; J.; DINIZ, M.; R.; THEAKSTON, R.; D.; CRAMPTON, J.; M. The molecular cloning of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A₂s may imply gene duplications. **J Mol Evol.**;41(2): p. 174- 179. 1995.
- NISENBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**. 24 (3): p. 259-72, 1986a
- NISENBOM, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.J.; VIDAL, J. C. Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon**. 24 (8): p.807-817, 1986b.
- NISENBOM, H.; E.; PERAZZO, J.; C.; MONSERRAT, A.; J.; VIDAL, J.; C. Effect of chemical modification with p-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz) venom. **Toxicon**, 26 (12): p.1137-1144, 1988
- OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.;B.; BELO, C.; A.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.; C.; GIGLIO, J.; R.; DA CRUZ-HOFLING M.; A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The Presynaptic Activity of Bothropstoxin-I, a Myotoxin from *Bothrops jararacussu* Snake Venom. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, **95**, p.175–182. 2004
- PETRICEVICH, V.; L.; TEIXEIRA, C.; F.; TAMBOURGI, D.; V.; GUTIERREZ, J.; M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**. 38(9): p. 1253-1266. 2000.
- PONCE-SOTO, L.; A.; TOYAMA, M.; H.; HYSLOP, S.; NOVELLO, J.; C.; MARANGONI, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J Protein Chem**. 21(3): p. 131-136, 2002.
- PRIANTI AC JR, RIBEIRO W, LOPES-MARTINS RA, LIRA-DA-SILVA RM, PRADO-FRANCESCHI J, RODRIGUES-SIMIONI L, DA CRUZ-HOFLING MA, LEITE GB, HYSLOP S, COGO JC. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**. 41(5): p. 595-603. 2003.
- QUEIROZ, L.; S. & PETTA, C.; A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 26(5): p. 247-53, 1984.

- QUEIROZ, L.; S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M.; T.; REICHL, A.; P.; MANDELBAUM, F.; R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, 1985; 23 (2): p. 341-345, 1985.
- RIBEIRO, L.A. & JORGE, M.T. – Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Ver Inst Med trop** São Paulo, 32, (6): p. 436- 442, 1990.
- RODRIGUES-SIMIONI, L., BORGES, N.; CECCARELLI, B.; The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**. 10 (2) p. 475- 489, 1983.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; ZAMUNER, S.; R.; COGO, J.; C.; BORJA-OLIVEIRA, C.; PRADO-FRANCHESCHI, J.; DA CRUZ-HOFLING, M.; A.; CORRADO, A.; P. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**. 43 (6) p.633-638, 2004.
- ROSENFELD, G. – Symptomatology, pathology and treatment of snakebites in South America . In: (BUCHERL, W., BUCKKEY, E.E.; DEULOFEU, V. eds.) *Venomous Animals and their venoms*. Vol. 2. **Academic Press**, New York, p. 345-395, 1971.
- SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem**. 166 (2): p. 368-379. 1987.
- VALIENTE, C.; MORENO, E.; SITTENFELD, A.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ J.; M. An electrophoretic study on phospholipase A2 isoenzymes in the venoms of Central American crotaline snakes. **Toxicon**. 30 (8): p. 815-823. 1992.
- VIDAL, J.C.; STOPPANI, A.O. Isolation and properties of an inhibitor of phospholipase A from *Bothrops neuwiedii* venom. **Arch Biochem Biophys**. 147 (1): p. 66-76, 1971.
- VITAL BRAZIL, O. - Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. Assoc. Med. Brasil*. 26:212-218, 1980. VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: (CORBETT, C. E., ed.) **Farmacodinâmica**. 6^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,. p. 1044-1074, 1982.
- ZAMUNER, S.; R.; DA CRUZ-HOFLING, M.; A.; CORRADO, A.; P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**. 44 (3): p. 259-71. 2004.