



RAFAEL STUANI FLORIANO

ESTUDO DO VENENO TOTAL DA SERPENTE
Bothriopsis bilineata smaragdina **E DE SUA FOSFOLIPASE A₂ Asp49**
SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

RAFAEL STUANI FLORIANO

**ESTUDO DO VENENO TOTAL DA SERPENTE
Bothriopsis bilineata smaragdina E DE SUA FOSFOLIPASE A₂ Asp49
SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Léa Rodrigues Simioni

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO Rafael Stuaní Floriano E ORIENTADO PELO(A) PROF(A). DR(A). Léa Rodrigues Simioni.

Assinatura do Orientador(a)

**CAMPINAS
2014**

F663e Floriano, Rafael Stuani, 1982-
Estudo do veneno total da serpente *Bothriopsis bilineata smaragdina* e de sua fosfolipase A₂ Asp49 sobre a junção neuromuscular / Rafael Stuani Floriano. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Lea Rodrigues Simioni.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neurotoxinas. 2. Eletrofisiologia. 3. Venenos de viperídeos. 4. Junção neuromuscular. 5. Músculo esquelético. I. Rodrigues-Simioni, Lea, 1942-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the *Bothriopsis bilineata smaragdina* venom and its Asp49 phospholipase A₂ on neuromuscular junction

Palavras-chave em inglês:

Neurotoxins

Electrophysiology

Viper venoms

Neuromuscular junction

Muscle, Skeletal

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Lea Rodrigues Simioni [Orientador]

Lourdes Dias de Araújo

Humberto Santo

Cháriston André Dal Belo

Yoko Oshima Franco

Data de defesa: 24-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

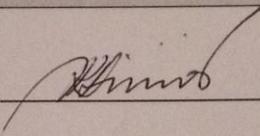
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RAFAEL STUANI FLORIANO

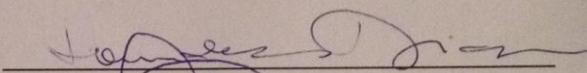
Orientador (a) PROF(A). DR(A). LÉA RODRIGUES SIMIONI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). LÉA RODRIGUES SIMIONI



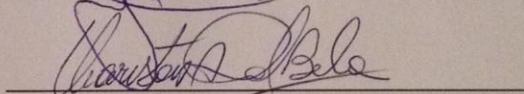
2. PROF(A). DR(A). LOURDES DIAS DE ARAÚJO



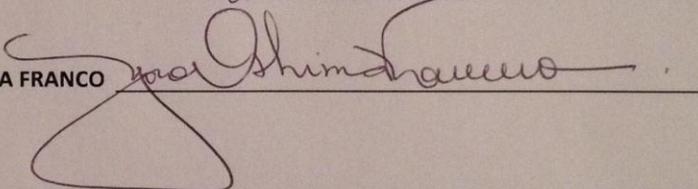
3. PROF(A). DR(A). HUMBERTO SANTO



4. PROF(A).DR(A). CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO



5. PROF(A).DR(A). YOKO OSHIMA FRANCO



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

Data: 24 de julho de 2014

DEDICATÓRIA

À minha esposa Érica Flávia Floriano, por ter estado disposta a mergulhar comigo no abismo das incertezas, por ser minha força nos momentos de fraqueza, minha coragem diante do medo e minha confiança diante dos obstáculos. Somente você é capaz de compreender tudo o que esta realização significa. Sem o teu cuidado realmente eu não teria superado tantas dificuldades e limitações. Obrigado meu amor por ter feito parte desta história.

À minha mãe Aparecida Stuani, por ter construído os alicerces da minha educação mesmo diante de tanta adversidade, o que me tornou apto a chegar até aqui.

Aos meus irmãos Evandro, Talita, Bruno e cunhados, pelo companheirismo e amizade ao longo de nossa história como família.

Ao meu tio Agenor Stuani, por ser o modelo profissional em quem me espelho e por ter cuidado de todos da minha família com o carinho e dedicação de um pai.

Aos meus sogros Iraídes e Eunice, por sempre estarem ao nosso lado nos apoiando e nos incentivando a prosseguir.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora:

Professora Dra. Léa Rodrigues Simioni. Foi uma honra fazer parte da sua história acadêmica e certamente levo comigo preciosos ensinamentos que transcendem os limites da Farmacologia. Serei para sempre grato por ter me aceitado como seu aprendiz e respeitado minhas limitações. A partir de seus incentivos pude enfrentar meus temores e superar limites que antes pareciam intransponíveis. Espero retribuir tudo o que ao seu lado pude incorporar para minha formação como pessoa e profissional partilhando as lições que com você aprendi. De todo meu coração, muito obrigado!

Aos Colaboradores:

Professor Dr. Stephen Hyslop. Tê-lo como colaborador neste projeto foi uma honra pra mim e de suma importância para sua concretização. Obrigado por toda orientação científica prestada e por apoiar meu crescimento acadêmico.

Professor Dr. Edward G. Rowan. Para sempre serei grato a você por ter vivido, sem sombra de dúvidas, o maior desafio da minha vida na University of Strathclyde. Muito obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório para esta colaboração e por todo apoio financeiro, científico e técnico prestado. Sua contribuição foi muito importante para a conclusão deste projeto. Foi uma honra conhecê-lo e tê-lo como supervisor durante minha estadia em Glasgow.

Professora Dra. Maria Alice da Cruz Höfling. Foi uma honra conhecê-la e principalmente tê-la como parceira neste projeto. Obrigado por abrir as portas de seu laboratório e por toda orientação prestada.

Professor Dr. Sergio Marangoni. Apesar do pouco contato que tivemos ao longo desse período, sou grato pela parceria de sucesso que estabelecemos e que rendeu bons frutos.

Professor Dr. Valdemir Aparecido de Abreu. Certamente Deus fez nossos caminhos se cruzarem para que este sonho hoje se tornasse realidade. Obrigado por ter acreditado em mim e tenha certeza que guardarei a sete chaves a nossa amizade. De todo coração muito obrigado.

Professor Dr. Cháriston André Dal Belo. Nossa convivência antes de Glasgow já havia acrescentado muito à minha experiência acadêmica, em Glasgow durante nossa temporada na University of Strathclyde então foi mais especial ainda. Serei para sempre grato por toda orientação prestada e constante incentivo.

Professora Dra. Thalita Rocha. Além de ganhar uma grande amiga foi uma honra tê-la como parceira neste trabalho. Certamente aprendi muito ao seu lado e espero que possamos estabelecer futuras parcerias.

Victor Carregari. Além de uma honrosa parceria também construímos uma genuína amizade ao longo desses anos. Obrigado pelo companheirismo e pelo auxílio prestado quando necessário.

Bruno Kenzo Kagawa. Sua contribuição foi muito valiosa quando precisávamos de resultados em um curto espaço de tempo. Obrigado por tudo e espero que seja apenas o início de uma forte parceria.

Norma Cristina Sousa. Obrigado pela sua importante participação em alguns protocolos experimentais e por sempre nos atender com muita simpatia.

Aos amigos de laboratório e departamento:

Gildo Bernardo Leite. Não sou o primeiro, mas talvez um dos últimos a reconhecer neste momento sua valiosa importância para o nosso laboratório. Em

especial agradeço por sua sincera amizade, por tanto conhecimento generosamente compartilhado e por toda ajuda prestada. Que Deus abençoe essa nova fase da sua vida.

Sandro Rostelato Ferreira. Você foi muito importante no início das minhas atividades no laboratório, sempre disposto a ajudar com muita cordialidade. Agradeço pelo seu companheirismo, pelo conhecimento compartilhado e por tanto auxílio prestado. Também sinto-me honrado de estar trabalhando com você.

Délkia Seabra de Moraes. Nossa convivência no laboratório foi muito especial e você certamente foi muito importante para a minha adaptação. Obrigado pela sua sincera e respeitosa amizade, pelos conselhos e auxílio prestado.

Rita de Cássia Collaço. Obrigado pela sua companhia no dia a dia do laboratório e também pelo auxílio prestado.

Priscila Randazzo Moura. Sua presença no laboratório, em viagens e confraternizações sempre foi sinônimo de alegria e simpatia. Foi um prazer conviver com você, mesmo sendo apenas em situações especiais, e espero continuar cultivando nossa amizade.

Lourdes Dias. Serei para sempre grato por ter confiado em mim quando participou da banca de avaliação do meu projeto. Também não me esquecerei por tantas vezes ter enaltecido meu desempenho dentro do departamento, o que me motivava muito. Foi uma honra conhecê-la e certamente cresci muito com seus conselhos.

Aos amigos da University of Strathclyde

Rabbad Own (Ruby), Carol Barnett, Laura Hutchison, Alasdair Henry, Louise Wilson, Ibtisam Kaziri, Sajjad Ali Khan e Basher Abdalsaed. Foi muito

especial conhecer vocês e serei para sempre grato por terem sido tão cordiais e pacientes comigo. Obrigado por todo aprendizado cultural, técnico e científico que adquiri convivendo com vocês. O carinho com que fui tratado foi de suma importância para a minha adaptação em Glasgow. Espero poder revê-los em breve.

Aos amigos pessoais:

Amigos da IASD de Indiana. Por mais de uma década tive o privilégio de conviver com pessoas maravilhosas na pequena igreja adventista de Indiana. Os meus amigos mais preciosos ainda encontram-se lá e certamente vocês representam muito neste momento. As lições que vocês me ensinaram são as mais importantes da minha vida. Obrigado pelas orações e constantes palavras de incentivo que contribuíram muito para que eu e a Érica superássemos as dificuldades iniciais. Parte desta conquista também dedico a vocês. Que Deus continue abençoando a todos.

Amigos da IASD Central de Paulínia. Muito obrigado pelo caloroso acolhimento de todos vocês. O carinho com que fomos tratados durante esta temporada será para sempre lembrado por nós. Certamente Deus nos mandou para o lugar certo e somos gratos a Ele também por nos apresentar pessoas tão especiais. Que Deus abençoe a todos, nossos mais sinceros agradecimentos. Até algum dia!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq):

Pela bolsa de estudo durante meu período de doutorado na Unicamp e também por financiar meu período sanduíche na University of Strathclyde.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

Neste trabalho, nós examinamos a atividade neuromuscular do veneno de *Bothriopsis bilineata smaragdina* (serpente de floresta) e de sua toxina Bbil-TX (fosfolipase A₂ Asp49) em preparações nervo-músculo isoladas de vertebrados. Em preparações BC, o veneno causou bloqueio neuromuscular concentração-dependente (0,1–30 µg/mL) que não foi reversível por lavagem, com 50% de bloqueio ocorrendo em 90–15 min. Contratura muscular em resposta à ACh exógena e ao KCl não foram afetadas pelo veneno, mas houve um discreto aumento na liberação de CK após 60 min [UI/mL: de 80 ± 15 (basal) para 113 ± 22; n = 6; *p* > 0,05]. Em preparações NFD, o veneno (1, 10 e 30 µg/mL) produziu marcante facilitação da neurotransmissão (~120% de aumento acima do basal) com a maior concentração seguida por bloqueio neuromuscular completo após 120 min; os efeitos com as menores concentrações foram considerados menos marcantes. O veneno aumentou o conteúdo quântico após 15 e 30 min de incubação seguido por significativa inibição ≥90 min. No entanto, o veneno não alterou o potencial de membrana muscular ou a resposta despolarizante ao carbacol. Em ambas as preparações, incubação a 22–24 °C ao invés de 37 °C atrasou o início do bloqueio, como fez também a inibição da atividade PLA₂ do veneno. Em preparações NFD curarizadas, o veneno produziu apenas uma discreta facilitação muscular. Estes resultados indicam que o veneno de *B. b. smaragdina* causa bloqueio neuromuscular *in vitro* por um mecanismo pré-sináptico envolvendo PLA₂. Também foi investigada a atividade neuromuscular de Bbil-TX, uma PLA₂ com atividade catalítica isolada do veneno de *B. b. smaragdina*, em preparações BC e NFD. Em preparações BC, Bbil-TX (35–702 nM) causou bloqueio tempo- e concentração-dependente que não foi reversível por lavagem; os tempos para causar 50% de bloqueio foram 87 ± 7, 41 ± 7 e 19 ± 2 min (média ± EPM; n = 4–6) para 70, 351 and 702 nM, respectivamente. Contraturas musculares à ACh exógena e KCl não foram alteradas. A toxina (702 nM) também não alterou as respostas contráteis de preparações BC curarizadas (d-Tc; 14,8 µM) e diretamente estimuladas. No entanto, Bbil-TX (702 nM) produziu moderada alteração morfológica (fibras edemaciadas e/ou hipercrômicas) em BC; houve também uma progressiva liberação de CK [UI/mL: de 116 ± 17 (basal) para 961 ± 48 após 60 min; n = 6; *p* < 0,05]. O bloqueio neuromuscular induzido por Bbil-TX (351 nM) foi significativamente inibido a 22–24 °C e o pré-tratamento com *p*-BPB aboliu seu bloqueio. Bbil-TX (210 nM, 702 nM e 2 µM; n = 4–6) causou bloqueio parcial tempo- e concentração-dependente em preparações NFD (52 ± 2% com a maior concentração). Bbil-TX (2 µM) também reduziu significativamente a frequência de PsPTM/min [de 26 ± 2,5 (basal) para 10 ± 1 após 60 min; n = 5; *p* < 0,05] e o conteúdo quântico [de 94 ± 14 (basal) para 24 ± 3 após 60 min; n = 5; *p* < 0,05] de preparações NFD, mas causou apenas uma discreta alteração do potencial de membrana em repouso [de -80 ± 1 mV (basal) para -66 ± 2 mV após 120 min; n = 5; *p* < 0,05], com nenhuma alteração significativa na resposta despolarizante ao carbacol. Estes resultados mostram que Bbil-TX é uma PLA₂ pré-sináptica que contribui para o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno de *B. b. smaragdina*. A atividade neuromuscular do veneno de *B. b. smaragdina* e o mecanismo de ação de Bbil-TX no sistema nervoso periférico foi examinado

também em outras preparações neuromusculares isoladas de camundongo. Em preparações NFD mantidas em solução fisiológica com baixo Ca^{2+} , o veneno de *B. b. smaragdina* (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produziu uma alteração trifásica nas respostas contráteis enquanto que a maior concentração (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produziu uma abrupta e marcante contratatura inicial a qual foi seguida por facilitação neuromuscular, oscilações rítmicas das contrações evocadas, alterações na linha de base e progressivo bloqueio neuromuscular. O veneno também atrasou a fase de relaxamento da resposta contrátil aumentando o tempo de decaimento constante. Em condições de baixo Ca^{2+} , Bbil-TX (210 nM) causou um progressivo aumento na amplitude das respostas contráteis (83 ± 19 % acima dos valores basais após 120 min) em preparações NFD; não houve alteração no tempo de decaimento constante após tratamento com a toxina. O veneno de *B. b. smaragdina* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Bbil-TX (210 nM) causaram discreta alteração na amplitude do potencial de ação composto registrado em preparações NC de camundongo (veneno: $20 \pm 2,1\%$ e toxina: $17 \pm 2,4\%$ de redução abaixo dos valores basais; $n = 3$; $p < 0,05$) e nenhum efeito significativo sobre o tempo de subida e a latência; Tetrodotoxina (3,1 nM) bloqueou os potenciais no final dos experimentos. Em preparações TSn-m, veneno (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Bbil-TX (210 nM) causaram significativa redução na forma de onda perineural associada à corrente K^+ (veneno: $35 \pm 7,2\%$ e toxina: $26 \pm 1,4\%$ de redução abaixo dos valores basais; $p < 0,05$; $n = 3-5$) enquanto que a amplitude da corrente de Na^+ não foi significativamente afetada (veneno: $18 \pm 3,3\%$ e toxina: $15 \pm 2,4\%$ de redução abaixo dos valores basais; $p > 0,05$; $n = 3-5$). Bbil-TX (210 nM) causou aumento nos valores de conteúdo quântico de preparações TSn-m mantidas em baixo Ca^{2+} [de $9,6 \pm 1,1$ (t_0) para $31,4 \pm 7,7$ (t_{60}), $p < 0,05$; $n = 4$]. O veneno (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e toxina (210 nM) induziram aumento na fluorescência ao cálcio em células SK-N-SH marcadas com indicador sensível ao Ca^{2+} Fluo3 AM (4 μM) e mantidas em solução fisiológica com normais condições de Ca^{2+} ou com baixo Ca^{2+} . Em células mantidas em Ca^{2+} normal, o aumento na amplitude de fluorescência foi acompanhado por irregular e frequente movimento de Ca^{2+} . Em preparações TSn-m marcadas com Fluo4 AM (4 μM), o veneno de *B. b. smaragdina* causou imediato aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular de fibras musculares seguido por frequente oscilação na fluorescência e contratatura muscular; Bbil-TX não induziu nenhuma alteração na fluorescência ao cálcio em fibras musculares de preparações TSn-m. Secções de preparações NFD pré-tratadas com Bbil-TX (210 nM) destinadas à imunohistoquímica foram marcadas positivamente para receptores juncionais de ACh mas houve perda de marcação para as proteínas pré-sináptica sinaptofisina e SNAP25. Juntos, estes dados indicam que Bbil-TX tem alta seletividade de ação sobre a região pré-sináptica semelhantemente a outras neurotoxinas PLA_2 modulando a atividade neuromuscular do veneno de *B. b. smaragdina*.

Palavras-chave: atividade pré-sináptica, Bbil-TX, eletrofisiologia celular, junção neuromuscular, PLA_2 Asp49, preparações neuromusculares, veneno de *B. b. smaragdina*.

ABSTRACT

In this work, we examined the neuromuscular activity of *Bothriopsis bilineata smaragdina* (forest viper) venom and its toxin Bbil-TX (Asp49 phospholipase A₂) in vertebrate isolated nerve-muscle preparations. In chick biventer cervicis preparations (BC) the venom caused concentration-dependent (0.1–30 µg/ml) neuromuscular blockade that was not reversed by washing, with 50% blockade occurring in 15–90 min. Muscle contractures to exogenous acetylcholine and KCl were unaffected by the venom, but there was a slight increase in creatine kinase release after 60 min [IU/ml: from 80 ± 15 (basal) to 113 ± 22; n = 6; *p* > 0.05]. In mouse phrenic nerve-diaphragm preparations (PND), the venom (1, 10 and 30 µg/ml) produced marked facilitation (~120% increase above basal) at the highest concentration followed by neuromuscular blockade; the effects at lower concentrations were considerably less marked. The venom increased quantal content values after 15 and 30 min followed by significant inhibition at ≥90 min. However, the venom did not alter the muscle membrane resting potential or the response to exogenous carbachol. In both preparations, incubation at 22 °C instead of 37 °C delayed the onset of blockade, as did inhibition of venom PLA₂ activity. In curarized mouse preparations, the venom produced only muscle facilitation. These results indicate that *B. b. smaragdina* venom causes neuromuscular blockade *in vitro* by a presynaptic mechanism involving PLA₂. It was also investigated the neuromuscular activity of Bbil-TX, a PLA₂ with catalytic activity isolated from *B. b. smaragdina* venom, in BC and PND preparations. In BC preparations, Bbil-TX (35–702 nM) caused time- and concentration-dependent blockade that was not reversed by washing; the times for 50% blockade were 87 ± 7, 41 ± 7 and 19 ± 2 min (mean ± SEM; n = 4–6) for 70, 351 and 702 nM, respectively. Muscle contractures to exogenous ACh and KCl were unaffected. The toxin (702 nM) also did not affect the twitch-tension of directly stimulated, curarized (d-Tc, 14.8 µM) BC preparations. However, Bbil-TX (702 nM) produced mild morphological alterations (edematous and/or hyperchromic fibers) in BC; there was also a progressive release of CK [IU/ml: from 116 ± 17 (basal) to 961 ± 48 after 60 min; n = 6; *p* < 0.05]. Bbil-TX (351 nM)-induced blockade was markedly inhibited at 22–24 °C and pretreatment with *p*-BPB abolished the neuromuscular blockade. Bbil-TX (210 nM, 702 nM and 2 µM; n = 4–6) caused partial time- and concentration-dependent blockade in PND preparations (52 ± 2% at the highest concentration). Bbil-TX (2 µM) markedly reduced the MEPPs frequency/min [from 26 ± 2.5 (basal) to 10 ± 1 after 60 min; n = 5; *p* < 0.05] and the quantal content [from 94 ± 14 (basal) to 24 ± 3 after 60 min; n = 5; *p* < 0.05] of PND preparations, but caused only minor depolarization of the membrane resting potential [from -80 ± 1 mV (basal) to -66 ± 2 mV after 120 min; n = 5; *p* < 0.05], with no significant change in the depolarizing response to exogenous carbachol. These results show that Bbil-TX is a presynaptic PLA₂ that contributes to the neuromuscular blockade caused by *B. b. smaragdina* venom. The neuromuscular activity of *B. b. smaragdina* venom and the mechanism of action of Bbil-TX on peripheral nervous system have been further examined in mouse nerve-muscle preparations *in vitro*. In PND preparations maintained in low Ca²⁺ physiological salt solution (PSS), *B. b. smaragdina* venom (3 µg/ml) caused a triphasic change in twitch height while the

highest concentration (10 µg/ml) produced an abrupt and marked initial contracture which was followed by neuromuscular facilitation, rhythmic oscillation of nerve evoked twitch, alteration in base line and progressive blockade. The venom also slowed the relaxation phase of the muscle twitch increasing the constant decay time. Under low Ca²⁺ conditions, Bbil-TX caused a progressive increase in twitch amplitude (83 ± 19 % above basal values after 120 min) in PND preparations; there was no change in the constant decay time after treatment with toxin. *B. b. smaragdina* venom (10 µg/ml) and Bbil-TX (210 nM) caused minor changes in the amplitude of the compound action potential (CAP) recorded from SN preparations (venom: 20 ± 2.1 % and toxin: 17 ± 2.4 % of reduction below basal values; n = 3; p < 0.05) and no significant effect on rise time and latency; tetrodotoxin (3.1 M) blocked the CAP at the end of the experiments. In TSn-m preparations, both venom (10 µg/ml) and Bbil-TX (210 nM) caused significant reduction in the perineural waveform associated with the outward K⁺ current (venom: 35 ± 7.2 % and toxin: 26 ± 1.4 % of reduction below basal values; p < 0.05; n = 3–5) while the amplitude of the inward Na⁺ current was not significantly affected (venom: 18 ± 3.3 % and toxin: 15 ± 2.4 % of reduction below basal values; p > 0.05; n = 3–5). Bbil-TX (210 nM) caused progressive increase in quantal content in TSn-m preparations maintained in low Ca²⁺ PSS [from 9.6 ± 1.1 (t₀) to 31.4 ± 7.7 (t₆₀), p < 0.05; n = 4]. Venom (3 µg/ml) and toxin (210 nM) induced increase in calcium fluorescence in neuroblastoma cell line SK-N-SH loaded with calcium sensitive indicator Fluo3 AM (4 µM) and maintained in low Ca²⁺ or normal Ca²⁺ PSS. In those cells maintained in normal Ca²⁺ PSS, the increase in fluorescence amplitude was accompanied by irregular and frequent calcium transients. In TSn-m preparations loaded with Fluo4 AM (4 µM), *B. b. smaragdina* venom (10 µg/ml) caused immediate increase in Ca²⁺ intracellular of muscle fibres followed by frequent oscillation in fluorescence and muscle contracture; Bbil-TX did not induce any change in calcium fluorescence in TSn-m preparations. Immunohistochemical sections of PND preparations pretreated with Bbil-TX (210 nM) were labeled positively for junctional ACh receptors but there was loss of labeling for presynaptic proteins synaptophysin and SNAP25. Together, these data indicate that Bbil-TX has high selectivity of action under the presynaptic region similarly as other PLA₂ neurotoxins modulating the neuromuscular activity of *B. b. smaragdina* venom.

Keywords: presynaptic activity, Bbil-TX, cell electrophysiology, neuromuscular junction, Asp49 PLA₂, neuromuscular preparations, *B. b. smaragdina* venom.

LISTAS

ILUSTRAÇÕES:

Figura 01. Epidemiologia dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil	30
Figura 02. Subespécies arborícolas do gênero <i>Bothriopsis</i>	31
Figura 03. Junção neuromuscular	35
Figura 04. Reciclagem de vesículas sinápticas	36
Figura 05. Complexo SNARE simplificado	36
Figura 06. Preparação biventer cervicis isolada de pintainho.....	51
Figura 07. Preparação nervo-frênico diafragma isolada de camundongo	52
Figura 08. Região de placa terminal em hemidiafragma de camundongo.....	54
Figura 09. Preparação nervo-ciático isolada de camundongo.....	58
Figura 10. Preparação nervo-músculo triangular externo isolada de camundongo	60
Figura 11. Atividade neuromuscular do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> em preparações BC.....	68
Figura 12. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre fibras musculares e receptores nicotínicos em preparações BC	69
Figura 13. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre preparações BC curarizadas	70
Figura 14. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre preparações BC mantidas em baixa temperatura.....	71
Figura 15. Atividade neuromuscular do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> em preparações NFD	72
Figura 16. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre preparações NFD curarizadas	73

Figura 17. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre preparações NFD mantidas em baixa temperatura	74
Figura 18. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> pré-tratado com <i>p</i> -BPB sobre preparações NFD	75
Figura 19. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre conteúdo quântico em preparações NFD	76
Figura 20. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre a frequência de PsPTM em preparações NFD	77
Figura 21. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre o potencial de membrana em repouso em preparações NFD	78
Figura 22. Cromatografia do veneno total de <i>B. b. smaragdina</i> em coluna Sephadex G-75	79
Figura 23. Atividade PLA ₂ comparada entre veneno total de <i>B. b. smaragdina</i> e picos P ₁ –P ₃	80
Figura 24. Atividade neuromuscular dos picos P ₁ -P ₃ em preparações BC e NFD	81
Figura 25. Efeito dos picos P ₂ e P ₃ sobre o conteúdo quântico em preparações NFD	83
Figura 26. Efeito dos picos P ₂ e P ₃ sobre a frequência de PPTM/min em preparações NFD	84
Figura 27. Cromatografia do pico P ₂ em coluna μ -Bondapack C-18 acoplada ao sistema HPLC de fase reversa	85
Figura 28. Eletroforese em SDS-PAGE e atividade PLA ₂ da fração P ₂ -III (Bbil-TX)	86
Figura 29. Atividade neuromuscular de Bbil-TX em preparações BC.....	87
Figura 30. Efeito de Bbil-TX sobre fibras musculares e receptores nicotínicos em preparações BC.....	88

Figura 31. Efeito de Bbil-TX sobre preparações BC curarizadas	89
Figura 32. Atividade neuromuscular de Bbil-TX em preparações NFD	90
Figura 33. Efeito de Bbil-TX sobre o conteúdo quântico em preparações NFD ...	91
Figura 34. Efeito de Bbil-TX sobre a frequência de PPTM/min em preparações NFD	92
Figura 35. Efeito de Bbil-TX sobre o potencial de membrana em repouso em preparações NFD	93
Figura 36. Alterações morfológicas em preparações BC pré-expostas ao veneno de <i>B. b. smaragdina</i>	94
Figura 37. Alterações morfológicas em preparações NFD pré-expostas ao veneno de <i>B. b. smaragdina</i>	95
Figura 38. Alterações morfológicas em preparações BC pré-expostas à Bbil-TX.....	96
Figura 39. Alterações morfológicas em preparações NFD pré-expostas à Bbil-TX.....	96
Figura 40. Atividade neuromuscular do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> em preparações NFD mantidas em baixo Ca ²⁺	98
Figura 41. Atividade neuromuscular de Bbil-TX e Taipoxina em preparações NFD mantidas em baixo Ca ²⁺	101
Figura 42. Atividade PLA ₂ do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> , Bbil-TX e Taipoxina na presença de Ca ²⁺ 1,8 mM e Ca ²⁺ 0,4 mM em temperatura ambiente.....	102
Figura 43. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> e Bbil-TX sobre o potencial de ação composto em preparação NC	103
Figura 44. Efeito de Bbil-TX e Taipoxina sobre o conteúdo quântico em preparações TSn-m mantidas em baixo Ca ²⁺	105

Figura 45. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> e Bbil-TX sobre as correntes perineurais em preparação TSn-m	108
Figura 46. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> e Bbil-TX sobre o movimento espontâneo de Ca ²⁺ intracelular de células SK-N-SH	110
Figura 47. Efeito de Bbil-TX sobre o movimento espontâneo de Ca ²⁺ intracelular de fibras musculares em preparações TSn-m	111
Figura 48. Efeito do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> sobre o movimento espontâneo de Ca ²⁺ intracelular de fibras musculares em preparações TSn-m ...	113
Figura 49. Imunohistoquímica controle para marcação de sinaptofisina, SNAP25 e receptores nicotínicos em preparações NFD.....	114
Figura 50. Imunohistoquímica para marcação de sinaptofisina, SNAP25 e receptores nicotínicos em preparações NFD pré-tratadas com Bbil-TX.....	115

TABELAS:

Tabela 01. Toxinas pré-sinápticas e serpentes de origem.....	39
Tabela 02. Medida do conteúdo quântico em preparações NFD tratadas com veneno de <i>B. b. smaragdina</i>	76
Tabela 03. Medida da frequência de PPTM/min em preparações NFD tratadas com veneno de <i>B. b. smaragdina</i>	77
Tabela 04. Medida do conteúdo quântico em preparações NFD tratadas com P ₂ e P ₃	83
Tabela 05. Medida da frequência de PPTM/min em preparações NFD tratadas com P ₂ e P ₃	84
Tabela 06. Medida do conteúdo quântico em preparações NFD tratadas com Bbil-TX.....	91

Tabela 07. Medida da frequência de PPTM/min em preparações NFD tratadas com Bbil-TX.....	92
Tabela 08. Parâmetros miográficos registrados de preparações NFD mantidas em baixo Ca ²⁺ e expostas ao veneno de <i>B. b. smaragdina</i>	99
Tabela 09. Medida do conteúdo quântico em preparações TSn-m tratadas com Bbil-TX e Taipoxina	104
Tabela 10. Parâmetros eletrofisiológicos registrados de preparações NC tratadas com veneno de <i>B. b. smaragdina</i> e Bbil-TX	106
Tabela 11. Medida das correntes perineurais em preparações TSn-m tratadas com veneno de <i>B. b. smaragdina</i> e Bbil-TX	109
Tabela 12. Comparação da potência bloqueadora neuromuscular de Bbil-TX com outras PLA ₂ pré-sinápticas de <i>Bothrops</i>	123

ABREVIATURAS:

ACh	Acetilcolina
BC	Biventer cervicis
BSA	Solução albumina sérica bovina
Cch	Carbacol
CK	Creatino quinase
CQ	Conteúdo quântico
d-Tc	d-Tubocurarina
EPM	Erro padrão da média
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HPLC	High performance liquid chromatography
KCl	Cloreto de potássio
NFD	Nervo-frênico diafragma
NC	Preparação nervo ciático de camundongo
p-BPB	Brometo de p-bromofenacila
PLA₂	Fosfolipase A ₂

PM	Potencial de membrana em repouso.
PPT	Potencial de placa terminal
PPTM	Potencial de placa terminal em miniatura
SNARE	Soluble NSF attachment receptor
SK-N-SH	Linhagem celular de neuroblastoma
TBS	Solução tampão salina tris
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
TSn-m	Preparação nervo-músculo triangular de camundongo
VT	Veneno total
w	Lavagem “ <i>washing</i> ”

NOTAÇÕES:

mg	Miligrama: milésima parte do grama.
µg	Micrograma: milésima parte do miligrama.
mL	Mililitro: milésima parte do litro.
µL	Microlitro: milésima parte do mililitro.
M	Molar
mM	Milimolar: milésima parte do molar (10^{-3} M).
µM	Micromolar: milésima parte do milimolar (10^{-6} M).
nM	Nanomolar: milésima parte do micromolar (10^{-9} M)
Hz	Hertz: frequência de estimulação.
ms	Milissegundo: duração do estímulo.
V	Volts: unidade de tensão elétrica.
mV	Milivolts: unidade de tensão elétrica (10^{-3} V).
MΩ	Megaohm: unidade de resistência elétrica.
Vo	Velocidade de reação na razão nanomolar/minuto (nmoles/min).
kDa	Quilo Dalton: 1 kDa é aproximadamente o peso molecular de um átomo de hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1. EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL	29
1.2. GÊNERO <i>Bothrops</i>	30
1.3. GÊNERO <i>Bothriopsis</i>	31
1.4. VENENO DA SERPENTE <i>Bothriopsis bilineata</i>	33
1.5. FISIOPATOLOGIA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR.....	34
1.5.1. <i>Mecanismos que regem a transmissão neuromuscular</i>	34
1.5.2. <i>Atividade neuromuscular de venenos e toxinas ofídicas</i>	37
1.6. FOSFOLIPASE A ₂	41
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	45
3.1. OBJETIVO GERAL	46
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. REAGENTES	48
4.2. MATERIAL BIOLÓGICO DE INTERESSE	48
4.2.1. <i>Veneno total da serpente B. b. smaragdina</i>	48
4.2.2. <i>Frações não puras (picos P₁–P₃) e PLA₂ (Bbil-TX)</i>	48
4.3. ANIMAIS.....	50
4.3.1. <i>Providos pela Universidade Estadual de Campinas</i>	50

4.3.2. <i>Providos pela University of Strathclyde</i>	50
4.4. PREPARAÇÃO ISOLADA MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO	50
4.5. PREPARAÇÃO ISOLADA NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO – UNICAMP	51
4.6. PREPARAÇÃO ISOLADA NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO – UNIVERSITY OF STRATHCLYDE	53
4.7. ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO	53
4.7.1. <i>Registro do potencial de membrana em repouso em hemidiafragma de camundongo</i>	54
4.7.2. <i>Registro do potencial de placa terminal em miniatura em hemidiafragma de camundongo</i>	55
4.7.3. <i>Técnica cut muscle e registro do potencial de placa terminal em hemidiafragma de camundongo</i>	55
4.7.4. <i>Análise dos PPT: medida do conteúdo quântico</i>	56
4.7.5. <i>Registro extracelular do potencial de ação composto em nervo-ciático de camundongo</i>	56
4.7.6. <i>Registro extracelular de correntes perineurais e registro intracelular de PsPT em preparação nervo-músculo triangular esterno de camundongo</i>	58
4.8. CULTURA CELULAR: LINHAGEM CELULAR DE NEUROBLASTOMA (SK-N-SK)	60
4.9. IMAGEM DE CÁLCIO.....	61
4.10. ATIVIDADE PLA ₂	62
4.11. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PLA ₂	62
4.12. ANÁLISE MORFOLÓGICA	63
4.13. MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE <i>CREATINE KINASE (CK)</i>	63

4.14. IMUNOHISTOQUÍMICA	63
4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5. RESULTADOS.....	66
5.1. EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i> SOBRE PREPARAÇÃO ISOLADA MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO (BC)	67
5.1.1. Registro miográfico	67
5.1.2. Respostas contraturantes à ACh e ao KCl na vigência do bloqueio neuromuscular completo pelo veneno de <i>B. b. smaragdina</i>	69
5.1.3. Registro miográfico em preparações pré-tratadas com d-Tubocurarina.....	69
5.1.4. Atenuação da atividade PLA ₂ : estudo em baixa temperatura e com p-BPB (inibidor-PLA ₂)	70
5.2. EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i> SOBRE PREPARAÇÃO ISOLADA NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO (NFD)	71
5.2.1. Registro miográfico	71
5.2.2. Registro miográfico em preparações pré-tratadas com d-Tubocurarina.....	72
5.2.3. Atenuação da atividade PLA ₂ : estudo em baixa temperatura e com p-BPB (inibidor-PLA ₂)	73
5.2.4. Medida dos valores do conteúdo quântico a partir do registro de potenciais de placa terminal evocados (PPT).....	75
5.2.5. Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM): frequência e amplitude.....	76
5.2.6. Medida do potencial de membrana em repouso (PM)	77
5.3. CROMATOGRAFIA DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i>	78

5.3.1. Exclusão molecular em coluna Sephadex-G75.....	78
5.3.2. Atividade PLA ₂ dos picos isolados.....	79
5.3.3. Registro miográfico em preparações BC e NFD tratadas com picos P ₁ -P ₃	80
5.3.4. Estudo eletrofisiológico dos picos P ² e P ³ isolados do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> : medida do potencial de membrana em repouso (PM) e do valor do conteúdo quântico (CQ) em preparações NFD.....	82
5.3.5. Estudo eletrofisiológico dos picos P ₂ e P ₃ isolados do veneno de <i>B. b. smaragdina</i> : registro de PPTM em preparações NFD – frequência e amplitude.....	83
5.4. ESTUDO CROMATOGRÁFICO DO P ₂	84
5.4.1. HPLC de fase reversa.....	84
5.4.2. Eletroforese em SDS-PAGE e atividade PLA ₂ da fração P ₂ -III (<i>Bbil-TX</i>).....	85
5.5. EFEITOS DA TOXINA <i>Bbil-TX</i> SOBRE PREPARAÇÃO ISOLADA MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO (BC).....	86
5.5.1. Registro miográfico.....	86
5.5.2. Respostas contraturantes à ACh e ao KCl na vigência do bloqueio neuromuscular completo causado pela <i>Bbil-TX</i>	87
5.5.3. Registro miográfico em preparações pré-tratadas com <i>d-Tubocurarina</i>	88
5.5.4. Atenuação da atividade PLA ₂ : estudo em baixa temperatura e com <i>p-BPB</i> (inibidor-PLA ₂).....	89
5.6. EFEITOS DA TOXINA <i>Bbil-TX</i> SOBRE PREPARAÇÃO ISOLADA NERVO-FRÊNICO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO (NFD).....	90
5.6.1. Registro miográfico.....	90

5.6.2. Medida dos valores do conteúdo quântico a partir do registro de potenciais de placa terminal evocados (PPT).....	90
5.6.3. Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM): frequência e amplitude.....	91
5.6.4. Medida do potencial de membrana em repouso (PM)	92
5.7. ESTUDO MORFOLÓGICO	93
5.7.1. Alterações morfológicas causadas pelo veneno total de <i>B. b. smaragdina</i> em preparações BC e NFD	93
5.7.2. Alterações morfológicas causadas por Bbil-TX em preparações BC e NFD	95
5.7.3. Liberação de creatine kinase (CK) em preparações BC	97
5.8. EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i> SOBRE PREPARAÇÕES NFD INCUBADAS EM BAIXO Ca ²⁺	97
5.9. EFEITOS DA TOXINA Bbil-TX SOBRE PREPARAÇÕES NFD INCUBADAS EM BAIXO Ca ²⁺	100
5.10. ATIVIDADE PLA ₂ DO VENENO DE <i>B. b. smaragdina</i> , Bbil-TX e Taipoxina EM BAIXO Ca ²⁺ E TEMPERATURA AMBIENTE	101
5.11. EFEITOS DE Bbil-TX E taipoxina SOBRE OS VALORES DO CONTEÚDO QUÂNTICO EM PREPARAÇÕES TSn-m MANTIDAS EM BAIXO Ca ²⁺	101
5.12. EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i> E Bbil-TX SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO COMPOSTO EM NERVO CIÁTICO DE CAMUNDONGO	104
5.13. EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i> E Bbil-TX SOBRE AS FORMAS DE ONDA PERINEURAIS EM PREPARAÇÕES TSn-m	107
5.14. EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i> E Bbil-TX SOBRE O MOVIMENTO ESPONTÂNEO DE Ca ²⁺ EM CÉLULAS SK-N-SH.....	109

5.15. EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>B. b. smaragdina</i> E Bbil-TX SOBRE O MOVIMENTO ESPONTÂNEO DE Ca ²⁺ EM PREPARAÇÕES TSn-m.....	110
5.16. IMUNOHISTOQUÍMICA	113
6. DISCUSSÃO	116
7. CONCLUSÃO	128
8. REFERÊNCIAS.....	130
9. ANEXOS	143
9.1. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNICAMP.....	144
9.2. ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS REFERENTES AO PROJETO DE PESQUISA.....	145

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL

O acidente ofídico é um importante problema de saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais e ainda é considerado uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, os acidentes de interesse médico são causados por serpentes dos gêneros *Micrurus* (Família Elapidae, Subfamília Elapinae), *Crotalus*, *Bothrops* e *Lachesis* (Família Viperidae, Subfamília Crotalinae) amplamente distribuídas no território nacional (Brasil, 2011)

Foram registrados no Brasil 29.635 acidentes ofídicos em 2010, dentre os quais 85% foram ocasionados por serpentes peçonhentas, sendo o restante por serpentes não-peçonhentas e ou não identificadas. Uma vez que a identificação da serpente nem sempre é possível de ser feita, o diagnóstico do tipo de envenenamento é baseado em critérios clínicos e epidemiológicos. Dentre os acidentes causados por serpentes dos gêneros de interesse médico, os botrópicos são predominantes (73,5%), fato que se deve à grande diversidade de espécies e sua ampla distribuição no território nacional. Acidentes crotálicos (7,5%), laquéuticos (3%) e elapídicos (1%) completam o quadro epidemiológico. Poucos casos são diagnosticados como acidentes por serpentes não peçonhentas (3%), por outro lado, em 12% dos acidentes notificados a serpente não foi identificada (Figura 1). Do total de acidentes por serpentes peçonhentas, ocorreram 146 mortes, sendo que 92 delas foram ocasionadas por jararacas (incidência: 15,5 acidentes/100.000 habitantes; letalidade: 0,5%), porém os acidentes crotálicos representam o maior índice de letalidade (1,1%) (Brasil, 2011).

Nota-se um número significativo de acidentes em que a serpente causadora não é identificada, o que conseqüentemente dificulta o diagnóstico do envenenamento atrasando o efeito da intervenção soroterápica, ou até mesmo sendo esta ineficaz. Assim, os sintomas mais comuns do envenenamento ofídico como edema, equimose, necrose, rabdomiólise, hemorragia, insuficiência renal (IRA) e respiratória acentuam-se na vítima podendo levá-la a óbito. Conhecer os principais componentes das peçonhas, bem como seus mecanismos de ação, é importante para contribuir na

identificação da serpente a partir dos sinais de envenenamento e aprimorar as vias de tratamento.

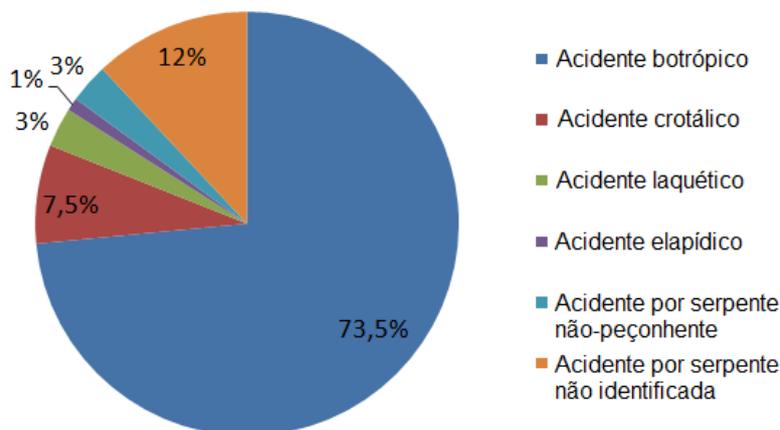


Figura 01. Dados epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos em 2010 no Brasil. (Brasil, 2011).

1.2. GÊNERO *Bothrops*

Recentes reformulações taxonômicas, fundamentadas em reconhecer a evolução, distribuição geográfica e morfologia comparada de linhagens distintas de serpentes, afetaram diretamente a taxonomia do gênero *Bothrops*, sendo este atualmente preservado, mas fragmentado em outros quatro gêneros distintos: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis*. Neste trabalho, para citações não específicas, o termo “botrópico(a)” será usado para abranger os gêneros citados neste parágrafo (Uetz et al., 2011; Bérnils e Costa, 2011).

No território brasileiro, serpentes botrópicas compreendem 26 espécies (Bérnils e Costa, 2011) que são responsáveis por 73% dos acidentes ofídicos. De acordo com o Ministério da Saúde, mais de 18.000 acidentes botrópicos ocorreram no último ano no país, com taxa de mortalidade de aproximadamente 0,5% dos casos tratados (Zeni et al., 2007; Pinho e Pereira, 2001; Brasil, 2011).

O veneno de serpentes botrópicas apresenta uma complexa mistura de toxinas com diferentes propriedades tóxicas e enzimáticas que são usadas para imobilização e eventual morte da presa. Entre os componentes do veneno estão incluídas neurotoxinas e enzimas como as fosfolipases, fosfodiesterases,

metaloproteinases e proteases que agem degradando proteínas dos tecidos de maneira não específica clivando proteínas plasmáticas por hidrólise e alterando o funcionamento das plaquetas (Braud et al., 2000; Matsui et al., 2000; Soares et al., 1997; Porto et al., 2007).

Tais substâncias podem ter atividades hemorrágica, coagulante, proteolítica e miotóxica que resultam em processos inflamatórios, destruição dos tecidos e dano à parede dos vasos sanguíneos (Teibler et al., 1999; Vieira et al., 2004; Spadacci-Morena et al., 2006; Santoro et al., 2008).

1.3. GÊNERO *Bothriopsis*

Existem seis espécies do gênero *Bothriopsis* na América do Sul (família Viperidae), comumente conhecidas como jararacas de floresta: *B. bilineata*, *B. chloromelas*, *B. medusa*, *B. oligolepis*, *B. pulchra* e *B. taeniata*. Particularmente a espécie *B. bilineata* inclui duas subespécies reconhecidas: *B. b. bilineata* e *B. b. smaragdina* (Uetz et al., 2011).

As espécies *Bothriopsis bilineata* e *Bothriopsis taeniata* manifestam hábito semi-arborícola (Figura 2), camuflando-se com a folhagem da vegetação, e se distribuem predominantemente na floresta Amazônica, tendo mamíferos, anuros e aves como principal dieta alimentar (Campbell e Lamar, 2004; Fenwick et al., 2009).

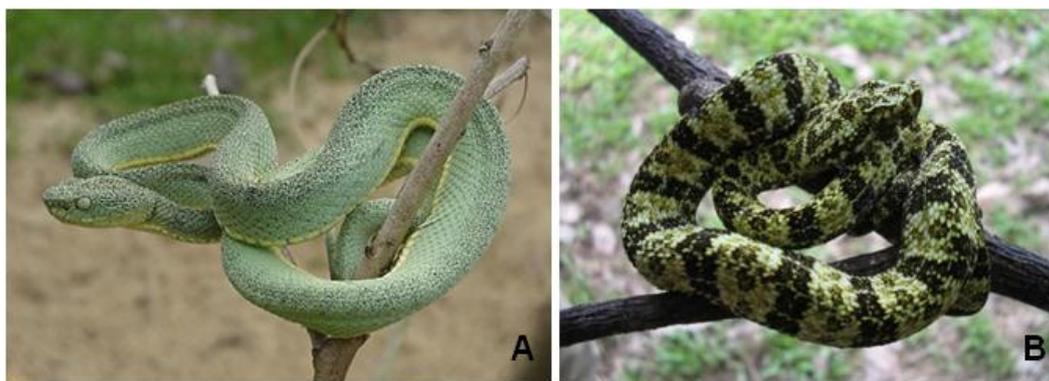


Figura 02. Subespécies arborícolas do gênero *Bothriopsis*. **A.** *Bothriopsis bilineata smaragdina*. **B.** *Bothriopsis taeniata* (Uetz et al., 2011)

Em relatos de acidentes humanos (Torrez et al., 2009), o veneno de *Bothriopsis taeniata* causou edema acentuado no membro acometido (inferior direito) sem evidência de necrose e ou hemorragia no local da picada

(tornozelo direito). Os exames laboratoriais revelaram apenas uma pequena alteração de glóbulos brancos após duas horas do envenenamento, o que sugere a indução de reação inflamatória. Os sinais vitais da vítima permaneceram estáveis mesmo antes do tratamento soroterápico, o qual foi eficiente na neutralização do efeito anticoagulante do veneno de *B. taeniata* que, segundo Kuch et al. (1996), é uma característica marcante do veneno desta serpente, além das atividades hemorrágica e miotóxica.

Em estudo de caracterização enzimática e biológica dos venenos de serpentes amazônicas (*Bothriopsis bilineata* e *Bothriopsis taeniata*), camundongos intoxicados experimentalmente com 5 e 10 µg de veneno bruto de *B. taeniata* apresentaram acentuada hemorragia peritoneal (local de injeção do veneno), efeito que está associado a atividade enzimática e proteolítica dos venenos de serpentes da família Viperidae. A atividade enzimática é responsável por alteração de coagulação sanguínea e por efeitos mionecróticos causados por veneno de serpentes botrópicas. O veneno de *B. taeniata* também induziu recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal em camundongos intoxicados de forma dose-dependente, caracterizando intensa resposta inflamatória. A migração de neutrófilos na reação inflamatória de ambos os venenos testados é particularmente dependente de metaloproteinase (Porto et al., 2007).

Para Kuch et al. (1996) a atividade coagulante do veneno de *Bothriopsis taeniata*, considerada como o maior fator de letalidade (DL50), é similar à atividade dos venenos das espécies *Bothrops asper* e *Bothrops atrox*, tipicamente coagulantes.

A análise cromatográfica do conteúdo enzimático do veneno de *Bothriopsis oligolepis* (coluna de Sephadex G-100) revelou três picos de proteínas com atividade para fosfodiesterase, protease e PLA₂. A atividade proteolítica responsável pelos fenômenos de incoagulabilidade, hemorragia, lesões de membranas e destruição de lipídios de tecidos distintos foi causada principalmente por PLA₂ (Lerma et al., 2004).

Vários estudos recentes têm mostrado que venenos de *Bothrops* (Zamúner et al., 2004; Abreu et al., 2007) e suas PLA₂ (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Gallacci e Cavalcante, 2010) podem produzir bloqueio neuromuscular *in vitro*. Embora o principal sítio de ação para este bloqueio pareça ser pós-

sináptico, há evidências de componentes pré-sinápticos nessa resposta (Cogo et al., 1998; Borja-Oliveira et al., 2003; Rodrigues-Simioni et al., 2004). Em contraste com os venenos de *Bothrops*, pouco é conhecido acerca da atividade neuromuscular dos gêneros relacionados como *Bothriechis* e *Bothriopsis* (antigamente incluídos no gênero *Bothrops*) (Campbell e Lamar, 2004). Os venenos de *Bothriopsis* contém L-aminoácido oxidase, esterase, peptidase, fosfodiesterase, PLA₂ e atividade proteolítica, bem como atividade coagulante, hemorrágica e miotóxica (Kuch et al., 1996; Porto et al., 2007; Furtado et al., 2010). Outras atividades biológicas desses venenos tem sido pouco estudadas.

1.4. VENENO DA SERPENTE *Bothriopsis bilineata*

Nossos experimentos preliminares em preparações neuromusculares isoladas de aves e mamíferos *in vitro* mostraram que o veneno da serpente *Bothriopsis bilineata* apresenta alta neurotoxicidade, que foi semelhante a outros venenos botrópicos que também induzem bloqueio da transmissão neuromuscular como o da *Bothrops insularis* (Cogo et al. 1993), *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops marajoensis* (Rodrigues-Simioni et al. 2004, Cavalcante et al., 2011). Apesar de o envenenamento por serpentes da espécie em estudo não representar problema de saúde pública por sua distribuição se limitar a regiões pouco habitadas, as manifestações clínicas relatadas são similares ao de outras espécies botrópicas sem manifestação de neurotoxicidade (Warrell, 2004).

A neurotoxicidade é uma atividade atípica em casos de envenenamento por serpentes botrópicas, mas quando presente pode indicar um processo de divergência adaptativa da espécie, pois os componentes das peçonhas podem variar entre as espécies, podendo haver variabilidade até mesmo na população. Fatores como estado fisiológico, nicho ecológico, habitat e dieta alimentar participam na modificação de seu conteúdo total, induzindo à produção maciça de um ou mais tipos de proteínas, ao desaparecimento ou à aparição de um novo fator protéico (Russel, 1983).

Porto et al. (2007) relataram que em camundongos intoxicados experimentalmente com veneno da serpente *B. bilineata*, houve importante atividade inflamatória, quantificada pela migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (local de injeção), porém menos intensa, quando

comparada à atividade induzida pelo veneno da serpente *B. taeniata*. A marcante atividade hemorrágica do veneno da *B. taeniata* não foi vista nos animais intoxicados com o veneno de *B. bilineata*.

A *B. b. smaragdina* é citada como uma das principais serpentes responsáveis por acidentes no Peru (Zavaleta e Salas, 1996).

1.5. FISIOPATOLOGIA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

1.5.1. Mecanismos que regem a transmissão neuromuscular

A junção neuromuscular (placa motora) é a região de inserção das terminações nervosas nas fibras musculares. As membranas da célula nervosa “pré-sináptica” e da célula muscular “pós-sináptica” são separadas por uma fenda com cerca de 20 a 30 nm (fenda sináptica), local de liberação de neurotransmissores. Próximo à placa motora, o axônio perde a bainha de mielina e se divide em vários ramos delgados (aproximadamente 2 μm de espessura), tendo em cada uma de suas extremidades múltiplas expansões denominadas de “botões sinápticos”, pelos quais os neurotransmissores são liberados para a fenda sináptica. Cada botão fica sobreposto às fendas subneurais (depressões profundas na superfície da fibra muscular), local de alta densidade de receptores colinérgicos (Figura 3). Cada botão sináptico contém a maquinaria necessária para liberar o neurotransmissor, que inclui: vesículas sinápticas (armazenam acetilcolina – ACh), complexo de acoplamento (complexo protéico de exocitose das vesículas), zona ativa (sítio de liberação do neurotransmissor) e canais de Ca^{2+} voltagem-dependente (permitem a entrada de Ca^{2+} na terminação a cada potencial de ação). O Ca^{2+} desencadeia a fusão das vesículas sinápticas com a zona ativa, liberando seu conteúdo para a fenda sináptica (Guyton, 2002; Kandell et al., 1997).

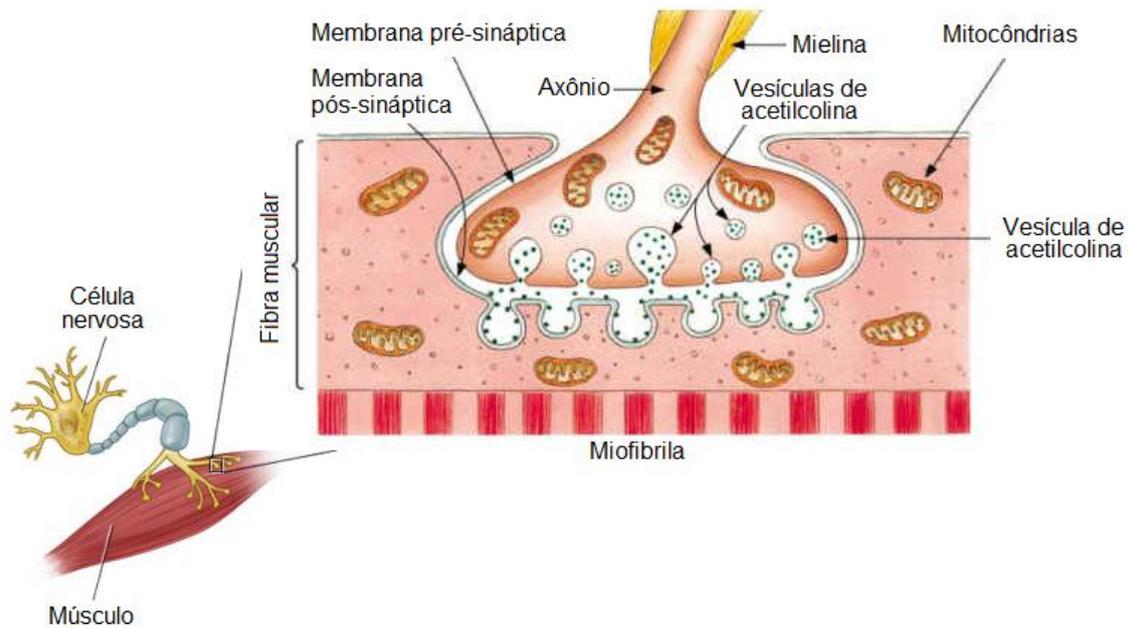


Figura 03. Junção neuromuscular.

Quando um potencial de ação se propaga pelo terminal, canais de Ca^{2+} voltagem-dependente se abrem permitindo o influxo em massa deste íon para o interior da terminação nervosa. Por sua vez, admite-se que os íons Ca^{2+} exerçam influência sobre as vesículas de ACh, atraindo-as para a membrana pré-sináptica adjacente aos sítios de liberação. A seguir as vesículas se fundem com a membrana e liberam ACh, na fenda sináptica, pelo processo de exocitose. O processo de fusão das vesículas de ACh à membrana celular pré-sináptica é desencadeado pela ação das proteínas do complexo SNARE. As vesículas sinápticas são transportadas pelos filamentos de citoesqueleto até se ligarem às zonas ativas da membrana pré-sináptica próximas a canais de Ca^{2+} , processo denominado de *tethering* ou *targeting*. A vesícula então se ancora (*docking*) com o complexo molecular SNARE imediatamente adjacente a um canal de Ca^{2+} , sendo ATPase-dependente o processo de engatilhamento da maquinaria de fusão (*priming*). Assim, a vesícula sináptica pode proceder a fase de fusão com a membrana plasmática (*fusion*) e liberar seu conteúdo (ACh) para a fenda sináptica quando a concentração de Ca^{2+} alcança um nível crítico. A vesícula vazia é então re-captada e reciclada no terminal nervoso (Guyton, 2002; Chapman, 2008).

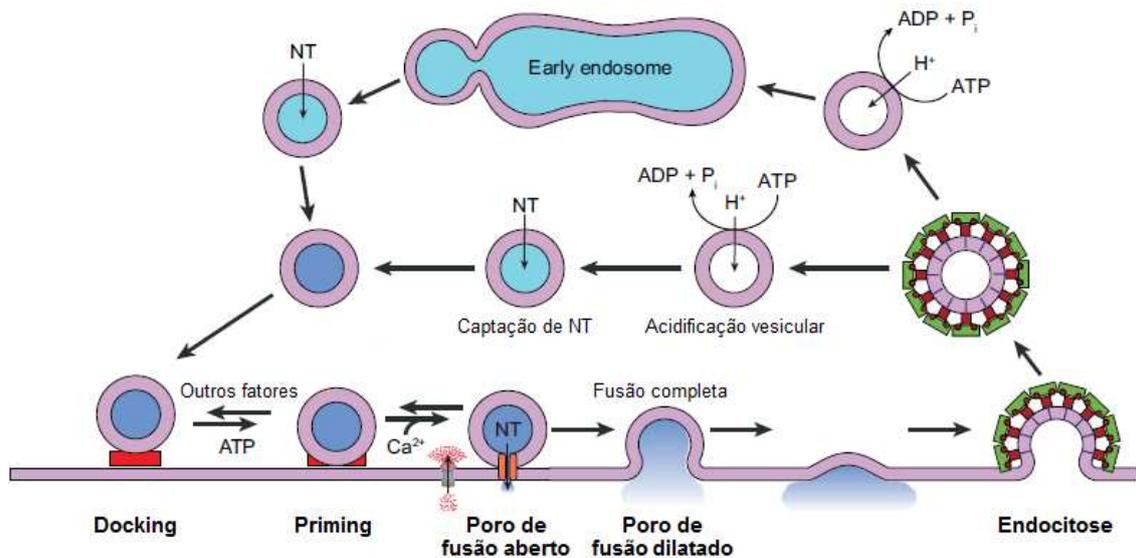


Figura 04. Reciclagem de vesículas sinápticas no terminal nervoso. Abreviação: NT; neurotransmissor (Chapman, 2008).

A exocitose neuronal é mediada por proteínas do complexo SNARE que podem estar associadas às vesículas sinápticas (*v*-SNARE - sinaptobrevina) ou à membrana plasmática pré-sináptica (*t*-SNARE – sintaxina e SNAP-25). O núcleo deste complexo protéico é constituído por um feixe de quatro hélices em que a SNAP-25 contribui com duas hélices, e sinaptobrevina e sintaxina - com suas âncoras de membrana incorporadas na vesícula e na membrana plasmática, respectivamente – contribuem com uma hélice cada (Figura 5) (Chapman, 2008). Após fusão completa, os neurotransmissores (ACh) são então liberados na fenda sináptica ficando livres para interagir com os receptores colinérgicos subjacentes à membrana plasmática da fibra muscular.

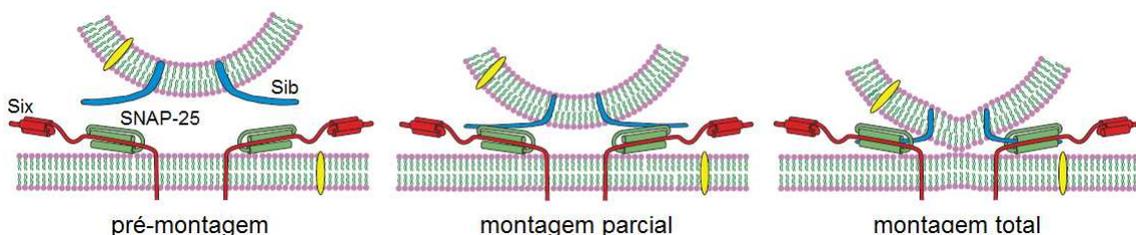


Figura 05. Complexo SNARE simplificado durante o processo de fusão da vesícula à membrana plasmática do terminal nervoso. Abreviação: Sib (Sinaptobrevina); Six (Sintaxina) (Chapman, 2008).

Os receptores colinérgicos são canais iônicos regulados pela ACh que permanecem contraídos até que duas moléculas de ACh se fixem, respectivamente, às duas α -subunidades das proteínas. Isso acarreta alteração conformacional que abre o canal permitindo um grande influxo de íons Na^+ para o interior da fibra muscular. Uma variação local de potencial positivo é criada no interior da membrana da fibra muscular, denominado de *potencial de placa motora*. Por sua vez, esse potencial da placa motora inicia um potencial de ação, que se propaga ao longo da membrana muscular e, dessa forma, acarreta a contração muscular. Uma vez liberada na fenda sináptica, a ACh continua ativando os receptores colinérgicos enquanto persistir ali, entretanto, a maior parte é degradada pela enzima acetilcolinesterase, principalmente, ou se perde para fora da fenda deixando de agir nos receptores (Guyton, 2002).

A fibra muscular esquelética é tão grande, que os potenciais de ação que se propagam ao longo da superfície de sua membrana quase não causam fluxo de corrente nas áreas mais profundas da fibra. Entretanto, para acarretar uma contração muscular, essas correntes elétricas penetram profundamente a fibra muscular atingindo todas as miofibrilas por meio dos *túbulos transversos* (túbulos T), prolongamentos internos da membrana plasmática, adjacentes às cisternas do retículo sarcoplasmático. Uma das características especiais do retículo sarcoplasmático é a alta concentração de Ca^{2+} dentro de seus túbulos vesiculares. Muitos desses íons são liberados para o sarcoplasma quando um potencial de ação ocorre no túbulo T adjacente. O Ca^{2+} disperso interage na posição TnC do complexo troponina liberando a posição TnI, antes ligada a uma actina globular (Act-G). A exposição dos sítios da Act-G permite a interação com as projeções das cadeias de miosina (cabeças). Esse fenômeno desencadeia o processo contrátil de miofibrilas, o que caracteriza a contração muscular (Figura 4). Uma vez cessado o estímulo (repolarização da membrana muscular), restabelece-se o sistema de transporte ativo do retículo sarcoplasmático e o excesso de Ca^{2+} retorna para seu interior, cessando a contração (Beltramini, 1997; Guyton, 2002; Ferreira, 2005).

1.5.2. Atividade neuromuscular de venenos e toxinas ofídicas

Preparações nervo-músculo de mamíferos (camundongo e rato), aves (pintainho) e anfíbios (sapos e rãs) são amplamente usadas

preliminarmente para examinar os efeitos de venenos e toxinas sobre a transmissão neuromuscular. No entanto, as preparações nervo frênico-diafragma de camundongo e biventer cervicis de pintainho têm sido mais amplamente usadas e, por conseguinte, permitem comparar e complementar resultados em estudos sobre a ação de venenos e de suas toxinas (Hodgson e Wickramaratna, 2002). A partir de preparações neuromusculares isoladas e aplicando-se as técnicas de registros miográficos e eletrofisiológicos é possível compreender o mecanismo de ação de toxinas peptídicas provenientes de venenos ofídicos, ou de qualquer outra natureza, o que pode representar instrumentos valiosos no esclarecimento, principalmente ao nível molecular, de fenômenos fisiológicos, farmacológicos e fisiopatológicos. Já é sabido que toxinas peptídicas de natureza ofídica podem apresentar uma gama de mecanismos de ação que afetam direta ou indiretamente a neurotransmissão causando grandes alterações funcionais que levam a presa à paralisia. Por esse motivo será brevemente apresentado uma revisão dos mecanismos de ação de toxinas ofídicas em canal de potássio, terminações nervosas, receptores nicotínicos da placa terminal e sobre as colinesterases, em membrana de células excitáveis e não excitáveis.

A dendrotoxina, proteína isolada da peçonha da serpente elapídica *Dendroaspis augusticeps* (Eastern green mamba), é responsável por acentuar a resposta contrátil da estimulação indireta do músculo esquelético bloqueando canais de potássio nas terminações nervosas, mas não na membrana das fibras musculares (Harvey e Anderson, 1983). As clássicas toxinas ofídicas pré-sinápticas atuam nas terminações nervosas motoras inibindo a liberação de acetilcolina e/ou aumentando a liberação desse neurotransmissor. A maior parte das toxinas tipicamente pré-sinápticas já isoladas e bioquimicamente caracterizadas provém de peçonhas das serpentes elapíneas, no entanto outras toxinas foram isoladas de venenos de espécies crotalíneas, como mostra a tabela 1.

Tabela 01. Principais toxinas ofídicas com atividade pré-sináptica e espécies de serpentes elapíneas e crotalíneas de origem, respectivamente.

Toxina	Serpente de origem	Referências
β-bungarotoxina	<i>Bungarus multicinctus</i> ¹	Lee e Chang, 1966
Ceruleotoxina	<i>Bungarus fasciatus</i> ¹	Ho e Lee, 1983
Notexina	<i>Notechis scutatus scutatus</i> ¹	Karlson et al., 1972; Datymer e Gage, 1973
Taipoxina	<i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i> ¹	Kamenskaya e Thesleff, 1974
Paradoxina	<i>Parademansia microlepdotus</i> ¹	Fohlman, 1979
Textilitoxina	<i>Pseudonaja textilis</i> ¹	Su et al., 1983
Crotoxina	<i>Crotalus durissus terrificus</i> ² <i>Crotalus durissus cascavella</i> ²	Vital Brazil e Excell, 1970
Mojave-toxina	<i>Crotalus scutullatus scutullatus</i> ²	Gopalakrishnakone et al., 1980

¹serpentes elapíneas; ²serpentes crotalíneas

Todas as toxinas pré-sinápticas exercem atividade PLA₂ que é, na maioria delas, essencial para a manifestação de seus efeitos biológicos. Produzem alterações ultraestruturais nas terminações nervosas e, com exceção da β-bungarotoxina, exercem ação miotóxica. Representam os compostos mais tóxicos dos venenos ofídicos, embora sua toxicidade seja variável em diferentes espécies animais (Vital Brazil et al., 1966; Chang, 1979). Os mecanismos pelos quais bloqueiam ou aumentam a liberação de acetilcolina não se acham totalmente esclarecidos, embora algumas hipóteses tenham sido formuladas para explicá-los (Wernicke et al., 1975; Hawgood e Smith, 1977; Vital Brazil et al., 1979; Rodrigues-Simioni et al., 1990). Acerca do mecanismo de ação da β-bungarotoxina, Rowan (2001) sugere que a facilitação da transmissão neuromuscular seja devido à capacidade desta toxina em se ligar e bloquear um tipo de canal de potássio voltagem-dependente, enquanto que o subsequente bloqueio é provavelmente devido à destruição do terminal nervoso mediada pela atividade PLA₂.

Com relação à neurotransmissão, a insuficiência metabólico-anatômica da região pré-sináptica do terminal nervoso motor pode estar relacionada, basicamente, à redução da entrada do íon Ca²⁺, desestabilização

do potencial de membrana (Gallacci e Cavalcante, 2010), defeito na síntese de ACh ou no seu acondicionamento vesicular acarretando, conseqüentemente, a diminuição de sua liberação na fenda sináptica. Em especial, falhas na abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente (CCVD), representados por três famílias diferentes de canais (Ca_{v1} , Ca_{v2} e Ca_{v3}), resultam na falta de íon Ca^{2+} no terminal nervoso, o que pode levar a importantes conseqüências. O resultado mais relevante de tais falhas é o comprometimento da fusão entre as vesículas sinápticas portadoras de neurotransmissores com as zonas ativas, processo este que é modulado por CCVD do tipo Ca_{v2} e pelo complexo protéico SNARE na junção neuromuscular (Hanson et al., 1997). Geralmente, os CCVD são responsáveis por mediar a neurotransmissão nas sinapses rápidas por high voltage-activated (Ca_{v1} e Ca_{v2}) ou low voltage-activated (Ca_{v3}) e podem ser bloqueados por toxinas peptídicas, como as clássicas ω -conotoxinas dos moluscos do gênero *Conus*, a ω -agatoxina da aranha *Agelenopsis aperta* e calciseptina da serpente *Dendroaspis polylepis* (Weille et al., 1991; Adams et al., 1993; Urbano et al., 2008).

As α -neurotoxinas clássicas, como α -bungarotoxina, exercem atividade pós-sináptica por se ligarem a receptores nicotínicos da placa terminal impedindo a sua interação com o neurotransmissor e demais agonistas (Lee, 1970). Recentemente Rey-Suárez et al. (2012) caracterizaram bioquimicamente e funcionalmente uma nova α -neurotoxina da família das *three-fingers* isolada do veneno *Micrurus mipartitus*, a mipartoxina-I, que causa potente bloqueio neuromuscular por antagonizar receptores nicotínicos a semelhança do que faz a α -bungarotoxina. Esse mecanismo de ação não é observado em serpentes da família Viperidae, no entanto, o veneno de *Bothrops alcatraz* produz bloqueio neuromuscular através de uma ação predominantemente pós-sináptica envolvendo a combinação da interação com receptores nicotínicos e dano às fibras musculares, como sugerido por Moraes et al. (2012).

Os venenos das serpentes *Dendroaspis augusticeps* e *D. polypepis* possuem toxinas anticolinesterásicas que causam fasciculação muscular, por isso são também chamadas de fasciculinas e podem exercer α -neurotoxicidade e cardiotoxicidade (Karlsson et al., 1984).

1.6. FOSFOLIPASE A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas que hidrolisam o éster ligado na posição sn-2 1,2-diacyl-sn-3-fosfolípídeo liberando ácidos graxos e lisofosfolípídeos. Esta superfamília de enzimas abrange, pelo menos, dez diferentes grupos de PLA₂ as quais estão localizadas tanto intra como extracelularmente (Valentin et al., 1999). Venenos originários de diferentes animais peçonhentos são fontes ricas de PLA₂ (Rosemberg, 1990). No que diz respeito às PLA₂ oriundas de venenos ofídicos geralmente são de baixo peso molecular (~14 kDa) e, baseando-se em suas estruturas primárias, estão classificadas em duas classes: classe I inclui PLA₂ de serpentes Elapidae e a classe II inclui aquelas de serpentes Viperidae (Valentin e Lambeau, 2000; Toyama et al., 2001; Lomonte et al., 2003; Gallacci e Cavalcante, 2010).

As PLA₂ de classe II, ditas como clássicas miotoxinas, são diferenciadas em dois subtipos baseando-se primordialmente pela presença de um resíduo conservado de ácido aspártico na posição 49 nas PLA₂ D49 (Asp49), cataliticamente ativas, ou pela sua substituição por uma lisina nas PLA₂ K49 (Lys49) homólogas, inativas ou com baixa atividade catalítica (Kaiser et al., 1990; Maraganore et al., 1984). Normalmente essas toxinas induzem miotoxicidade sistêmica (rabdomiólise) associada com mialgia generalizada, aumento de marcadores plasmáticos de lesão muscular, tais como creatinoquinase (CK), e mioglobínúria (Warrell, 1995; Gutiérrez et al., 2008).

Apesar do papel inato dessas enzimas no veneno ser provavelmente digestivo, no decurso da evolução, algumas PLA₂ emergiram também por apresentarem certa atividade fisiopatológica. Com efeito, dentre as muitas atividades farmacológicas atribuídas às PLA₂, a neurotoxicidade tem atraído particular atenção, pois a sua presença nos venenos em geral e, em particular, nos venenos ofídicos, está relacionada à paralisação da presa e ao componente mais tóxico (Kini, 1997; Valentin et al., 1999). Entretanto, apesar de numerosos esforços terem sido feitos, para esclarecer as bases moleculares dessa neurotoxicidade bem como avaliar a possibilidade dessas toxinas serem empregadas como instrumentos de pesquisa para o esclarecimento dos fenômenos que regem a neurotransmissão, o processo fisiopatológico continua ainda pouco entendido.

Neurotoxinas pós-sinápticas (α -ntxs) estão presentes principalmente

na forma não-enzimática (*three-fingers*) em venenos de serpentes Elapidae e em alguns de Colubridae, porém venenos com neurotoxinas pré-sinápticas (β -ntxs) exibem atividade catalítica. Para os venenos elapídicos, α -ntxs trabalham em sinergismo com β -ntxs ou citotoxinas, enquanto que em alguns venenos de Viperidae, β -ntxs podem contribuir diretamente para os efeitos mionecrótico, anticoagulante ou hipotensivo, ou ainda interagir com outros componentes do veneno potencializando esses efeitos (Tsai e Hseu, 2009; Pawlak et al., 2006).

As neurotoxinas PLA₂ que agem pré-sinápticamente, aumentando e posteriormente bloqueando a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos motores somáticos, estão entre as proteínas mais tóxicas dos venenos ofídicos (Beghini et al., 2004; Rowan, 2001; Chang et al., 1972). A falência da neurotransmissão associada com paralisia respiratória representa o sintoma mais pronunciado no quadro de envenenamento. As quatro toxinas mais estudadas deste grupo são a β -bungarotoxina, a crotoxina, a notexina e a taipoxina, secretadas pela krait taiwanesa *Bungarus multicinctus*, pela cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, pela serpente tigre australiana *Notechis scutatus* e pela serpente taipan *Oxyuranus microlepidotus*, respectivamente. Estas toxinas se caracterizam pela presença de uma subunidade que contém uma cadeia básica que exhibe atividade PLA₂. Este denominador comum tem levado vários grupos de pesquisadores a investigar o papel das PLA₂ na expressão da atividade neurotóxica (Rigoni et al., 2004; Rigoni et al., 2005; Liou et al., 2006).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Os venenos animais são ricas fontes de neurotoxinas polipeptídicas usadas como instrumentos farmacológicos em numerosos estudos farmacológicos, fisiológicos e em processos fisiopatológicos. A disponibilização de novas neurotoxinas já caracterizadas tanto bioquimicamente quanto farmacologicamente aumenta o grupo de substâncias potencialmente empregáveis nesses estudos.

Nas últimas décadas, muitas neurotoxinas pré-sinápticas, aquelas chamadas de β -neurotoxinas, têm sido isoladas de venenos de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae tais como crotoxina, β -bungarotoxina e taipoxina de *Crotalus durissus terrificus*, *Bungarus multicinctus* e *Oxyuranus scutellatus*, respectivamente, as quais têm sido amplamente aplicadas em pesquisas de âmbito fisiopatológico. No entanto, neurotoxinas pré-sinápticas são incomuns em venenos de *Bothrops* e pouco é conhecido sobre a capacidade destes venenos de causarem neurotoxicidade. Embora o principal sítio de ação de venenos botrópicos pareça ser pós-sináptico, normalmente causando miotoxicidade, há evidências da presença de componentes pré-sinápticos nesses venenos.

O presente trabalho é o primeiro estudo sistemático a abordar a farmacologia do veneno de serpente pertencente ao gênero *Bothriopsis*. Os experimentos preliminares mostraram que o veneno de *Bothriopsis bilineata smaragdina* exibe potente ação bloqueadora neuromuscular incluindo-o no grupo dos poucos venenos botrópicos que exibem potência inibidora da neurotransmissão semelhante aos venenos das serpentes tipicamente neurotóxicas como aquelas pertencentes ao gênero *Crotalus* e *Micrurus*. Além disso, há evidências de que componentes do veneno atuam no terminal nervoso motor esquelético ao contrário da maioria dos venenos botrópicos que causam severos danos às fibras musculares.

Desta forma, a caracterização farmacológica de componentes de ação pré-sináptica originários de venenos botrópicos a partir de uma ampla abordagem eletrofisiológica muito contribuiria para o entendimento da fisiopatologia do envenenamento.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO

Estudar os efeitos do veneno da serpente *Bothriopsis bilineata smaragdina* sobre a junção neuromuscular de preparações nervo-músculo isoladas de aves e mamíferos *in vitro*.

3.1 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do veneno total de *B. b. smaragdina* sobre a transmissão neuromuscular;
- Isolar a fração ativa responsável pelos efeitos do veneno sobre a junção neuromuscular;
- Investigar o mecanismo de ação da fração ativa sobre canais voltagem-dependente e sobre receptores nicotínicos da placa motora;
- Investigar o mecanismo de ação do veneno total e da fração isolada sobre o movimento de Ca^{2+} em fibras musculares e cultura celular de neuroblastoma.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Todos os reagentes e sais com alto grau de pureza foram obtidos dos laboratórios: Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA), Abbott Lab. do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), Merck Inds. Químicas S. A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Quimibrás Inds. Químicas S. A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Labsynth Prod. para Lab. Ltda. (Diadema, SP, Brasil) e Cetus Ind. e Com. de Prod. Químicos Ltda. (Santo Amaro, SP, Brasil).

4.2. MATERIAL BIOLÓGICO DE INTERESSE

4.2.1. Veneno total da serpente *B. b. smaragdina*

O veneno total de *B. b. smaragdina* foi fornecido pelo Prof. Dr. Ronaldo Navarro Oviedo (*Laboratory of Biological Chemistry, Academic and Biological School of the National University of San Agustín, Arequipa, Peru*). O pool de veneno foi obtido de serpentes adultas, de ambos os sexos, capturadas na região amazônica. O veneno foi desidratado e estocado a -20°C . Quando requerido, o veneno foi dissolvido em solução tampão fisiológico antes de ser empregado nos protocolos experimentais com preparações neuromusculares isoladas ou em solução tampão específica para cromatografia.

4.2.2. Frações não puras (picos P_1 - P_3) e PLA_2 (*Bbil-TX*)

Os picos (P_1 - P_3) obtidos do veneno total por cromatografia de exclusão molecular em coluna de resina Sephadex G-75, bem como o pico P_2 -III isolado a partir de P_2 por HPLC de fase reversa e que apresentou alta atividade PLA_2 , foram fornecidos pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp.

O veneno total (50 mg) foi homogeneizado em 1 mL de tampão bicarbonato de amônio (1 M). Esta solução de veneno foi centrifugada a 9000 rpm por 3 minutos para clarificação. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna, previamente equilibrada com AMBIC (0,2 M). A coluna foi eluída com tampão bicarbonato de amônio (0,2 M) a um fluxo constante de 0,25 mL/min e

monitorado a 280 nm. As frações foram coletadas, liofilizadas e estocadas a -20 °C.

A fração não pura com atividade PLA₂ (P₂), obtida na cromatografia em Sephadex G-75 foi purificada em HPLC de fase reversa. O sistema cromatográfico usado foi o HPLC-PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um "loop" de 200 µL e um coluna µ-Bondapak C-18 0,78 X 30 cm, previamente equilibrada com TFA (ácido trifluoroacético 0,1 %), pH 3,5. Foram aplicados 5 mg da fração dissolvida em 120 µL de tampão A (TFA) e 80 µL de AMBIC bruto (1 M). A eluição das amostras foi realizada usando-se um gradiente linear (0-100%) com tampão B (acetonitrila 60% e TFA 0,025%). A corrida cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/min e monitorada em absorbância de 280 nm. O procedimento foi novamente realizado com uma das frações desta segunda etapa cromatográfica (P₂-III) que apresentou maior atividade PLA₂.

Em adição, a fração P₂-III foi submetida à eletroforese em gel de poli(acrilamida) como descrito por Laemmli (1970). As placas de poli(acrilamida) feita de modo descontínuo apresentam um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas com solução de acrilamida estoque (30% T; 0,8% C). O gel (5%) foi preparado com tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito com tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8. Em ambos os géis, foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20% (dodecil-sulfato de sódio). A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,075 M; pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de bromofenol). A corrida foi realizada a 30 mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C, o excesso de corante foi removido em ácido acético 7%.

A caracterização bioquímica e estrutural do pico P₂-III, executada paralelamente aos estudos farmacológicos aqui abordados, revelou uma PLA₂ Asp49 com massa molecular de 14243,8 Da que foi denominada Bbil-TX, como descrito por Carregari et al. (2013).

4.3. ANIMAIS

4.3.1. Fornecidos pela Universidade Estadual de Campinas

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY-LINE W 36 (40 g; 4–8 dias) fornecidos pela Globo Aves Agrícola Ltda. (Campinas, SP) e camundongos machos de linhagem SWISS (20 a 35 g; 8 semanas) obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos em caixas com cama de maravalha (10 animais por caixa) em ambiente com temperatura controlada (23 °C) e ciclos de claro-escuro de 12 horas, com fornecimento de água clorada e ração industrial *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados com isoflurano (sedação por inalação) e os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEE/IB/UNICAMP), protocolado sob n.º 2267-1 (anexo).

4.3.2. Fornecidos pela University of Strathclyde

Foram utilizados camundongos machos de linhagem Balb C (20 a 35 g; 8 dias) obtidos do Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences (SIPBS) da University of Strathclyde. Os animais foram mantidos em caixas com cama de maravalha (12 animais por caixa) em ambiente com temperatura controlada (21 °C) e ciclos de claro-escuro de 12 horas, com fornecimento de dieta padrão para roedores. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ de acordo com o UK Home Office guidelines.

4.4. PREPARAÇÃO ISOLADA MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO (BC)

Os animais foram eutanasiados sob anestesia em câmara com isoflurano (Cristália). A preparação foi isolada e montada em cubas de 5 mL contendo solução Krebs (composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 25 e glicose 11,65) sob aeração constante com carbogênio de acordo com método descrito por Ginsborg e Warriner (1960), sendo realizados os ensaios em banho Panlab Automatic Organ Bath a 37 °C. Cada músculo isolado foi tensionado a 1 g/cm (transdutor isométrico

Adinstruments TRI201AD) e submetido a estímulos supramaximais (0,1 Hz; 0,2 ms) por eletrodos bipolares posicionados entre tendão e músculo para se obter estimulação de campo (estimulador Panlab LE 12406 TC). As respostas contráteis e contraturas, induzidas por KCl 40 mM e ACh 110 μ M na ausência de estimulação elétrica antes e após tratamento da preparação com veneno total, picos P₁–P₃ ou Bbil-TX, foram registradas em software LabChart 6.0 por meio de transdutores isométricos (Adinstruments TRI201AD). O registro da resposta contrátil foi observado, após adição de veneno total, picos P₁–P₃ ou Bbil-TX em diferentes concentrações para determinar seus efeitos na junção neuromuscular, por 120 minutos ou até ocorrência de bloqueio total. Alguns experimentos foram feitos em preparações pré-incubadas com d-tubocurarina (d-Tc; 14,7 μ M) para avaliar o efeito do veneno total, dos picos P₁–P₃ ou da Bbil-TX quanto à resposta muscular sob estimulação direta usando-se pulsos supramaximais (0,1 Hz; 2 ms). Algumas preparações foram incubadas a 22–24 °C para observar a influência da temperatura sobre o efeito induzido pelo veneno ou pelas frações (Figura 06).

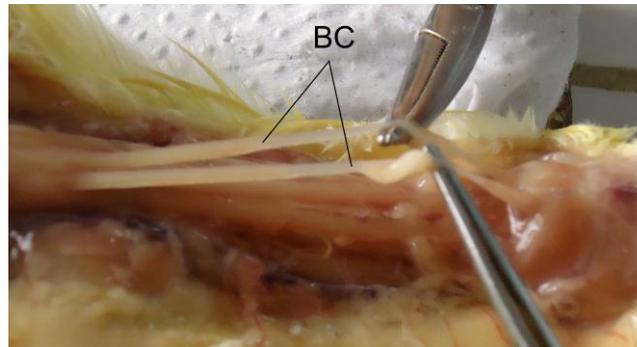


Figura 06. Fotografia da dissecação da região posterior do pescoço de pintainho e isolamento dos músculos biventer cervicis (BC).

4.5. PREPARAÇÃO ISOLADA NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO (NFD) - UNICAMP

Os animais foram eutanasiados sob anestesia em câmara com isoflurano e posteriormente exsanguinados. Após a dissecação foram retirados os hemidiafragmas e isolados os nervos frênicos correspondentes. As preparações foram montadas 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 de acordo com método descrito por Bülbring (1946), sendo os ensaios realizados em banho a 37°C. Cada músculo isolado foi tensionado a 5 g/cm (transdutor isométrico LOAD CELL BG-25 GRAMS) e submetido a estímulos supramaximais indiretos (0,1 Hz; 0,2 ms;), sendo o nervo-frênico posicionado sobre eletrodos bipolares (estimulador GRASS S88), entretanto, para protocolos com estimulação direta, os eletrodos bipolares foram posicionados em contato direto com o músculo. As respostas contráteis foram registradas em fisiógrafo GOULD RS3400 por meio de transdutores isométricos (LOAD CELL BG-10 GM). O registro das respostas contráteis foi observado, após adição de veneno total, dos picos P₁-P₃ ou da Bbil-TX em diferentes concentrações para avaliar seus efeitos na junção neuromuscular, por 120 minutos ou até ocorrência de bloqueio total (Figura 07).

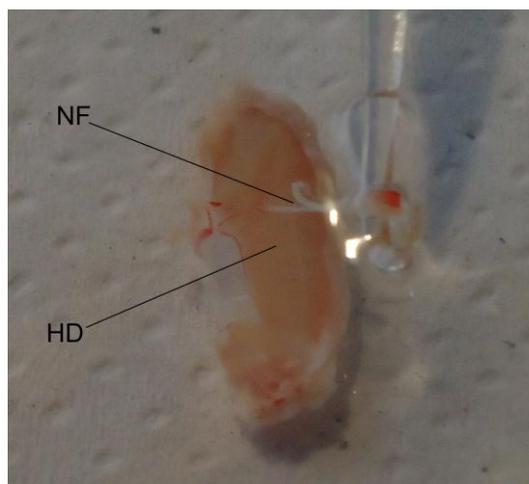


Figura 07. Fotografia de hemidiafragma (HD) isolado de camundongo com nervo frênico (NF) preservado.

Alguns experimentos foram feitos usando-se preparações pré-incubadas com d-tubocurarina (d-Tc; 14,7 µM) e diretamente estimuladas (0,1 Hz; 2 ms) para avaliar o efeito do veneno total, picos P₁-P₃ ou Bbil-TX sobre a resposta muscular. Para avaliar a influência da temperatura sobre o efeito neuromuscular induzido pelo veneno total ou Bbil-TX, algumas preparações foram incubadas a 22-24 °C por 120 min.

4.6. PREPARAÇÃO ISOLADA NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO (NFD) – UNIVERSITY OF STRATHCLYDE

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ de acordo com o *UK Home Office guidelines*. Após a dissecação foram retirados os hemidiafragmas e isolados os nervos frênicos correspondentes. As preparações foram montadas em cubas de 5 mL contendo solução nutritiva Krebs modificada (composição em mM: NaCl 119; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; CaCl₂ 1,8 e glicose 5,5) sob tensão de 1 g/cm e aeração constante por carbogênio de acordo com método descrito por Bülbiring (1946), sendo os ensaios realizados a temperatura ambiente. As respostas contráteis foram evocadas por estímulos supramaximais (0,1 Hz; 0,2 ms) dados por um estimulador Grass S88 acoplado a uma unidade de isolamento de estímulo Grass 5 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) e registradas isometricamente por um Grass Polygraph D. C. Driver Amplifier 79G e Grass Force-Displacement Transducers FT03. As respostas musculares foram registradas e analisadas em software personalizado e atualizado [Chart versão 5.0.2 (University of Strathclyde, UK)]. Para garantir que a estimulação direta da preparação nervo-músculo não contribuiu para a tensão total registrada, estímulos indiretamente evocados foram completamente bloqueados pela adição de MgCl₂ (10 mM) diretamente na cuba uma vez que o excesso de magnésio bloqueia canais de Ca²⁺ voltagem-dependente presentes no terminal nervoso. O excesso de MgCl₂ foi removido por sucessivas lavagens. As preparações foram mantidas em solução nutritiva Krebs com baixo Ca²⁺ (0,25–0,45 mM) durante 15 min sob estimulação indireta até adição de veneno ou toxina.

4.7. ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

A preparação hemidiafragma de camundongo com sua face torácica voltada para cima foi fixada horizontalmente por meio de alfinetes entomológicos em cuba revestida de resina e silicone, preenchida com 2 mL de solução Tyrode (ver composição na seção 4.5.) e aerada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) a temperatura ambiente (25–30°C). A cuba foi posicionada na platina do microscópio estereoscópio (Wild M7 S – Switzerland) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Utilizando a técnica convencional de registro com microeletrodo (Fatt e Katz, 1952), os microeletrodos de vidro foram preparados por meio do Vertical Pipete Puller (modelo 700D – David Kopf Instruments) e preenchidos com KCl 3 M, com uma resistência entre 10–20 M Ω . Os microeletrodos foram introduzidos intracelularmente nas fibras musculares superficiais na região de placa, com auxílio de micromanipuladores (Leitz, Germany) para as medidas dos potenciais de membrana em repouso (PM), de placa terminal em miniatura (PPTM) e de placa terminal (PPT). Os biopotenciais foram obtidos por meio de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram armazenados em um microcomputador (Microtec, SP, Brasil) carregado com um software para aquisição de dados (AqDados, Lynx, SP, Brasil). O computador munido de uma placa conversora A/D foi capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise (Figura 08).

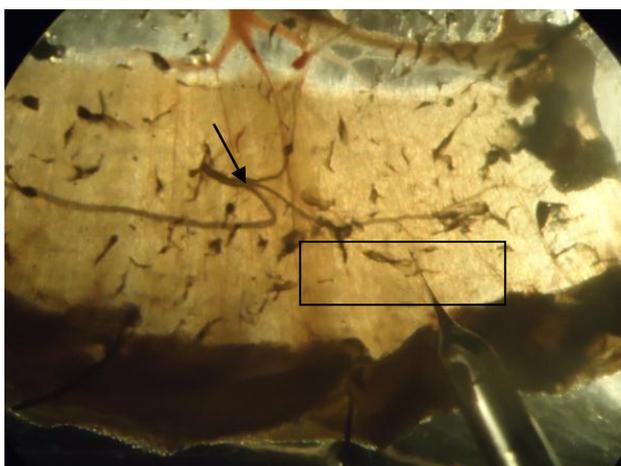


Figura 08. Fotografia de hemidiafragma isolado de camundongo vista ao estereoscópio (20x) indicando a região de placa terminal, área em que o microeletrodo é inserido “empalado” para captação dos potenciais. A seta indica o ponto de inserção do nervo frênico e o retângulo a região de placa terminal.

4.7.1. Registro do potencial de membrana em repouso (PM) em hemidiafragma de camundongo

O efeito do veneno total, dos picos P₁-P₃ ou da Bbil-TX sobre o PM foi avaliado em músculo hemidiafragma de camundongo montado em cuba contendo solução Tyrode (pH 7,0). O potencial de repouso foi registrado com

microeletrodos de vidro preenchidos com KCl 3 M (resistência 10-20 M Ω) e posicionados dentro das fibras musculares na região de placa terminal. Os registros exibidos no osciloscópio Tektronix e digitalizados no software AqDados, como descrito anteriormente, foram obtidos após adição de veneno e/ou toxinas nos intervalos t_0 (controle), t_{15} , t_{30} , t_{60} , t_{90} e t_{120} (Oshima-Franco et al., 2004). Após o último registro (t_{120}) foi adicionado carbacol (Cch, 12,5 $\mu\text{g/mL}$) à solução nutritiva da cuba para avaliar a atividade dos receptores nicotínicos pós-sinápticos por meio de sua ação despolarizante. Ao constatar se houve ou não alteração do PM pela ação despolarizante do Cch, foi efetuada a lavagem da preparação e após 15 min de repouso o último registro foi feito.

4.7.2. Registro do potencial de placa terminal em miniatura (PPTM) em hemidiafragma de camundongo

Os PPTM foram captados através de microelétrodo inserido nas fibras musculares, na região da placa motora. Em cada tempo, de três a cinco placas motoras foram empaladas em período de 1 min e posteriormente calculou-se a média do número de potenciais registrados. Os PPTM foram observados em osciloscópio e em seguida registrados e analisados em computador com o software já descrito. Os parâmetros-controle foram definidos antes da adição do veneno total, picos P₁-P₃ ou Bbil-TX e os PPTM registrados nos tempos t_0 (controle), t_5 , t_{15} , t_{30} , t_{45} e t_{60} min.

4.7.3. Técnica cut muscle e registro do potencial de placa terminal (PPT) em hemidiafragma de camundongo

A técnica *cut muscle* proposta por Barstad (1962) e modificada para camundongo por Banker et al. (1983) foi utilizada para impedir a propagação do potencial de ação muscular, evitar o processo contrátil e permitir a captação do potencial de placa terminal. Essa técnica consiste em cortar periféricamente, em toda a sua extensão, as fibras musculares da preparação hemidiafragma de camundongo com o nervo frênico preservado. Este procedimento causa queda do potencial de membrana celular (em torno de -40 mV), com inativação inicial dos canais de sódio, o que impede a deflagração do potencial de ação e

consequentemente paralisa muscular, assegurando assim, o registro de PPT isentos de potencial de ação (Prior et al., 1993).

Os registros dos PPT foram feitos em resposta à estimulação elétrica (supramaximal). Para tal, utiliza-se a estimulação elétrica indireta por meio de eletrodo de platina posicionado no coto distal do nervo-frênico (10–15 V; 0,2 ms; 1 Hz).

4.7.4. Análise dos PPT: medida do conteúdo quântico

O conteúdo quântico de uma resposta sináptica corresponde ao número de vesículas efetivas liberadas (unidades quânticas) cuja somatória dá origem ao PPT. No presente trabalho, o “tamanho quântico” foi a estimativa do valor unitário. Assim, uma vez obtido em uma célula esse tamanho quântico, o conteúdo quântico do PPT correspondeu ao quociente entre a sua amplitude e o tamanho quântico.

Os cálculos relativos ao conteúdo quântico foram realizados após a correção dos PPT para a somatória não-linear de quanta, de acordo com a fórmula de Elmqvist e Quastel (1965), modificada para a técnica *cut muscle* (Oshima et al., 2010)

$$\mathbf{PPT' = (PPT) \times (PM/PM-PPT)}$$

Onde:

PPT' = PPT corrigido

PPT = PPT observado

PM = potencial de membrana

Concentrações de 30 µg/mL de veneno total, picos P₁–P₃ ou Bbil-TX (2 µM) foram testadas e monitoradas nos tempos t₀, t₅, t₁₅, t₃₀, t₄₅ e t₆₀ min.

4.7.5. Registro extracelular do potencial de ação composto (PAC) em nervo-ciático de camundongo (NC)

Foram utilizados camundongos machos (Balb C) pesando entre 20-25g para isolamento do nervo ciático, sendo os animais eutanasiados em câmara de CO₂ de acordo com The United Kingdom Home Office Guidelines. O nervo ciático foi removido, com cerca de 5-7 cm de comprimento, e colocado

em uma placa de Petri para remoção de tecidos adjacentes e ramificações para facilitar o acesso das drogas e toxinas. O nervo foi então montado em uma cubeta de registro com três compartimentos cilíndricos de 500 μ L de capacidade cada. O isolamento elétrico entre os compartimentos foi feito com vaselina para preencher as fendas sobre as quais o nervo, previamente seco em papel-toalha fino, foi posicionado de modo a ocupar os três compartimentos, porém com sua maior extensão ocupando o compartimento central. Os dois compartimentos externos foram preenchidos com solução tampão fisiológica (composição em mM: NaCl 150; KCl 5,4; HEPES 10; NaHCO₃ 12; KH₂PO₄ 0,4; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 1,8; glicose 10; pH 7,4), sendo que os compostos avaliados foram adicionados no compartimento central em um volume de 400 μ L. Os experimentos foram realizados em temperatura em solução previamente oxigenada por 1 hora antes do início dos protocolos.

A técnica extracelular padrão foi empregada para os registros do potencial de ação composto do nervo. Dois eletrodos do tipo *pellet* de prata cloretada foram usados, sendo um deles mergulhado no compartimento central da cuba de registro e o outro em um dos compartimentos da extremidade. O eletrodo de estimulação elétrica foi posicionado no outro compartimento extremo. Os registros foram obtidos através do eletrodo do compartimento central. O eletrodo terra também foi mergulhado no compartimento central. Um estimulador Grass S88 foi usado para aplicação dos estímulos supramaximais (1 Hz, 0,05 ms de duração) através da unidade de isolamento de estímulo modelo SIU 5A (Grass Instrument Co., Quincy, Mass, USA). Os sinais foram amplificados através de um transdutor do tipo CED 1902, digitalizados através de um conversor analógico-digital DigiData 1200 Interface (Axon Instruments, Scotland), registrados e analisados posteriormente através do software WinWCP 4.5.7 (Dempster, 1988). Em cada experimento a amplitude, latência e o tempo de surgimento (*rise time*) dos potenciais adquiridos foram avaliados. Também foi avaliado o tempo refratário entre um potencial e outro (*paired pulse*). Antes da adição dos compostos avaliados, a preparação nervo ciático foi incubada em tampão fisiológico por 30 min sob estimulação supramaximal constante para mostrar a viabilidade da mesma e a consistência dos registros. Tetrodotoxina (TTX; 3,1 nM) foi adicionada no final dos experimentos para verificar se os tecidos conectivos foram removidos suficientemente para

permitir o acesso dos compostos testados aos nódulos de Ranvier. Todas as concentrações de veneno e toxina foram avaliadas por um período máximo de 60 min ou até a ocorrência de bloqueio completo do potencial de ação composto (Figura 09).

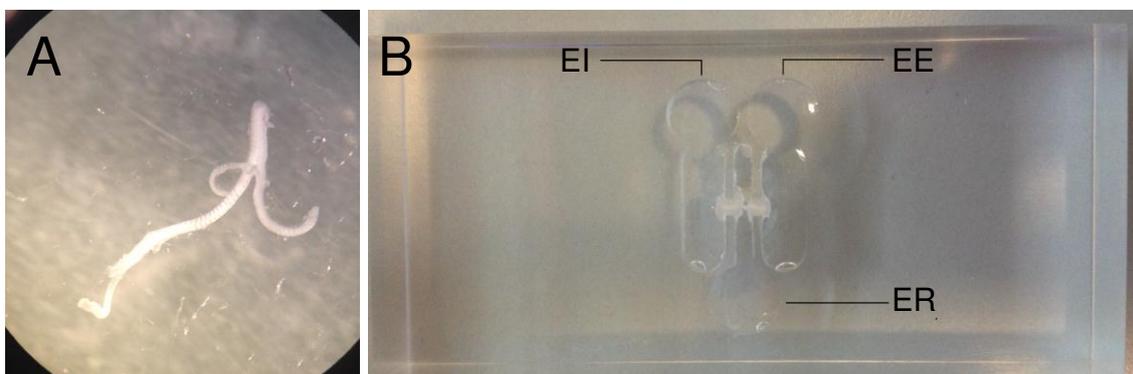


Figura 09. Preparação nervo ciático de camundongo para captação de potencial de ação composto. **A.** Fotografia do nervo ciático isolado. **B.** Cuba utilizada para registro dos potenciais. Em B, as setas indicam o correto posicionamento dos eletrodos; EI (eletrodo de isolamento de sinal), EE (eletrodo de estimulação) e ER (eletrodo de referência).

4.7.6. Registro extracelular de correntes perineurais e registro intracelular de PsPT em preparação nervo-músculo triangular esterno de camundongo (TSn-m)

Foram utilizados camundongos machos (Balb C) pesando entre 20-25 g para isolamento da preparação TSn-m, sendo os animais eutanasiados em câmara de CO₂ de acordo com The United Kingdom Home Office Guidelines. A dissecação completa da preparação foi feita sob perfusão contínua a um fluxo de 15-20 mL/min com solução tampão fisiológica [composição em mM: NaCl 150; KCl 5,4; HEPES 10; NaHCO₃ 12; KH₂PO₄ 0,4; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 1,8; glicose 10; pH 7,4], como descrito por McArdle et al. (1981).

O músculo triangular esterno está localizado na superfície da caixa torácica. É uma camada muscular trapezoidal com origem no osso esterno e inserção nas intercalações das costelas. O músculo é ligado pelo segundo e sétimo espaço intercostal o qual forma o seu limite interno e externo. A face anterior-direita da caixa torácica é removida e fixada através de alfinetes

entomológicos com a parte externa voltada para o Sylgard da placa de Petri. O excesso de músculo diafragma e tecidos conectivos que recobrem a parte interna das costelas foram cuidadosamente removidos para expor o músculo TS que foi mantido intacto. A preparação ficou voltada para cima e fixada com a porção interna das costelas voltada para o Sylgard. Para facilitar a dissecação, as costelas foram posicionadas de maneira plana e fixadas com alfinetes (três alfinetes entomológicos fixados no osso esterno e outros três nas extremidades das costelas) para estabilizá-las. Os músculos de cinco espaços intercostais (começando na terminação abdominal) foram cuidadosamente removidos em camadas até que o músculo TS e sua ramificação nervosa estivessem visíveis. As costelas foram liberadas do externo e cortadas a poucos mm, proximal da ramificação nervosa, sendo finalmente retiradas da preparação. A superfície do TS foi então limpa de qualquer tecido remanescente que pudesse causar obstrução. Cerca de 4-6 mm do tronco nervoso inserido paralelamente à costela do último espaço intercostal (terminação cervical da preparação) também foi isolado. A preparação foi posteriormente transferida para uma cuba de acrílico específica com sua face interna voltada para o Sylgard da mesma maneira como descrito anteriormente. O tronco nervoso previamente isolado foi sugado por um capilar que foi conectado a um estimulador.

Para os registros extracelulares, a cuba foi posicionada em um microscópio óptico binocular (Wild Heerbrugg, Switzerland) sob magnificação de 400-600x para observar a melhor região de inervação (nervos motores) onde o microeletrodo é posicionado. Os microeletrodos usados para os registros extracelulares foram preparados a partir de capilares de vidro (borossilicato) contendo um filamento de vidro interno (Harvard Apparatus Ltd., USA). Um puxador vertical P-30 (Sutter Instrument Co., USA) foi usado para preparar os eletrodos com resistência de 5–15 M Ω preenchidos com NaCl (2 M). O tronco nervoso foi estimulado via eletrodo de sucção conectado a um Electrometer Electro 705 (World Precision Instruments, USA) e este a um estimulador Grass 88 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) para produzir contração maximal. Para os registros perineurais, a d-tubocurarina (14,7 μ M) foi na cuba para abolir os potenciais pós-sinápticos. O eletrodo foi posicionado sobre as ramificações do nervo intercostal e inserido superficialmente na região

perineural. Os sinais foram amplificados e digitalizados por um transdutor CED 1902 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, England) e placa A/D BCN-2110 (National Instruments, UK), respectivamente, depois registrados e analisados em software personalizado e atualizado [WinWCP version 4.5.7 (Dempster, 1988)]. A mesma metodologia também foi empregada para registro intracelular dos potenciais de placa terminal nesta preparação, sendo o eletrodo preenchido com KCl (3 M) e posicionado sobre as fibras musculares ao redor das terminações nervosas (identificadas através do microscópio) (Figura 10).

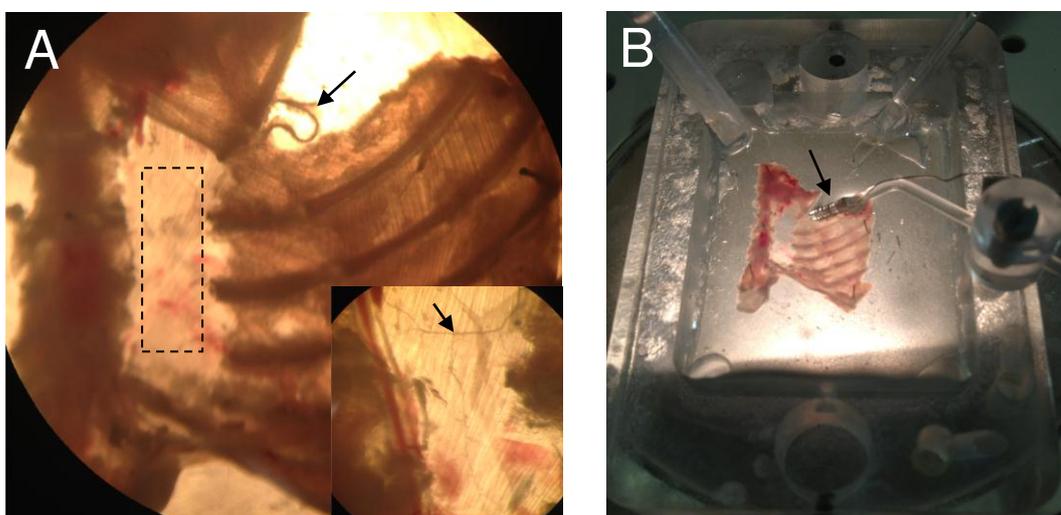


Figura 10. Preparação nervo-músculo triangular externo de camundongo para captação de formas de ondas perineurais e potencial de placa terminal. **A.** Fotografia da preparação TSn-m isolada; a seta indica o tronco nervoso dissecado e o *retângulo* a região da preparação em que é posicionado o eletrodo. Note que a figura *in set* mostra a ramificação nervosa sobre o músculo triangular externo (magnificação de 25x). **B.** Cuba utilizada para registro perineural e de potenciais; a seta indica o posicionamento do eletrodo de sucção para estimulação indireta.

4.8. CULTURA CELULAR: LINHAGEM CELULAR DE NEUROBLASTOMA (SK-N-SH)

Células SK-N-SH foram mantidas em gibco® RPMI Medium 1640 (Life Technologies Ltd., Paisley, UK) e suplementadas com soro fetal bovino (10%), kanamicina (5%), aminoácidos não-essenciais (10%) e piruvato sódico (5%). A cultura cresceu em frascos de 25 cm² a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% CO₂ e 95% O₂. O meio de cultura celular foi trocado e

lavado com BioWhittaker® HBSS (Lonza Group Ltd., Verviers, Belgium) duas a três vezes por semana. A dissociação celular foi executada adicionando gibco® TrypLE™ Express (Life Technologies Ltd., Paisley, UK) por 3 min seguido por centrifugação (1000 rpm; 2,5 min) para remoção do sobrenadante. As células foram ressuspensas em gibco® RPMI Medium 1640 e transferidas para placa de 24 poços contendo *coverslips* (densidade celular 1×10^5 células/poço) dois dias antes dos experimentos em imagem de cálcio.

4.9. IMAGEM DE CÁLCIO

O movimento espontâneo de Ca^{2+} intracelular foi monitorado em células SK-N-SH e fibras musculares de preparações TSn-m com indicador de fluorescência sensível ao Ca^{2+} (fluo-3 AM e fluo-4 AM, respectivamente), como descrito essencialmente por Logantha et al., 2010. Os indicadores de fluorescência (Biotium Inc., Hayward, USA) foram preparados com solução estoque 1 mM em dimetilsulfóxido (DMSO 100%) e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparações TSn-m foram incubadas com Fluo4 AM ($10\text{ }\mu\text{M}$) e cremophol EL (0,03%) por pelo menos uma hora no escuro a temperatura ambiente. Após incubação com o indicador de fluorescência, as preparações foram lavadas para remover o excesso de indicador extracelular e depois fixadas em cuba de acrílico específica preenchida com solução fisiológica com baixo Ca^{2+} (composição descrita no item 4.7.6). As preparações foram mantidas em solução fisiológica por aproximadamente 10-20 min antes de iniciar os protocolos experimentais. De outra forma, as *coverslips* contendo células SK-N-SH foram diretamente transferidas para placas de Petri contendo solução fisiológica após período de incubação com Fluo3 AM ($4\text{ }\mu\text{M}$) e os experimentos foram executados em diferentes concentrações de Ca^{2+} na solução fisiológica. Todos os experimentos foram executados à temperatura ambiente.

As imagens foram registradas por uma câmera Hamamatsu Multiformat CCD (modelo C4880-80) acoplada a um microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop 50 (Carl Zeiss, Germany) com objetiva de 40x (Achromplan, Carl Zeiss, Germany). A luz de excitação foi fornecida por uma lâmpada de mercúrio de arco curto de 50 W (Osram, Germany) e filtro de ajuste (Carl Zeiss, Germany) que consiste em um filtro de excitação (BP 450–

490 nm), um divisor de feixe (FT 510 nm) e um filtro de emissão (LP 520 nm). A aquisição de imagens foi controlada por um software personalizado (WinFluor versão 3.4.9, University of Strathclyde) e instalado em um computador compatível, com imagens sendo obtidas na frequência de 300–400 fotogramas e 1500–2000 ms de tempo de exposição.

4.10. ATIVIDADE PLA₂

A determinação da atividade PLA₂ foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996), modificado para placa de 96 poços (Ponce-Soto et al., 2002). O substrato utilizado foi o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. Foram utilizadas amostras de veneno total, picos P₁-P₃ ou Bbil-TX na concentração de 0,1 mg/mL. As amostras foram incubadas com o substrato e tampão de reação (Tris-HCl 0,1 M; Ca²⁺ 0,01 M; pH 8) por 20 minutos. Após o tempo de incubação, a reação enzimática foi lida em um espectrofotômetro a 425 nm de absorbância.

4.11. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PLA₂

A atividade PLA₂ do veneno total de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX foram inibidas com brometo de *p*-bromofenacila (*p*-BPB) segundo método descrito por Díaz-Oreiro e Gutiérrez (1997), com as seguintes modificações: cerca de 3 mg do veneno foi dissolvido em 1 mL de bicarbonato de amônio (0,1 M; pH 8) contendo EDTA (0,7 mM) e incubados com 125 µL de *p*-BPB (1,5 mg/mL em etanol). Após incubação por 24 horas à temperatura ambiente, a solução protéica foi centrifugada (7.000 rpm/10 min) e retirado o reagente precipitado, sendo o sobrenadante lavado várias vezes em sistema de ultrafiltração (Amicon, membrana YM-3) e tampão bicarbonato de amônio (0,05 M; pH 8) até que a absorbância do descarte estivesse semelhante à leitura do tampão (A_{280 nm}=0,001). O controle do veneno e Bbil-TX foram feitos como descrito anteriormente, fazendo-se a incubação somente com 125 µL do etanol sem o reagente. As amostras de veneno e Bbil-TX incubadas com *p*-BPB e amostras controles foram testadas em preparação neuromusculares isoladas.

4.12. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Ao final dos protocolos miográficos em estimulação direta a 37 °C (até ocorrência de bloqueio completo ou por 120 min quando o bloqueio completo não foi observado), preparações neuromusculares BC e NFD controle (incubadas apenas com solução Krebs ou Tyrode; n=3) e tratadas com 10 e 30 µg/mL de veneno total ou Bbil-TX (n=3 por grupo), respectivamente, foram fixadas em formaldeído 10% *overnight* e depois lavadas por 30 min em salina (0,1 M), 30 min em água destilada e estocadas em etanol 70% *overnight*. As amostras foram desidratadas em etanol graduado (80%, 95% and 100%), clareadas em xileno (1:1 etanol:xileno, 1:1 xileno:parafina) e finalmente embutidas em paraplasto. Três conjuntos de 2–5 secções (5 µm de espessura) por grupo (controle e tratado) e separadas uma da outra por 100 µm foram cortadas e montadas sobre lâminas de vidro liso para coloração com hematoxilina eosina (HE). As fatias foram examinadas com um microscópio óptico Olympus (Olympus, Japão) e as imagens depois capturadas e analisadas qualitativamente usando o software Image ProPlus 6.0 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, EUA).

4.13. MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE CREATINE KINASE (CK)

A liberação de CK foi mensurada a partir de uma concentração de veneno total e Bbil-TX (702 nM) em preparações BC incubadas a 37 °C. Alíquotas de 100 µL da solução nutritiva foram coletadas diretamente da cuba nos tempos t_0 e t_{60} e congeladas a -20 °C por até 24 horas. A atividade foi ensaiada usando kit comercial CK-NAC (LaborLab, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante e a reação foi lida em ELISA Spectramax 340 (Molecular Devices LCC, USA) a 340 nm.

4.14. IMUNOHISTOQUÍMICA

As preparações neuromusculares de aves e mamíferos controle e pré-incubadas com veneno total (10 e 30 µg/mL, respectivamente, n=3) ou Bbil-TX (210 nM, respectivamente, n=3) destinadas à imunohistoquímica foram preparadas para microtomia em criostato (criocortes) obedecendo as seguintes etapas: (1) montagem sobre papel filtro com auxílio de meio de montagem específico “OCT-Tissue Tek” e congelamento em n-hexano resfriado em

nitrogênio líquido; (2) microtomia dos blocos (20 μm) e coleta dos criocortes em lâminas de vidro silanizadas; (3) permeabilização em etanol e metanol resfriados a -20°C por 10 min; e Triton X-100 (0,1%) por 10 minutos; (4) lavagem em TBS 0,05 M; (5) incubação em solução bloqueadora (TBS/BSA1%) por 1 hora.

Passado o tempo de bloqueio, os criocortes foram incubados *overnight* em anticorpo primário (1:150), e então lavados (3 banhos de TBS 5 minutos cada) para novo período de incubação (1 hora) com anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo FITC + β -bungarotoxina conjugada com o fluorocromo TRITC (1:80 + 1:40). Os criocortes foram novamente lavados em TBS e as lâminas montadas com gelatina glicerinada para análise ao microscópio de fluorescência (MF).

Para as reações de imunohistoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo primário [anti-sinaptofisina e anti-SNAP25 produzido em coelho (Sigma-Aldrich SAB 4502906)] e anticorpo secundário [anti-coelho IgG produzido em cabra e conjugado com FITC (Sigma-Aldrich F0382)] para marcação de vesículas do terminal nervoso; α -bungarotoxina [conjugada com TRITC (Molecular Probes T1175)] para a marcação do receptor de acetilcolina, na membrana pós-sináptica.

4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As alterações nas respostas contráteis de preparações biventer cervicis e nervo-frênico diafragma foram expressas como uma porcentagem relativa aos valores basais (tempo zero) considerados como 100%.

As alterações no conteúdo quântico, na frequência de potenciais de placa terminal em miniatura e no potencial de membrana em preparações nervo-frênico diafragma foram expressas a partir de valores absolutos obtidos por softwares específicos [AqDados, Lynx, SP, Brasil e WinWCP version 4.5.7 (Dempster, 1988)].

As alterações no conteúdo quântico e nas formas de ondas perineurais em preparações nervo-músculo esterno foram expressas a partir de valores absolutos obtidos por software específico [WinWCP version 4.5.7 (Dempster, 1988)].

Todos os resultados apresentados nos protocolos miográficos e eletrofisiológicos foram expressos como média \pm EPM e as comparações estatísticas foram feitas usando o teste t de Student ou ANOVA seguido pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$ indicando significância (software Microcal Origin).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos do veneno total de *B. b. smaragdina* sobre preparação isolada músculo biventer cervicis de pintainho (BC)

5.1.1. Registro miográfico

A incubação de preparações com o veneno total de *B. b. smaragdina* (0,1–30 µg/mL), estimuladas indiretamente (estímulo de campo), resultou em bloqueio neuromuscular completo e irreversível, tempo- e concentração-dependente entre 30 – 90 min a não ser com a menor concentração; a concentração supramaximal foi igual a 10 µg/mL que determinou bloqueio completo em 30 min (Figura 11A). Esta concentração-dependente também foi evidente nos tempos requeridos para 50% de bloqueio ($91 \pm 1,4$; $53 \pm 1,3$; $41 \pm 1,3$; $32 \pm 1,2$; $16 \pm 0,7$; 17 ± 1 min para 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 µg/mL, respectivamente), que diminuíram progressivamente com o aumento da concentração de veneno (Figura 11B). Não foi observada resposta facilitadora antecedendo o bloqueio em todas as concentrações avaliadas. A Figura 11C mostra um registro miográfico representativo do bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno na concentração de 10 µg/mL.

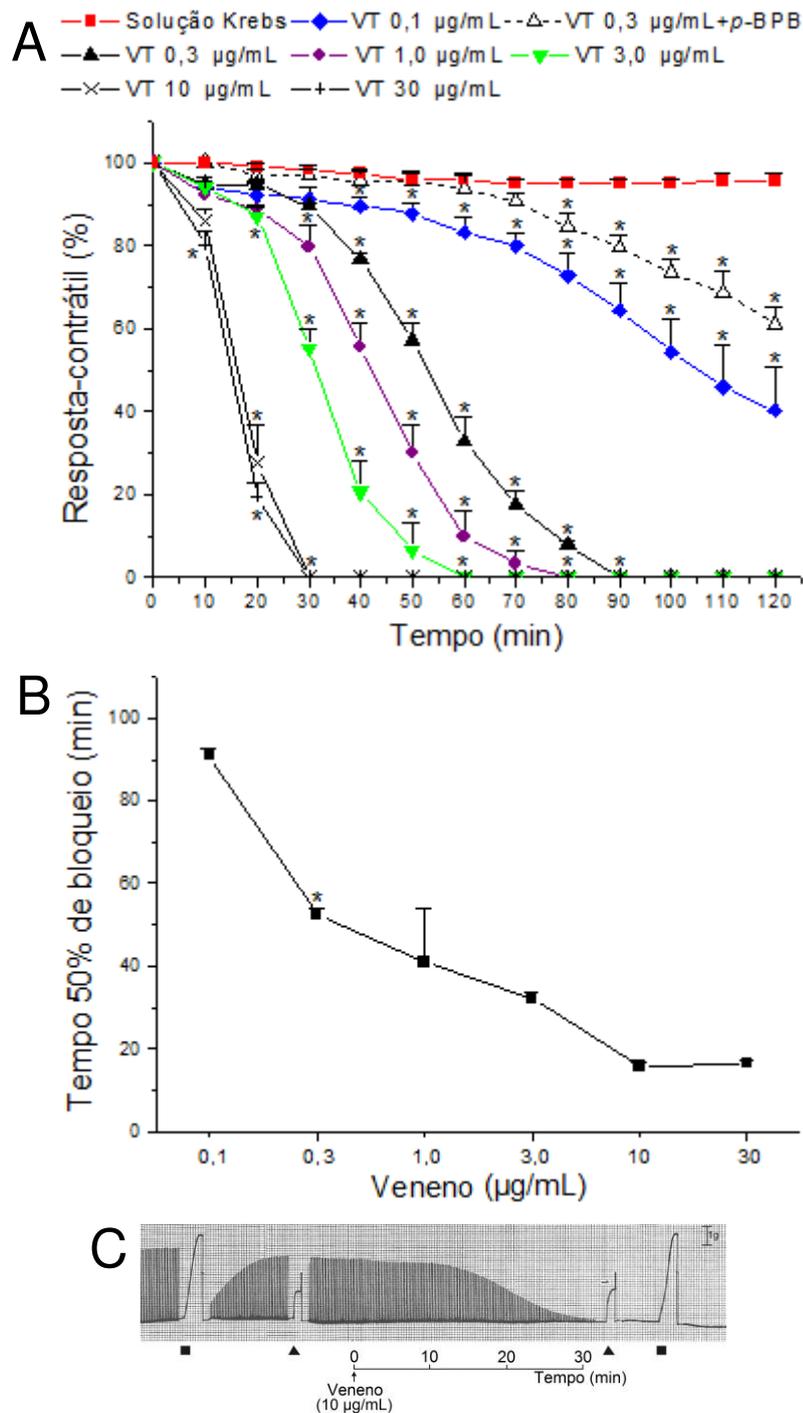


Figura 11. Bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* em preparações BC. **A.** Bloqueio tempo- concentração-dependente e inibição da atividade PLA₂ por *p*-BPB na concentração de 0,3 µg de VT/mL. **B.** Tempo para 50% de bloqueio. Em A e B, os pontos representam a média ± E.P.M. (n = 4–6). Em A, **p* < 0,05 comparado as com preparações controle. Em B, todos os pontos a partir de (*) são significativamente diferentes (*p* < 0,05) da concentração mais baixa (0,1 µg/mL). **C.** Registro miográfico do bloqueio neuromuscular produzido por 10 µg de veneno/mL a 37°C e a resposta contraturante à ACh exógena (110 µM, ▲) e ao KCl (40 mM, ■) antes e após bloqueio.

5.1.2. Respostas contraturantes à ACh e ao KCl na vigência do bloqueio neuromuscular completo pelo veneno de *B. b. smaragdina*

A incubação de preparações BC com o veneno não causou alterações importantes na contração muscular induzida por ACh e KCl (respostas para ACh foram 119 ± 4 , 113 ± 23 , 120 ± 33 , 119 ± 19 , 147 ± 17 , 118 ± 12 e aquelas para KCl foram 88 ± 3 , 89 ± 2 , 85 ± 11 , 92 ± 7 , 105 ± 2 , 98 ± 2 para 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μg de veneno/mL, respectivamente, expressas como uma porcentagem do controle, considerado 100%) (Figura 12). A ausência de efeito sobre as contrações induzidas por ACh e KCl indicam normal funcionamento dos receptores nicotínicos e integridade das fibras musculares, respectivamente.

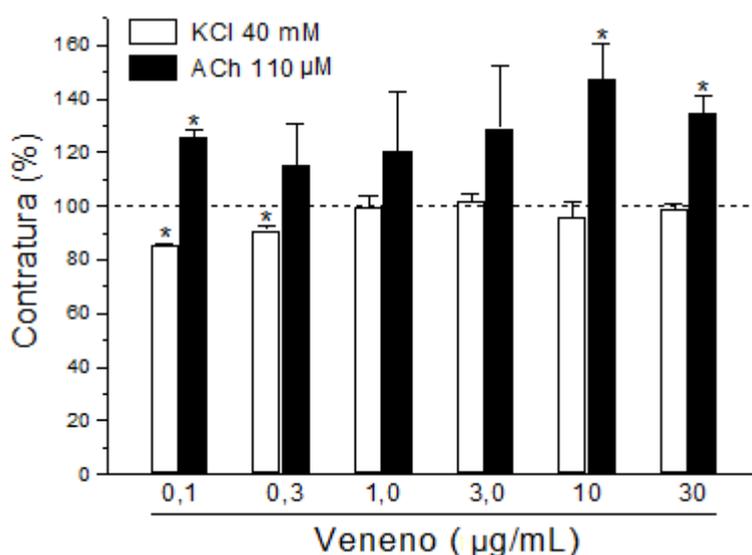


Figura 12. Efeito do veneno total de *B. b. smaragdina* sobre as fibras musculares e receptores nicotínicos em preparações BC. Respostas contraturantes à adição de ACh exógena (110 μM) e KCl (40 mM) após 120 min de incubação com veneno (0,1–30 $\mu\text{g/mL}$) ou até a ocorrência de bloqueio neuromuscular completo. As colunas representam a média \pm E.P.M. ($n = 4-6$); * $p < 0,05$ comparado com controle correspondente (solução Krebs).

5.1.3. Registro miográfico em preparações pré-tratadas com d-Tubocurarina

Em preparações pré-tratadas com d-Tubocurarina (d-Tc; 14,7 μM) e estimuladas diretamente com pulsos supramaximais, o efeito bloqueador passou a ser significativo a partir de 70 min de incubação, porém houve apenas

aproximadamente 10% de bloqueio neuromuscular após 120 min de observação. Na Figura 13 compara-se o efeito bloqueador neuromuscular do veneno total de *B. b. smaragdina* em preparações de aves estimuladas diretamente e indiretamente. Note no registro miográfico (*in set*) a ausência do bloqueio neuromuscular em preparação curarizada exposta a 10 µg de veneno/mL sob estimulação direta.

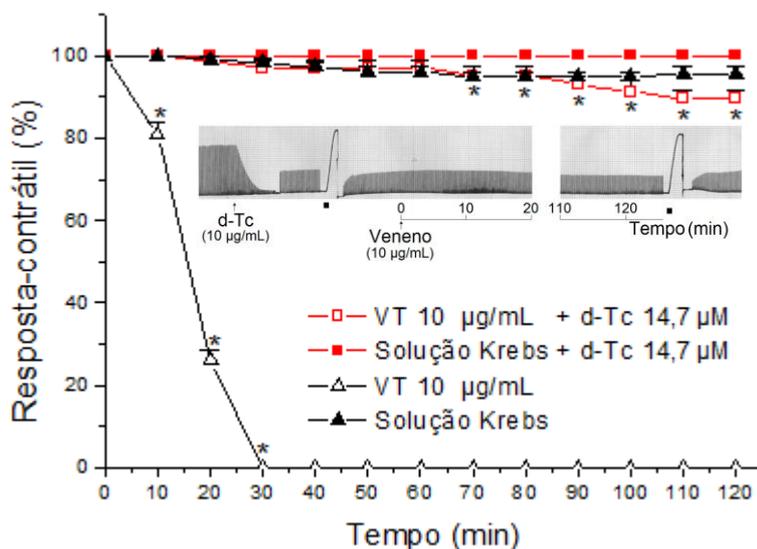


Figura 13. Efeito do veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL) sobre preparações BC curarizadas (d-Tc; 14,7 µM) e estimuladas diretamente com pulsos supramaximais. Note também a ausência de efeito sobre a resposta contraturante ao KCl (40 mM, ■). Os pontos representam a média ± E.P.M. (n = 4–6); *p < 0,05 comparado com preparações controle.

5.1.4. Atenuação da atividade PLA₂: estudo em baixa temperatura e com p-BPB (inibidor-PLA₂)

A atividade PLA₂ presente no veneno total diminuiu 91±4% a 22–24 °C [8,2±1,3 nmoles/min (37 °C) vs. 0,7±0,03 nmoles/min (22–24 °C); n = 3]. Em preparações BC incubadas a 22–24°C e expostas a uma concentração de 10 µg de veneno/mL, houve um atraso no início do bloqueio neuromuscular (manifestação de um efeito trifásico) que evolui para ~70% de bloqueio após 120 (Figura 14). Para fins de comparação, o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno a 37 °C, na mesma concentração, foi completo em ~30 min (ver Fig. 11A).

A atividade PLA₂ do veneno foi inibida em 50±4% após tratamento com *p*-BPB [3,6±0,4 nmoles/min (sem *p*-BPB) vs. 1,7±0,1 nmoles/min (com *p*-BPB); n = 3]. O veneno (0,3 µg/mL) pré-tratado com *p*-BPB em preparações BC mostrou um bloqueio atenuado para ação PLA₂ (ver Fig. 11A).

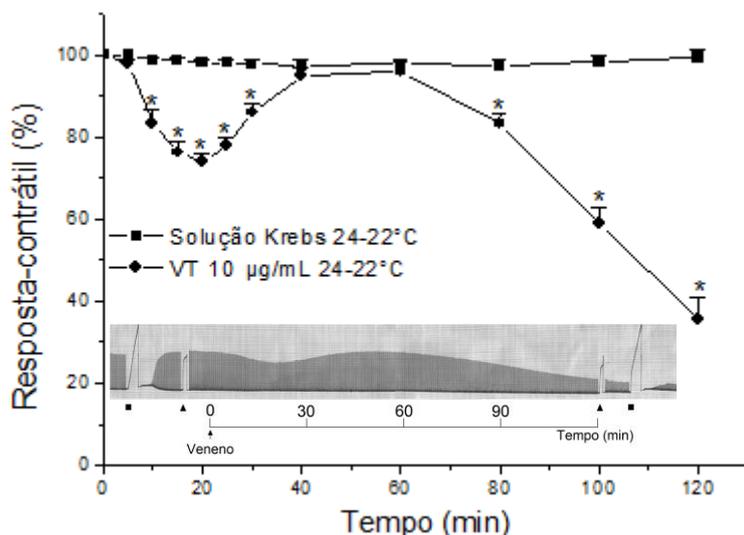


Figura 14. Efeito do veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* sobre preparações BC mantidas em baixa temperatura (22–24 °C). Efeito trifásico induzido pelo veneno (10 µg/mL) após 120 min de incubação. Os pontos representam a média ± E.P.M. (n = 6); **p* < 0,05 comparado com preparações controle.

5.2. Efeitos do veneno total de *B. b. smaragdina* sobre preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD)

5.2.1. Registro mioelétrico

Em preparações NFD de camundongo, todas as concentrações de veneno testadas (1, 3 e 30 µg/mL) inicialmente produziram facilitação neuromuscular (Figura 15A), o que não foi observado em preparações BC. Este efeito foi mais acentuado aos 20–40 min, seguido por progressivo e completo bloqueio das respostas contráteis após 120 min com a maior concentração testada (30 µg/mL) como mostrado na Figura 15B. O bloqueio foi irreversível após várias lavagens da preparação.

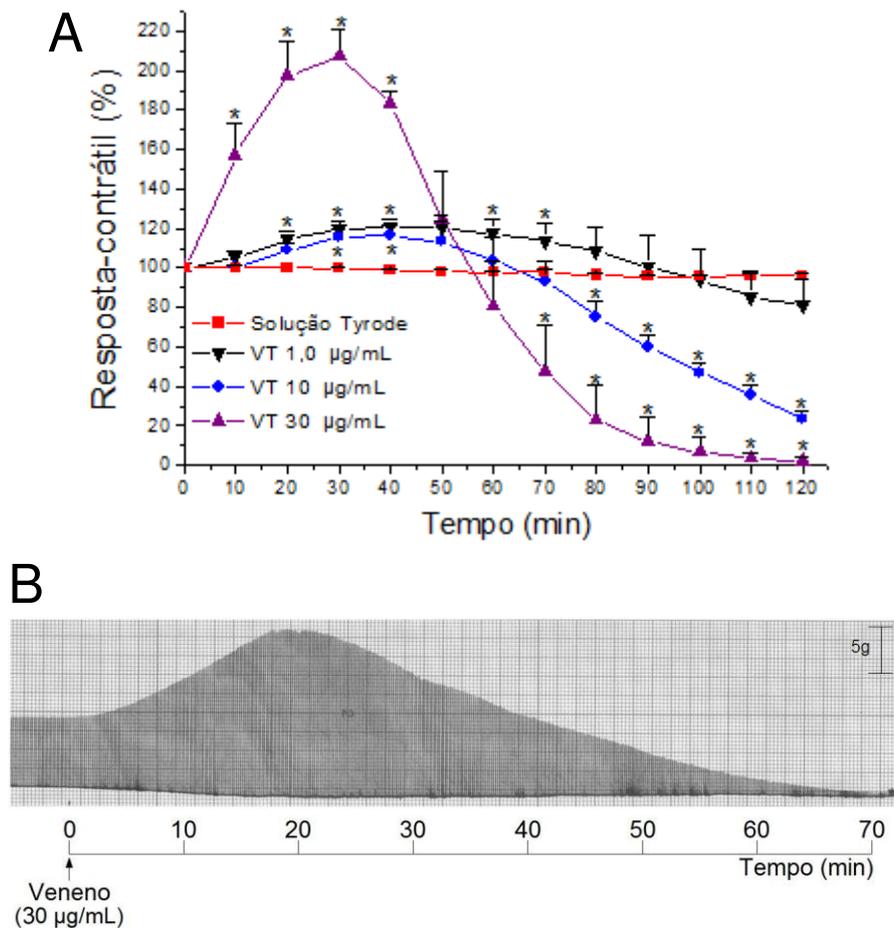


Figura 15. Bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* em preparações NFD. **A.** Bloqueio tempo- concentração-dependente. **B.** Registro miográfico da facilitação inicial seguida de completo bloqueio neuromuscular (30 µg/mL) a 37°C, sob estímulo maximal indireto no nervo motor. Em A, os pontos representam a média \pm E.P.M. (n = 4–6); * $p < 0,05$ comparado com preparações controle.

5.2.2. Registro miográfico em preparações pré-tratadas com *d-Tubocurarina*

O veneno na concentração de 30 µg de veneno/mL não induziu bloqueio neuromuscular em preparações curarizadas (d-Tc; 14,7 µM), embora tenha causado uma progressiva e significativa facilitação das respostas contráteis entre 30 – 90 min de incubação (Figura 16). Assim, o efeito facilitador observado em preparações curarizadas alcançou seu efeito máximo a partir de 30 min permanecendo até 90 min de incubação, diferente da facilitação observada em preparações não curarizadas em que a facilitação da

neurotransmissão surgiu precocemente após 10 min de incubação, com seu pico em 30 min e retornando a níveis controle após 50 min (ver Fig. 15).

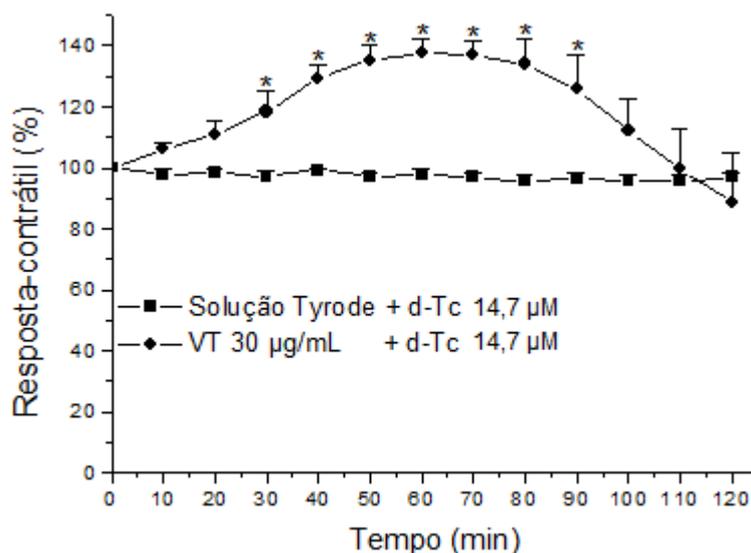


Figura 16. Resposta facilitadora causado pelo veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* em preparações NFD pré-incubadas com d-Tc (14,7 µM) sob estimulação direta. Os pontos representam a média ± E.P.M. (n = 4–6); **p* < 0,05 comparado com preparações controle.

5.2.3. Atenuação da atividade PLA₂: estudo em baixa temperatura e com p-BPB (inibidor-PLA₂)

A atividade PLA₂ do veneno total foi inibida em 91±4% a 22–24 °C [8,2±1,3 nmoles/min (37 °C) vs. 0,7±0,03 nmoles/min (22–24 °C); n = 3]. Em preparações NFD incubadas a 22–24 °C e expostas a uma concentração de 30 µg de veneno/mL, observou-se uma lenta e discreta facilitação da neurotransmissão sem ocorrência de bloqueio. No entanto, elevando-se rapidamente a temperatura do banho de incubação para 37 °C, ambos os fenômenos de facilitação e bloqueio neuromuscular se manifestaram (Figura 17). Para fins de comparação, a manifestação da facilitação seguida por bloqueio neuromuscular completo observada neste segundo momento do protocolo foi mais rápida quando esses fenômenos são comparados com aqueles em preparações incubadas somente a 37 °C (ver Fig. 15A).

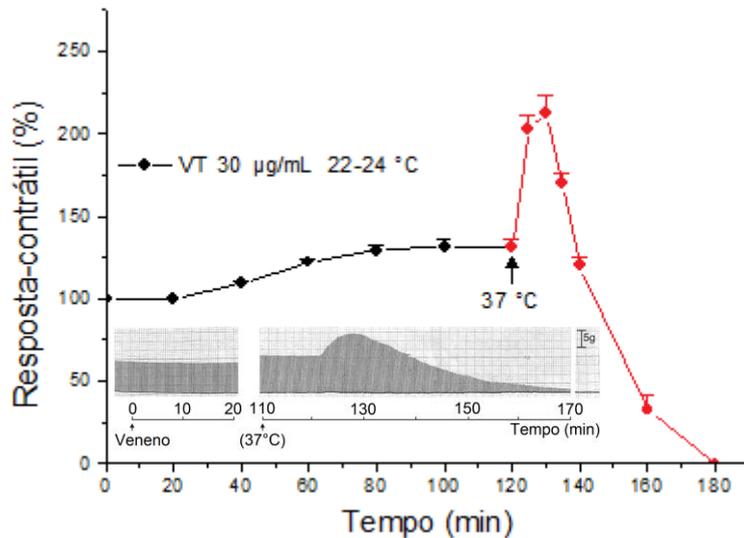


Figura 17. Efeito do veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* sobre preparações NFD incubadas em baixa temperatura (22–24 °C). Atenuação da facilitação e bloqueio neuromuscular induzidos pelo veneno total (30 µg/mL). Note que houve lenta e progressiva facilitação durante 120 min de incubação; ao elevar a temperatura a 37 °C a manifestação da facilitação seguida por bloqueio neuromuscular foi mais acentuada. Os pontos representam a média ± E.P.M. (n = 4–6).

A atividade PLA₂ do veneno foi inibida em 50±4% após tratamento com *p*-BPB [3,6±0,4 nmoles/min (sem *p*-BPB) vs. 1,7±0,1 nmoles/min (com *p*-BPB); n = 3]. Alíquotas correspondentes a 30 µg/mL de veneno pré-tratado com *p*-BPB foram testadas em preparações NFD. A inibição da atividade-PLA₂ também retardou a facilitação e atenuou o bloqueio induzido pelo veneno, porém sem afetar a facilitação maximal (Figura 18).

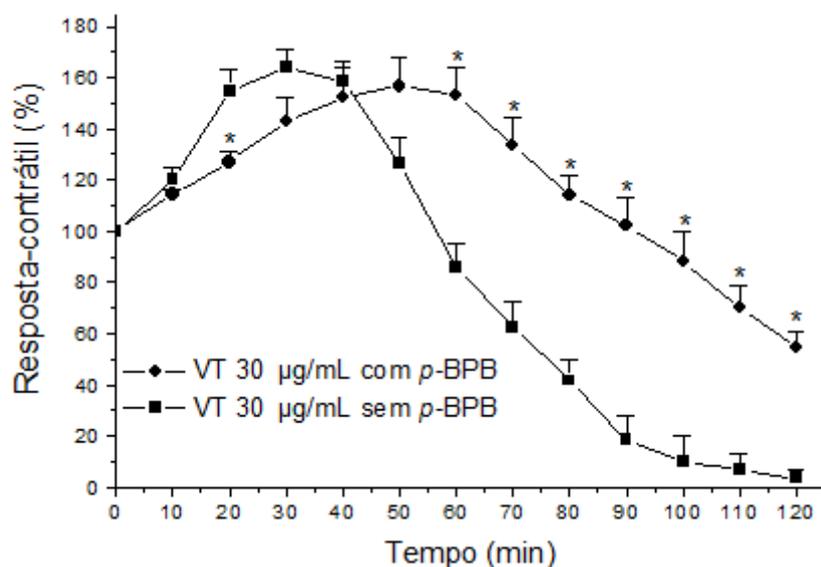


Figura 18. Efeito do veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* pré-tratado com inibidor de PLA₂ (*p*-BPB) em preparações NFD. Atraso na resposta facilitadora e atenuação do bloqueio neuromuscular após 120 min de observação. Os pontos representam a média \pm E.P.M. ($n = 4-6$); * $p < 0,05$ comparado com preparações controle positivo.

5.2.4. Medida dos valores do conteúdo quântico a partir do registro de potenciais de placa terminal evocados (PPT)

O veneno (30 µg/mL) produziu marcante aumento do conteúdo quântico entre 15–30 min de incubação, o que coincide com a facilitação observada nos registros miográficos realizados. A partir de 90 min de incubação a liberação de neurotransmissor foi significativamente menor que os valores basais, o que também corrobora com o bloqueio neuromuscular visto nos protocolos miográficos (> 80% em 90 min) (Figura 19 e Tabela 02).

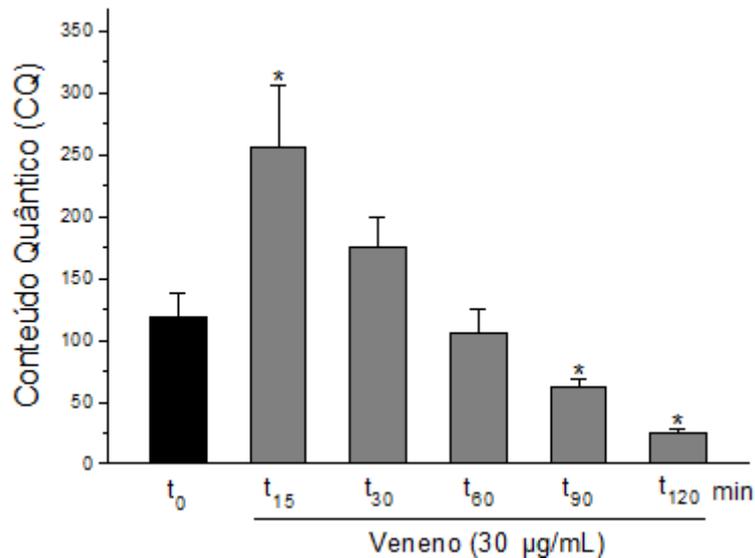


Figura 19. Medida do conteúdo quântico a partir de potenciais de placa terminal (PPT) evocados em preparações NFD tratadas com veneno de *B. b. smaragdina* (30 µg/mL). O aumento significativo da liberação de neurotransmissor aos 15 min e sua acentuada redução aos 90 e 120 min confirmam a facilitação e subsequente bloqueio neuromuscular observados nos experimentos miográficos (ver Fig. 15A). As colunas representam a média ± E.P.M. (n = 5); * $p < 0,05$ comparado com os valores basais (t₀, controle).

Tabela 02. Medida do valor do conteúdo quântico em preparações NFD tratadas com veneno total de *B. b. smaragdina* (30 µg/mL).

Tempos (min)	Conteúdo Quântico (QC)
Controle (t ₀)	119±19
15 min	256±50*
30 min	175±25
60 min	106±19
90 min	63±6*
120 min	25±3*

* $p < 0,05$

5.2.5. Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM): frequência e amplitude

O veneno (30 µg/mL) produziu discreto aumento na frequência de PsPTM/min que foi significativo apenas aos 60 min com os valores retornando aos níveis basais no final do período de incubação (Figura 20 e Tabela 03).

Não houve nenhuma alteração na amplitude dos PPTM [mV: de $1\pm 0,08$ (t_0) para $1\pm 0,06$ (t_{120})].

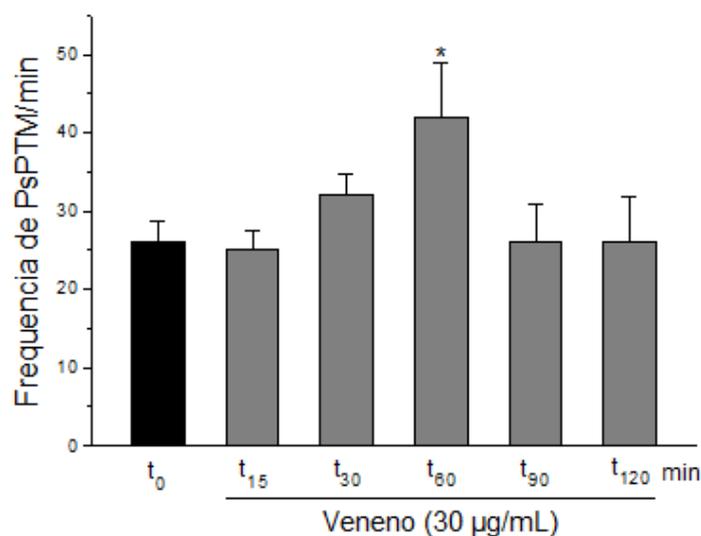


Figura 20. Medida da frequência de PsPTM/min em preparações NFD tratadas com veneno de *B. b. smaragdina* (30 µg/mL). As colunas representam a média ± E.P.M. ($n = 6$); * $p < 0,05$ comparado com valores basais (t_0 , controle).

Tabela 03. Medida da frequência de PsPTM/min em preparações NFD tratadas com veneno de *B. b. smaragdina* (30 µg/mL).

Tempo (min)	Frequência de PsPTM/min
Controle (t_0)	26±3
15 min	25±3
30 min	32±3
60 min	42±7*
90 min	26±5
120 min	26±6

* $p < 0,05$

5.2.6. Medida do potencial de membrana em repouso (PM)

Não houve nenhuma alteração significativa no potencial de membrana em repouso em preparações NFD incubadas com veneno (30 µg/mL) após 120 min [-81 ± 1 mV (basal) vs. -74 ± 2 mV (t_{120})]. Além disso, a

exposição da preparação ao carbacol (Cbc; 68 μ M), um agonista muscarínico despolarizante, ainda na presença do veneno, resultou em despolarização significativa da membrana ($-83\pm 0,2$ mV vs. -63 ± 2 mV) que retornou aos valores basais pré-Cch após sucessivas lavagens ($-81\pm 0,1$ mV), indicando normal funcionamento dos receptores nicotínicos pós-sinápticos e viabilidade da membrana ao agente despolarizante (Figura 21).

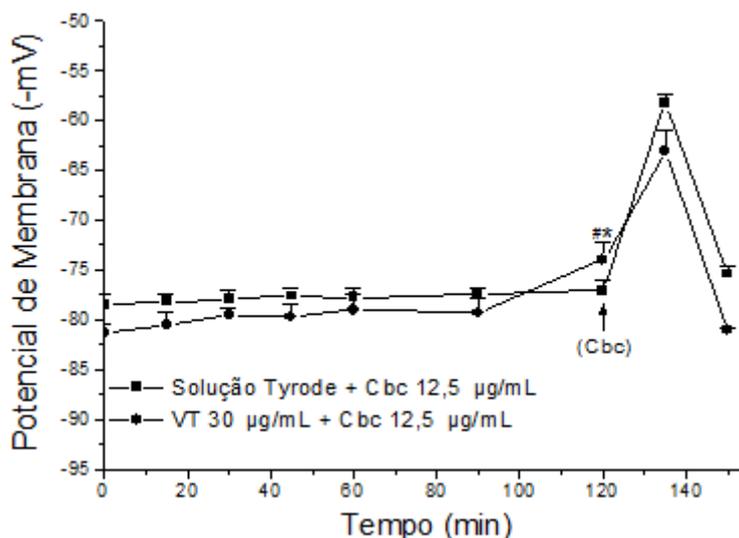


Figura 21. Medida do potencial de membrana em repouso da fibra muscular em preparações NFD tratadas com veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* (30 μ g/mL). Ausência de efeito despolarizante do veneno após 120 min de incubação. Note a despolarização induzida por carbacol (Cbc; 68 μ M) ao final do tratamento, indicando que a maquinaria pós-sináptica estava íntegra e funcional. Os pontos representam a média \pm E.P.M. (n = 5); #*p* < 0,05 comparado com valores basais; **p* < 0,05 comparado com preparações controle.

5.3. Cromatografia do veneno total de *B. b. smaragdina*

5.3.1. Exclusão molecular em coluna Sephadex-G75

O perfil cromatográfico do veneno bruto de *B. b. smaragdina* mostrou a presença de três picos de proteínas majoritárias, os quais foram denominados de P₁, P₂ e P₃ (Figura 22). A atividade PLA₂ dos picos foi avaliada, tendo o P₂ maior atividade catalítica do que os demais (ver item 5.3.2). O P₂ foi então submetido a uma nova etapa cromatográfica em sistema HPLC de fase reversa.

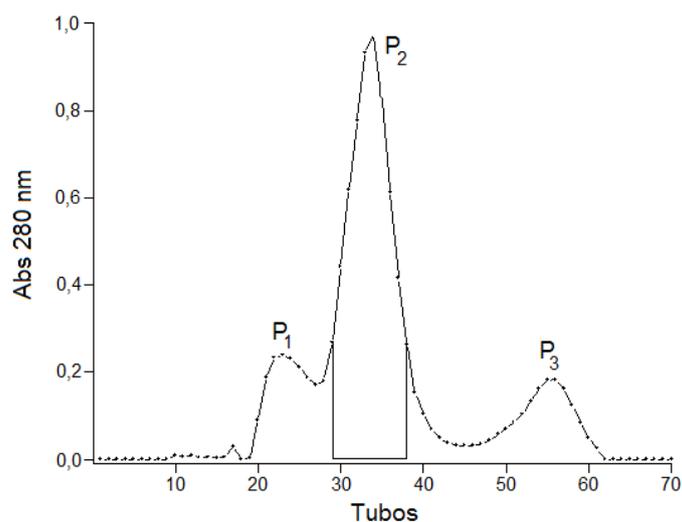


Figura 22. Perfil cromatográfico da purificação do veneno total de *B. b. smaragdina* por exclusão molecular em coluna Sephadex G-75. Foram aplicados 50 mg de veneno na coluna Sephadex G-75 e a corrida foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,2 M; pH 7,8) a um fluxo constante de 0,25 ml/min. O pico em destaque (P_2) mostrou alta atividade PLA_2 .

5.3.2. Atividade PLA_2 dos picos isolados

O veneno total de *B. b. smaragdina* apresentou significativa atividade PLA_2 ($8,2 \pm 0,03$ nmoles/min) e após a primeira etapa de purificação cromatográfica por exclusão molecular em coluna Sephadex (G-75), apenas o P_2 reproduziu atividade similar ($7,7 \pm 0,01$ nmoles/min). Os picos P_1 e P_3 não apresentaram atividade PLA_2 importante ($1,4 \pm 0,004$ e $0,5 \pm 0,04$ nmoles/min, respectivamente) (Figura 23).

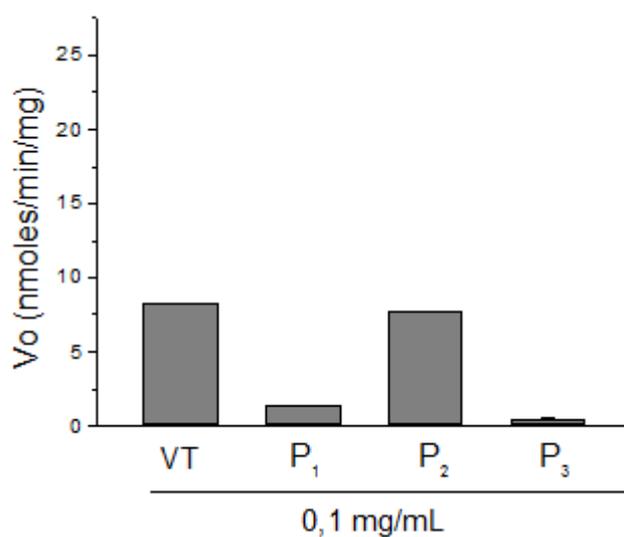


Figura 23. Atividade PLA₂ do veneno total (VT) e dos picos (P₁–P₃) obtidos por exclusão molecular em coluna Sephadex-G75. Foi utilizado 4-nitro-3-(octanoyloxy) ácido benzóico como substrato cromogênico e os ensaios foram feitos a 37 °C; (n = 3).

5.3.3. Registro miográfico em preparações BC e NFD tratadas com os picos P₁, P₂ e P₃

Em preparações BC, os picos P₁ e P₂ (10 µg/mL) induziram bloqueio neuromuscular completo e irreversível após 82±6 e 36±3 min, respectivamente; os tempos requeridos para alcançar 50% de bloqueio foram 54±4 e 24±2 min, respectivamente. Para fins de comparação, o veneno total de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL) produziu 50% de bloqueio em 15±0,7 min (ver item 5.1.1.). O pico P₃ foi inativo nesta preparação (Figura 24A). Nenhum dos picos causou alteração significativa nas contraturas musculares induzidas por ACh exógena e KCl [respostas para ACh: 112±6%; 110±11% e 100±5% e respostas para KCl: 86±5%, 105±4% e 101±6% para P₁, P₂ e P₃ (10 µg/mL), respectivamente, expressas como uma porcentagem do controle, considerado 100%]. Também não houve nenhuma alteração nas respostas contráteis em preparações curarizadas sob estimulação direta (d-Tc; 14,7 µM) e tratadas com P₁–P₃ (10 µg/mL) por 120 min.

Em preparações NFD, apenas o P₂ (30 µg/mL) produziu completo e irreversível bloqueio neuromuscular; o tempo requerido para causar 50% de bloqueio foi de 46±6 min. Para fins de comparação, o tempo para a determinação de bloqueio completo induzido por P₂ (79±11 min) foi semelhante ao observado usando-se o veneno total após o período de facilitação voltar aos

valores basais (ver Fig. 15A). No entanto, o P₃ (30 µg/mL) produziu somente uma progressiva e mantida facilitação neuromuscular (~45% de aumento acima dos valores basais após 120 min). O P₁ (30 µg/mL) mostrou um discreto e progressivo efeito facilitador da neurotransmissão, significativo após 80 min de incubação (Figura 24B). Preparações pré-tratadas com d-Tc (14,7 µM) e estimuladas diretamente não reproduziram o efeito bloqueador do P₂ e o efeito facilitador do P₃ (30 µg/mL) observados em preparações estimuladas indiretamente através do nervo motor; P₁ também foi inativo em preparações NFD curarizadas.

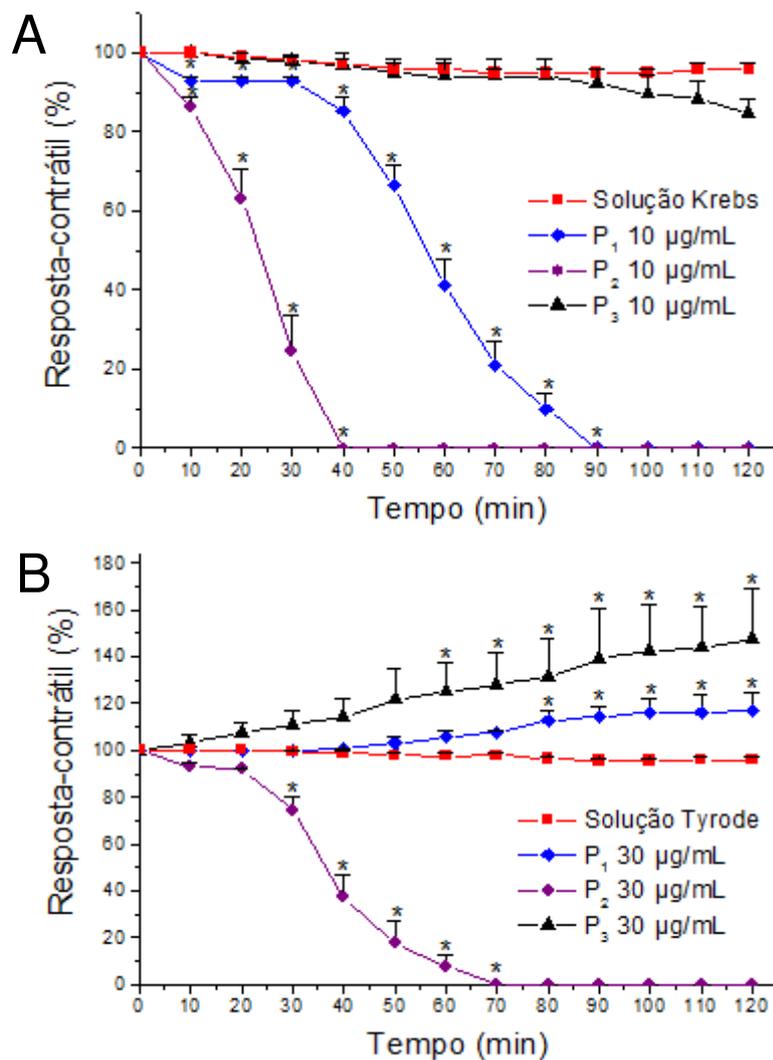


Figura 24. Atividade neuromuscular dos picos P₁–P₃ em preparações BC e NFD. **A.** Efeitos dos picos em preparações BC. **B.** Efeitos dos picos em preparações NFD. Em A e B, os pontos representam a média ± E.P.M. (n = 4–6); *p < 0,05 comparado com preparações controle.

5.3.4. Estudo eletrofisiológico dos picos P₂ e P₃ isolados do veneno de *B. b. smaragdina*: medida do potencial de membrana em repouso (PM) e do valor do conteúdo quântico (CQ) em preparações NFD

O P₂ (30 µg/mL) causou uma diminuição significativa no valor do CQ quando comparado aos valores basais, a partir de 15 min de incubação (Figura 25A e Tabela 04); este resultado corrobora com a potente atividade bloqueadora neuromuscular deste pico observada nos protocolos miográficos (ver Fig. 24B). Não houve alteração no PM em preparações incubadas com P₂ (30 µg/mL) após 120 min de observação [-81±1,2 mV (basal) vs. -82±1,4 mV (t₁₂₀); n = 6; $p > 0,05$]. Além disso, a exposição da preparação ao carbacol (Cbc; 68 µM) ainda na presença do P₂ (30 µg/mL), resultou na despolarização da membrana (de -82±1,4 mV para -56±2,2 mV) que retornou aos valores basais após sucessivas lavagens (-79±0,9 mV), indicando normal funcionamento dos receptores nicotínicos pós-sinápticos e viabilidade da membrana ao agente despolarizante.

O P₃ (30 µg/mL) produziu progressivo e mantido aumento da liberação de neurotransmissor a partir de 5 min de incubação, sendo significativo em relação aos valores basais após 30 min (Figura 25B e Tabela 04). Esse achado concorda com o aumento da força de contração em protocolos miográficos via estimulação indireta (ver Fig. 24B). O P₃ (30 µg/mL) também não alterou o PM ao longo de 120 min de incubação [-79±0,8 mV (basal) vs. -76±1,1 mV (t₁₂₀); n = 3; $p > 0,05$]. A exposição da preparação ao carbacol (Cbc; 68 µM), ainda na presença do P₃, resultou em despolarização da membrana (de -76±1,1 mV para -58±1,7 mV) que retornou aos valores basais após sucessivas lavagens (-76±2,1 mV), indicando normal funcionamento dos receptores nicotínicos pós-sinápticos e viabilidade da membrana ao agente despolarizante.

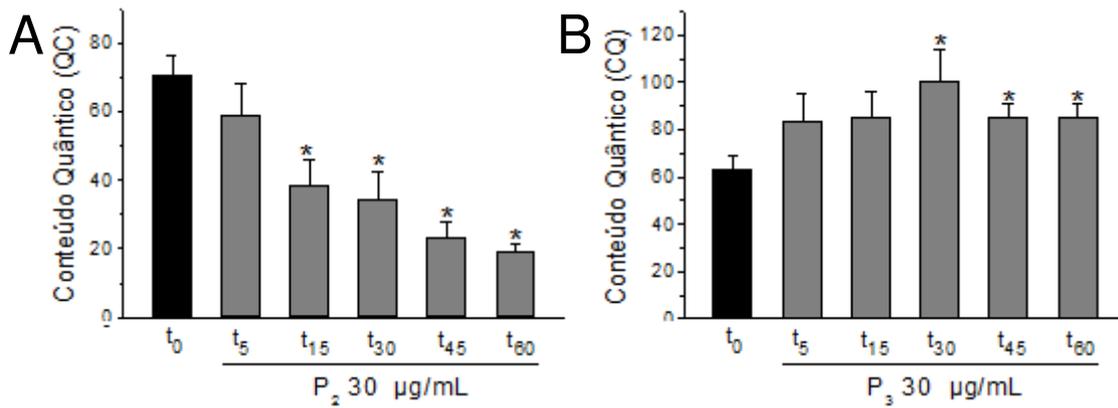


Figura 25. Medida do conteúdo quântico a partir do registro de potenciais de placa terminal (PsPT) evocados em preparações NFD tratadas com os picos P₂ e P₃ (30 µg/mL). **A.** Redução do valor do conteúdo quântico induzida pelo P₂. **B.** Aumento do valor do conteúdo quântico induzido pelo P₃. As colunas representam a média ± E.P.M. (n = 5); *p < 0,05 comparado com valores basais (t₀) em ambos os casos.

Tabela 04. Medida do conteúdo quântico em preparações NFD tratadas com P₂ e P₃ (30 µg/mL).

Tempos (min)	Conteúdo Quântico (QC)	
	P ₂	P ₃
Controle	70±6	63±6
5 min	59±9	83±12
15 min	39±8*	85±12
30 min	34±8*	100±14*
45 min	23±5*	85±6*
60 min	19±3*	85±6*

*p < 0,05

5.3.5. Estudo eletrofisiológico dos picos P₂ e P₃ isolados do veneno de *B. b. smaragdina*: registro de PPTM em preparações NFD – frequência e amplitude

A incubação de preparações NFD com P₂ (30 µg/mL) resultou em uma significativa diminuição da frequência de PPTM/min a partir de 5 min de incubação [33±3 (basal) vs. 16±1 (t₆₀)] (Figura 26A e Tabela 05). Não houve nenhuma alteração na amplitude dos PPTM em preparações NFD tratadas com P₂ [0,8±0,06 mV (basal) vs. 0,8±0,04 mV (t₆₀); n = 5; p > 0,05]. Em preparações tratadas com P₃ (30 µg/mL) observou-se um aumento da frequência de

PPTM/min a partir de 30 min de incubação [20 ± 2 (basal) vs. 30 ± 3 (t_{60})] (Figura 26B e Tabela 05), sem nenhuma alteração importante na sua amplitude [$1,0 \pm 0,2$ mV (basal) vs. $0,8 \pm 0,1$ mV (t_{60}); $n = 5$; $p > 0,05$].

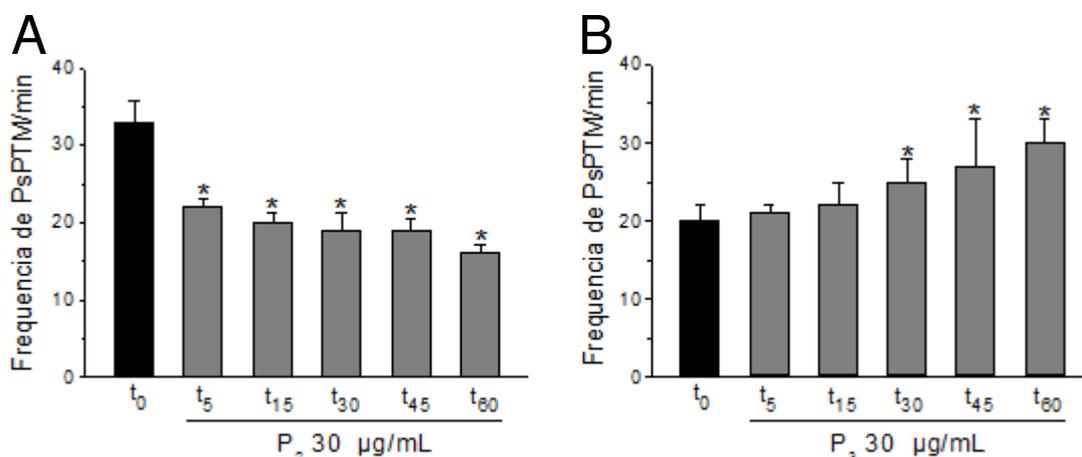


Figura 26. Medida da frequência de PPTM/min em preparações NFD tratadas com P₂ e P₃. **A.** Diminuição na frequência de PPTM/min durante o período de incubação com P₂ (30 µg/mL). **B.** Aumento na frequência de PPTM/min durante incubação com P₃ (30 µg/mL). Em A e B, as colunas representam a média ± E.P.M. ($n = 5$); * $p < 0,05$ comparado aos valores basais (t_0) em ambos os casos.

Tabela 05. Medida da frequência de PPTM/min em preparações NFD tratadas com P₂ e P₃ (30 µg/mL).

Tempo (min)	Frequência de PPTM/min	
	P ₂	P ₃
Controle	33 ± 2,8	20 ± 2
5 min	22 ± 1,2*	21 ± 1
15 min	20 ± 1,2*	22 ± 3
30 min	19 ± 2,4*	25 ± 3*
45 min	19 ± 1,4*	27 ± 6*
60 min	16 ± 1,1*	30 ± 3*

* $p < 0,05$

5.4. Estudo cromatográfico do pico P₂

5.4.1. HPLC de fase reversa

O perfil cromatográfico de P₂ submetido ao HPLC resultou em cinco picos de proteínas (Figura 27). O pico em destaque (P₂-III) contém alta

atividade PLA₂ e após ter sido re-purificado, empregando-se a mesma metodologia empregada na etapa anterior (Figura 27 *in set*), foi identificado como sendo uma PLA₂ Asp49 denominada de Bbil-TX (Carregari et al., 2013). Bbil-TX foi usada em protocolos para sua caracterização farmacológica e para o estudo do seu mecanismo de ação

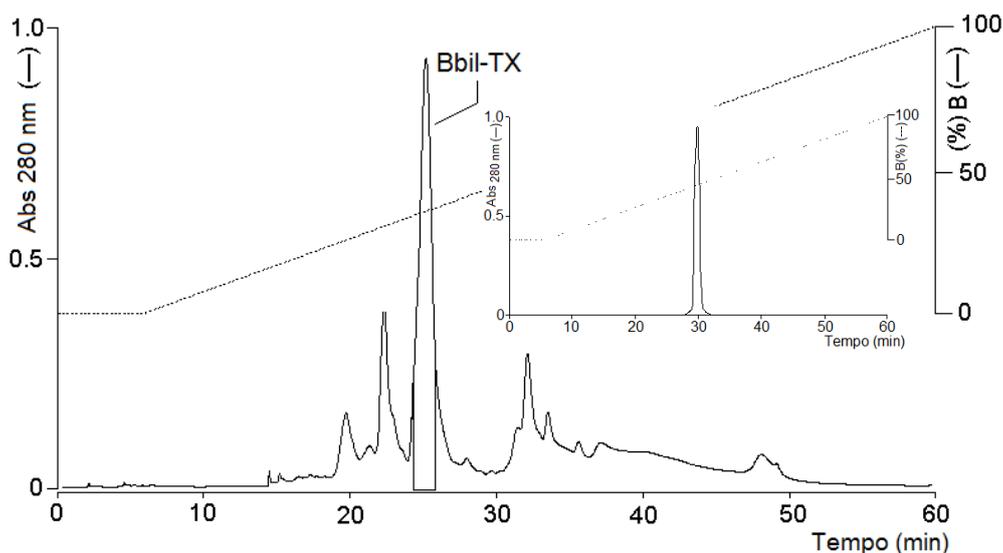


Figura 27. Perfil cromatográfico da purificação do pico 2 (P₂) utilizando-se coluna μ -Bondapack C-18 acoplada ao sistema HPLC de fase reversa. A amostra (5 mg) foi dissolvida em 200 μ L de TFA (0,1%) e aplicada na coluna a um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (acetoneitrila 60% e TFA 0,025%) a um fluxo constante de 1 mL/min. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm de absorbância. *In set*, re-purificação da proteína mostrando sua homogeneidade molecular.

5.4.2. Eletroforese em SDS-PAGE e atividade PLA₂ da fração P₂-III (Bbil-TX)

A massa molecular relativa em SDS-PAGE da fração P₂-III (Bbil-TX) mostrou uma única banda protéica de aproximadamente 14 kDa, em relação aos marcadores (Figura 28A-B, *traço 1*), e está apresentada em condições não reduzidas (Figura 28A, *traço 2*) e reduzidas (Figura 28B, *traço 2*) indicando homogeneidade molecular. A Bbil-TX exibiu alta atividade PLA₂ (25 \pm 0,03 nmoles/min) (Figura 28C). Estes resultados também mostram que o processo cromatográfico utilizado foi eficiente em preservar, não só a integridade das moléculas, mas também a atividade catalítica.

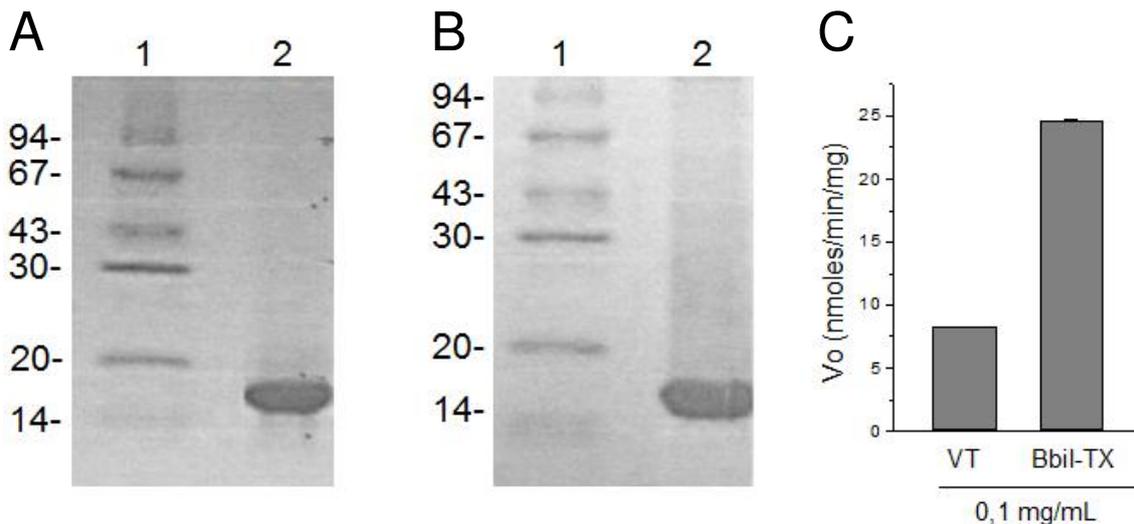


Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida e atividade PLA_2 da fração P_2 -III (Bbil-TX). **A** (*traço 2*). Bbil-TX em condições não reduzidas. **B**. (*traço 2*). Bbil-TX em condições reduzidas. Em ambas as figuras o *traço 1* representa os seguintes marcadores em kDa: fosforilase b (94), albumina (67), ovoalbumina (43), anidrase carbônica (30), inibidor de tripsina (20), α -lactoalbumina (14). A corrida foi realizada com amperagem constante de 30 mA e os géis corados com solução Coomassie Blue 0,05% a 37 °C; o excesso de corante foi removido com ácido acético 7%. **C**. Atividade PLA_2 comparada entre o veneno total de *B. b. smaragdina* (VT) e sua PLA_2 Asp49 Bbil-TX; foi utilizado 4-nitro-3-(octanoyloxy) ácido benzóico como substrato cromogênico e os ensaios foram feitos a 37 °C; (n = 3). Os demais picos derivados do pico P_2 não foram positivos para atividade PLA_2 .

5.5. Efeitos da toxina Bbil-TX sobre preparação isolada músculo biventer cervicis de pintainho (BC)

5.5.1. Registro miográfico

A Bbil-TX (35–702 nM) causou bloqueio neuromuscular irreversível tempo- e concentração-dependente em preparações BC estimuladas indiretamente. Causou na maior concentração testada (702 nM) completo bloqueio após 41 ± 2 min. A Bbil-TX reproduziu o bloqueio neuromuscular observado com o P_2 (10 μ g/mL), a partir do qual a toxina foi purificada (Figura 29A). Os tempos requeridos para se obter 50% de bloqueio foram 87 ± 7 , 41 ± 7 e 19 ± 2 min para concentrações de Bbil-TX de 70, 351 e 702 nM, respectivamente. A Figura 29B mostra um registro miográfico do bloqueio

neuromuscular produzido pela Bbil-TX (702 nM) em preparação mantida sob estimulação indireta a 37°C.

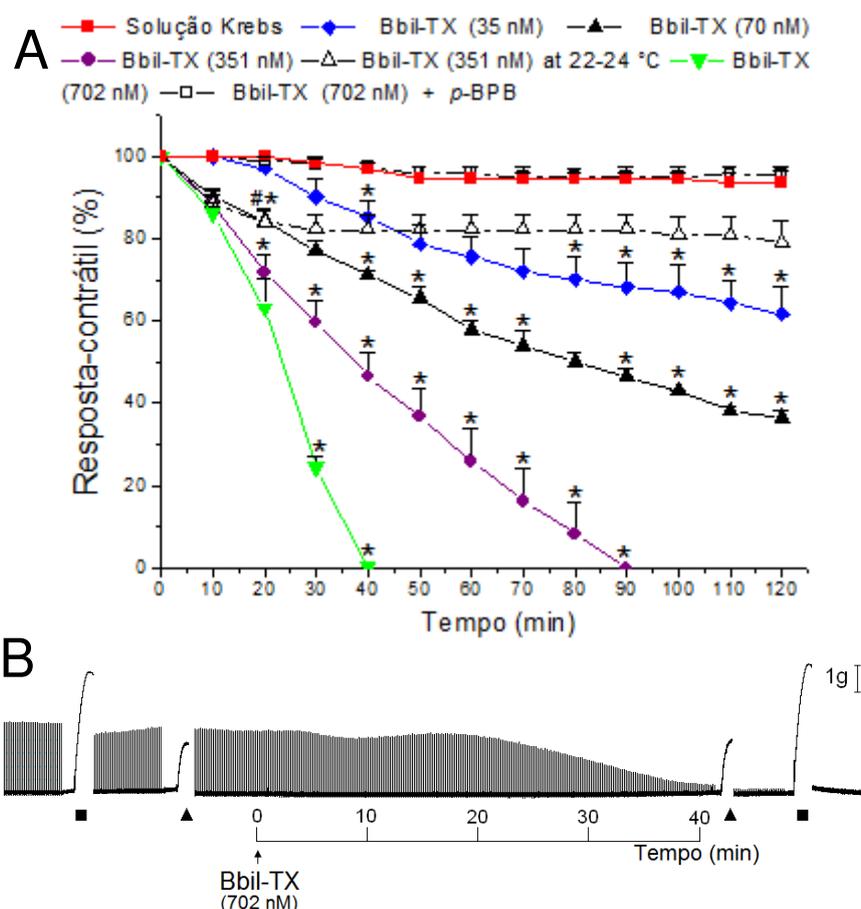


Figura 29. Bloqueio neuromuscular produzido pela toxina Bbil-TX em preparações BC. **A.** Bloqueio tempo- e concentração-dependente. A incubação a 22–24 °C atenuou o bloqueio induzido por Bbil-TX (351 nM) e o pré-tratamento com ρ -BPB aboliu o seu efeito bloqueador. Os pontos representam a média \pm E.P.M. ($n = 4-6$); $*p < 0,05$ comparado com preparações controle. Para experimentos com Bbil-TX (351 nM) feitos a 22–24 °C, os pontos a partir de (#) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) das preparações incubadas a 37°C. **B.** Registro miográfico mostrando o bloqueio neuromuscular causado pela Bbil-TX (702 nM) em preparação indiretamente estimulada a 37°C. Note que as respostas contraturantes à ACh exógena (110 μ M, ▲) e ao KCl (40 mM, ■) não foram alteradas pela toxina.

5.5.2. Respostas contraturantes à ACh e ao KCl na vigência do bloqueio neuromuscular completo causado pela Bbil-TX

A Bbil-TX não causou nenhuma alteração importante nas contraturas induzidas por ACh (110 μ M) exógena e KCl (40 mM) após bloqueio

neuromuscular (respostas para ACh foram 123 ± 9 , 113 ± 12 , 117 ± 11 , 98 ± 6 e aquelas para KCl foram 95 ± 3 , 92 ± 3 , 91 ± 8 , 102 ± 4 para concentrações de toxina de 35; 70; 351 e 702 nM, respectivamente, expressas como a porcentagem do controle, considerado 100%) (Figura 30).

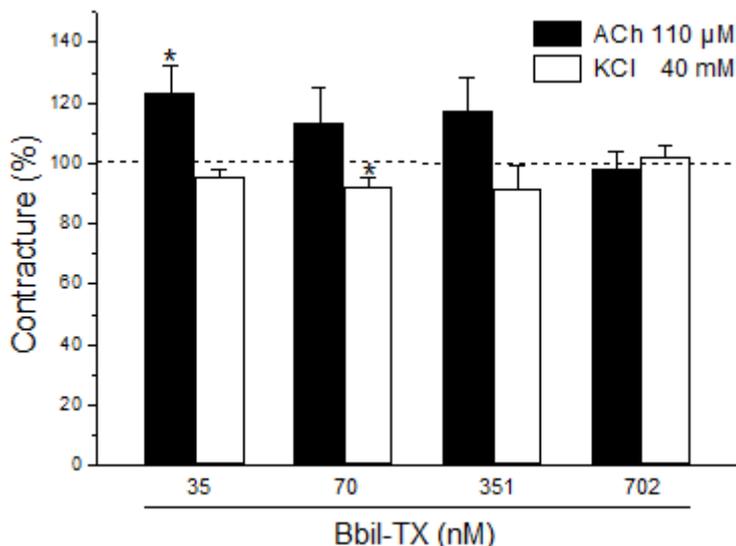


Figura 30: Efeito da toxina Bbil-TX sobre as fibras musculares e receptores nicotínicos em preparações BC. As respostas contraturantes foram medidas a partir da adição de ACh exógena ($110 \mu\text{M}$) e KCl (40 mM) após 120 min de incubação com toxina (35–702 nM) ou até a ocorrência de bloqueio neuromuscular completo e comparadas com as respostas iniciais em solução fisiológica Krebs (basal). As colunas representam a média \pm E.P.M. ($n = 4\text{--}6$); * $p < 0,05$ comparado com valores basais.

5.5.3. Registro miográfico em preparações pré-tratadas com d-Tubocurarina

O bloqueio neuromuscular característico da toxina Bbil-TX (702 nM) não foi observado em preparações BC curarizadas (d-Tc; $14,8 \mu\text{M}$) mantidas sob estimulação direta (Figura 31A). A Figura 31B mostra a ausência de bloqueio neuromuscular em preparações pré-incubadas com d-Tc sob estimulação direta e expostas à Bbil-TX (702 nM).

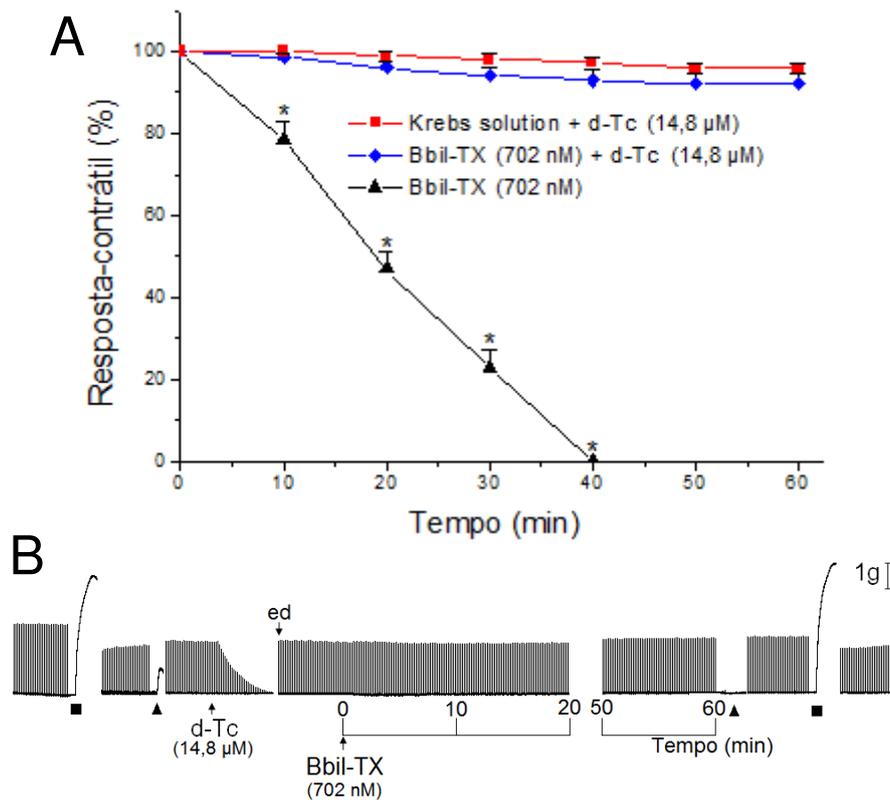


Figura 31. Efeito da toxina Bbil-TX (702 nM) sobre preparações BC pré-tratadas com d-Tc (14,7 μM) mantidas sob estimulação direta. **A.** Respostas musculares para estimulação direta na presença de d-Tc e Bbil-TX foram similares às preparações controle. Os pontos representam a média ± E.P.M. (n = 4–6); * $p < 0,05$ comparado com preparações controle. **B.** Registro miográfico mostrando a ausência de bloqueio em uma preparação tratada com 702 nM de Bbil-TX e diretamente estimulada a 37 °C. Note que a resposta ao KCl (40 mM, ■) não foi alterada pela toxina; a abolição da contratura por ACh exógena (110 μM, ▲) deve-se à presença de d-Tc.

5.5.4. Atenuação da atividade PLA₂: estudo em baixa temperatura e com *p*-BPB (inibidor-PLA₂)

Em preparações mantidas a 22–24°C, a Bbil-TX (351 nM) causou apenas 21±5% de bloqueio após 120 min de incubação. Para fins de comparação, naquelas preparações mantidas a 37 °C a Bbil-TX (351 nM) induziu bloqueio neuromuscular completo após 90 min de incubação (ver Fig. 29A). O pré-tratamento de Bbil-TX com *p*-BPB aboliu sua atividade catalítica [25±0,03 nmoles/min (sem *p*-BPB) vs. 1,7±0,1 nmoles/min (com *p*-BPB); n = 3] e também aboliu sua atividade bloqueadora neuromuscular (ver Fig. 29A; respostas superpostas ao controle).

5.6. Efeitos da toxina Bbil-TX sobre preparação isolada nervo-frênico diafragma de camundongo (NFD)

5.6.1. Registro miográfico

A Bbil-TX causou bloqueio neuromuscular parcial tempo- e concentração-dependente em preparações NFD estimuladas indiretamente (bloqueio máximo de $15,2\pm 3\%$, $29,8\pm 3\%$ e $52,2\pm 2\%$ comparado com controle para concentrações de 210 nM, 702 nM e 2 μM , respectivamente, após 120 min) (Figura 32). Assim como em preparações BC, a Bbil-TX (2 μM) não alterou significativamente as respostas contráteis de preparações NFD curarizadas (d-Tc; 14,8 μM) sob estimulação direta. A toxina (2 μM) também não exerceu efeito bloqueador em preparações mantidas a 22–24 °C ou quando pré-tratada com inibidor-PLA₂.

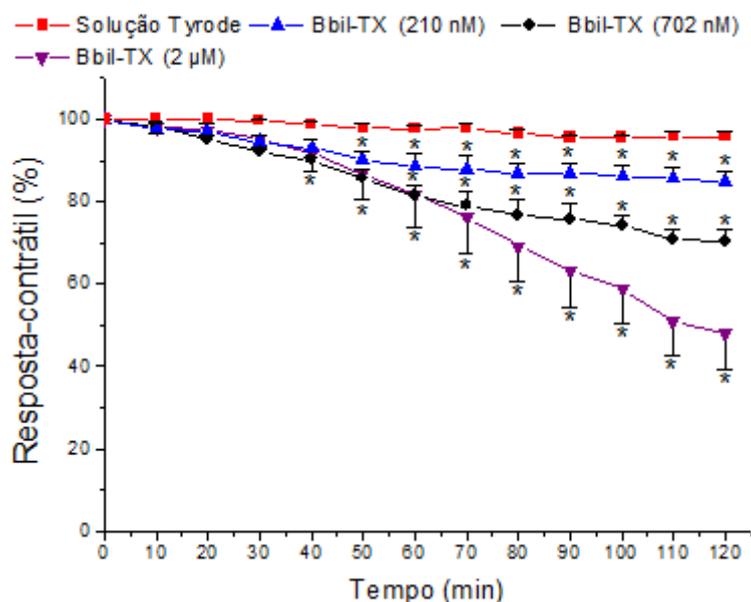


Figura 32. Bloqueio neuromuscular tempo- e concentração dependente causado por Bbil-TX (210 nM, 702 nM e 2 μM) em preparações NFD. Os pontos representam a média \pm E.P.M. (n = 4–6); * $p < 0,05$ comparado com preparações controle.

5.6.2. Medida dos valores do conteúdo quântico a partir do registro de potenciais de placa terminal evocados (PPT)

A Bbil-TX (2 μM) causou significativa e progressiva diminuição no valor do conteúdo quântico em relação aos valores basais dos 30 min aos 60 min de incubação (Figura 33 e Tabela 06).

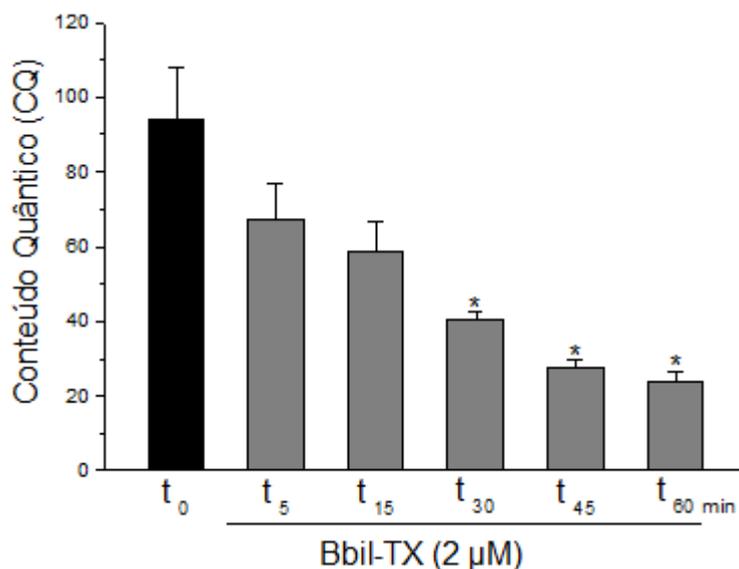


Figura 33. Medida do conteúdo quântico a partir de potenciais de placa terminal (PPT) evocados em preparações NFD tratadas com Bbil-TX (2 μ M). As colunas representam a média \pm E.P.M. (n = 5); * p < 0,05 comparado com valores basais (t₀, controle).

Tabela 06. Medida do conteúdo quântico em preparações NFD tratadas com Bbil-TX (2 μ M).

Tempo (min)	Conteúdo Quântico (QC)
Controle (t ₀)	94 \pm 14
5 min	67 \pm 10
15 min	59 \pm 8
30 min	41 \pm 2*
45 min	28 \pm 2*
60 min	24 \pm 3*

* p < 0,05

5.6.3. Registro dos potenciais de placa terminal em miniatura (PsPTM): frequência e amplitude

A Bbil-TX (2 μ M) causou significativa diminuição na frequência dos PPTM/min a partir de 30 min (Figura 34, Tabela 07). Não foi observada alteração na amplitude dos potenciais espontâneos [0,9 \pm 0,06 mV (t₀) vs. 0,7 \pm 0,06 mV (t₆₀); p > 0,05; n = 5].

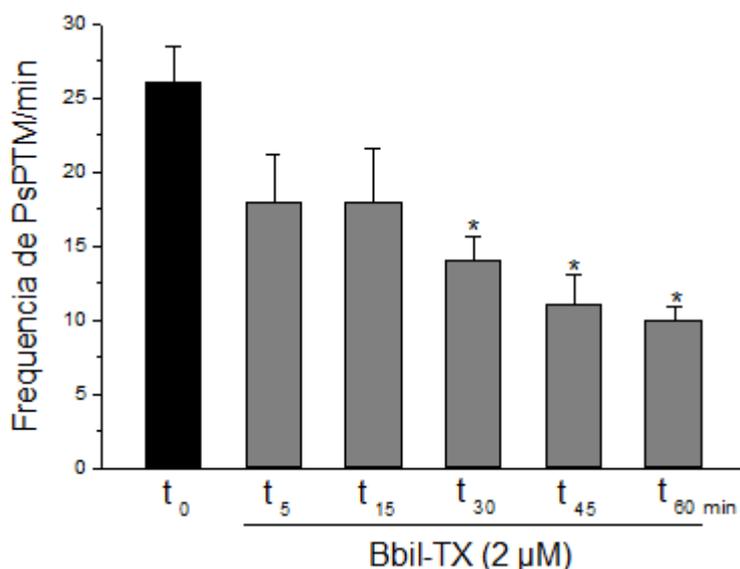


Figura 34. Medida da frequência de PPTM/min em preparações NFD tratadas com Bbil-TX (2 μ M). As colunas representam a média \pm E.P.M. (n = 5); * p < 0,05 comparado com valores basais (t₀, controle).

Tabela 07. Medida da frequência de PPTM/min em preparações NFD tratadas com Bbil-TX (2 μ M).

Tempo (min)	PsPTM/min
Controle (t ₀)	26 \pm 3
5 min	18 \pm 3
15 min	18 \pm 4
30 min	14 \pm 2*
45 min	11 \pm 2*
60 min	10 \pm 1*

* p < 0,05

5.6.4. Medida do potencial de membrana em repouso (PM)

A Bbil-TX (30 μ g/mL) causou moderada despolarização do PM de fibras musculares em diafragma de camundongo após 120 min [-80 \pm 1 mV (basal) vs. -66 \pm 2 mV (t₁₂₀), n = 4, p < 0,05). No entanto, quando as preparações tratadas com Bbil-TX foram expostas ao carbacol (Cch; 68 μ M) ao final do período de incubação (t₁₂₀), observou-se uma queda na polaridade da membrana [de -66 \pm 2 mV para -50 \pm 3 mV (p < 0,05) que, após sucessivas

lavagens, retornou para valores pré-Cch (-67 ± 4 mV) (Figura 35), indicando um normal funcionamento dos receptores nicotínicos pós-sinápticos e viabilidade da membrana ao agente despolarizante. Note que a despolarização observada após adição de carbacol (Cch, $68 \mu\text{M}$) mostra que a maquinaria pós-sináptica está íntegra e funcional após tratamento com a toxina.

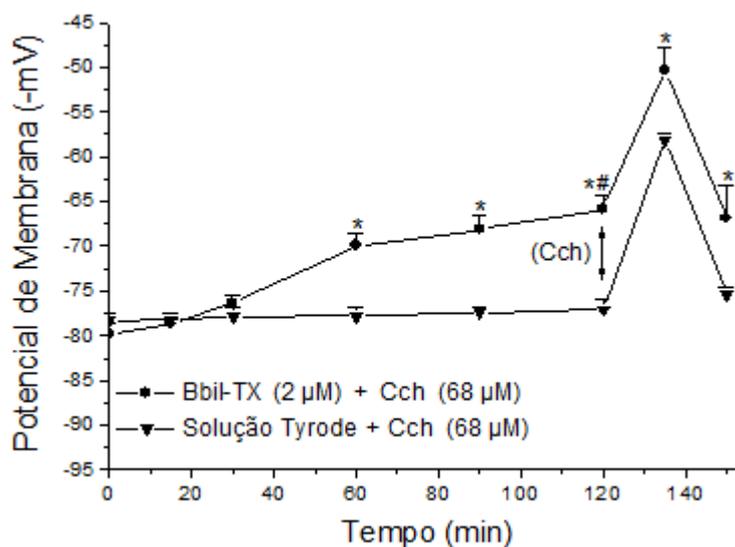


Figura 35. Medida do PM da fibra muscular em preparações NFD tratadas com Bbil-TX ($2 \mu\text{M}$). Os pontos representam a média \pm E.P.M. ($n = 5$); * $p < 0,05$ comparado com preparações controle; # $p < 0,05$ comparado com valores basais (t_0).

5.7. Estudo morfológico

5.7.1. Alterações morfológicas causadas pelo veneno total de *B. smaragdina* em preparações BC e NFD

O veneno de *B. b. smaragdina* causou moderada alteração morfológica em preparações BC and NFD. Na análise histológica observou-se uma correlação positiva entre o nível de danos observados e as concentrações de veneno usadas ($0,1$ – $10 \mu\text{g/mL}$ para BC e 3 – $30 \mu\text{g/mL}$ para NFD). No entanto, nenhuma das concentrações testadas em ambas as preparações, causaram lesões nas fibras musculares semelhantes àsquelas causadas por venenos botrópicos.

A Figura 36 mostra um corte histológico de músculo BC incubado em solução Krebs por 60 min (controle, painel A) e de músculo tratado com veneno ($10 \mu\text{g/mL}$) por ~ 30 min (tempo em que o veneno causou completo

bloqueio das respostas contráteis) (painel B). As alterações morfológicas das fibras musculares de preparações BC incluíram a presença de fibras edemaciadas (e), hipercrômicas (H) e/ou em necrose (nc). Também houve perda de citoarquitetura normal que consistia de feixes de fibras cercadas por uma bainha perimisial conjuntiva (indicada por P no painel A).

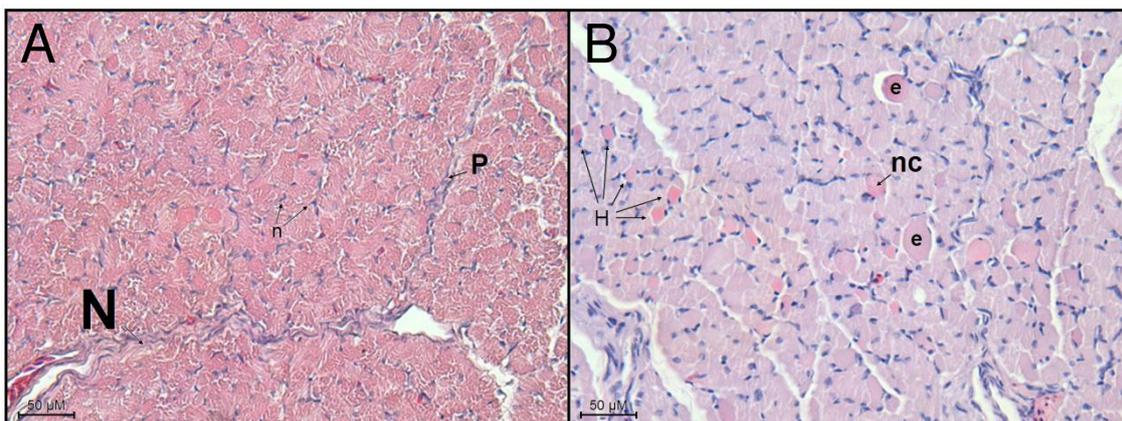


Figura 36. Alterações histológicas induzidas pelo veneno de *B. b. smaragdina* em preparações BC. **A.** Preparação controle (solução Krebs) incubada por 60 min. **B.** Preparação incubada com veneno (10 µg/mL); (N) – tronco nervoso motor, (n) – núcleos, (P) – perímio, (H) fibras hipercrômicas, (nc) necrose, (e) fibras edemaciadas.

A Figura 37 mostra um corte histológico de músculo diafragma incubado em solução Tyrode por 120 min (controle, painel A) e de músculo tratado com veneno (30 µg/mL) por 120 min (painel B). Comparado com as preparações controle (painel A), músculo diafragma também mostrou fibras edemaciadas (e) e/ou em processo de necrose (nc) (painel B).

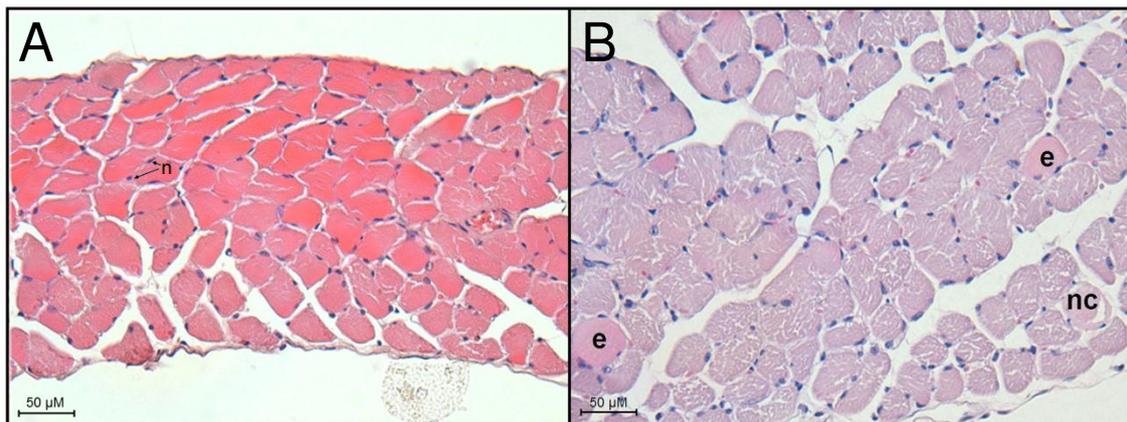


Figura 37. Alterações histológicas induzidas pelo veneno de *B. b. smaragdina* em preparações NFD. **A.** Preparação controle (solução Tyrode) incubada por 120 min. **B.** Preparação incubada com veneno (30 µg/mL); (n) núcleo, (e) fibras edemaciadas, (nc) – necrose de miofibrilas.

5.7.2. Alterações morfológicas causadas por Bbil-TX em preparações BC e NFD

Bbil-TX causou moderada mionecrose em preparações BC e NFD. A microscopia óptica mostrou que o nível de danos correlacionou com as concentrações de toxinas usadas (35 nM, 70 nM, 351 nM e 702 nM para BC e 210 nM, 702 nM e 2 µM para NFD). No entanto, em nenhuma dessas concentrações houve danos às fibras musculares tão extensivos como aqueles causados por outras miotoxinas isoladas de venenos botrópicos.

A Figura 38 mostra a morfologia de preparações BC incubadas em solução Krebs por 60 min (controle, painel A) e de preparações tratadas com Bbil-TX (702 nM) por ~40 min (tempo em que a toxina causou completo bloqueio das respostas contráteis nesta concentração) (painel B). As alterações na morfologia das fibras musculares de preparações BC incluíram a presença de fibras edemaciadas (e) e/ou hipercrômicas (H) e perda de normal citoarquitetura que consistia de feixes de fibras cercada por uma bainha perimisial conjuntiva (indicada por P no painel A).

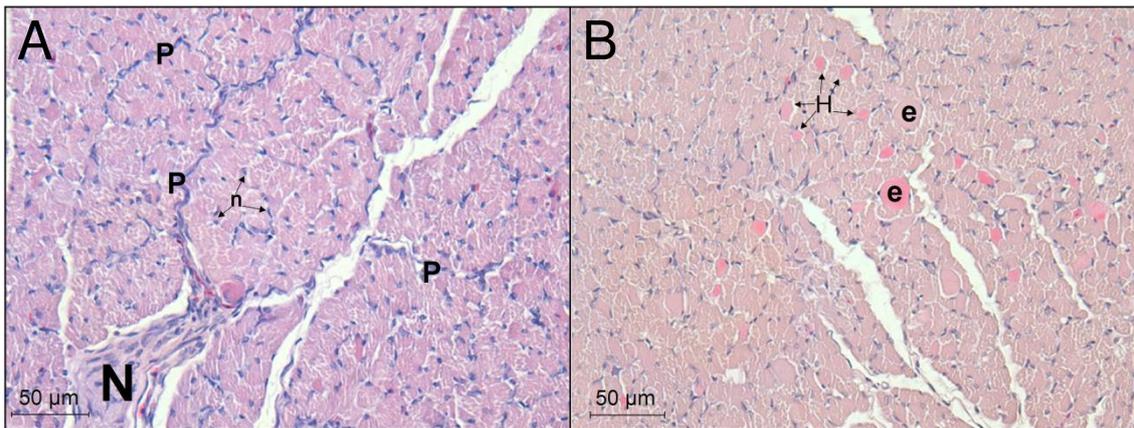


Figura 38. Alterações histológicas induzidas por Bbil-TX em preparações BC. **A.** Preparação controle incubada em solução Krebs sozinha por 60 min. **B.** Preparação incubada com Bbil-TX (702 nM); (N) – tronco nervoso motor, (n) – núcleos, (P) – perimísio, (H) fibras hiperocrômicas, (e) fibras edemaciadas.

A Figura 39 mostra a morfologia de preparações NFD incubadas em solução Tyrode por 120 min (controle, painel A) e de preparações tratadas com Bbil-TX (2 µM) por 120 min (sem ocorrência de completo bloqueio neuromuscular) (painel B). Quando comparadas com as preparações controle (painel A), as preparações NFD também mostraram fibras edemaciadas (e) e/ou hiperocrômicas, uma perda de citoarquitetura do tecido muscular, fibras com lesão delta (d) e bandas condensadas de miofibrilas (*) (painel B).

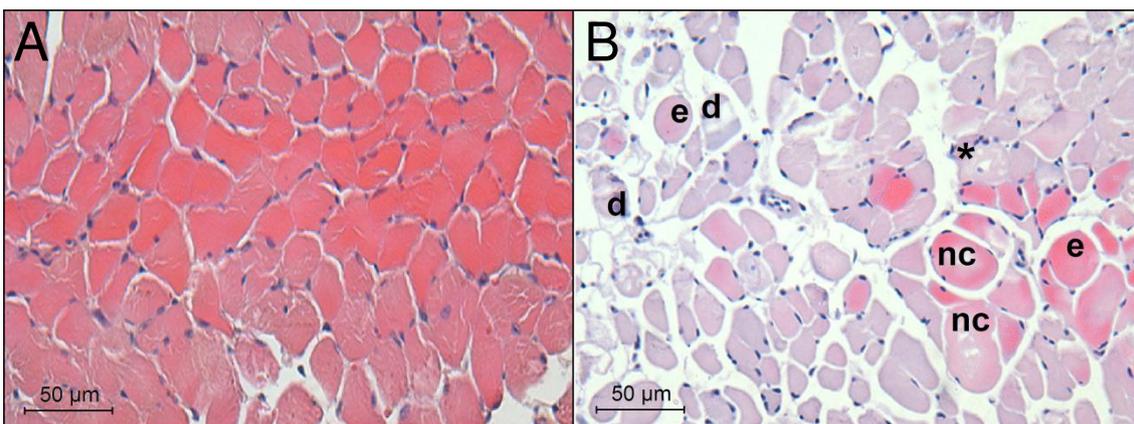


Figura 39. Alterações histológicas induzidas por Bbil-TX em preparações NFD. **A.** Preparação controle incubada em solução Tyrode sozinha por 120 min. **B.** Preparação incubada com Bbil-TX (2 µM) (120 min); (d) – lesões delta, (e) fibras edemaciadas, (nc) – necrose de miofibrilas, (*) – fibras com miofibrilas aglutinadas.

5.7.3. Liberação de creatine kinase (CK) em preparações BC

Em preparações BC expostas ao veneno de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL) houve discreta liberação de CK [IU/mL: 80±15 (t₀) vs. 113±22 (t₆₀); n = 6; $p > 0,05$]. Em concordância com as moderadas alterações morfológicas descritas no item 5.7.2., a Bbil-TX (702 nM) também produziu moderada liberação de CK [UI/mL: 116±17 (t₀) vs. 961±48 (t₆₀); n = 6; $p < 0,05$] nestas preparações. Esta liberação de CK foi acentuadamente atenuada pelo pré-tratamento da toxina com *p*-BPB [UI/mL: 55±14 (t₀) vs. 299±84 (t₆₀); n = 6], não havendo diferença neste intervalo ($p > 0,05$), porém significativamente menor do que o valor correspondente obtido sem *p*-BPB ($p < 0,05$).

5.8. Efeitos do veneno total de *B. b. smaragdina* sobre preparações NFD incubadas em baixo Ca²⁺

O veneno (3 µg/mL) causou um rápido aumento na amplitude das respostas contráteis e, subsequentemente, uma alteração trifásica nas respostas contráteis foi observada, como mostrado pela Figura 40A e pelos dados sumarizados na Tabela 08A. A maior concentração de veneno (10 µg/mL) produziu uma abrupta e marcante contratatura inicial seguida por facilitação neuromuscular, oscilações das contrações evocadas, alterações na linha de base e progressivo bloqueio das respostas contráteis (Figura 40B, Tabela 08^a). Além disso, o veneno atrasou a fase de relaxamento das respostas contráteis como mostrado pelo aumento no tempo de decaimento constante. Este efeito foi mais evidente apenas durante o rápido aumento das respostas contráteis em preparações NFD tratadas com 3 µg de veneno/mL, enquanto nas preparações tratadas com 10 µg de veneno/mL houve alterações no tempo de decaimento constante da contratatura inicial e durante a fase de facilitação (Figura 40C e dados sumarizados na Tabela 08B).

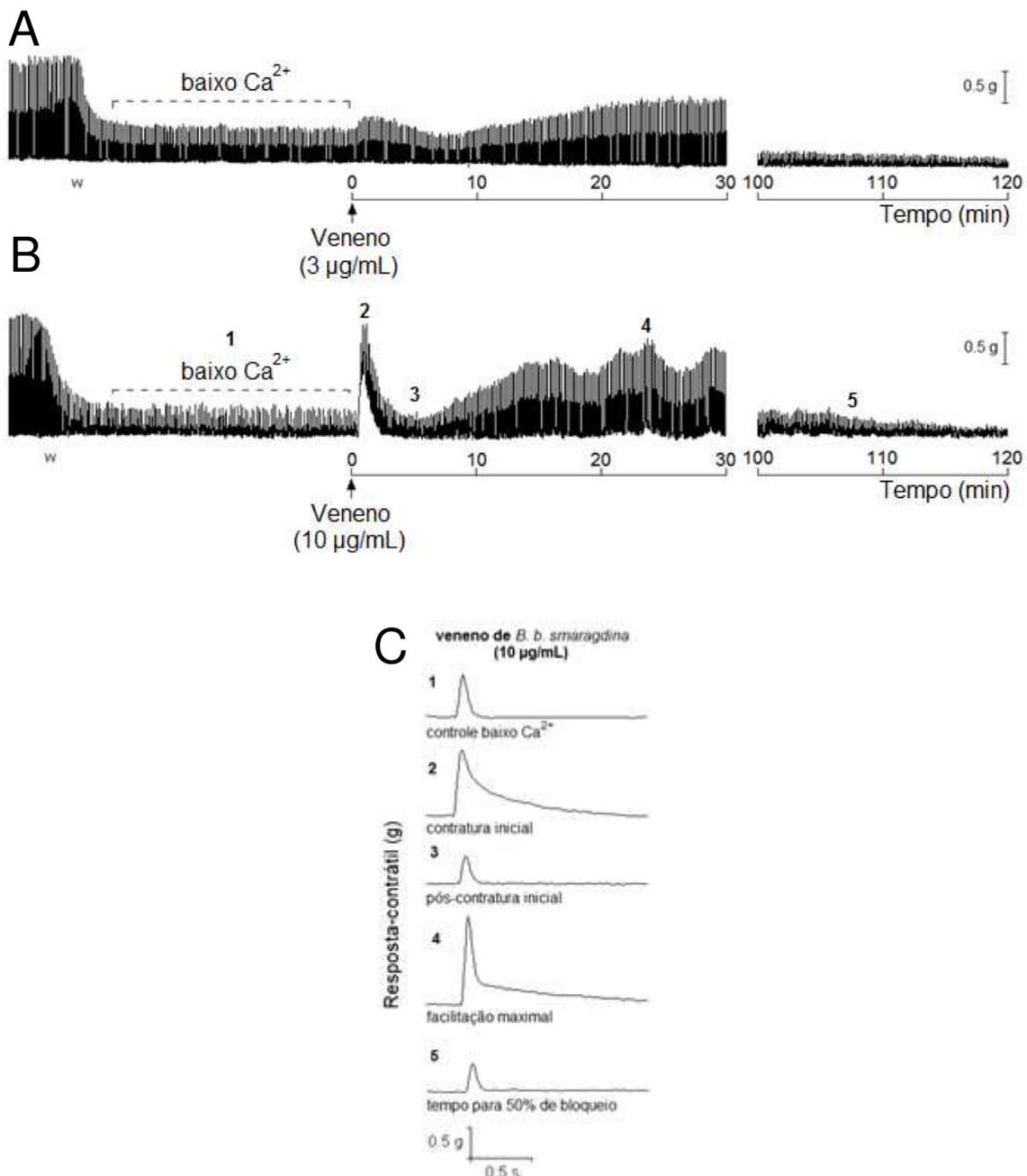


Figura 40. Registros miográficos mostrando o efeito neuromuscular do veneno total de *B. b. smaragdina* em preparações NFD incubadas em solução fisiológica com baixo Ca^{2+} (0,2–0,4 mM) por 120 min. **A.** Efeito trifásico do veneno (3 µg/mL). **B.** Efeito contraturante, facilitação e bloqueio neuromuscular causados pelo veneno (10 µg/mL). **C.** Registro individual da resposta contrátil de preparações tratadas com veneno de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL). Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente (23–25 °C) (n = 4); *washing* (w).

Tabela 08A. Parâmetros miográficos registrados de preparações NFD mantidas em baixo Ca^{2+} e expostas ao veneno de *B. b. smaragdina*.

Tratamento	Amplitude da contratura inicial (%)	Amplitude da facilitação maximal (%)	Tempo para facilitação maximal (min)	Tempo para 50% de bloqueio (min)
VT (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	147 \pm 30 ^{#*}	200 \pm 31 [*]	29 \pm 1	79 \pm 14
VT (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	324 \pm 76 [*]	322 \pm 68 [*]	18 \pm 3	76 \pm 10

Valores expressados como porcentagem do controle em baixo Ca^{2+} (valores basais) para contratura inicial e facilitação maximal ($n = 4$); ^{*} $p < 0,05$ comparado com valores basais; “VT” veneno total. [#]O termo “contratura inicial” é usado aqui para indicar a facilitação inicial vista em preparações tratadas com 3 μg de veneno/mL (ver Fig. 40A).

Tabela 08B. Parâmetros para o tempo de decaimento (*time decay*) registrados em preparações NFD mantidas em baixo Ca^{2+} e expostas ao veneno de *B. b. smaragdina*.

Tratamento	Tempo de Decaimento (ms) para:			
	Controle (baixo Ca^{2+})	Contratura inicial	Facilitação maximal	50% de bloqueio
VT (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	20 \pm 1	117 \pm 20 ^{#*}	33 \pm 5	28 \pm 2
VT (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	26 \pm 1	216 \pm 13 [*]	128 \pm 25 [*]	35 \pm 2

^{*} $p < 0,05$ comparado com controle em baixo Ca^{2+} (valores basais). [#]O termo “contratura inicial” é usado aqui para indicar a facilitação inicial vista em preparações tratadas com 3 μg de veneno/mL (ver Fig. 40A); “VT” veneno total.

5.9. Efeitos da toxina Bbil-TX sobre preparações NFD incubadas em baixo Ca^{2+}

A Bbil-TX (210 nM) causou um progressivo aumento na amplitude das respostas contráteis ($83 \pm 19\%$ acima dos valores basais após 120 min) (Figura 41A e 41B). Não houve nenhuma contratura inicial como observado em preparações tratadas com veneno total. Em preparações tratadas com Taipoxina (22 nM), uma clássica neurotoxina pré-sináptica, observou-se um aumento na amplitude das respostas contráteis de $169 \pm 46\%$ acima dos valores basais até 22 ± 2 min com retorno das respostas contráteis para valores basais após 120 min de incubação (Figura 41A e 41C). Não houve alterações no tempo de decaimento constante durante a fase de relaxamento das respostas contráteis em preparações NFD incubadas com Bbil-TX ou Taipoxina.

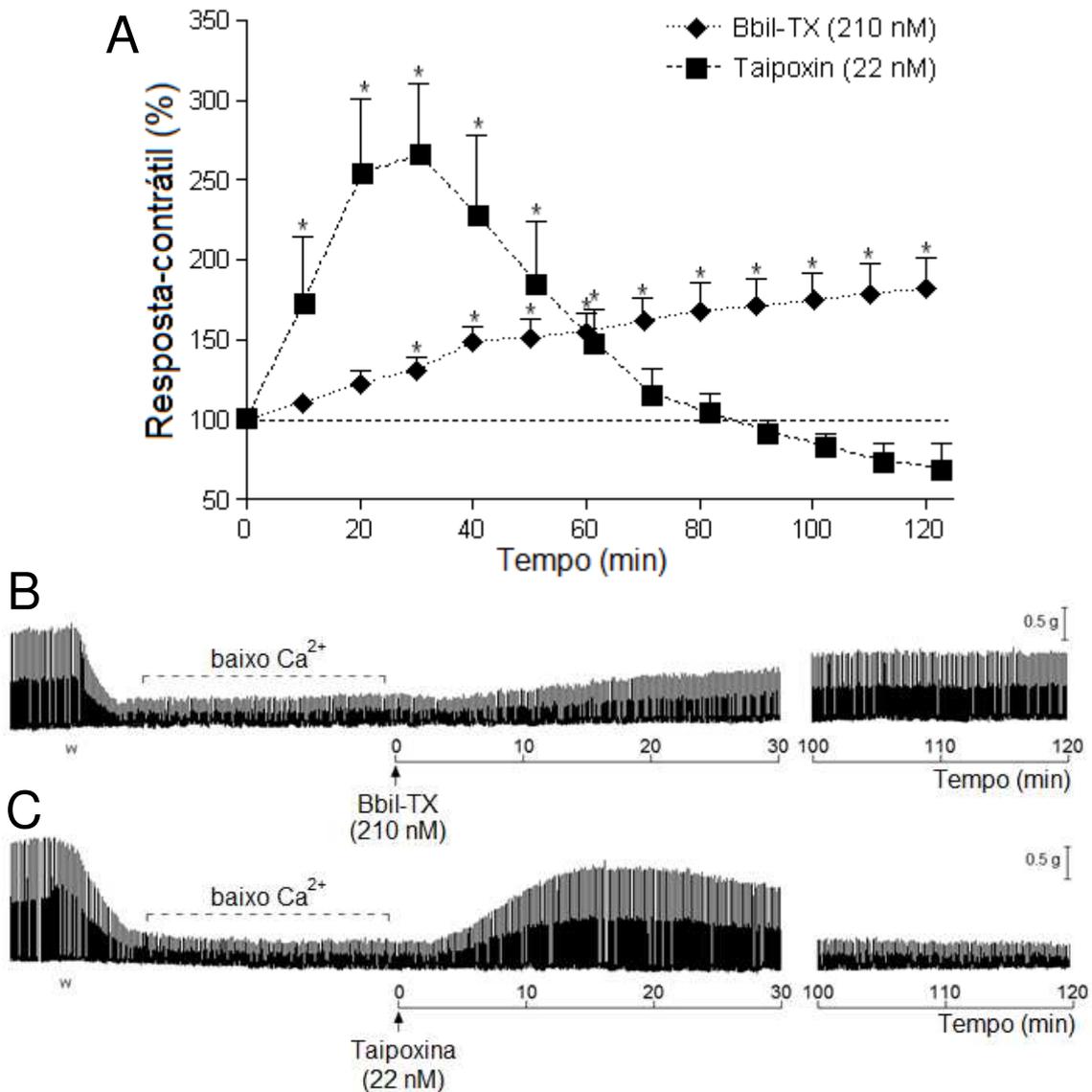


Figura 41. Efeito neuromuscular de Bbil-TX e Taipoxina em preparações NFD incubadas em solução fisiológica em baixo Ca^{2+} (0,2–0,4 mM). **A.** Facilitação neuromuscular causada por Bbil-TX (210 nM) e Taipoxina (22 nM). **B.** Registro representativo da facilitação neuromuscular progressiva causada por Bbil-TX (210 nM). **C.** Registro miográfico da facilitação neuromuscular causada por Taipoxina (22 nM). Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente (23–25 °C) ($n = 4$); * $p < 0,05$ comparado com valores basais; *washing* (w).

5.10. Atividade PLA_2 do veneno de *B. b. smaragdina*, Bbil-TX e Taipoxina em baixo Ca^{2+} e temperatura ambiente

A atividade PLA_2 do veneno de *B. b. smaragdina*, da Bbil-TX e da Taipoxina foi realizada em temperatura ambiente (23–25 °C) seguida de incubação em solução *buffer* 1, 8 mM ou 0,4 mM de Ca^{2+} . A atividade PLA_2 do

veneno total, tanto quanto da Bbil-TX e da Taipoxina foi significativamente atenuada em concentração reduzida de Ca^{2+} e temperatura ambiente (Figura 42).

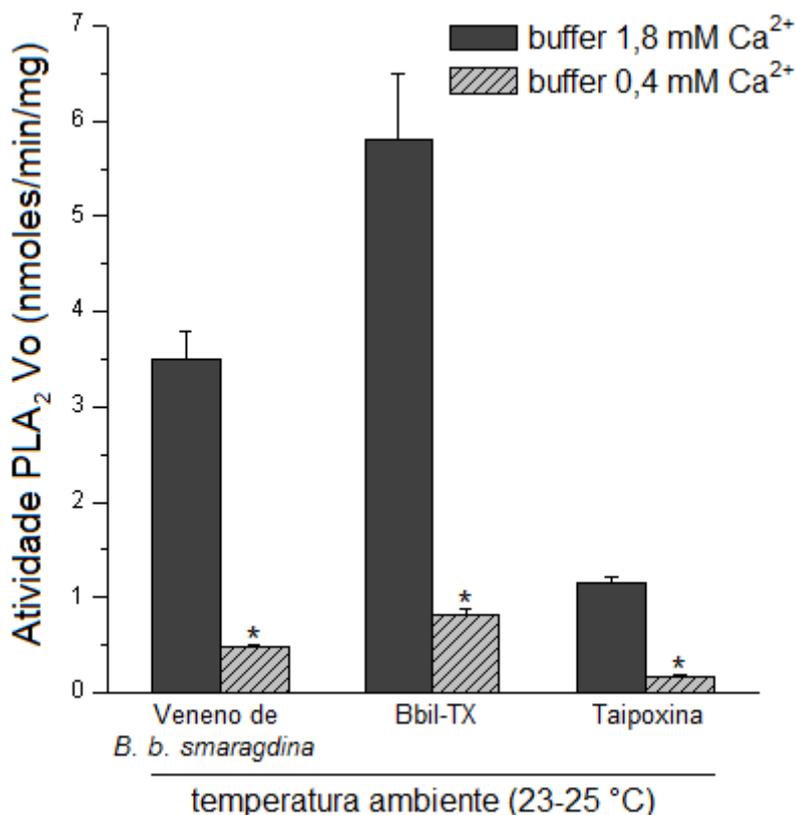


Figura 42. Atividade PLA_2 do veneno de *B. b. smaragdina*, da Bbil-TX e da Taipoxina na presença de Ca^{2+} (1,8 mM) e Ca^{2+} (0,4 mM) em temperatura ambiente (23–25 °C). As colunas representam a média \pm EPM (n = 3); * $p < 0,05$ comparado com respectivos controles positivos.

5.11. Efeitos de Bbil-TX e da Taipoxina sobre o conteúdo quântico em preparações TSn-m mantidas em baixo Ca^{2+}

Em registros intracelulares de PsPT evocados de preparações TSn-m incubadas em solução fisiológica em baixo Ca^{2+} , a Taipoxina (22 nM) e a Bbil-TX (210 nM) causaram progressivo aumento no conteúdo quântico (Figura 43A e Tabela 09). As Figuras 43B1 e 43B2 mostram registros representativos do aumento da amplitude do PPT produzido por Taipoxina (22 nM) e Bbil-TX (210 nM), respectivamente [Taipoxina: $1,5 \pm 0,2$ mV (t_0) vs. $2,9 \pm 1$ mV (t_{60}), $p > 0,05$; Bbil-TX: $1,8 \pm 0,4$ (t_0) vs. $3,6 \pm 1,1$ (t_{60}), $p > 0,05$; n = 4]. O tempo decorrido para o aumento na liberação de neurotransmissor é similar ao

tempo estimado para a facilitação neuromuscular vista em experimentos de contração muscular em preparações NFD mantidas na mesma condição fisiológica (ver Fig. 41).

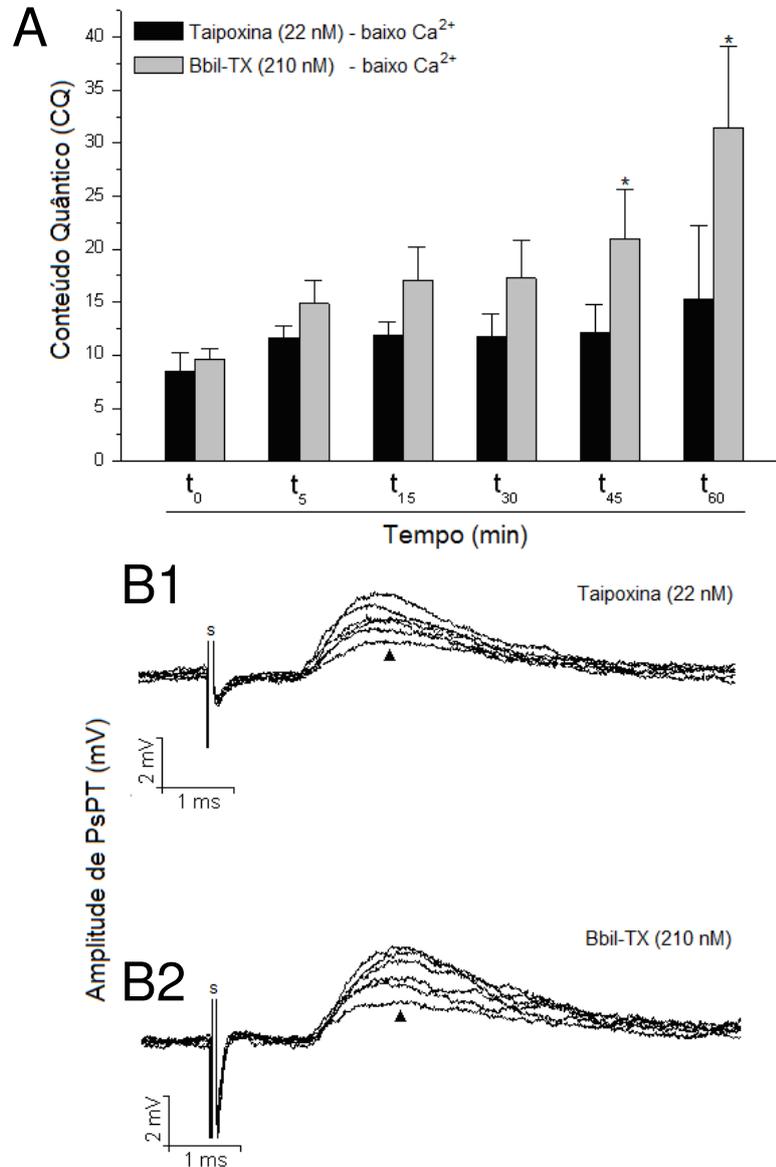


Figura 43. Medida dos potenciais de placa terminal (PPT) em preparações TSn-m mantidas em solução fisiológica em baixo Ca²⁺ e tratadas com Taipoxina (22 nM) e Bbil-TX (210 nM). **A.** Efeitos da Taipoxina e da Bbil-TX sobre o conteúdo quântico. Em A, as colunas representam a média \pm EPM ($n = 4$); * $p < 0,05$ comparado com valores basais. **B1.** Registro representativo mostrando o aumento na amplitude de PPT causado por Taipoxina do t₀ (basal) indicado por (\blacktriangle) até o t₆₀ (traço superior). **B2.** Registro representativo mostrando o aumento na amplitude de PPT causado pela Bbil-TX do t₀ (basal) indicado por (\blacktriangle) até o t₆₀ (traço superior) (**B2**). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente; “s” indica artefato de estímulo.

Tabela 09. Medida do conteúdo quântico em preparações TSn-m tratadas com Taipoxina (22 nM) e Bbil-TX (210 nM).

Tempo (min)	Conteúdo Quântico (CQ)	
	Taipoxina	Bbil-TX
Controle	8,5±1,8	9,6±1,1
5 min	11,6±1,2	14,9±2,2
15 min	11,9±1,3	17,1±3,1
30 min	11,7±2,2	17,3±3,6
45 min	12,2±2,6	21±4,7*
60 min	15,3±6,9	31±7,7*

* $p < 0,05$

5.12. Efeitos do veneno total de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX sobre o potencial de ação composto em nervo ciático de camundongo

O veneno de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL) e Bbil-TX (210 nM) causaram pequenas alterações na amplitude do potencial de ação composto e nenhum efeito significativo sobre o tempo de subida (*rise time*) e latência, como mostrado na Figura 44A e dados sumarizados na Tabela 10). A Figura 44B mostra registros de potenciais evocados do nervo ciático em preparações mantidas em solução fisiológica com Ca^{2+} 1,8 mM (B1), seguido da adição de 10 µg de veneno/mL (B2) e 210 nM de Bbil-TX (B3), com todos os experimentos sendo realizados em temperatura ambiente por 60 min. As concentrações de veneno e de toxina não causaram nenhuma alteração na amplitude dos potenciais observados onde foi usado pulsos pareados [$101 \pm 0,8$ (t_0) vs. $99 \pm 0,4$ (t_{60}) para 10 µg de veneno/mL; 101 ± 1 (t_0) vs. $100 \pm 0,6$ (t_{60}) para 210 nM de Bbil-TX; valores expressados como uma porcentagem dos valores absolutos basais; $n = 3$ para ambos os tratamentos]. Houve bloqueio completo dos potenciais após adição de Tetrodotoxina (TTX; 3,1 nM) no final dos experimentos, mostrando que os tecidos conectivos foram removidos suficientemente para permitir o acesso aos nódulos de Ranvier e que os canais de Na^+ estavam responsivos; a Figura 44A também mostra o efeito de TTX em preparações pré-tratadas com veneno (10 µg/mL) e Bbil-TX (210 nM).

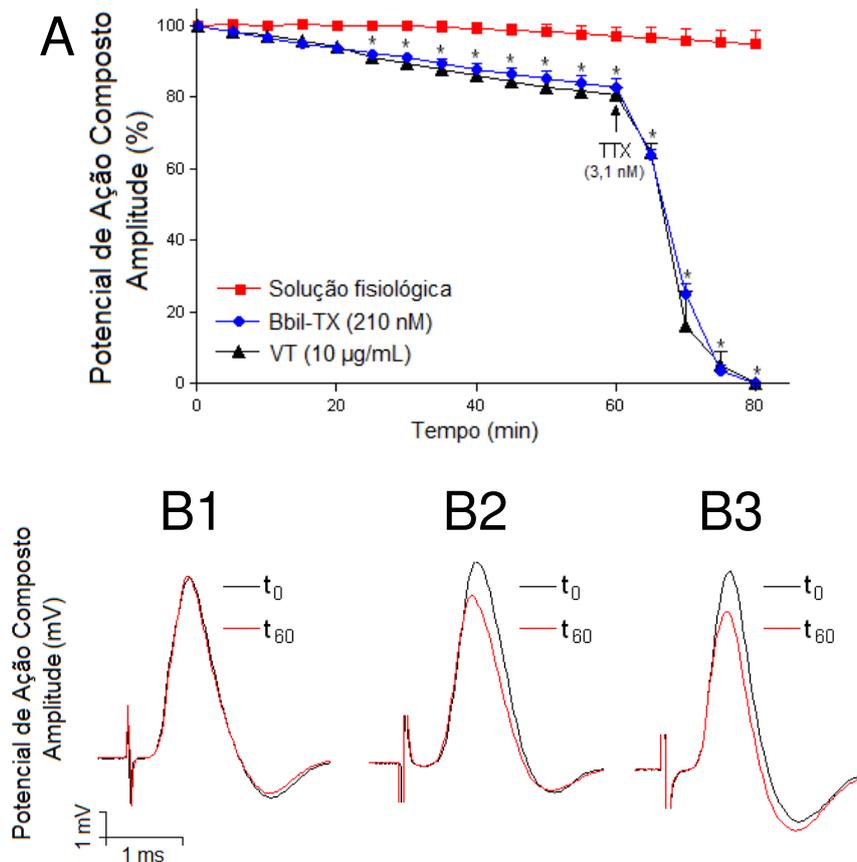


Figura 44. Potenciais de ação compostos registrados em nervo ciático de camundongo. **A.** Discreta diminuição na amplitude do potencial de ação composto durante a incubação do nervo com veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL) e Bbil-TX (210 nM). A Tetrodotoxina (TTX; 3,1 nM) foi adicionada ao final dos experimentos para mostrar que os tecidos conectivos foram completamente removidos e que os canais de Na⁺ estavam responsivos. Os pontos representam a média ± EPM (n = 3); **p* < 0,05 comparado com preparações controle. **B.** Registros de preparações controle (**B1**), preparações tratadas com veneno de *B. b. smaragdina* [10 µg/mL (**B2**)] e Bbil-TX [210 nM (**B3**)]. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente; “s” indica artefato de estímulo.

Tabela 10. Parâmetros eletrofisiológicos registrados de preparações NC tratadas com veneno total de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX.

Tratamento	Amplitude		Latência		Rise Time	
	t ₀ (valores absolutos, mV)	Fim da incubação (% t ₀)	t ₀ (valores absolutos, ms)	Fim da incubação (% t ₀)	t ₀ (valores absolutos, ms)	Fim da incubação (% t ₀)
Controle	8,0±0,6	97±2,5	0,26±0,06	115±6,8	0,25±0,03	98±0,2
VT (10 µg/mL)	7,5±0,7	80±2,1*	0,55±0,05	108±2,4	0,28±0,02	97±2,3
Bbil-TX (210 nM)	7,2±0,6	83±2,4*	0,40±0,09	106±1,7	0,24±0,01	97±3,9

Os experimentos foram executados em temperatura ambiente por 60 min. A Fig. 44A mostra alterações na amplitude em outros intervalos. Os valores são a média ± EPM (n = 3–5); *p < 0,05 comparado com valores basais.

5.13. Efeitos do veneno total de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX sobre as formas de onda perineurais em preparações TSn-m

O veneno (10 µg/mL) e Bbil-TX (210 nM) causaram significativa redução na forma de onda associada com a corrente de efluxo de K⁺ em preparações TSn-m comparado com as preparações controle (controle: 5 ± 0,7%, veneno: 35 ± 7,2% e Bbil-TX: 26 ± 1,4% de redução após 30 min de incubação; $p < 0,05$; $n = 3-5$) (Figura 45A; para diferenças com valores basais ver Tabela 11). A amplitude da corrente de influxo de Na⁺ não sofreu alteração importante em ambos os tratamentos (controle: 6,5 ± 1,5%, veneno: 18 ± 3,3% ($p < 0,05$) e toxina: 15 ± 2,4% ($p > 0,05$) de redução após 30 min de incubação; $n = 3-5$) (Figura 45B; para diferenças com valores basais ver Tabela 11). A Figura C mostra traçados representativos de formas de onda perineurais registradas em preparações TSn-m mantidas apenas em solução fisiológica (C1), tratadas com veneno 10 µg de veneno/mL (C2) e 210 nM de Bbil-TX (C3), com todos os experimentos executados por 30 min em temperatura ambiente.

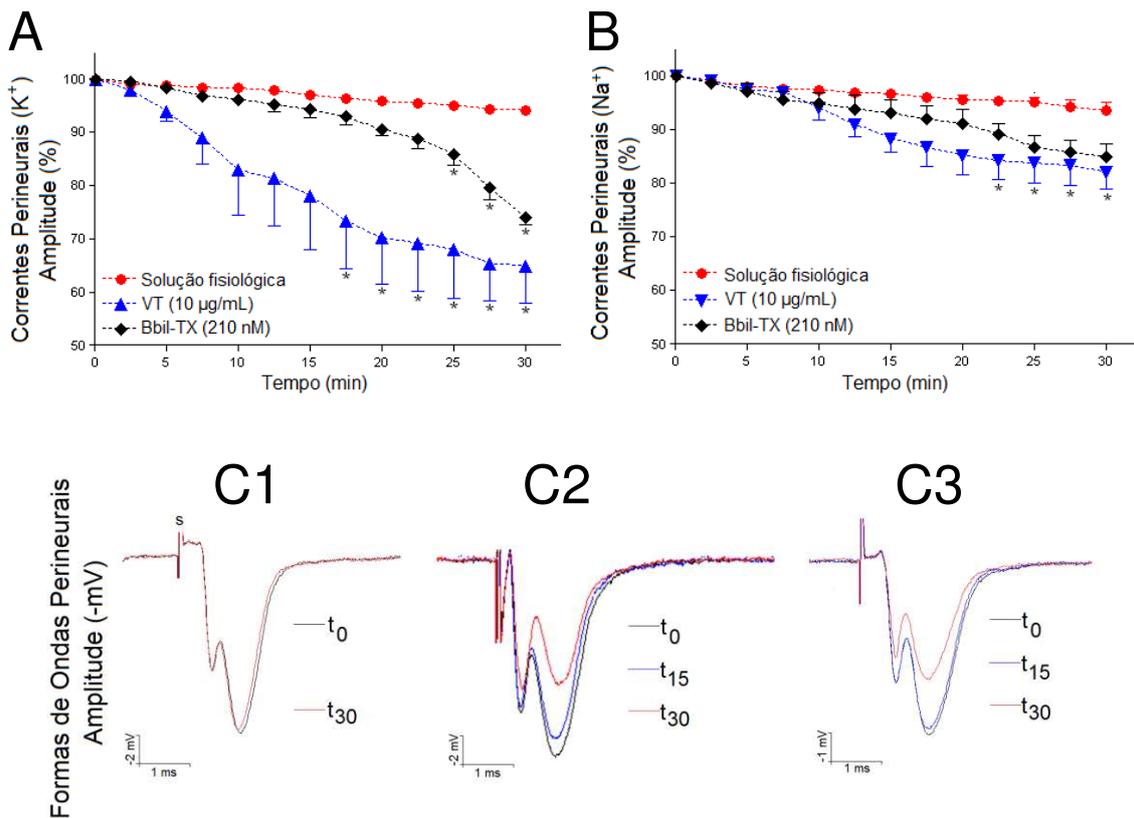


Figura 45. Correntes perineurais de preparações TSn-m mostrando a forma de onda associada com o movimento de Na⁺ (primeira deflexão negativa) e de K⁺ (segunda deflexão negativa), respectivamente. **A.** Efeito do veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL) e Bbil-TX (210 nM) sobre as correntes de Na⁺. **B.** Efeito do veneno total de *B. b. smaragdina* (10 µg/mL) e Bbil-TX (210 nM) sobre as correntes de K⁺. Em A e B, os pontos representam a média ± EPM (n = 4); *p < 0,05 comparado com preparações controle. **C.** Registros perineurais sobrepostos de preparações controle (**C1**), preparações tratadas com veneno [10 µg/mL (**C2**)] e Bbil-TX [210 nM (**C3**)]; “s” indica artefato de estímulo. Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente e com solução fisiológica contendo cálcio normal (1,8 mM).

Tabela 11. Medida das correntes perineurais em preparações TSn-m tratadas com veneno de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX.

Tratamento	Corrente de Na ⁺		Corrente de K ⁺	
	Amplitude		Amplitude	
	t ₀ (mV)	Fim da incubação (% t ₀)	t ₀ (mV)	Fim da incubação (% t ₀)
Controle	-6,8±1,1	93,5±1,5	-9,4±1,8	94,1±0,7
VT (10 µg/ml)	-8,0±1,5	82,1±3,3	-8,7±1,3	64,9±7,2*
Bbil-TX (210 nM)	-7,3±1,0	84,9±2,4	-9,5±1,5	73,9±1,4*

Os experimentos foram executados em temperatura ambiente por 60 min. A Fig. 45A-B mostra alterações na amplitude em outros intervalos. Os valores são a média ± EPM (n = 3–5); **p* < 0,05 comparado com valores basais.

5.14. Efeitos do veneno total de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX sobre o movimento espontâneo de Ca²⁺ em células SK-N-SH

A fim de determinar se o veneno ou a Bbil-TX causam aumento no Ca²⁺ intracelular, linhagem celular de neuroblastoma (SK-N-SH) foi marcada com indicador sensível ao Ca²⁺ (Fluo-3 AM; 4 µM). Não houve alteração na fluorescência ao cálcio quando as células foram expostas ao veneno de *B. b. smaragdina* (3 µg/mL) e Bbil-TX (210 nM) em solução fisiológica ausente de Ca²⁺ [amplitude de fluorescência: 133 ± 8,4% (controle), 134 ± 6,6% (veneno) e 159 ± 4,6% (toxina) acima dos valores basais após 10 min de incubação; n = 15–20 células; *p* > 0,05] (Figura 46A). No entanto, o veneno e a Bbil-TX causaram um progressivo aumento na fluorescência ao cálcio em células mantidas em solução fisiológica em baixo Ca²⁺ [amplitude de fluorescência: 120 ± 11,5% (controle), 198 ± 5,3% (veneno) e 169 ± 7,6% (toxina) acima dos valores basais após 10 min de incubação; n = 15–20 células; *p* < 0,05] (Figura 46B). Em células mantidas em normais condições de Ca²⁺, o aumento na amplitude de fluorescência causado pelo veneno e pela Bbil-TX foi acompanhado por irregular e frequente movimento de Ca²⁺ (Figura 46C). No entanto, o pré-tratamento do veneno e da Bbil-TX com *p*-BPB diminuiu a frequência e reduziu a amplitude do movimento de Ca²⁺ em células mantidas em solução fisiológica com normais condições de Ca²⁺ (Figura 46D).

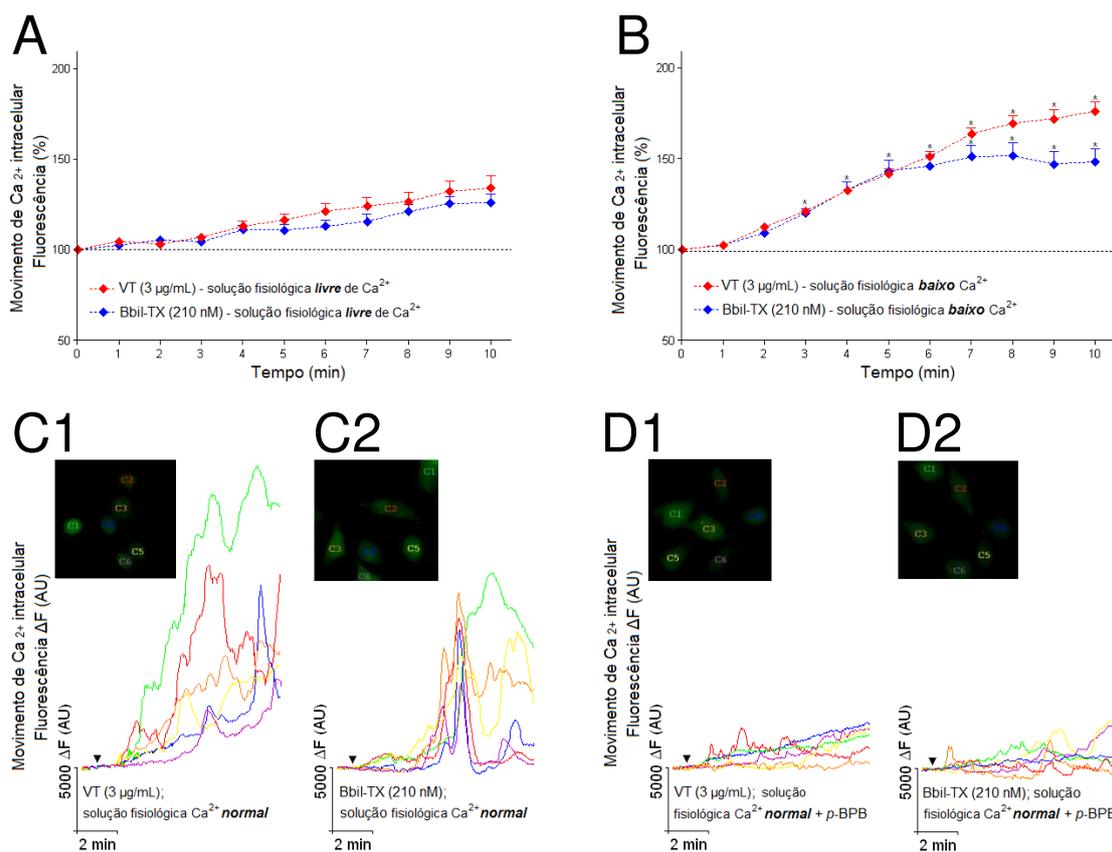


Figura 46. Alterações na fluorescência por Fluo3 (4 μM) em células SK-N-SH expostas ao veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Bbil-TX (210 nM). **A.** Células mantidas em solução fisiológica ausente de Ca^{2+} . **B.** Células mantidas em solução fisiológica com baixo Ca^{2+} . Em A e B, os pontos representam a média \pm EPM ($n = 15\text{--}20$ células por protocolo); $*p < 0,05$ comparado com valores basais. **C.** Registros sobrepostos das alterações de fluorescência de uma única *coverslip* de células ilustrando as oscilações na fluorescência induzida pelo veneno (**C1**) e Bbil-TX (**C2**) em células mantidas em solução fisiológica com Ca^{2+} normal. **D.** Atenuação da fluorescência após pré-tratamento de veneno (**D1**) e Bbil-TX (**D2**) por *p*-BPB em células mantidas em solução fisiológica com Ca^{2+} normal; as figuras *in set* em C e D representam as respectivas células monitoradas.

5.15. Efeitos do veneno total de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX sobre o movimento espontâneo de Ca^{2+} em preparações TSn-m

A Bbil-TX (210 nM) não causou alterações na fluorescência ao cálcio em fibras musculares monitoradas de preparações TSn-m [amplitude de fluorescência: $95 \pm 0,6\%$ (controle) e $98 \pm 0,3\%$ (toxina) abaixo dos valores basais após 10 min de incubação] (Figura 47). No entanto, o veneno de

B. b. smaragdina (10 µg/mL) causou um aumento na fluorescência ao cálcio em preparações TSn-m. Após a adição do veneno, houve um imediato aumento no Ca²⁺ intracelular nas fibras musculares seguido por frequente oscilação na fluorescência e contratura (Figura 48A1); os *red spots* indicados por setas na Figura 48A1 podem corresponder a regiões de placas motoras, porém esta informação não é conclusiva. A Figura 48A2 mostra as oscilações na fluorescência induzida pelo veneno mensuradas em *full screen* sob condições de solução fisiológica com baixo Ca²⁺. Em preparações mantidas em solução fisiológica livre de Ca²⁺, o aumento inicial no Ca²⁺ intracelular esteve ainda presente, porém reduzido em magnitude (Figura 48B1). A Figura 48B2 mostra as oscilações na fluorescência induzida pelo veneno mensuradas em *full screen* sob condições de solução fisiológica livre de Ca²⁺.

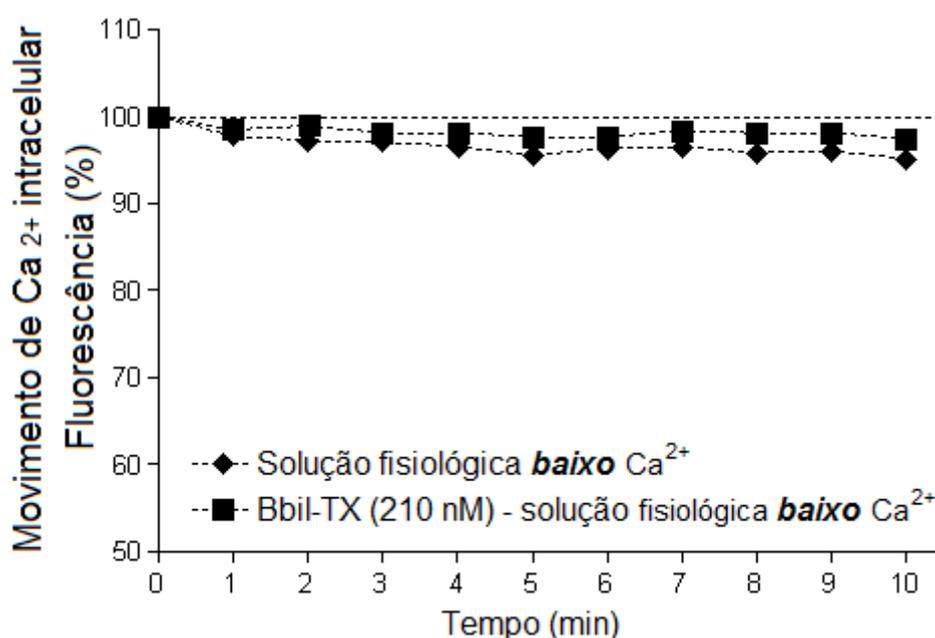
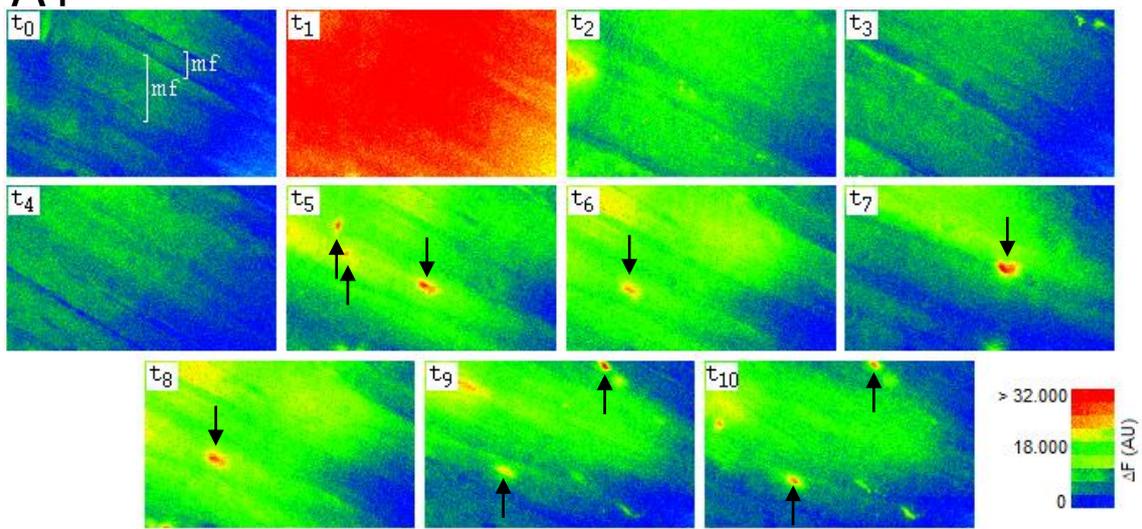
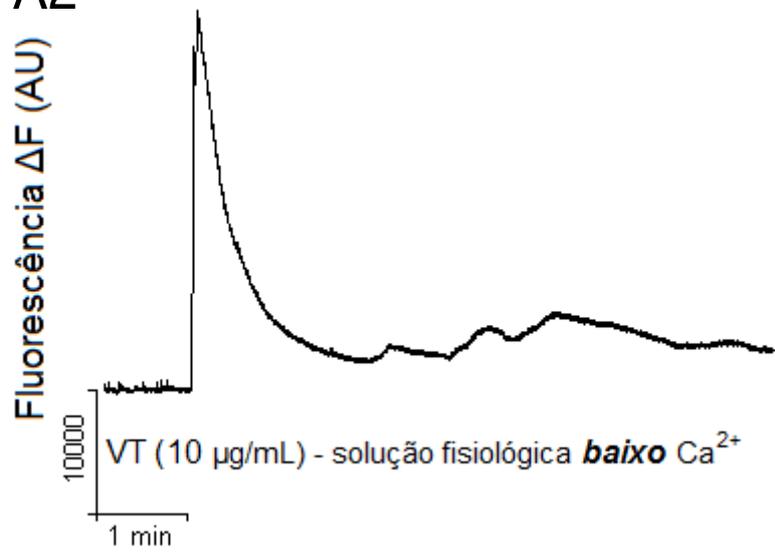


Figura 47. Ausência de alterações na fluorescência por Fluo4 (4 µM) em preparações TSn-m mantidas em solução fisiológica com baixo Ca²⁺ e expostas à toxina Bbil-TX (210 nM). Os pontos representam a média ± EPM (n = 3; p > 0,05 comparado com preparações controle).

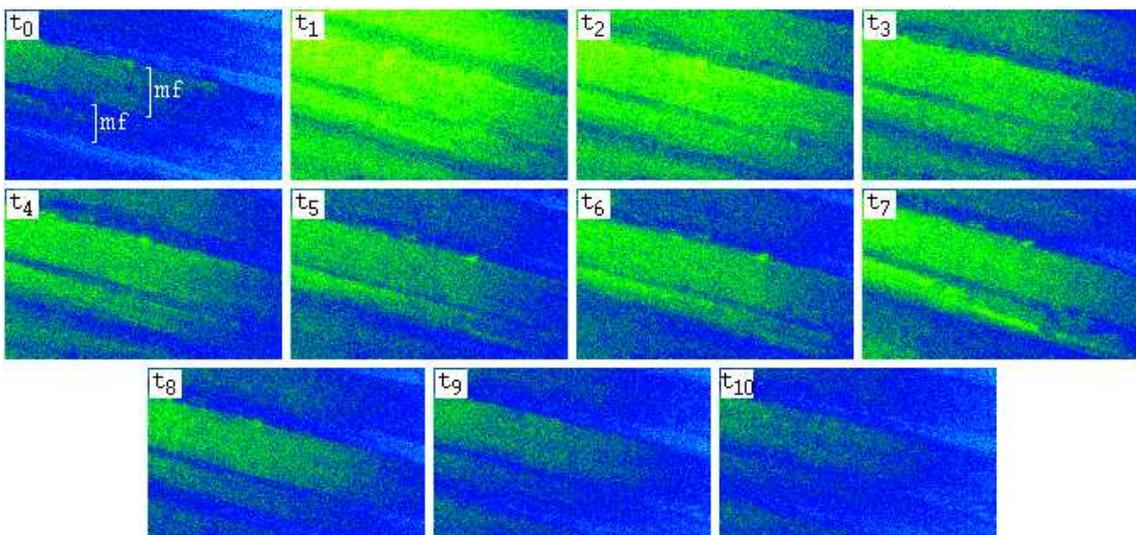
A1



A2



B1



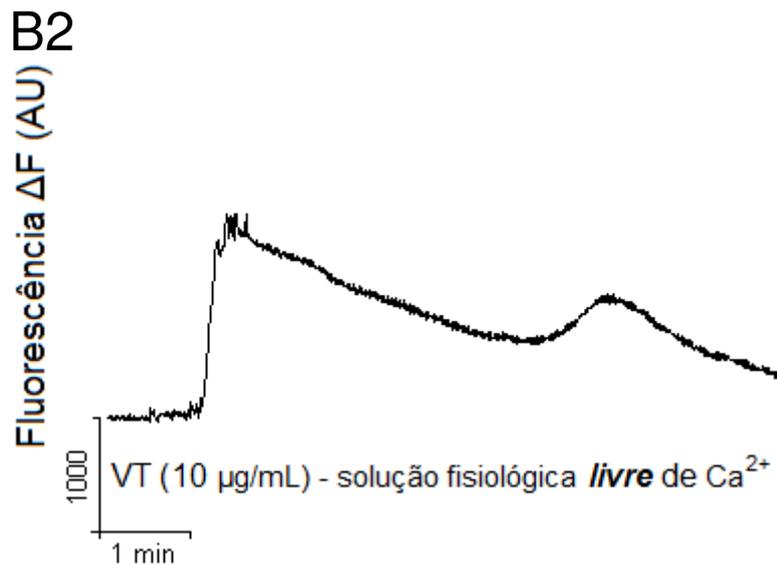


Figura 48. Alterações na fluorescência por Fluo4 (4 μM) em preparações TSn-m expostas ao veneno total (VT) de *B. b. smaragdina* (10 $\mu\text{g/mL}$). **A.** Efeito do veneno em preparações mantidas em solução fisiológica com baixo Ca^{2+} (**A1**); monitoramento da fluorescência em *full screen* (**A2**). **B.** Efeito do veneno em preparações mantidas em solução fisiológica livre de Ca^{2+} (**B1**); monitoramento da fluorescência em *full screen* (**B2**). Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente ($n = 3$); mf: fibra muscular; as setas em A1 indicam *red spots*, possíveis regiões de placas motoras.

5.16. Imunohistoquímica

Secções longitudinais e transversais de preparações NFD controle foram marcadas positivamente para receptores juncionais de ACh e também para proteínas de vesícula (sinaptofisina) e membrana (SNAP25) pré-sináptica (Figura 49). No entanto, uma perda de marcação para anti-sinaptofisina e anti-SNAP35 foi observada em hemidiafragmas pré-expostos à Bbil-TX (210 nM); nestas preparações, a marcação para receptores nicotínicos foi positiva (Figura 50).

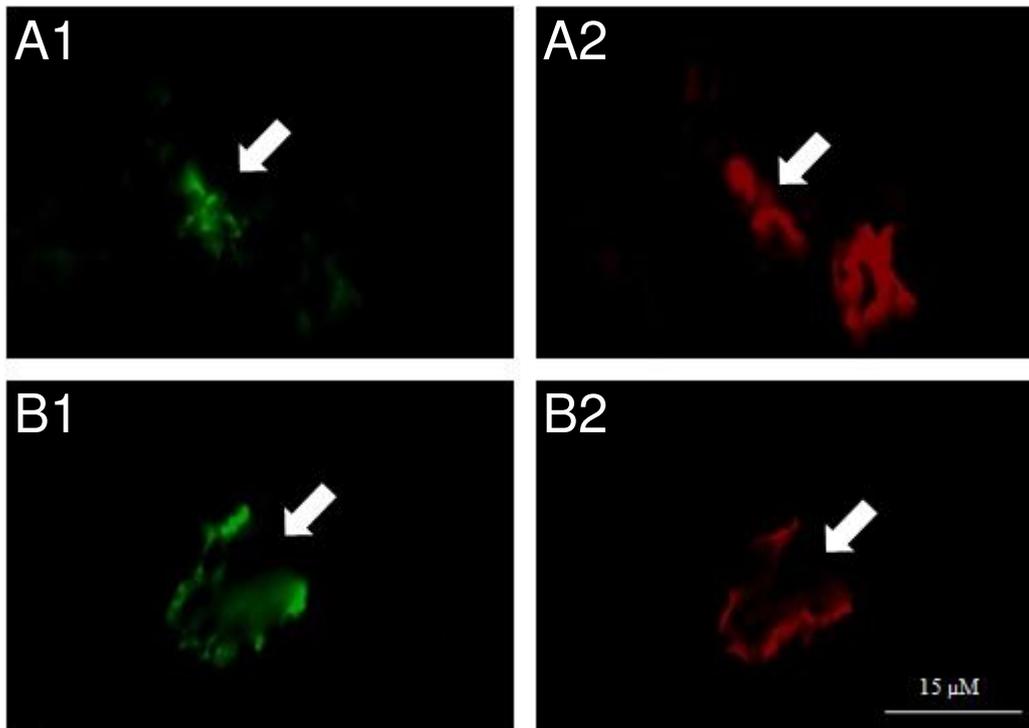


Figura 49. Imunohistoquímica de secções controle de hemidiafragma de camundongo. **A.** Marcação com anticorpo primário anti-sinaptofisina co-marcado com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC em verde (seta - **A1**); marcação com α -bungarotoxina conjugada com TRITC em vermelho (seta - **A2**). **B.** Marcação com anticorpo primário anti-SNAP25 co-marcado com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC em verde (seta - **B1**); marcação com α -bungarotoxina conjugada com TRITC em vermelho (seta - **B2**). Os painéis A e B representam diferentes regiões de placas na mesma secção, respectivamente (n = 3). Magnificação: 400x.

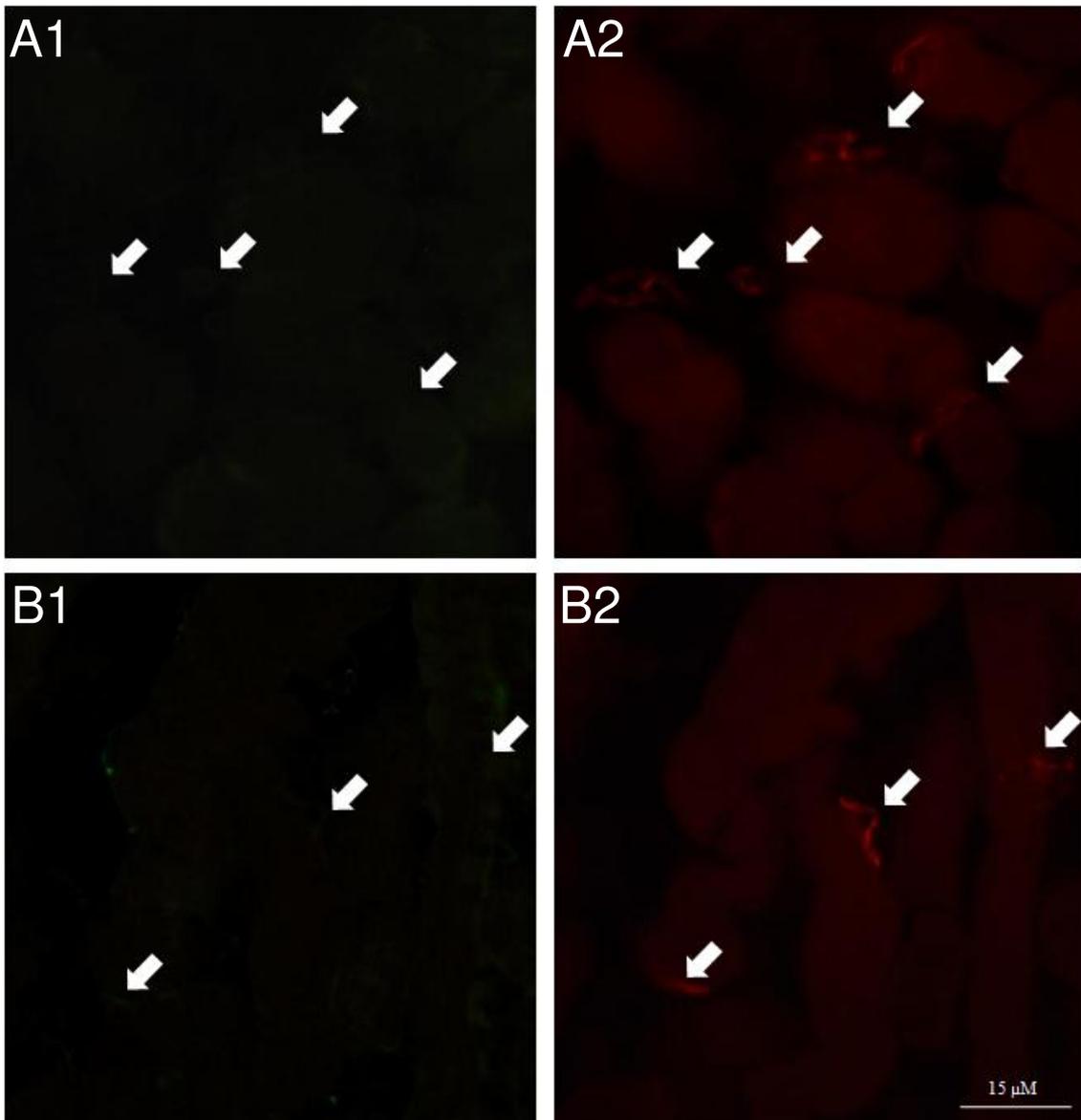


Figura 50. Imunohistoquímica de secções de hemidiafragma de camundongo tratadas com Bbil-TX (210 nM). **A.** Ausência de marcação com anticorpo primário anti-sinaptofisina co-marcado com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC em verde (setas - **A1**); presença de marcação com α -bungarotoxina conjugada com TRITC em vermelho (setas - **A2**). **B.** Ausência de marcação com anticorpo primário anti-SNAP25 co-marcado com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC em verde (setas - **B1**); presença de marcação com α -bungarotoxina conjugada com TRITC em vermelho (setas - **B2**). Os painéis A e B representam diferentes regiões de placas na mesma secção, respectivamente (n = 3). Magnificação: 400x.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O acidente ofídico é um importante problema de saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais, além de ser considerado uma doença tropical negligenciada. No Brasil existem 26 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, as quais são responsáveis por mais de 70% dos acidentes que ocorrem a cada ano. O envenenamento por *Bothrops* causa importantes alterações fisiológicas pelo fato desses venenos conterem diferentes enzimas e proteínas que são responsáveis por atividades coagulante, hemorrágica, proteolítica e miotóxica (Gutiérrez e Ownby, 2003) além de induzirem edema e inflamação (Teixeira et al., 2003). Estudos tem mostrado, também, que esses venenos (Zamunér et al., 2004) e algumas de suas PLA₂ podem induzir bloqueio neuromuscular pós-sináptico (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Gallacci e Cavalcante, 2010; Moraes et al., 2012) ou pré-sináptico *in vitro* (Cogo et al., 2006; Borja-Oliveira et al., 2007; Calgarotto et al., 2008; Ponce-Soto et al., 2009; Galbiatti et al., 2012).

Uma descrição preliminar da atividade farmacológica do veneno de *Bothriopsis bilineata smaragdina* apresentada neste trabalho mostra que este veneno causa potente bloqueio neuromuscular *in vitro* em preparações neuromusculares de aves e mamíferos, com as preparações de aves sendo aproximadamente dez vezes mais sensíveis do que as preparações de mamíferos. Estes achados concordam com estudos que mostram que venenos botrópicos e suas PLA₂ básicas podem causar bloqueio neuromuscular *in vitro* (Zamunér et al., 2004; Gallacci e Cavalcante, 2010). Embora β -neurotoxinas clássicas não tenham sido identificadas em venenos originários de serpentes Viperidae, vários estudos têm mostrado que os venenos de algumas espécies botrópicas, como por exemplo, a *Bothrops insularis* (Cogo et al., 1993), *Bothrops neuwiedi* (Borja-Oliveira et al., 2003; Rodrigues-Simioni et al., 2004) e *Bothrops marajoensis* (Cavalcante et al., 2011), causam bloqueio neuromuscular em concentrações muito baixas (0,1–30 $\mu\text{g/mL}$) via ação pré-sináptica a partir de evidências como: diminuição do conteúdo quântico e ausência de alterações significativas no potencial de membrana em preparações NFD de camundongo; ausência de efeito sobre a resposta muscular à ACh exógena e KCl em preparações BC de pintainhos; reduzida liberação de CK e ausência de efeito inibitório sobre a resposta muscular de

preparações sob estimulação elétrica direta, indicando ausência de danos musculares em ambas preparações.

Uma vez que estas mesmas características foram observadas em preparações nervo-músculo tratadas com veneno de *B. b. smaragdina*, podemos inferir que este veneno também causa bloqueio neuromuscular por ação pré-sináptica, como outros poucos venenos botrópicos e suas toxinas (Cogo et al., 1998; Borja-Oliveira et al., 2007; Ponce-Soto et al., 2009). Na verdade, a alta potência do veneno de *B. b. smaragdina* (50% de bloqueio em aproximadamente 15 min com 10 µg/mL) foi similar, ou até mesmo superior, ao de muitos venenos botrópicos com atividade pré-sináptica (tempo de 50% de bloqueio: *B. marajoensis* 17±1 min, *B. insularis* 30±2 min e *B. neuwiedi* 42±2 min) (Rodrigues-Simioni et al., 2004 e Cavalcante et al., 2011).

A diminuição na potência (tempo maior para alcançar 50% de bloqueio) e a atenuação da facilitação vista quando os experimentos foram feitos sob baixa temperatura (22–24 °C) e quando a atividade PLA₂ foi inibida com brometo de *p*-bromofenacila (*p*-BPB) sugere o envolvimento de atividade PLA₂ nestas respostas, como também relatado para outros venenos botrópicos (Cogo et al., 1993; Rodrigues-Simioni et al., 2004). Entretanto, como mostrado em experimentos com d-Tubocurarina (d-Tc), a atividade neuromuscular do veneno em preparações NFD parece envolver pelo menos dois componentes: um que causa prolongada facilitação (atividade PLA₂-independente) e outro que contribui na fase inicial da facilitação e causa bloqueio neuromuscular (provavelmente atividade PLA₂-dependente) (Rodrigues-Simioni et al., 2011). A similar facilitação neuromuscular observada em experimentos com d-Tc e inibição de atividade PLA₂ em preparações NFD, também é um indicativo de que componentes de natureza não-PLA₂ presentes no veneno de *B. b. smaragdina* podem contribuir para este efeito.

A incidência de acidentes por *B. b. smaragdina* em humanos varia consideravelmente (3–38%) em toda área da bacia amazônica (Smalligan et al., 2004; Warrell, 2004), com maior frequência de acidentes envolvendo punhos, mãos, braços e parte superior do corpo, incluindo a face, cabeça e pescoço por se tratar de uma espécie de hábito arborícola. As manifestações clínicas do envenenamento por esta espécie são similares ao de outras espécies botrópicas, a saber, edema local, dor e equimose (necrose é

incomum), com as principais manifestações sistêmicas sendo coagulopatia e sangramento espontâneo (Warrell, 2004). No entanto, manifestações neurotóxicas não têm sido relatadas.

Esta discrepância entre os resultados para neurotoxicidade *in vitro* e *in vivo* pode refletir a presença de inibidores de PLA₂ endógenos circulantes no plasma humano. Na verdade, moléculas capazes de inibir as atividades de metaloproteinase e PLA₂ *in vitro* e *in vivo* foram isoladas do plasma de serpentes e mamíferos (gambá) (Lizano et al., 2003), tendo também o plasma humano compostos inibidores de PLA₂ (Miwa et al., 1984, Miwa et al., 1985). Além disso, o sequestro não-específico de PLA₂ de venenos por vários tipos celulares tem sido sugerido como uma possível explicação para a discrepância entre miotoxicidade local e sistêmica (Gutiérrez et al., 2008) e a neurotoxicidade *in vitro* e *in vivo* de venenos botrópicos e suas PLA₂ (Gallacci e Cavalcante, 2010). Nota-se que as respostas neuromusculares do veneno de *B. b. smaragdina* em diferentes espécies (aves, roedores e humana) são variáveis. Dada a natureza arbórea de *B. b. smaragdina* e a potência de seu veneno em preparações de aves, este veneno pode ser particularmente adaptado para este tipo de presa.

A partir da hipótese de que o efeito bloqueador neuromuscular por ação pré-sináptica do veneno de *B. b. smaragdina* é PLA₂-dependente, como sugerem os protocolos farmacológicos executados em baixa temperatura e com inibidor específico da atividade PLA₂, a segunda fase do projeto consistiu na caracterização bioquímica do componente do veneno que apresentasse atividade catalítica significativa, tal qual aquela previamente observada no veneno bruto. Essa parte do estudo foi executada em parceria com o Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp.

A purificação do composto com alta atividade catalítica a partir do veneno total envolveu duas fases cromatográficas, sendo a primeira por gel filtração em coluna Sephadex (G-75) que resultou em três picos majoritários de proteínas. O segundo pico (P₂) mostrou maior atividade PLA₂ do que os demais e exibiu efeitos similares àqueles observados com o veneno total em preparações neuromusculares. A segunda fase executada a partir de P₂ em sistema HPLC de fase reversa revelou cinco proteínas, identificadas como P₂-I – P₂-V, das quais apenas o composto P₂-III apresentou atividade PLA₂

significativa, sendo também aquele de maior massa molecular isolado do pico em descrição. O composto P₂-III foi, então, repurificado sob as mesmas condições aplicadas ao P₂ e sua integridade molecular e atividade catalítica foram preservadas mostrando a otimização do processo cromatográfico. A massa molecular do composto P₂-III (denominado de Bbil-TX) estimada por SDS-PAGE apresentou, em condições reduzidas e não-reduzidas, uma única banda protéica de ~14 kDa, semelhantemente à outras PLA₂ isoladas de venenos botrópicos (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996; Gutiérrez et al., 2008).

A caracterização bioquímica completa de Bbil-TX foi descrita por Carregari et al. (2013) como sendo uma PLA₂ básica (Asp49) com massa molecular de 14243.8 Da. A presença de Cys-14 nesta toxina fornece a base para sua característica estrutural comum às PLA₂ na formação de suas sete pontes dissulfeto, além do alto conteúdo de resíduo básico e hidrofóbico que provê uma explicação consistente para a interação da PLA₂ com fosfolípidios de membranas celulares negativamente carregados (Ponce-Soto et al., 2006; Ponce-Soto et al., 2009; Burke e Dennis, 2009). A atividade catalítica de Bbil-TX mostrou ser intrinsecamente dependente de Ca²⁺, uma vez que na presença de outros íons divalentes (Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e Cd²⁺) foi significativamente reduzida. Além disso, a presença do aminoácido Asp-49 no sítio catalítico favorece a imobilização do Ca²⁺ que por sua vez induz mudanças sutis em sua configuração necessárias para a catálise (Scott et al., 1990). A atividade catalítica de Bbil-TX pôde ser verificada em diferentes níveis de pH tendo sido máxima em pH 8,0, uma vez que as PLA₂ básicas mostram ótima atividade catalítica entre pH 7.0 – 8,5 (Breithaupt, 1976; Kini, 1997). A exposição de PLA₂ à diferentes temperaturas também é um importante parâmetro cinético para evidenciar o caráter básico dessas proteínas; assim, a atividade catalítica de Bbil-TX manteve-se estável entre 25 – 40 °C. Ainda segundo Carregari et al. (2013), a Bbil-TX induz aumento do CK plasmático e é pró-inflamatória, causando edema e estimulando a formação de TNF α , interleucina (IL)-1 e IL-6.

Como mostrado aqui, a Bbil-TX também causa bloqueio neuromuscular em preparações nervo-músculo de vertebrados. Na verdade, Bbil-TX reproduz a maioria dos efeitos do veneno em que é possível notar

bloqueio neuromuscular tempo- e concentração-dependente, com preparações de aves sendo mais sensíveis do que preparações de mamíferos (35–702 nM vs. 210 nM–2 μ M; completo bloqueio com 702 nM após 40 min na primeira, enquanto que 2 μ M causou apenas 52% de bloqueio após 120 min na segunda). O bloqueio neuromuscular induzido pela Bbil-TX envolveu, principalmente, uma ação pré-sináptica como sugerem as seguintes evidências: (1) na vigência de bloqueio neuromuscular completo, não interferiu na função dos receptores nicotínicos pós-sinápticos como indicado pelas respostas inalteradas à ACh e CCh exógenos; (2) progressiva diminuição nos valores do conteúdo quântico e frequência de potenciais de placa terminal em miniatura em músculo diafragma de camundongo [esse efeito inibitório da neurotransmissão é característico de toxinas pré-sinápticas clássicas tal como a β -bungarotoxina (Oberg e Kelly, 1976) e crotoxina (Hawgood e Smith, 1989; Rodrigues-Simioni et al., 1990)], (3) ausência ou discreto efeito sobre os valores de potencial de membrana em repouso (em músculo diafragma), (4) reposta contrátil inalterada em preparações BC e NFD pré-incubadas com d-Tc e diretamente estimuladas e (5) ausência de efeito sobre resposta contraturante ao KCl, indicando integridade da musculatura esquelética que foi corroborada pela falta de alteração na linha de base das respostas contráteis nos registros miográficos.

A contribuição da lesão muscular para o bloqueio neuromuscular causado por PLA₂ de venenos botrópicos pré-sinápticamente ativos é um aspecto que não tem sido ainda sistematicamente investigado e é provável que o grau de lesão varie consideravelmente entre essas toxinas tendo em vista suas diferentes capacidades para danificar as fibras musculares (Gallacci e Cavalcante, 2010; Correia-de-Sá et al., 2013). Embora tanto os valores de CK como a análise histológica tenham indicado que a toxina causa discreto dano muscular, aparentemente este foi insuficiente para afetar significativamente a resposta contrátil sob estimulação direta, as respostas ao KCl e os valores do potencial de membrana em repouso, como descrito acima. O dano muscular induzido pela Bbil-TX, no entanto, não parece ser o principal responsável pelo bloqueio neuromuscular visto aqui. De fato, os dados apresentados mostram que não há correlação positiva entre os efeitos da toxina sobre a membrana muscular e o bloqueio da neurotransmissão.

Enquanto que em preparações BC com Bbil-TX observou-se o bloqueio com o pico P₂ (a partir do qual a toxina foi purificada), em NFD a Bbil-TX mostrou-se nitidamente menos ativa do que o P₂. Embora não tenha sido investigada a razão desta discrepância, é possível que o P₂ contenha outros componentes (em adição à Bbil-TX) que sejam ativos nesta preparação.

Em preparações NFD, a Bbil-TX não causou a facilitação inicial nas repostas contráteis e conteúdo quântico visto com o veneno de *B. b. smaragdina*, em vez disso, o bloqueio pela Bbil-TX foi progressivo a partir de sua adição no meio de incubação. Este achado sugere que algum componente do veneno com exceção da Bbil-TX seja o responsável pela facilitação inicial induzida pelo veneno. Em concordância com esta conclusão, o pico P₃ produziu progressiva e mantida facilitação da neurotransmissão aumentando a liberação do neurotransmissor, mostrado pelo aumento dos valores do conteúdo quântico e pela frequência dos potenciais em miniatura.

PLA₂ são as principais toxinas presentes em venenos de serpentes incluídas no gênero *Bothrops* e afins e contribuem para atividades tais como edema, mionecroses e dor (Gutiérrez e Ownby, 2003; Teixeira et al., 2003; Teixeira et al., 2009). Além disso, muitas dessas PLA₂ tem atividade neuromuscular *in vitro* (Gallacci e Cavalcante, 2010) e pouquíssimas tem sido implicadas na neurotoxicidade pré-sináptica (Cogo et al., 1998; Oshima-Franco et al., 2004; Borja-Oliveira et al., 2007; Galbiatti et al., 2012). A Tabela 12 sumariza o tempo necessário para alcançar 90% de bloqueio por várias dessas toxinas in preparações BC. Claramente, existem importantes diferenças na potência destas toxinas apesar do fato de que foram usadas diferentes concentrações nestes estudos.

Tabela 12. Comparação da potência de Bbil-TX com PLA₂ pré-sinápticas de *Bothrops* expressas como tempo para 90% de bloqueio neuromuscular em preparações biventer cervicis de pintainho. As toxinas estão organizadas em ordem de aumento de concentração testada e o tempo para 90% de bloqueio foi estimado a partir dos gráficos dados pelas correspondentes referências.

Serpente	PLA ₂	Massa molecular (Da)*	Concentração (µg/mL)	Tempo para 90% de bloqueio (min)	Número de acesso UniProtKB
<i>B. alternatus</i>	BaTX (Lys49)	13,899	5	~40 ^a	P86453
<i>B. b. smaragdina</i>	Bbil-TX (Asp49)	14,244	10	~35 ^b	--
<i>B. n. pauloensis</i>	NeuTX-I (Asp49)	~14,000	10	~70 ^c	--
	NeuTX-II (Asp49)	~14,000	10	~80 ^c	--
<i>B. marajoensis</i>	BmajTX-9 (Asp49)	13,679	20	~55 ^d	B3A0N3
<i>B. insularis</i>	BinTX-I (Asp49)	13,975	40	>120 ^e	Q8QG87
<i>B. moojeni</i>	BmTX-I (Asp49)	14,239	50	~65 ^f	P0C8M1

*Massa molecular arredondada para o número inteiro mais próximo. A massa molecular de NeuTX-I e NeuTX-II foi determinada por SDS-PAGE e aquelas das demais toxinas por espectrometria de massa ou por cálculo baseado na composição de aminoácidos. Apenas parcial sequenciamento de aminoácidos (N-terminal ou tryptic fragments) tem sido determinado para Bbil-TX, NeuTX-I e NeuTX-II, uma vez que não há número de acesso UniProtKB para essas toxinas. ^aPonce-Soto et al. (2007, 2009); ^bFloriano et al. (2013); ^cBorja-Oliveira et al. (2007); ^dGalbiatti et al. (2012); ^eCogo et al. (2006); ^fCalgarotto et al. (2008).

Para examinar o papel da atividade catalítica no bloqueio neuromuscular causado pela Bbil-TX, foram feitos experimentos a 22–24 °C ao invés de 37 °C. Esta temperatura mais baixa é conhecida por atenuar o bloqueio neuromuscular por PLA₂ de *Bothrops* (Cogo et al., 1998; Ponce-Soto et al., 2009). O uso da baixa temperatura reduziu acentuadamente o bloqueio neuromuscular induzido pela Bbil-TX, sugerindo a dependência da atividade PLA₂ nesta resposta. Similarmente, o tratamento da toxina com *p*-BPB, um inibidor de atividade PLA₂ de *Bothrops* preconizado (Lomonte et al., 2003), aboliu o bloqueio neuromuscular, fornecendo mais uma evidência de um papel da atividade enzimática nesse fenômeno.

A fim de melhorar o entendimento da atividade neuromuscular do veneno de *B. b. smaragdina* e a ação pré-sináptica da Bbil-TX, a terceira fase do projeto foi executada em parceria com o Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences (University of Strathclyde, Glasgow, UK). O perfil farmacológico da toxina Bbil-TX foi comparado com o da Taipoxina, uma clássica β-neurotoxina isolada da serpente *Oxyuranus scutellatus scutellatus*.

Com o objetivo de identificar na Bbil-TX uma atividade neuromuscular independente de atividade PLA₂, como observada em outras β-neurotoxinas, algumas preparações NFD foram mantidas em solução fisiológica com baixo Ca²⁺ e em temperatura ambiente (23–25 °C) para reduzir a atividade PLA₂ da toxina. Preparações neuromusculares mantidas nas condições de Ca²⁺ reduzido, as contrações musculares são reduzidas em amplitude devido a uma redução no conteúdo quântico e consequente desativação de unidades motoras. Como muitas unidades motoras estão no limiar para a geração do potencial de ação muscular, um aumento no conteúdo quântico resultará no recrutamento de mais unidades motoras e conseqüentemente haverá um aumento da amplitude das respostas contráteis. Sendo assim, quando as toxinas Bbil-TX e Taipoxina foram testadas nestas condições experimentais, ou seja, preparações NFD mantidas em solução fisiológica com baixo Ca²⁺, ambas as toxinas induziram uma resposta facilitatória na contração muscular. Esta facilitação da neurotransmissão foi corroborada pelo aumento na amplitude dos PsPT visto em preparações TSn-m. Embora as β-neurotoxinas, comumente, induzam aumento na liberação de neurotransmissor por uma redução inicial transitória do valor do conteúdo quântico seguida por uma facilitação e progressivo bloqueio da liberação de ACh (Chang e Su, 1982; Pungerčar e Križaj, 2007; Rossetto e Montecucco, 2008; Fathi et al., 2013), no presente estudo, não observamos a redução inicial do conteúdo quântico a partir da medida dos potenciais de placa terminal, mas identificamos uma redução da amplitude das contrações musculares por estimulação indireta do nervo motor que deve resultar de uma queda da liberação de neurotransmissor. Apesar de ter sido usada uma concentração de Bbil-TX 10 vezes maior do que a de Taipoxina, Bbil-TX não causou diminuição na amplitude das respostas contráteis durante 120 min de incubação, como fez a Taipoxina, mantendo a resposta facilitatória até o final do período de incubação. Nós atribuímos esta ausência de bloqueio neuromuscular pela Bbil-TX em preparações NFD mantidas em solução com baixo Ca²⁺ à diferença de potência entre ambas as toxinas (Floriano et al., 2013; Fohlman et al., 1976). No entanto, à semelhança de Taipoxina, o veneno total de *B. b. smaragdina* também exibiu um efeito trifásico no registro da amplitude das respostas contráteis; na maior concentração testada o veneno induziu uma imediata contratura muscular que

não foi vista em investigações anteriores em condições normais de Ca^{2+} . Em preparações TSn-m a adição de veneno causou um imediato aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} nas fibras musculares indicando um possível efeito direto do veneno na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Esta contratura muscular compartilha algumas das características farmacológicas da cafeína (Lin-Shiau et al., 1989) e cardiotoxinas ofídicas (Harvey et al., 1982). É uma atividade que não tem sido mostrada antes e requer mais investigação afim de caracterizar a natureza deste fenômeno.

O efeito facilitatório inicial de β -neurotoxinas parece não estar relacionado com a atividade PLA_2 uma vez que é possível observar aumento da liberação de ACh em experimentos com toxinas pré-tratadas com p -BPB (Chang e Su, 1982; Rowan et al., 1990), em baixa temperatura (Fathi et al., 2013) e sob condições de Ca^{2+} reduzido (Su e Chang, 1984), tratamentos que determinam a inibição PLA_2 . Aqui também observamos que o efeito facilitatório causado pelo veneno de *B. b. smaragdina*, Bbil-TX e Taipoxina estava presente em condições de Ca^{2+} reduzido e em baixa temperatura. Todos esses resultados sugerem, fortemente, que a facilitação neuromuscular é independente da atividade PLA_2 enquanto que a atividade PLA_2 é requerida para determinar o bloqueio neuromuscular.

Com o objetivo de examinar a atividade pré-sináptica do veneno de *B. b. smaragdina* e da Bbil-TX foram registradas correntes iônicas que estão relacionadas ao fenômeno de polarização e repolarização dos terminais nervosos. A forma de onda do terminal nervoso é composta de duas deflexões negativas; a primeira sendo atribuída à entrada de sódio e a segunda ao movimento das correntes de potássio e cálcio no terminal nervoso. O bloqueio dos canais de potássio do terminal nervoso (a exemplo de 3,4-Diaminopiridina) aumenta a duração do potencial de ação resultando em um atraso na repolarização da membrana; o potencial de ação prolongado mantém a abertura dos canais de cálcio voltagem dependente e conseqüentemente aumenta a liberação de neurotransmissor (Penner e Dreyer, 1986; Fathi et al., 2001). Em nossos experimentos, observamos que o veneno total de *B. b. smaragdina* e a toxina Bbil-TX causaram redução significativa da corrente de K^+ de preparações TSn-m, enquanto que a corrente de Na^+ pouco foi alterada, embora a evidência de que as β -neurotoxinas operam desta maneira está

ainda aberta para debate pelo fato de que β -neurotoxinas não têm uma ação direta sobre canais de potássio clonados (Fathi et al., 2001). Além disso, o bloqueio da corrente de sódio (a exemplo de TTX) afeta os canais iônicos (Braga et al., 1992) e um bloqueio aparente de canais de potássio é observado mas sem nenhum aumento subsequente da liberação de neurotransmissor. Este aparente bloqueio dos canais de potássio é também visto quando o terminal nervoso é despolarizado por toxinas ofídicas (Miotoxina a) ou pela Ouabaína, um inibidor da bomba de sódio e potássio (Fatehi et al., 1998). A ausência de efeito do veneno de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX sobre o potencial de ação composto do nervo ciático e uma discreta alteração do potencial de membrana muscular poderia sugerir que a despolarização generalizada do potencial de membrana tanto no nervo quanto no músculo não explicam as alterações fisiológicas observadas.

A ausência de marcação de sinaptofisina e SNAP25 no terminal nervoso de preparações NFD previamente incubadas com Bbil-TX suporta a hipótese de que Bbil-TX tem alta seletividade de ação sobre a região pré-sináptica como também reportado para outros venenos e toxinas (Dixon e Harris, 1999; Harris, 2006; Rocha et al., 2009; Faiz et al., 2010).

Em linhagem celular de neuroblastoma (células SK-N-SH), o veneno de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX aumentam o movimento do cálcio intracelular em solução fisiológica e em condições de cálcio reduzido. Em células mantidas em condições normais de cálcio houve intensa e transitória alteração na concentração de cálcio intracelular o que não foi observado em células mantidas sob condições reduzidas de cálcio. Além disso, o tratamento do veneno e toxina com *p*-BPB também preveniu esta oscilação na concentração de cálcio intracelular, mostrando o papel da PLA₂ na geração desses efeitos. No entanto, a ausência de efeito da toxina sobre o cálcio intracelular das fibras musculares poderia sugerir que a Bbil-TX tem uma alta seletividade sobre tecido neuronal versus tecido muscular esquelético. Nós sugerimos que o veneno de *B. b. smaragdina* e Bbil-TX aumentam a concentração de cálcio intracelular o que acarretaria um aumento nos valores do conteúdo quântico; esse mecanismo é dependente de atividade PLA₂ e pode também estar relacionado ao bloqueio de canais de potássio ou ainda ser devido a um

mecanismo fusogênico como proposto por Tedesco et al., (2009) para outras neurotoxinas PLA₂.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- O veneno de *Bothriopsis bilineata smaragdina* causa bloqueio neuromuscular *in vitro* por ação pré-sináptica dependente de atividade PLA₂ sem induzir importantes alterações nas fibras musculares.
- O efeito bloqueador neuromuscular induzido por este veneno é essencialmente exercido por uma PLA₂ Asp49 (Bbil-TX) a qual é responsável pela maior parte desta atividade.
- A Bbil-TX apresenta um perfil farmacológico semelhante ao de outras neurotoxinas-PLA₂ (β -neurotoxinas) sugerindo um bloqueio de canais de potássio do terminal nervoso motor, o que aumentaria a duração do potencial de ação neuronal mantendo os canais de cálcio voltagem-dependente abertos por mais tempo. Assim, o conseqüente aumento da concentração de cálcio intracelular induziria uma intensa liberação de vesículas sinápticas podendo até causar a depleção do neurotransmissor (acetilcolina).
- A ausência da marcação para as proteínas sinaptofisina e SNAP25 no terminal nervoso corrobora a hipótese de que Bbil-TX exerce alta seletividade de ação sobre a região pré-sináptica.
- A discreta despolarização de membrana e a ausência de efeito sobre o cálcio intracelular das fibras musculares sugerem baixa atividade pós-sináptica para esta toxina.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Abreu, V.A., Dal Belo, C.A., Hernandez-Oliveira, S.S., Borja-Oliveira, C.R., Hyslop, S., Furtado, M.F.D., Rodrigues-Simioni, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 2007; 148: 142–149.
2. Adams, M.E., Mintz, I.M., Reily, M.D., Thanabal, V., Bean, B.P. Structure and properties of ω -Agatoxin IVB, a new antagonist of P-Type Calcium Channels. *Molecular Pharmacology* 1993; 44: 681–688.
3. Arni, R.K., Ward, R.J. Phospholipase A₂ – An Structural Review. *Toxicon* 1996; 34: 327–841.
4. Banker, B.Q., Kelly, S.S., Robbins, N. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J. Physiol.* 1983; 339: 355–377.
5. Barstad, J.A. Presynaptic effect of the neurotransmitter. *Experientia* 1962; 18: 579–580.
6. Beghini, D.G., Rodrigues-Simioni, L., Toyama, M.H., Novello, J.C., Cruz-Höfling, M.A., Marangoni, S. Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon* 2004; 43: 255–261.
7. Beltramini, L.M. Elementos da Histologia Anatomo-Fisiologia Humana. Instituto de Física de São Carlos-USP 1997; 1: 270.
8. Bérnils, R.S., Costa, H.C. Brazilian reptiles-List of species, <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia 2011. Acesso 09/05/2011.
9. Borja-Oliveira, C.R., Durigon, A.M., Vallin, A.C.C., Toyama, M.C., Souccar, C., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L. The pharmacological effects of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003; 36: 617–624.
10. Borja-Oliveira, C.R., Kassab, B.H., Soares, A.M., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L. Purification and N-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂, neuweditoxin-I and neuweditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2007; 13: 103–121.
11. Braga, M.F., Anderson, A.J., Harvey, A.L., Rowan, E.G. Apparent block of K⁺ currents in mouse motor nerve terminals by tetrodotoxin, muconotoxin and reduced external sodium. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 106(1): 91–94.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Aspectos epidemiológicos dos acidentes por animais peçonhentos-serpentes, <http://portal.saude.gov.br>. 2010. Acesso 09/05/2011.

13. Braud, S., Bom, C., Wisner, C. A snake venom protein acting on hemostasis. *Biochimie* 2000; 82: 851–859.
14. Breithaupt, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* 1976; 14: 221–233.
15. Bülbring, E. Observations on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1946; 1: 38–61.
16. Burke, J.E., Dennis, E.A. “Phospholipase A₂ biochemistry,” *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2009; 23 (1): 49–59.
17. Calgarotto, A.K., Damico, D.C.S., Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Da Silva, S.L., Souza, G.H.M.F., Eberlin, M.N., Marangoni, S. Biological and biochemical characterization of a new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 2008; 51: 1509–1519.
18. Campbell, J.A., Lamar, W.W. *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca (NY): Comstock Publishing Associates 2004.
19. Carregari, V.C., Floriano, R.S., Rodrigues-Simioni, L., Winck, F.V., Baldasso, P.A., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S. Biochemical, pharmacological, and structural characterization of new basic PLA₂ Bbil-TX from *Bothriopsis bilineata* snake venom. *BioMed Research International* 2013; ID 612649.
20. Cavalcante, W.L.G., Hernandez-Oliveira, S., Galbiatti, C., Randazzo-Moura, P., Rocha, T., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Pai-Silva, M.P., Gallacci, M., Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L. Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom. *Journal of Venom Research* 2011; 2: 37–41.
21. Chang, C.C., Chen, T.F., Lee, C.Y. Studies of the presynaptic effect of β -bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J. Pharm. and Experimental Therap.* 1972; 184: 339–345.
22. Chang, C.C. The action of snake venoms on the nerve and muscle. In: Lee CY, *Snake Venoms*. Berlin: Springer 1979; 309–376.
23. Chang, C.C., Su, M.J. Presynaptic toxicity of the histidine-modified, phospholipase A₂-inactive, β -bungarotoxin, crotoxin and notexin. *Toxicon* 1982; 20: 895–905.
24. Chapman, E.R. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annual Review of Biochemistry* 2008; 77: 615–41.
25. Cho, W., Kézdy, F.J. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymol* 1991; 197: 75–79.
26. Cogo, J.C., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Corrado, A.P., Rodrigues-Simioni, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 1993; 31(10): 1237–1247.
27. Cogo, J.C., Prado-Franceschi, J., Giglio, J.R., Corrado, A.P., Cruz-Höfling, M.A., Donato, J.L., Leite, G.B., Rodrigues-Simioni, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom

- mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicon* 1998; 36: 1323–1332.
28. Cogo, J.C., Lilla, S., Souza, G.H.M.F., Hyslop, S., Nucci, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Biochimie* 2006; 88: 1947–1959.
 29. Correia-de-Sá, P., Noronha-Matos, J.B., Timóteo, M.A., Ferreirinha, F., Marques, P., Soares, A.M., Carvalho, C., Cavalcante, W.L., Gallacci, M. Bothropstoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: radiochemical and real-time video-microscopy studies. *Toxicon* 2013; 61: 16–25.
 30. Datymer, M.E., Gage, P.W. Presynaptic and postsynaptic effects of venom of Australian tiger-snake at the neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 1973; 49: 340–354.
 31. Dempster, J. Computer analysis of electrophysiological signals. In: Frazer, P.J. (Ed.), *Microcomputers in Physiology: a Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1988; 51–93.
 32. Díaz-Oreiro, C., Gutiérrez, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of miotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 1997; 35: 241–252.
 33. Dixon, R.W., Harris, J.B. Nerve terminal damage by β -Bungarotoxin – its clinical significance. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 447–455.
 34. Elmqvist, D., Quastel, D.M.J. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J. Physiol.* 1965; 178: 505–529.
 35. Faiz, A., Ghose, A., Ahsan, F., Rahman, R., Amin, R., Hassan, M.U., Chowdhury, A.W., Kuch, U., Rocha, T., Harris, J.B., Theakston, R.D., Warrell, D.A. The greater black krait (*Bungarus niger*), a newly recognized cause of neuro-myotoxic snake bite envenoming in Bangladesh. *Brain*. 2010; 133 (11): 3181–3193.
 36. Fatehi, M., Harvey, A.L., Rowan, E.G. Characterization of the effects of depolarizing toxins on nerve terminal action potentials: apparent block of presynaptic potassium currents. *Toxicon* 1998; 36: 115–129.
 37. Fathi, B., Rowan, E.G., Harvey, A.L. The facilitatory actions of snake venom phospholipase A₂ neurotoxins at the neuromuscular junction are not mediated through voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon* 2001; 39: 1871–1882.
 38. Fathi, B., Harvey, A.L., Rowan, E.G. The effect of temperature on the effects of the phospholipase A₂ neurotoxins β -bungarotoxin and taipoxin at the neuromuscular junction. *Toxicon* 2013; 70: 86–89.
 39. Fatt, P., Katz, B. Spontaneous sub-threshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* 1952; 117: 109–128.

40. Fenwick, A.M., Gutberlet, J.R.L., Evans, J.A., Parkinson, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 2009; 156: 617–640.
41. Ferreira, A.T. Fisiologia da Contração Muscular. *Revista Neurociências* 2005; 13 (3): 60–62.
42. Floriano, R.S., Carregari, V.C., Abreu, V.A., Kenzo-Kagawa, B., Ponce-Soto, L.A., da Cruz-Höfling, M.A., Hyslop, S., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L. Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A₂ (Bbil-TX) isolated from *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations. *Toxicon* 2013; 69: 191–199.
43. Fohlman, J., Eaker, D., Karlsson, E., Thesleff, S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian Snake Taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). *Eur. J. Biochem.* 1976; 68: 457–469.
44. Fohlman, J. Comparison of two highly toxic Australian snake venoms: the taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*) and the fierce snake (*Parademansia microlepidotus*). *Toxicon* 1979; 17: 170–172.
45. Furtado, M.F.D., Cardoso, S.T., Soares, O.E., Pereira, A.P., Fernandes, D.S., Tambourgi, D.V., Sant'Ana, O.A. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. *Toxicon* 2010; 55: 881–887.
46. Galbiatti, C., Rocha, T., Randazzo-Moura, P., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L. Pharmacological and partial biochemical characterization of a new non-myotoxic neurotoxic PLA₂ (Bmaj-9) isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. *J. Venom. Anim. Toxin. Incl. Trop. Dis.* 2012; 18: 62–72.
47. Gallacci, M., Cavalcante, W.L.G. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. *Toxicon* 2010; 55: 1–11.
48. Ginsborg, B.L., Warriner, J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.* 1960; 15: 410–411.
49. Gopalakrishnakone, P., Hawgood, B.J., Holbrooke, S.E., Marsh, N.A., Santana De Sa, S., Tu, A.T. Sites of action of Mojave toxin isolated from the venom of the Mojave rattlesnake. *Br. J. Pharmacol.* 1980; 69(3): 421–431.
50. Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995; 33: 1405–1424.
51. Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipase A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003; 42: 915–931.

52. Gutiérrez, J.M., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Lomonte, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. *Toxicon* 2008; 51: 80–92.
53. Guyton, A.C. *Fisiologia Médica*. Guanabara Koogan 2002; 10^a ed.: 49–80.
54. Hanson, P., Heuser, J.E., Jahn, R. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Current Opinion in Neurobiology* 1997; 7: 310–315.
55. Harris, J.B. Neuron to nerve terminals: aspects of neuropathology and toxinology. *Braz. J. Morphol. Sci.* 2006; 23: 195–216.
56. Harvey, A.L., Marshall, R.J., Karlsson, E. Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations. *Toxicon* 1982; 20(2): 379–396.
57. Harvey, A.L., Anderson, A.J. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmac. Ther.* 1983; 31: 33–55.
58. Hawgood, B.J., Smith, J.W. The mode of action of the phospholipase A-crotoxin complex isolated from venom of the South American rattlesnake at the mouse neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 1977; 61: 597–609.
59. Hawgood, B.J., Smith, I.C. The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials the frog neuromuscular junction. *Toxicon* 1989; 27: 272–276.
60. Ho, C.L., Lee, C.Y. Mode of neuromuscular blocking action of ceruleotoxin. *Toxicon* 1983; 22: 301–307.
61. Hodgson, W.C., Wickramaratna, J.C. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2002; 29: 807–814.
62. Holzer, M., Mackessy, S.P. Na aqueous endpoint assay of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 1996; 34: 1149–1155.
63. Kaiser, I.I., Gutiérrez, J.M., Plummer, D., Aird, S.D., Odell, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys* 1990; 278: 319–325.
64. Kamenskaya, M.A., Thesleff, S. Neuromuscular blocking actions of an isolated toxin from the elapid (*Oxyuranos scutellatus*). *Act. Physiol. Scand.* 1974; 90: 716–724.
65. Kandell, E.R., Schwartz, J.M., Jessel, T.M. *Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*. Guanabara Koogan 1997; 161–177.

66. Karlsson, E., Eaker, D., Rydén, L. Purification of presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon* 1972; 10: 405–413.
67. Karlsson, E., Mbugua, P.M., Rodriguez-Ithurralde, D. Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. *J. Physiol.* 1984; 79(4): 232–240.
68. Kini, R.M. Phospholipase A₂ a complex multifunctional protein puzzle,” in *Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, R. M. Kini, John Wiley & Sons, Chichester, UK 1997; 1–28.
69. Kini, R.M. *Venom Phospholipases Enzymes*. Chichester: John Willey & Sons 1997: 269–282.
70. Kuch, U., Mebs, D., Gutiérrez, J.M., Freire, A. Biochemical and biological characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). *Toxicon* 1996; 34: 714–717.
71. Laemmli, U.K. Cleavage o structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
72. Lee, C.Y., Chang, C.C. Modes of action of purified toxins from elapide venoms on neuromuscular transmission. *Mem. Inst. Butantan* 1966; 33: 555–572.
73. Lee, C.Y. Elapide neurotoxins and their mode of action. *Clin. Toxicol.* 1970; 3: 457–472.
74. Lerma, L., Sandoval, G., Inga, R., Muñoz, M., Cavero, E., Yarlequé, A. Análisis cromatográfico del contenido enzimático de tres serpientes peruanas. *Arnaldoa* 2004; 11(2).
75. Lin-Shiau, S.Y., Fu, W.M., Liu, S.H., Ni, C.T. Studies on contractures induced in mouse diaphragm by caffeine and cupric and selenite ions. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1989; 300: 265–280.
76. Liou, J.C., Kang, K.H., Chang, L.S., Ho, S.Y. Mechanism of β -bungarotoxin in facilitating spontaneous transmitter release at neuromuscular synapse. *Neuropharmacology* 2006; 51: 671–680.
77. Lizano, S., Domont, G., Perales, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* 2003; 42: 963–977.
78. Logantha, S.J.R.J., Cruickshank, S.F., Rowan, E.G., Drummond, R.M. Spontaneous and electrically evoked Ca²⁺ transients in cardiomyocytes of the rat pulmonary vein. *Cell Calcium* 2010; 48: 150–160.
79. Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 2003; 42: 885–901.

80. Maraganore, J.M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kézdy, F.J., Heinrichson, R.L. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 13839–13843.
81. Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. *Biochem. Biophys. Acta* 2000; 1477: 146–156.
82. McArdle, J.J., Angaut-Petit, D., Mallart, A., Bournaud, R., Faille, L., Brigant, J.L. Advantages of the triangularis sterni muscle of the mouse for investigations of synaptic phenomena. *Journal of Neuroscience Methods* 1981; 4: 109–115.
83. Miwa, M., Kubota, I., Ichihashi, T., Motojima, H., Matsumoto, M. Studies on phospholipase A inhibitor in blood plasma. I. Purification and characterization of phospholipase A inhibitor in bovine plasma. *J. Biochem.* 1984; 96: 761–773.
84. Miwa, M., Ichihashi, T., Motojima, H., Onodera-Kubota, I., Matsumoto, M. Studies on phospholipase A inhibitor in blood plasma. II. Interaction of phospholipase A inhibitor with phospholipase A and its specificity. *J. Biochem.* 1985; 98: 157–165.
85. Moraes, D.S., Abreu, V.A., Rostelato-Ferreira, S., Leite, G.B., Cruz-Höfling, M.A., Travaglia-Cardoso, S.R., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L. Neuromuscular activity of *Bothrops alcatraz* snake venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon* 2012; 59: 294–299.
86. Oberg, S., Kelly, R.B. The mechanism of beta-bungarotoxin action. I. Modification of transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Neurobiol.* 1976; 7: 129–141.
87. Oshima, M., Leite, G.B., Rostelato-Ferreira, S., Da Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L., Oshima-Franco, Y. Insights of the effects of polyethylene glycol 400 on mammalian and avian nerve terminals. *Muscle Nerve* 2010; 41(4): 540–546.
88. Oshima-Franco, Y., Leite, G.B., Belo, C.A., Hyslop, S., Prado-Franceschi, J., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 95: 175–182.
89. Pawlak, J., Mackessy, S.P., Fry, B.G., Bhatia, M., Mourier, G., Fruchart-Gaillard, C., Servent, D., Ménez, R., Stura, E., Ménez, A., Kini, R.M. Denmotoxin, a Three-finger Toxin from the Colubrid Snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with Bird-specific Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281 (39): 29030–29041.
90. Penner, R., Dreyer, F. Two different presynaptic calcium current in mouse nerve terminals. *Pflugers Arch* 1986; 406: 190–197.
91. Pinho, F.M.O., Pereira, I.D. Ofidismo. *Rev. Ass. Med. Brasil* 2001; 47: 24–29.

92. 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 collileneautus* venom. *J. Protein Chem.* 2002; 21: 131–136.
93. Ponce-Soto, L.A., Bonfim, V.L., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. *Protein Journal* 2006; 25 (2): 147–155.
94. Ponce-Soto, L.A, Barros, J.C., Marangoni, S., Hernandez, S., Dal Belo, C.A., Corrado, A.P., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2009; 150: 291–297.
95. Porto, B.N., Tellib, C.A., Dutra, T.P., Alves, L.S., Bozza, M.T., Finc, C.A., Thiesenb, F.V., Rennerd, M.F. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 2007; 50: 270–277.
96. Prior, C., Dempster, J., Marshall, G. Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 1993; 30: 1–17.
97. Pungercar, J., Krijaz, I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂. *Toxicon* 2007; 50: 871–892.
98. Rey-Suárez, P., Floriano, R.S., Rostelato-Ferreira, S., Saldarriaga-Córdoba, M., Núñez, V., Rodrigues-Simioni, L., Lomonte, B. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon* 2012; 60: 851–863.
99. Rigoni, M., Caccin, P., Gschmeissner, S., Koster, G., Postle, A.D., Rossetto, O., Schiavo, G., Montecucco, C. Equivalent Effects of Snake PLA₂ Neurotoxins and Lysophospholipid–Fatty Acid Mixtures. *Science* 2005; 310: 1678–1680.
100. Rigoni, M., Schiavo, G., Weston, A.E., Caccin, P., Allegrini, F., Pennuto, M., Valtorta, F., Montecucco, C., Rossetto, O. Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A₂ activity induce punctate swellings of neurites and exocytosis of synaptic vesicles. *Journal of Cell Science* 2004; 117: 3561–3570.
101. Rocha, T., de Souza, B.M., Palma, M.S., da Cruz-Höfling, M.A., Harris, J.B. The neurotoxicological effects of mastoparan Polybia-MPII at the murine neuromuscular junction: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Histochem. Cell Biol.* 2009; 132 (4): 395–404.

102. Rodrigues-Simioni, L., Borgese, N., Ceccarelli, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* 1983; 10(2): 475–489.
103. Rodrigues-Simioni, L., Hawgood, B.J., Smith, I.C.H. Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. *Toxicon* 1990; 28: 1479–1489.
104. Rodrigues-Simioni, L., Zamunér, S.R., Cogo, J.C., Borja-Oliveira, C.R., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Corrado, A.P. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* 2004; 43(6): 633–638.
105. Rodrigues-Simioni, L., Floriano, R.S., Rostelato-Ferreira, S., Sousa, N.C., Marangoni, S., Ponce-Soto, L.A., Carregari, V.C., Hyslop, S. Presynaptic action of *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vitro. *Toxicon* 2011; 58: 140–145.
106. Rosenberg, P. Phospholipases. In: Shier, TW, Mebs, D. *Handbook of toxicology*. New York: Marcel Dekker 1990; 68-223.
107. Rossetto, O., Montecucco, C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2008; 184: 129–170.
108. Rowan, E.G., Pemberton, K.E., Harvey, A.L. On the blockade of acetylcholine release at mouse motor nerve terminals by β -bungarotoxin and crotoxin. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 100: 301–304.
109. Rowan, E.G. What does β -bungarotoxin do at the neuromuscular junction? *Toxicon* 2001; 39: 107–118.
110. Russell, F. *Snake venoms poisoning*. New York: Scholium International, Inc. 1983.
111. Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., Theakston, R.D.G., David, A., Warrell, D.A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 2008; 51: 1440–1448.
112. Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 1990; 14 (250): 1541–1546.
113. Smalligan, R., Cole, J., Brito, N., Laing, G.D., Mertz, B.L., Manock, S., Maudlin, J., Quist, B., Holland, G., Nelson, S., Laloo, D.G., Rivadeneira, G., Barragan, M.E., Dolley, D., Eddleston, M., Warrell, D.A., Theakston, R.D.G. Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon: randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. *Br. Med. J.* 2004; 329: 1–7.
114. Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Borges, M.H., Escarso, S.H.A., Cunha, O.A.B., Homsí-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R. Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A₂ from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis*

albiventris opossum serum. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997; 43: 1091–1099.

115. Spadacci-Morena, D.D., Tomy, S.C., Sano-Martins, I.S., Katz, S.G. The effect of experimental *Bothrops jararaca* envenomation on pregnant mice. *Toxicon* 2006; 47: 196–207.
116. Su, M.J., Coulter, A.R., Sutherland, S.K., Chang, C.C. The presynaptic neuromuscular blocking effect and PLA₂ activity of textilodoxin, a potent toxin isolated from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis*. *Toxicon* 1983; 21: 143–151.
117. Su, M.J., Chang, C.C. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A₂ activity (beta-bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon* 1984; 22(4): 631–640.
118. Tedesco, E., Rigonia, M., Caccin, P., Grishin, E., Rossetto, O., Montecucco, C. Calcium overload in nerve terminals of cultured neurons intoxicated by alpha-latrotoxin and snake PLA₂ neurotoxins. *Toxicon* 2009; 54(2): 138–144.
119. Teibler, P., Acosta de Pérez, O., Maruñak, S., Ruiz, R., Koscinczuk, P., Sánchez-Negrette, M., Mussart de Coppo, M. Local and systemic lesions induced by *Bothrops alternatus* venom (víbora de la cruz) of Argentine. *Acta Toxicol.* 1999; 7: 7–10.
120. Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 2003; 42: 947–962.
121. Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 2009; 54: 988–997.
122. Torrez, P.Q., Duarte, M.R., França, F.O.S., Figueiredo, L., Abati, P., Campos, L.R., Pardal, P.P.O., Quiroga, M., Mascheretti, M., Boulos, M. First report of an accident with the speckled forest pit viper (*Bothriopsis taeniata*) in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; 42(3): 342–344.
123. Toyama, M.H., Soares, A.M., Andrião-Escarso, S.H., Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R., Fontes, M.R.M., Marangoni, S. Comparative biochemical studies of myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops* venom. *Protein and Peptide Letters* 2001; 8(3): 179–186.
124. Tsai, I.H., Hseu, M.J. Snake venom neurotoxic phospholipases A₂. *Animal toxins: state of the art – perspectives in health and biotechnology*. UFMG, 2009.
125. Uetz, P., Hosek, J., Hallerman, J. The reptile database, www.reptile-database.org. 2011. Acesso 09/05/2011.
126. Urbano, F.J., Pagani, M.R., Uchitel, O.D. Calcium channels, neuromuscular synaptic transmission and neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology* 2008; 201-202: 136–144.

127. Valentin, E., Ghomasschi, F., Gelb, M.H., Lazdunski, M., Lambeau, G. On the diversity of secreted phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 31195–31202.
128. Valentin, E., Lambeau, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie* 2000; 82(9-10): 815–831.
129. Vieira, D.F., Watanabe, L., Sant´ana, C.D., Marcussi, S., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Arni, R.K. Purification and Characterization of Jararassin-I a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2004; 36(12): 798–802.
130. Vital-Brazil, O., Prado-Franceschi, J., Waisbich, E. Pharmacology of crystalline crotoxin. I Toxicity. *Mem. Inst. Butantan* 1966; 33: 973–980.
131. Vital-Brazil, O., Excell, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 1970; 212: 34–35.
132. Vital-Brazil, O., Fontana, M.D., Heluany, N.F. Mode of action of crotoxin at the guinea-pig neuromuscular junction. *Toxicon* 1979; 17 (supple. 1).
133. Warrell, D.A. Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula. In: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Florida 1995; 433–492.
134. Warrell, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Vol. 2. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca 2004; 709–761.
135. Weille, J.R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., Lazdunski, M. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 2437–2440.
136. Wernicke, J.F., Vanker, A.D., Howard, B.D. The mechanism of action of β -bungarotoxin. *J. Neurochem.* 1975; 25: 483–496.
137. Zamunér, S.R., Cruz-Höfling, 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* 2004; 44: 259–271.
138. Zavaleta, A., Salas, M. Ofidismo: envenenamiento por mordedura de serpientes. In: Martínez-Villaverde JR, León-Barúa R, Vidal-Neira L, Losmo-García R, editors. *Emergencias em Medicina Interna*, Lima, Perú 1996; 241–260.
139. Zeni, A.L.B., Becker, A., Krug, M., Albuquerque, C.A.C. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops*

jararacussu venom in mice. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2007; 13 (3): 665.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp

 
UNICAMP CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

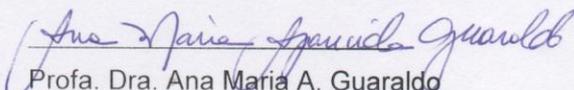
CERTIFICADO

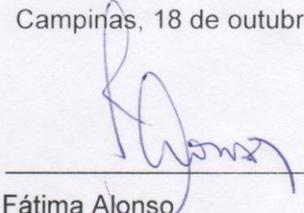
Certificamos que o Protocolo nº **2267-1**, sobre "**Estudo dos efeitos do veneno total da serpente *Bothriopsis bilineata* e suas frações ativas sobre a junção neuromuscular**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Rafael Stuani Floriano**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **18 de outubro de 2010**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2267-1**, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **October 18, 2010**.

Campinas, 18 de outubro de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

9.2. Artigos publicados em periódicos referentes ao projeto de pesquisa.

Toxicon 58 (2011) 140–145



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon



Short communication

Presynaptic action of *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom *in vitro*

Léa Rodrigues-Simioni^{a,*}, Rafael Stuani Floriano^a, Sandro Rostelato-Ferreira^a, Norma Cristina Sousa^a, Sergio Marangoni^b, Luis Alberto Ponce-Soto^b, Victor Corasolla Carregari^b, Stephen Hyslop^a

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^bDepartment of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2011

Received in revised form 29 April 2011

Accepted 3 May 2011

Available online 11 May 2011

Keywords:

Bothriopsis bilineata smargadina

Neuromuscular blockade

Phospholipase A₂

Presynaptic

Snake venom

ABSTRACT

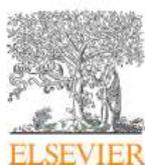
In this work, we examined the neuromuscular activity of *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vertebrate isolated nerve-muscle preparations. In chick biventer cervicis preparations the venom caused concentration-dependent (0.1–30 µg/ml) neuromuscular blockade that was not reversed by washing, with 50% blockade occurring in 15–90 min. Muscle contractures to exogenous acetylcholine and KCl were unaffected by venom, but there was a slight increase in creatine kinase release after 120 min (from 80 ± 15 to 206 ± 25 U/ml, $n=6$, $p<0.05$). In mouse phrenic nerve-diaphragm preparations, the venom (1, 10 and 30 µg/ml) produced marked facilitation (~120% increase above basal) at the highest concentration followed by neuromuscular blockade; the effects at lower concentrations were considerably less marked. Venom increased the quantal content values after 15 and 30 min followed by significant inhibition at ≥90 min. However, venom did not alter the muscle membrane resting potential or the response to exogenous carbachol. In both preparations, incubation at 22 °C instead of 37 °C delayed the onset of blockade, as did inhibition of venom PLA₂ activity. In curarized mouse preparations, the venom produced only muscle facilitation. These results indicate that *B. b. smargadina* venom causes neuromuscular blockade *in vitro* by a presynaptic mechanism involving PLA₂.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 9533; fax: +55 19 3289 5846.

E-mail address: simioni@unicamp.br (L. Rodrigues-Simioni).

0041-0101/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicon.2011.05.002



Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A₂ (Bbil-TX) isolated from *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations

Rafael Stuani Floriano^a, Victor Corasolla Carregari^b,
Valdemir Aparecido de Abreu^{a,c}, Bruno Kenzo-Kagawa^d,
Luis Alberto Ponce-Soto^b, Maria Alice da Cruz-Höfling^d,
Stephen Hyslop^a, Sergio Marangoni^b, Léa Rodrigues-Simioni^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887 Campinas, SP, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

^c Adventist University of São Paulo (UNASP), 05828-001 São Paulo, SP, Brazil

^d Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2012

Received in revised form 20 February 2013

Accepted 7 March 2013

Available online 26 March 2013

Keywords:

Asp49 PLA₂

Bothriopsis bilineata smargadina

Neuromuscular blockade

Presynaptic action

Snake venom

ABSTRACT

The neuromuscular activity of Bbil-TX, a PLA₂ with catalytic activity isolated from *Bothriopsis bilineata smargadina* venom, was examined in chick biventer cervicis (BC) and mouse phrenic nerve–diaphragm (PND) preparations. In BC preparations, Bbil-TX (0.5–10 µg/ml) caused time- and concentration-dependent blockade that was not reversed by washing; the times for 50% blockade were 87 ± 7, 41 ± 7 and 19 ± 2 min (mean ± SEM; n = 4–6) for 1, 5 and 10 µg/ml, respectively. Muscle contractures to exogenous ACh and KCl were unaffected. The toxin (10 µg/ml) also did not affect the twitch-tension of directly-stimulated, curarized (10 µg/ml) BC preparations. However, Bbil-TX (10 µg/ml) produced mild morphological alterations (edematous and/or hyperchromic fibers) in BC; there was also a progressive release of CK (from 116 ± 17 IU/ml (basal) to 710 ± 91 IU/ml after 45 min). Bbil-TX (5 µg/ml)-induced blockade was markedly inhibited at 22–24 °C and pretreatment with *p*-bromophenacyl bromide (*p*-BPB) abolished the neuromuscular blockade. Bbil-TX (3–30 µg/ml, n = 4–6) caused partial time- and concentration-dependent blockade in PND preparations (52 ± 2% at the highest concentration). Bbil-TX (30 µg/ml) also markedly reduced the MEPPs frequency [from 26 ± 2.5 (basal) to 10 ± 1 after 60 min; n = 5; *p* < 0.05] and the quantal content [from 94 ± 14 (basal) to 24 ± 3 after 60 min; n = 5; *p* < 0.05] of PND preparations, but caused only minor depolarization of the membrane resting potential [from –80 ± 1 mV (basal) to –66 ± 2 mV after 120 min; n = 5; *p* < 0.05], with no significant change in the depolarizing response to exogenous carbachol. These results show that Bbil-TX is a presynaptic PLA₂ that contributes to the neuromuscular blockade caused by *B. b. smargadina* venom.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 9533; fax: +55 19 3289 2968.
E-mail address: simioni@unicamp.br (L. Rodrigues-Simioni).

Research Article

Biochemical, Pharmacological, and Structural Characterization of New Basic PLA₂ Bbil-TX from *Bothriopsis bilineata* Snake Venom

Victor Corasolla Carregari,¹ Rafael Stuani Floriano,²
Lea Rodrigues-Simioni,² Flavia V. Winck,³ Paulo Aparecido Baldasso,¹
Luis Alberto Ponce-Soto,¹ and Sergio Marangoni¹

¹Department of Biochemistry, Institute of Biology (IB), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

³Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology and University of Potsdam, Potsdam, Germany

Correspondence should be addressed to Luis Alberto Ponce-Soto; poncesoto@yahoo.com.ar

Received 9 May 2012; Revised 17 August 2012; Accepted 1 September 2012

Academic Editor: Laura Leiva

Copyright © 2013 Victor Corasolla Carregari et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bbil-TX, a PLA₂, was purified from *Bothriopsis bilineata* snake venom after only one chromatographic step using RP-HPLC on μ -Bondapak C-18 column. A molecular mass of 14243.8 Da was confirmed by Q-ToF Ultima API ESI/MS (TOF MS mode) mass spectrometry. The partial protein sequence obtained was then submitted to BLASTp, with the search restricted to PLA₂ from snakes and shows high identity values when compared to other PLA₂s. PLA₂ activity was presented in the presence of a synthetic substrate and showed a minimum sigmoidal behavior, reaching its maximal activity at pH 8.0 and 25–37°C. Maximum PLA₂ activity required Ca²⁺ and in the presence of Cd²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, and Mg²⁺ it was reduced in the presence or absence of Ca²⁺. Crota-potin from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake venom and antihemorrhagic factor DA2-II from *Didelphis albiventris* opossum sera under optimal conditions significantly inhibit the enzymatic activity. Bbil-TX induces myonecrosis in mice. The fraction does not show a significant cytotoxic activity in myotubes and myoblasts (C2C12). The inflammatory events induced in the serum of mice by Bbil-TX isolated from *Bothriopsis bilineata* snake venom were investigated. An increase in vascular permeability and in the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 was induced. Since Bbil-TX exerts a stronger proinflammatory effect, the phospholipid hydrolysis may be relevant for these phenomena.

Campinas, 24 de julho de 2014

ELSEVIER LIMITED

The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB

This is to request for COPYRIGHT release(s) of the following article(s) published in Toxicon for purpose of including in my Ph.D. thesis dissertation:

Léa Rodrigues-Simioni, Rafael Stuani Floriano, Sandro Rostelato-Ferreira, Norma Cristina Sousa, Sergio Marangoni, Luis Alberto Ponce-Soto, Victor Corasolla Carregari, Stephen Hyslop. Presynaptic action of *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom *in vitro*. Toxicon 2011, 58: 140–145.

Rafael Stuani Floriano, Victor Corasolla Carregari, Valdemir Aparecido de Abreu, Bruno Kenzo-Kagawa, Luis Alberto Ponce-Soto, Maria Alice da Cruz-Höfling, Stephen Hyslop, Sergio Marangoni, Léa Rodrigues-Simioni. Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A₂ (Bbil-TX) isolated from *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations. Toxicon 2013, 69: 191–199.

This thesis is for academic use only and it is not going to be for commercial, advertising or promotion purposes. I am planning in making (four) copies of my thesis. One of this copies will be displayed in The University (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, BRAZIL) library. In addition, an electronic version of the thesis will be made available at the *University Thesis Database*.

I thank you very much in advance.

Sincerely,

RAFAEL STUANI FLORIANO
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Cidade Universitária Zeferino Vaz
13083-887
Campinas, SP, Brazil