

PRISCILA RANDAZZO DE MOURA

**EFEITOS DO MANGANÊS SOBRE A
TOXICIDADE DA BOTHROPSTOXINA-I UMA MIOTOXINA
DO VENENO DE *Bothrops jararacussu***

2005 05322

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica - Priscila Randazzo de Moura.

Campinas, 14 de outubro de 2004.

*Profa. Dra. Leá Rodrigues Simioni
- Orientadora -*

CAMPINAS

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

PRISCILA RANDAZZO DE MOURA

**EFEITOS DO MANGANÊS SOBRE A
TOXICIDADE DA BOTHROPSTOXINA-I UMA MIOTOXINA
DO VENENO DE *Bothrops jararacussu***

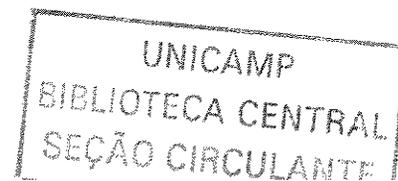
*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.*

Orientação: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Co-orientação: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

CAMPINAS

2004



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M865e Moura, Priscila Randazzo de
Efeitos do manganês sobre a toxicidade da bothroptoxina-I uma
miotoxina do veneno de *Bothrops jararacussu* / Priscila Randazzo de
Moura. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Léa Rodrigues Simioni, Maria Alice da Cruz-Höfling
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Junção neuromuscular. 2. Eletrofisiologia. 3. Íon. 4. Toxinas.
4. Histologia. 5. Músculos. 6. Serpentes. I. Léa Rodrigues Simioni.
II. Maria Alice da Cruz-Höfling. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/Unicamp M865e
V	EX
TOMBO BC	62218
PROC.	16-86-03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	26/02/05
Nº CPD	

Bibid: 341573

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Prof. Dr. José Carlos Cogo

Profa. Dra. Marli Gerenutti

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

Data: 14/10/2004

DEDICATÓRIA

A DEUS,

Pela minha existência e por tornar possível todos os meus sonhos. Pai, obrigada pela minha família e por eu ser privilegiada! Te adoro!

Ao meu pai, Claudimir

Sempre me incentivou a estudar, e assim despertou em mim o estímulo de sempre produzir mais. Fonte inesgotável de amor para com os filhos. Sei o quanto se orgulha de mim e isso me faz bem. Te amo!

À minha mãe, Sandra

Mãe maravilhosa, digna de ser admirada. É o alicerce da minha família. Sou orgulhosa de ser sua filha. Sabe o quanto a amo e o quanto é importante para mim.

Ao meu irmão, San

É o irmão que toda irmã gostaria de ter! Você é o melhor irmão do mundo! Obrigada por sempre me incentivar em progredir nos estudos. É um presente de Deus ser sua irmã! Te amo!

Ao meu namorado, André

Obrigada por seu amor e compreensão, pelo conforto demonstrado nas horas mais difíceis. Você é um presente de DEUS na minha vida! Amo você!

Aos meus avós, José, Paulo e Zuleika

Obrigada pelo amor, companheirismo, amizade e conselhos que me proporcionaram valioso crescimento espiritual e intelectual. Amo vocês!

À minha querida amiga, Yoko

Obrigada minha amiga, por me presentear com a chave do mundo da ciência. Deus permitiu que você me mostrasse o caminho para a realização do meu sonho. Você é um anjo de luz! Amo você!

Aos mestres...

À minha orientadora Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pela dedicação dispensada em minha formação científica e pela amizade. Muito obrigada por permitir que eu realizasse meu sonho. Que Deus a abençoe sempre!

À Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, minha querida amiga e conselheira, amiga de todos os momentos. Não preciso dizer o quanto a admiro, é imensurável!

À Profa. Dra. Maria Alice Cruz Höfling, obrigada pela preciosa contribuição, um exemplo a ser seguido. Obrigada também pela atenção dispensada em todos os momentos em que a procurei.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, por enriquecer todos os trabalhos científicos, pelas ilustres correções.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio e Profa. Dra. Adélia Cintra, por tornar possível a realização deste trabalho, através da preciosa doação da bothropstoxina-I. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, obrigada pela maravilhosa e enriquecedora contribuição, pela alegria contagiante. Muito obrigada, mestre!

Ao Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol, sabe o quanto o admiro, obrigada por contribuir cientificamente. Você é responsável por uma parcela desse meu crescimento. Obrigada pela oportunidade!

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, pela amizade, contribuição e incentivo indispensáveis.

À Profa. Dra. Marli Gerenutti, grande amiga e conselheira, obrigada pela contribuição científica, sou eternamente grata! Te admiro muito!

Aos amigos...

Aos amigos da UNISO, Ana Paula, Fâni, Isaltino, Andréia, Carol, Profa. Eni, Prof. Fernando e Profa. Marli, obrigada pelos incentivos, dispensa do trabalho e conselhos enriquecedores. Obrigada, amigos!

Gildo Bernardo Leite, exemplo de ser humano. Obrigada pelos conselhos, paciência, momento de desabafos que confidenciei com você. Não encontro palavras para agradecer tudo que me ensinaste!

Cháriston André Dal Belo, meu amigo. Com você aprendi muito! Obrigada por dispor do seu tempo para me ajudar. Te admiro muito! Você é um profissional e tanto!

Saraguaci Hernandez de Oliveira e Silva, minha querida Sarinha, você é inesquecível, nos contagia com seu sorriso. Obrigada pela sua grande amizade!

Caroline Ribeiro Borja de Oliveira, meiga e delicada, dissemina sua ternura por onde passa. Obrigada pela sua amizade!

Josiane Cristina Barros, uma moleca... esse seu jeito particular de ser é muito cativante. Foi muito bom conhecê-la, Cris!

Lilian Gobbo, menina dócil, trabalhadora e muito interessada. Tantas foram as nossas discussões a respeito do manganês. Obrigada pela sua amizade.

Valdemir Abreu, representa para mim uma pessoa ponderada, serena e muito responsável. Admiro sua garra e força de vontade.

Ricardo Stelatti, menino maroto com jeito de moleque. Admiro seu entusiasmo com as descobertas científicas. Continue assim!

Josiane Patini, achou que eu a esqueceria? De jeito nenhum! Conte sempre comigo.

Luís Emílio, nunca esquecerei da tão famosa geléia real. Foi de muito crescimento o nosso convívio.

Gisele, Gustavo, Cleusa, Daniela Damico, Daniela Beghini, Vera, Carol, Márcia, Rosany, obrigada pela convivência saudável e alegre.

Aos amigos Wanderlei, Gislaine, Elaine, Fran, José Ilton e Miguel, obrigada pela disposição, ajuda e alegre convivência.

Sejam bem-vindos: Mariana, Sandro e Dimas!

À Diretoria do Apoio Didático, Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelos excelentes serviços prestados. Sou muito grata aos amigos: Mercedes, Rosana e Alexandre.

A todos os funcionários da Unicamp, amigos e alunos do curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia, que, mesmo através de um simples gesto ou sorriso, ajudaram, de alguma forma, na realização deste trabalho.

À Unicamp, que possibilitou a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro concedido.

A todos que colaboraram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

SENHOR,

Tu me sondas e me conheces. Sabes quando me assento e quando me levanto; de longe penetras os meus pensamentos.

Esquadrinhas o meu andar e o meu deitar, e conheces todos os meus caminhos.

Ainda a palavra me não chegou à língua, e tu, SENHOR, já a conheces toda.

Tu me cercas por trás e por diante, e sobre mim pões a tua mão.

Tal conhecimento é maravilhoso demais para mim:

É sobremodo elevado, não o posso atingir.

Para onde me ausentarei do teu Espírito? Para onde fugirei da tua face?

Se subo aos céus, lá estás; se faço a minha cama no mais profundo abismo, lá estás

também; se tomo as asas da alvorada e me detenho nos confins dos mares:

ainda lá me haverá de guiar a tua mão e a tua destra me susterá.

Se eu digo: As trevas, com efeito me encobrirão, e a luz ao redor de mim se fará noite, até as próprias trevas não te serão escuras; As trevas e a luz são a mesma cousa.

Pois tu formaste o meu interior, tu me teceste no seio de minha mãe.

Graças te dou, visto que por modo assombrosamente maravilhoso me formaste; as tuas

obras são admiráveis, e a minha alma o sabe muito bem; os meus ossos não te foram

encobertos, quando no oculto fui formado,

e entretecido como nas profundezas da terra.

Os teus olhos me viram a substância ainda informe, e no teu livro foram escritos todos os meus dias, cada um deles escrito e determinado, quando nem um deles havia ainda.

Que preciosos para mim, senhor, são os teus pensamentos!

E como é grande a soma deles!

AMÉM!

(Sl. 139: 1-17)

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1-INTRODUÇÃO	37
1.1-Dados epidemiológicos.....	39
1.2-Espécies peçonhentas da fauna brasileira.....	39
1.3-Miotoxinas.....	39
1.4-Gênero <i>Bothrops</i>	42
1.4.1- <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu).....	43
1.4.2-Bothropstoxina-I (BthTX-I).....	49
1.5-Íons manganês (Mn ²⁺).....	53
2-OBJETIVOS	55
3-MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1-Animais.....	61
3.2-Toxina.....	61
3.3-Reagentes.....	61
3.4-Preparações biológicas (camundongos).....	61
3.4.1-Nervo frênico-diafragma (NFD).....	61
3.4.2- <i>Extensor digitorum longus</i> (EDL).....	63
3.4.2.1-Determinação de creatinoquinase (CK).....	64
3.4.3-Técnica histológica (microscopia óptica).....	65
3.4.3.1-Determinação da área lesada das fibras musculares.....	65
3.4.3.2-Determinação da área transversal das fibras musculares.....	66
3.5-Estudo eletrofisiológico.....	67
3.5.1-Registro do potencial de placa terminal (PPT).....	68
3.5.1.1-Desacoplamento excitação-contração.....	68
3.5.1.2-Análise dos PsPT.....	68
3.5.1.2.1-Tamanho quântico (TQ).....	68
3.5.1.2.2-Conteúdo quântico (CQ).....	69

3.6-Análise estatística.....	70
4-RESULTADOS	71
4.1-Estudo miográfico.....	73
4.1.1-Preparação nervo frênico-diafragma (NFD).....	73
4.1.1.1-Ensaio miográfico com íons manganês e BthTX-I.....	73
4.1.2-Preparação <i>extensor digitorum longus</i> (EDL).....	76
4.1.2.1-Ensaio miográfico com íons manganês e BthTX-I.....	76
4.2-Miotoxicidade.....	81
4.2.1-Preparação nervo frênico-diafragma (NFD).....	81
4.2.2-Preparação <i>extensor digitorum longus</i> (EDL).....	84
4.2.3-Análise morfométrica em músculo diafragma.....	87
4.2.4-Análise morfométrica em músculo EDL.....	87
4.2.5-Determinação enzimática de creatinoquinase em EDL.....	91
4.3-Estudo eletrofisiológico.....	93
4.3.1-Medida e análise dos potenciais de placa terminal (PsPT).....	93
5-DISCUSSÃO	95
6-CONCLUSÃO	105
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8-ANEXO	125

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
a.a.	Aminoácido
ATP	Adenosina trifosfato
Bjssu	<i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-I	Bothropstoxina-I
BthTX-II	Bothropstoxina-II
Ca²⁺	Íon cálcio
<i>C. d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CK	Creatinoquinase
CQ	Conteúdo Quântico
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
i.p.	Intraperitoneal
JNM	Junção neuromuscular
KCl	Cloreto de potássio
L	Lavagem
Mn²⁺	Íon manganês
NFD	Nervo frênico-diafragma
PE	Potencial de equilíbrio
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PM	Potencial(s) de membrana em repouso
PPT	Potencial de placa terminal
PPT'	Potencial de placa terminal corrigido
PPTM	Potencial de placa terminal em miniatura
PsPT	Potenciais de placa terminal
PsPTM	Potenciais de placa terminal em miniatura
TQ	Tamanho quântico
Vb	Veneno bruto

LISTA DE TABELAS

		<i>Pág.</i>
Tabela 1-	Classificação das miotoxinas.....	41
Tabela 2-	Tempo de bloqueio neuromuscular entre as preparações.....	78
Tabela 3-	Efeito da BthTX-I sobre o CQ dos PsPT.....	93

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
FIGURA 1- A serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	43
FIGURA 2- Distribuição geográfica da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> no Brasil.....	44
FIGURA-3 Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.....	62
FIGURA 4- Preparação <i>extensor digitorum longus</i> de camundongo.....	63
FIGURA 5- Curva da resposta contrátil da preparação neuromuscular NFD, sob estimulação elétrica indireta.....	74
FIGURA 6- Registros da força de contração muscular de preparações NFD (estímulo elétrico indireto).....	75
FIGURA 7- Registro da força de contração muscular de ensaios com Mn^{2+} e BthTX-I.....	76
FIGURA 8- Curva da resposta contrátil da preparação neuromuscular EDL, sob estimulação elétrica indireta.....	79
FIGURA 9- Registros da força de contração muscular de preparações EDL (estímulo elétrico indireto).....	80
FIGURA 10- Morfologia do músculo diafragma incubado com solução de Tyrode (controle) e Mn^{2+} (0,9 mM).....	82
FIGURA 11- Morfologia do músculo diafragma incubado com BthTX-I (1,4 μ M) e pré-tratado com Mn^{2+} (0,9 mM).....	83
FIGURA 12- Morfologia do músculo EDL incubado com solução de Tyrode (controle) e Mn^{2+} (0,9 mM).....	85
FIGURA 13- Morfologia do músculo EDL incubado com BthTX-I (1,4 μ M) e pré-tratado com Mn^{2+} (0,9 mM).....	86

FIGURA 14-	Determinação da porcentagem de fibras lesadas em músculos diafragma e EDL.....	89
FIGURA 15-	Determinação da área transversal das fibras em músculos diafragma e EDL.....	90
FIGURA 16-	Determinação de CK em preparação EDL.....	92

RESUMO

Os efeitos miotóxicos dos venenos botrópicos são inquestionáveis pela exuberante manifestação clínica e são extensivamente relatados na literatura. Já os efeitos neurotóxicos têm sido descritos sob condições *in vitro*, em preparações neuromusculares, com pouca ou nenhuma evidência clínica. O objetivo do presente trabalho foi o de contribuir para o conhecimento sobre a farmacologia da bothropstoxina-I (BthTX-I), o principal componente do veneno de *Bothrops jararacussu*, em suas dimensões pré- e pós-sinápticas. Esta toxina reproduz os mesmos efeitos *in vitro* do veneno bruto, quais sejam, bloqueio neuromuscular e mionecrose. Como ferramenta farmacológica utilizou-se o íon manganês (Mn^{2+}), capaz de prevenir o efeito bloqueador da BthTX-I, mas não ainda investigado o seu efeito protetor sobre a miotoxicidade da BthTX-I. Para isso foram utilizadas as preparações nervo frênico-diafragma (NFD) e *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongos. A neurotoxicidade foi avaliada pelas técnicas miográfica e eletrofisiológica, enquanto a miotoxicidade pelas técnicas histológica (determinação da porcentagem das fibras lesadas e determinação da área transversal das fibras musculares) e bioquímica (determinação da creatinoquinase, CK).

Na aplicação da técnica miográfica, as preparações foram incubadas com Mn^{2+} (0,9 mM, 120 min) ou BthTX-I (1,4 μ M, 120 min) ou pré-tratadas com Mn^{2+} (0,9 mM, 60min) seguido da adição de BthTX-I (1,4 μ M, 60 min) a 37°C, sempre nestas concentrações. A BthTX-I produziu 50% de bloqueio neuromuscular em $32,8 \pm 3,3$ min (NFD, n=6) e $32,9 \pm 3,2$ min (EDL, n=11) com completo bloqueio ocorrendo aos 120 min. Mn^{2+} (0,9 mM) em preparação NFD produziu um rápido bloqueio neuromuscular (50% em $3,3 \pm 0,2$ min, n=13) que foi espontaneamente revertido ao longo dos 120 min; em preparações EDL ocorreu um bloqueio parcial mantido ao longo dos 120 min e após a lavagem a amplitude retornou $79,9 \pm 4,9\%$ (n=19) em relação à amplitude inicial. O pré-tratamento das preparações com Mn^{2+} preveniu significativamente ($p < 0,05$) o bloqueio neuromuscular característico induzido pela BthTX-I, o qual foi confirmado após a lavagem, pelas amplitudes obtidas de $97 \pm 5,7\%$ (NFD, n=7) e $78,8 \pm 6,9\%$ (EDL, n=11).

Preparações NFD de camundongo foram incubadas com solução nutritiva de Tyrode (controle) ou BthTX-I (0,35 μ M) para o registro da frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal para a medida do conteúdo quântico. A BthTX-I produziu um significativo aumento do conteúdo quântico (10-20 min) seguido de uma drástica

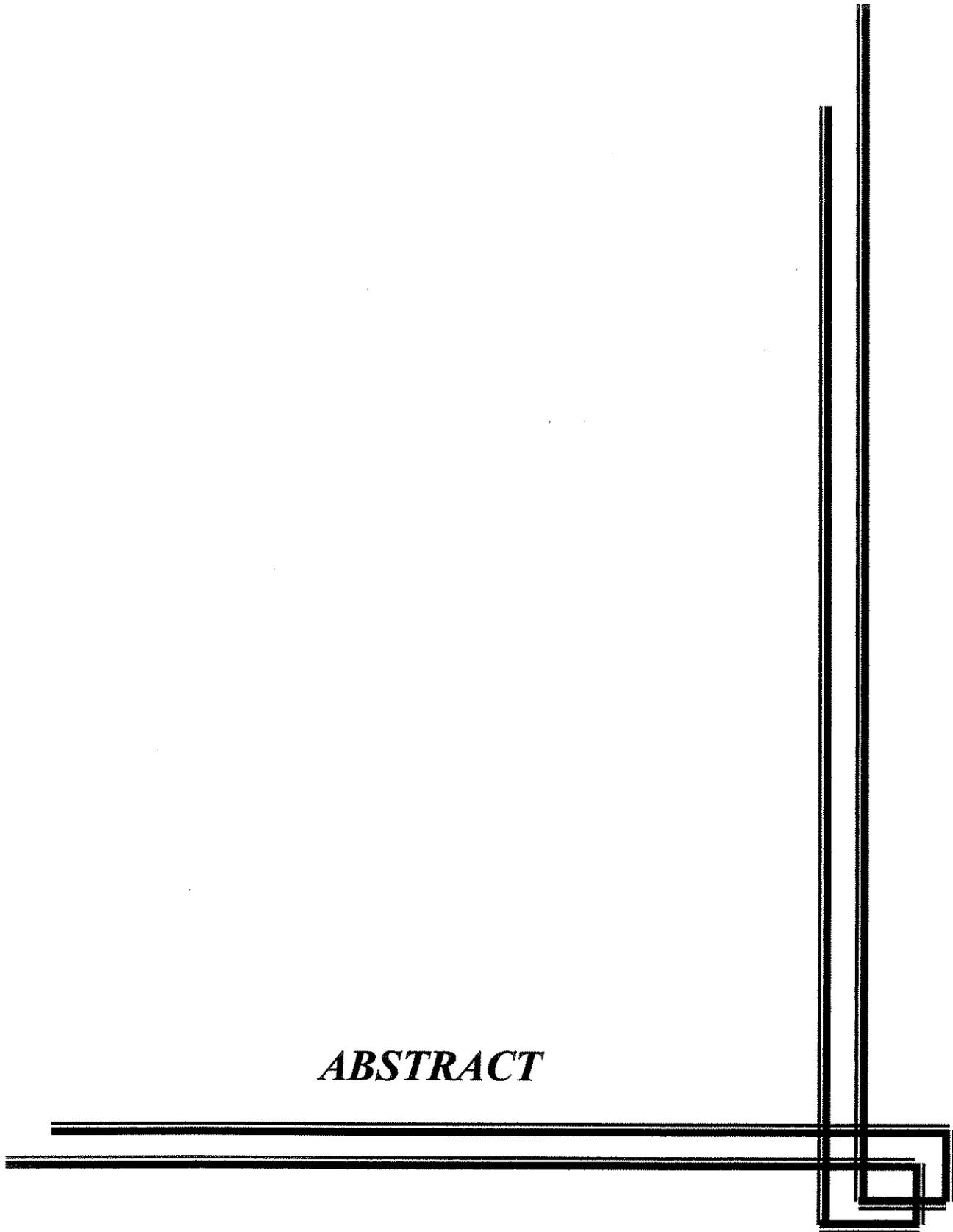
diminuição a partir dos 30 min ($p < 0,05$ comparado ao controle), sem alteração significativa nos valores do potencial de membrana.

Na aplicação da técnica histológica obtiveram-se os seguintes achados, em relação aos dois parâmetros avaliados (número de fibras lesadas e medida da área transversal das fibras, respectivamente): BthTX-I, após 120 min de incubação, lesou $82 \pm 3,1\%$ e a área transversal obtida foi de $3.885 \pm 141 \mu\text{m}^2$ (NFD, $n=11$ e 5 respectivamente) e $68,5 \pm 2,9\%$ com área transversal de $1.573,8 \pm 58 \mu\text{m}^2$ (EDL, $n=6$ e 5 respectivamente). O pré-tratamento com Mn^{2+} reduziu parcialmente a extensão do dano muscular, com proteção de $40 \pm 4,5\%$ (NFD, $n=10$), $39,7 \pm 2,9\%$ (EDL, $n=6$) ($p < 0,05$, comparado à toxina) e com área transversal preservada em $20 \pm 3,5\%$ (NFD, $n=5$) e $14,5 \pm 3,5\%$ (EDL, $n=5$).

O pré-tratamento com Mn^{2+} reduziu significativamente a liberação de CK promovida pela BthTX-I, de $1.261 \pm 113 \text{ U/L}$ ($n=20$) para $94,5 \pm 17,5 \text{ U/L}$ ($n=17$).

Resumidamente os principais achados deste trabalho foram: 1) por meio de parâmetros eletrofisiológicos demonstrou ser pré-sináptico o sítio de ação da BthTX-I, em baixas concentrações, seguida pela sua característica ação miotóxica; 2) as preparações utilizadas NFD e EDL apresentaram diferenças quanto à sensibilidade ao Mn^{2+} e à toxina; 3) Mn^{2+} protegeu completamente a neurotoxicidade e parcialmente a miotoxicidade da BthTX-I. Conclui-se que a BthTX-I é uma miotoxina com ação pré-sináptica e suas atividades neurotóxica e miotóxica podem ser dissociadas, como demonstrado pelo uso do Mn^{2+} , importante ferramenta farmacológica no estudo de venenos e toxinas.

ABSTRACT



Various *Bothrops* snake venoms produce neuromuscular blockade in avian and mammalian nerve-muscle preparations *in vitro* that is partly mediated by myotoxins. Bothropstoxin-I (BthTX-I) is the principal myotoxin present in *Bothrops jararacussu* venom and contributes to the neuromuscular blockade and myonecrosis caused by the venom *in vitro*. In this work, we investigated the ability of manganese (Mn^{2+}) to prevent the neuromuscular blockade caused by BthTX-I in mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) and *extensor digitorum longus* (EDL) preparations. Conventional electrophysiological and myographic techniques were used to study the neurotoxicity while myotoxicity was assessed based on the release of creatine kinase (CK) and on histological analysis.

Initially, the preparations were incubated with Mn^{2+} (0.9 mM, 120 min), BthTX-I (1.4 μ M, 120 min), or with Mn^{2+} (0.9 mM, 60 min) prior to BthTX-I (1.4 μ M, 60 min). BthTX-I produced 50% neuromuscular blockade in 32.8 ± 3.3 min (PND, n=6) and 32.9 ± 3.2 min (EDL, n=11), with complete blockade by 120 min. In PND preparations, Mn^{2+} alone produced rapid neuromuscular blockade (50% in 3.3 ± 0.2 min, n=13) that reverted spontaneously during the following 120 min. In EDL preparations, the blockade by Mn^{2+} was only partial during the 120 min of incubation, with a recovery of $79.9 \pm 4.9\%$ (n=19) after washing. Pretreating the preparations with Mn^{2+} significantly ($p < 0.05$) prevented the blockade by BthTX-I, with recoveries of $97 \pm 5.7\%$ (PND, n=7) and $78.8 \pm 6.9\%$ (EDL, n=11) after washing.

End-plate potentials were recorded in PND to determine the quantal content following incubation with Tyrode solution (control) or BthTX-I (0.35 μ M). BthTX-I significantly increased the quantal content within 10-20 min followed by a marked decrease from 30 min onwards ($p < 0.05$ compared to the control); there was no significant change in the membrane potential.

Incubation with BthTX-I for 120 min damaged $82 \pm 3.1\%$ of the fibers in PND (n=11) and $68.5 \pm 2.9\%$ of the fibers in EDL (n=6). Pretreatment with Mn^{2+} reduced the extent of muscle damage to $40 \pm 4.5\%$ (PND, n=10) and $39.7 \pm 2.9\%$ (EDL, n=6) ($p < 0.05$, compared to BthTX-I alone). BthTX-I increased the cross-sectional area of PND and EDL muscle fibers from $1,887 \pm 93.2 \mu m^2$ (n=5) and $940 \pm 37 \mu m^2$ (n=5) to $3,885 \pm 141 \mu m^2$ (n=5) and $1,574 \pm 58 \mu m^2$ (n=5) in PND and EDL, respectively. This increase in area was attenuated by $20 \pm 3.5\%$ (PND, n=5) and $14.5 \pm 3.5\%$ (EDL, n=5) when the preparations were

pretreated with Mn^{2+} . BthTX-I significantly increased the release of CK by EDL from 52.3 ± 4.2 U/L to $1,261 \pm 113$ U/L (n=20), whereas after pretreatment with Mn^{2+} the CK release in the presence of BthTX-I was only 94.5 ± 17.5 U/L (n=17).

Based on these results, we conclude that BthTX-I has a presynaptic action and that its neurotoxic and myotoxic activities can be dissociated by using Mn^{2+} .

1-INTRODUÇÃO

1.1- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A incidência e o número de mortes por picada de serpente, no mundo todo, são desconhecidos. No Brasil, das notificações de acidentes ofídicos (janeiro de 1990 a dezembro de 1993) informando o gênero a que a serpente pertencia, 90,5% eram do gênero *Bothrops*; 7,7% *Crotalus*; 1,4% *Lachesis* e 0,4% *Micrurus* (ARAÚJO et al., 2003).

1.2-ESPÉCIES PEÇONHENTAS DA FAUNA BRASILEIRA

Há, atualmente, cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, há representantes de nove famílias, 75 gêneros e 321 espécies, ou seja, cerca de 10% do total de espécies (FRANCO, 2003).

De todo esse elenco, as serpentes peçonhentas existentes no Brasil pertencem a duas famílias, Elapidae e Viperidae (subfamília Crotalinae). O único gênero da família Elapidae, no Brasil, é o *Micrurus*, cujas espécies são conhecidas popularmente por corais (MELGAREJO, 2003).

Os viperídeos representam o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria e os mais graves acidentes ofídicos registrados, não só no Brasil, mas também em outros países americanos. Os representantes da subfamília Crotalinae pertencem aos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops* (MELGAREJO, 2003).

1.3-MIOTOXINAS

MEBS e OWNBY (1990) definem miotoxicidade como uma ação específica do veneno sobre o músculo esquelético, causado por substâncias denominadas miotoxinas, que exercem, portanto, uma ação direta e específica sobre o músculo esquelético, levando à degeneração e morte celular (mionecrose). Essa ação direta diferencia as miotoxinas de outros componentes tóxicos, como as hemorraginas, que podem, indiretamente, destruir o músculo esquelético e outros tecidos. Uma “verdadeira” miotoxina não destrói terminais nervosos, células satélites, vasos sanguíneos ou tecido conjuntivo. Encontram-se amplamente distribuídas nos venenos de serpentes (MEBS et al., 1983).

Sua classificação abrange de dois a quatro grupos, de acordo com os diferentes pesquisadores. OWNBY (1990) e MEBS e OWNBY (1990) dividem-nas em dois grupos principais: (1) pequenas miotoxinas e (2) miotoxinas fosfolipásicas. HARRIS e CULLEN (1990) incluíram os mesmos grupos e adicionaram um outro, formado pelas (3) cardiotoxinas. GUTIÉRREZ e CERDAS (1984) descreveram um quarto grupo, as (4) toxinas hemorrágicas, que podem danificar as fibras musculares esqueléticas, indiretamente, provavelmente por isquemia (Tabela 1).

Existem vários métodos para avaliação da atividade miotóxica de venenos e toxinas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre eles, a análise histológica de tecido muscular injetado é indubitavelmente o método de referência e pode ser feito quantitativamente (OWNBY et al., 1982; KOUYOUMDJIAN et al., 1986; OWNBY e COLBERG, 1988; PRESTON et al., 1990; McLOON et al., 1991). Como alternativa, métodos baseados na medida de indicadores bioquímicos do dano muscular têm sido utilizados. Tais métodos incluem a quantificação de enzimas intracelulares específicas, liberadas após injúria celular, pelo aumento de sua atividade no plasma (soro) ou pela diminuição do conteúdo intracelular no tecido muscular afetado. A determinação de CK tem sido freqüentemente utilizada. Esta enzima ocorre em três isoformas eletroforicamente distintas: MM, MB e BB, que são preferencial e respectivamente expressas nos músculos esquelético, cardíaco e no sistema nervoso central (RAPHAEL, 1983).

Tabela 1-Classificação das miotoxinas

(OWNBY, 1990; MEBS e OWNBY, 1990; HARRIS e CULLEN, 1990; GUTIÉRREZ e CERDAS, 1984)

GRUPO	CARATERÍSTICAS
(1) Pequenas	Básica, não-enzimática, cadeia única de peptídeo com 42-45 a.a. Ex.: crotamina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>) miotoxina a (<i>Crotalus viridis viridis</i>) peptídeo c (<i>Crotalus viridis hellen</i>)
(2) Fosfolipásicas	
a. neurotóxicas	Básica, cadeia única (~120 a.a.) ou complexada a proteínas com atividades neurotóxica e fosfolipásica. Ex.: notexina (<i>Notechis scutatus scutatus</i>) taipoxina (<i>Oxyuranus scutellatus</i>) crotoxina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)
b. não-neurotóxicas	Básica, cadeia única (~120 a.a.) ou proteínas diméricas com estrutura fosfolipásica.
b1. com atividade enzimática	Asp-49 PLA ₂ Ex.: miotoxina I (<i>Bothrops asper</i>)
b2. sem atividade enzimática	Lys-49 (ou outra variante) PLA ₂ Ex.: miotoxina I (<i>Bothrops nummifer</i> e <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>) BthTX (<i>Bothrops jararacussu</i>) miotoxina II (<i>Bothrops asper</i>) proteínas básicas I e II (<i>Trimeresurus flavoviridis</i>) amoditina L (<i>Vipera ammodytes</i>)
(3) Cardiotoxinas	Básica, não-enzimática, cadeia única de proteínas com ~60 a.a. Ex.: toxina gama (<i>Naja nigricollis</i>)
(4) Toxinas hemorrágicas	Atuam por mecanismos indiretos, talvez por isquemia. Ex.: toxina b (<i>Crotalus atrox</i>) viriditoxina (<i>Crotalus viridis viridis</i>)

1.4-GÊNERO *BOTHRUPS*

O gênero *Bothrops* apresenta 32 espécies e subespécies que estão distribuídas nas Américas, desde o México até a Argentina (HOGE e ROMANO-HOGE, 1978; HOGE e ROMANO, 1972).

Essas serpentes habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruído. São conhecidas popularmente por 'jararaca', 'jararacuçu', 'urutu-cruzeiro', 'cotiara', 'jararaca-do-rabo-branco', 'malha-de-sapo', 'patrona', 'surucucurana', 'combóia', 'caçara', e outras denominações. Destas, a 'jararaca' é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no sudoeste do Brasil (MELGAREJO, 2003).

Diversos componentes isolados de venenos botrópicos, como fator hemorrágico (MANDELBAUM et al., 1976, 1984), proteases, que atuam em etapas da coagulação sanguínea causando distúrbios de coagulação (NAHAS et al., 1979; HOFMANN e BON, 1987), enzimas proteolíticas (ASSAKURA et al., 1985; TANIZAKI et al., 1989) e miotoxinas (GUTIÉRREZ et al., 1984, 1989; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; MOURA-DA-SILVA et al., 1991) são responsáveis pelos sintomas clínicos exibidos no envenenamento botrópico.

De uma maneira geral, o quadro clínico dos pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops* consiste, sobretudo, de distúrbios da coagulação, hemorragias, edema e necrose local (HOMMA e TU, 1971; ROSENFELD, 1971). As principais causas de óbito estão relacionadas à insuficiência renal aguda, sangramento em órgãos vitais e choque (AMARAL et al., 1986; KOUYOUMDJIAN et al., 1991).

1.4.1-*Bothrops jararacussu* (Bjssu)

A *Bothrops jararacussu* é uma serpente de grande porte, podendo atingir até 2,20 m de comprimento. Possui cabeça grande, negra, triangular e com estrias amarelas pós-oculares, ostentando no dorso colorido de tom aveludado, em que o negro contrasta com o amarelo-dourado (Figura 1).



Figura 1-A serpente *Bothrops jararacussu*¹

¹ http://www.gifte.de/bothrops_jararacussu_bild02.htm

A Bjsu está distribuída geograficamente em quase todo o território sul-americano: Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina e no Brasil principalmente nas regiões Sul e Sudeste (MELGAREJO, 2003) (Figura 2).

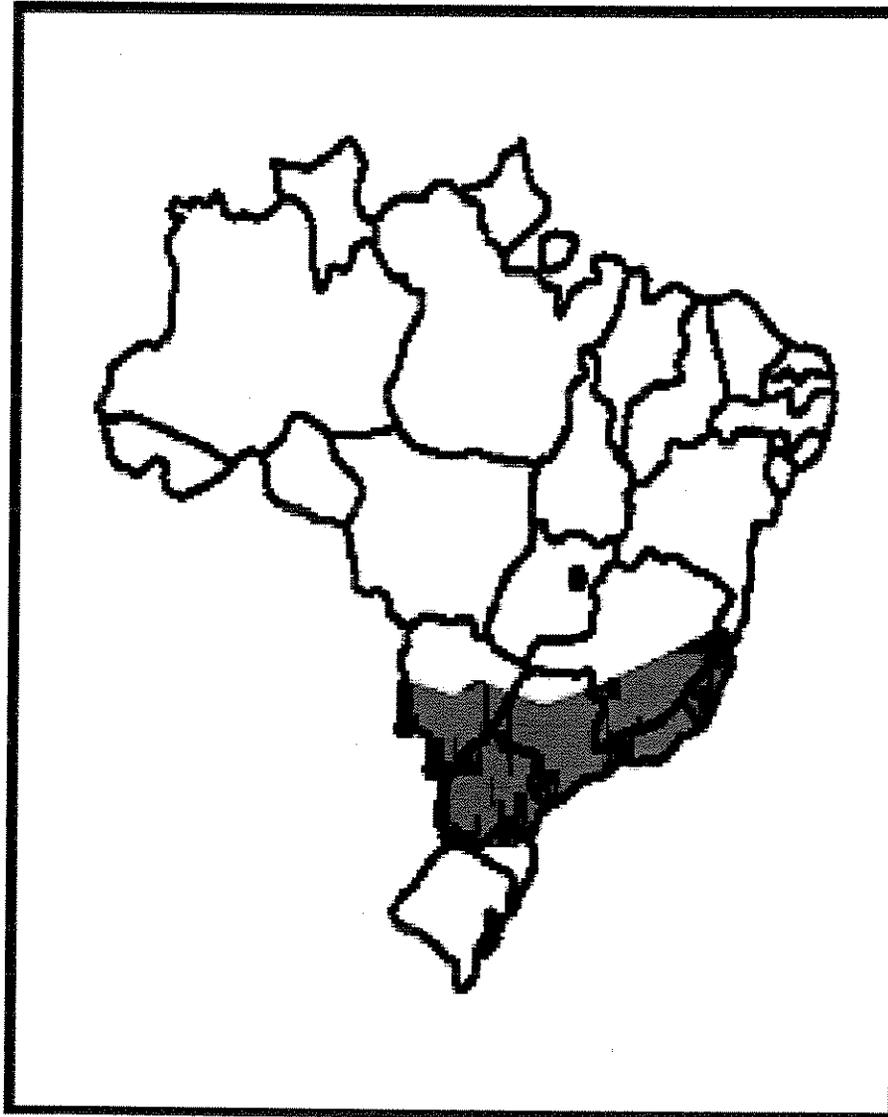


Figura 2-Distribuição geográfica da serpente *Bothrops jararacussu* no Brasil²

² <http://www.proto.ufsc.br/manualpeconhentos.pdf>

O veneno da serpente Bjssu tem sido estudado desde 1909 por BRAZIL e RANGEL PESTANA. BRAZIL (1911) descreveu que os sinais e sintomas exibidos no envenenamento causado pela Bjssu assemelhavam-se, em parte, aos observados no acidente crotálico. O veneno demonstrava intensa atividade coagulante e discreta ação proteolítica, quando comparado à atividade de outras espécies do gênero *Bothrops*.

Essas observações nortearam, de certo modo, pesquisas subseqüentes realizadas por outros autores, como GONÇALVES (1956), que descreveu que o veneno da Bjssu continha um peptídio “crotamina-like” e VITAL BRAZIL, em 1966, que verificou ter a peçonha a propriedade de inibir a contração causada pela ACh, no diafragma desnervado de rato, de forma semelhante à crotoxina.

O estudo do modo de ação dos venenos ofídicos sofreu grande progresso, pelo emprego de variados métodos e técnicas de investigação farmacológica, como também pela separação dos constituintes das peçonhas em estado de pureza. No que se refere a este último item, os venenos botrópicos das espécies brasileiras, de um modo geral, foram pouco estudados em seus componentes isolados. O veneno da Bjssu, em particular, foi fracionado pela primeira vez por VIDAL e STOPPANI, em 1971, que dele isolaram duas fosfolipases A₂.

Utilizando a preparação nervo-músculo *cutaneous pectoris* de rã, RODRIGUES-SIMIONI et al. (1983) observaram que o veneno rapidamente inibia a contração muscular, evocada direta ou indiretamente pelo nervo motor, e abolia o potencial de ação composto do músculo e do nervo. O veneno foi fracionado e a fração principal - “pool IV” – reproduziu, na preparação isolada utilizada, a maioria dos efeitos da peçonha.

QUEIROZ et al. (1984) estudaram os efeitos locais do veneno de Bjssu, após injeção em músculo tibial anterior de camundongo e observaram sinais de necrose na fibra muscular seguido de alterações vasculares e trombose. A recuperação da fibra muscular se dava de forma deficiente, resultando, às vezes, em seqüela permanente. AMARAL et al. (1985), por sua vez, detectaram necrose do córtex renal em indivíduos picados por Bjssu.

Pesquisas sobre peçonhas têm surgido tanto no campo da biologia molecular, quanto da celular, por serem proteínas mediadoras de muitos processos patológicos. Concomitantemente, a tecnologia do DNA permite um acesso rápido aos genes que controlam estes processos. Nesta linha, MOURA-DA-SILVA et al. (1995) seqüenciaram o cDNA para uma PLA₂ de Bjssu e, por análise comparativa de seqüências, sugeriram que as PLA₂ do grupo II evoluíram por duplicação genética.

ZAGANELLI et al. (1996) descreveram os resultados da purificação e caracterização de uma serina proteinase de Bjssu, que demonstrou possuir atividades amidase e fibrinogênio-coagulante.

Para melhor entender a gravidade do acidente causado por Bjssu, MILANI JUNIOR et al. (1997) fizeram um estudo clínico-patológico em 29 casos, atendidos num período de 20 anos, em dois hospitais do Estado de São Paulo. Foram encontrados sinais de necrose local, abscessos, coagulopatia, choque, necrose tubular renal e morte.

Um novo fator de coagulação do veneno de Bjssu foi descrito por ANDRIÃO-ESCARSO et al. (1997), o qual permitiu a estabilidade do coágulo quando produzido em presença de aprotinina, um inibidor da síntese de calicreína-cinina, proporcionando futuras aplicações na produção de adesivo de fibrina.

ANDRIÃO-ESCARSO et al. (1999) também descreveram sobre o isolamento e a caracterização parcial de uma serina protease com atividade arginina éster hidrolase do veneno de Bjssu, a qual induziu contrações uterinas em ratas.

A neutralização cruzada do veneno de Bjssu por antivenenos heterólogos foi estudada por DE ROODT et al. (1999). Em experimentos pré-incubados com antivenenos heterólogos, os mesmos neutralizaram as atividades biológica e tóxica do veneno de Bjssu. Este resultado sugeriu a possibilidade de se utilizar antivenenos antibotrópicos heterólogos para o tratamento de picadas por serpente Bjssu.

Os toxinologistas a partir de então, voltaram a atenção ao estudo do veneno bruto, principalmente da serpente *B. jararacussu*, o que poderá ser comprovado pelas inúmeras publicações descritas a seguir, neste breve apanhado histórico.

PEREIRA-BITTENCOURT et al. (1999) investigaram o efeito de uma lecitina do veneno de Bjssu (BJcuL) na proliferação de célula tumoral. Os autores sugeriram que a BJcuL foi efetiva em inibir o crescimento celular em algumas linhagens de célula

cancerígena. Nessa mesma linha, DE CARVALHO et al. (2001) sugeriram que a BJcuL seria uma interessante ferramenta para combater a progressão tumoral e o crescimento de célula endotelial.

BONFIM et al. (2001) isolaram e caracterizaram uma PLA₂ básica do veneno de Bjssu, denominada Bj IV, homóloga às miotoxinas básicas PLA₂ D49. Os autores verificaram que a presença de proteínas crotapotina-like capazes de inibir a atividade catalítica de PLA₂ D49 poderiam, em parte, explicar a baixa atividade fosfolipásica dos venenos botrópicos.

Os efeitos renais produzidos pelo veneno de Bjssu e a função da PLA₂ e do fator de agregação plaquetária foram estudados por HAVT et al. (2001). Os autores sugeriram que as alterações na taxa de filtração glomerular, fluxo urinário e porcentagem de potássio tubular foram provavelmente mediados pelo fator de ativação plaquetária. A dexametasona não bloqueou os efeitos renais, e os autores sugeriram que poderia ser devido à concentração utilizada ou os efeitos renais foram promovidos pela miotoxina, a qual não tem atividade PLA₂.

Apesar de ser sabido que o veneno de Bjssu produz sintomas locais severos nas vítimas envenenadas, tais como hemorragia, edema e mionecrose, TEIBLER et al. (2001) estudaram a regeneração muscular após mionecrose induzida pelo veneno de Bjssu em músculo gastrocnêmio de camundongo. Os autores confirmaram a severa mionecrose do veneno de Bjssu e verificaram que a recuperação das fibras musculares era parcial, o que poderia ser interpretado como uma seqüela funcional para o músculo injuriado, justificando a gravidade dos sintomas locais.

Continuando os estudos com BJcuL, DE CARVALHO et al. (2002) caracterizaram a sua estrutura primária sugerindo que esta, assim como as lecitinas de outros venenos de serpente, possuía estrutura similar ao domínio de reconhecimento de carboidrato de uma lecitina animal, cálcio-dependente, pertencentes à família lecitina ligante C-tipo beta-galactosídeo.

O efeito da heparina e do antiveneno polivalente foi estudado por CALIL-ELIAS et al. (2002a) sobre o dano muscular esquelético em camundongos produzido pelo veneno de Bjssu. Eles verificaram que a heparina diminuía a atividade

proteolítica do veneno, mas não afetava a atividade fosfolipásica. Entretanto o antiveneno polivalente antagonizou ambas as atividades. Já a heparina associada ao antiveneno polivalente demonstrou atividade antimiotóxica de acordo com os níveis de CK plasmático observados.

O efeito da dose e do volume na injeção perimuscular do veneno de Bjssu sobre a mionecrose de músculos esqueléticos foi estudada em camundongos também por CALIL-ELIAS et al. (2002b). Os autores verificaram que altas doses e volumes aumentavam significativamente os níveis de CK plasmático, enquanto histologicamente observou-se completa degeneração das fibras musculares.

DE SOUZA QUEIROZ et al. (2002) verificaram que o veneno de Bjssu induzia lesões locais agudas em tecido nervoso de camundongo, possivelmente agindo diretamente em fosfolipídios da bainha de mielina promovendo sério dano axonal.

A seqüência completa de nucleotídeo de um precursor do fator de crescimento nervoso do veneno de Bjssu (Bj-NGF) foi determinado pelo seqüenciamento de DNA de um clone de cDNA preparado de poly(A) + RNA da glândula venenosa da Bjssu por KASHIMA et al. (2002). Segundo os autores, a estrutura tridimensional do Bj-NGF foi baseada na estrutural cristal do NGF humano.

Um caso clínico foi relatado por BENVENUTI et al. (2003), em que o indivíduo picado pela serpente Bjssu na região do tornozelo apresentou hemorragia pulmonar culminando em morte rápida, provavelmente devido à inoculação intravenosa do veneno, explicando o início brusco do transtorno da coagulação, hemorragia e óbito.

KETELHUT et al. (2003) isolaram, caracterizaram e estudaram a atividade biológica de quatro isoformas de PLA₂ ácidas do veneno de Bjssu designadas SIIISPIIA, SIIISPIIB, SIIISPIIA e SIIISPIIB. As três primeiras demonstraram atividade anticoagulante, mas não atividade hemolítica indireta. Ao contrário, a SIIISPIIB não revelou atividade anticoagulante, mas apresentou atividade hemolítica indireta e a SIIISPIIB também inibiu a agregação plaquetária.

Estudos com a BJcuL continuaram sendo realizadas por KASSAB et al. (2004), que descreveram a clonagem, expressão e análise estrutural da BJcuL recombinante, uma lecitina ligante à lactose pertencente ao grupo VII da lecitina animal do tipo-C.

MAZZI et al. (2004) isolaram e caracterizaram bioquimicamente uma nova metaloprotease hemorrágica de alto peso molecular do veneno de Bjsu que pode ter um papel relevante na hemorragia local e sistêmica que caracteriza envenenamentos botrópicos.

Recentemente ROBERTO et al. (2004a, b) investigaram a clonagem e identificação de um completo cDNA codificado por uma PLA₂ ácida antitumoral e bactericida e de uma PLA₂ ácida inibidora da agregação plaquetária do veneno de Bjsu. Este breve histórico ressalta a importância dos acidentes causados por esta serpente.

1.4.2-Bothropstoxina-I (BthTX-I)

O veneno bruto de Bjsu foi fracionado através de filtração em gel em Sephadex G-50, por RODRIGUES-SIMIONI et al. (1983), obtendo-se, deste procedimento, uma fração, “pool IV”, com atividade miotóxica, e equivalente a 30% do conteúdo protéico do veneno total. Esta subfração ativa (“pool IV”), constituída por dois polipeptídios básicos, com peso molecular aproximadamente de 13.000, apresentava atividade hemolítica indireta na presença de íons Ca²⁺, baixa atividade PLA₂ sobre lecitina de ovo e nenhuma atividade proteolítica. O “pool IV” mostrou-se ainda responsável pela ação bloqueadora do potencial de ação composto de nervo e músculo e das respostas musculares, tanto a estímulos elétricos diretos, como indiretos. Os autores sugeriram, então, que a fração possuía uma ação ativa em membrana semelhante a das cardiotoxinas, toxinas presentes nos venenos de algumas serpentes da família Elapidae.

O veneno de Bjsu foi purificado por HOMSI-BRANDEBURGO et al. (1988), combinando filtração em gel Sephadex G-75 com cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25. A fração isolada S_{III}SP_V, correspondente à fração purificada relatada por RODRIGUES-SIMIONI et al. (1983) – “pool IV” – foi denominada bothropstoxina-I (BthTX-I) por HOMSI-BRANDEBURGO et al. (1988). Ao contrário do veneno bruto, que, além de miotóxico também afetava artérias e veias intramusculares podendo levar à trombose, a BthTX-I foi considerada especificamente miotóxica. A fração S_{III}SP_{IV}, denominada bothropstoxina-II (BthTX-II) também exibia ação miotóxica (GUTIÉRREZ et al., 1991), cuja seqüência de aminoácidos foi posteriormente identificada (PEREIRA

et al., 1998) e caracterizada como sendo uma Asp-49 PLA₂, com baixa atividade fosfolipásica sobre lecitina de ovo.

Em preparações musculares de camundongos e aves a BthTX-I causava contratura, bloqueio das contrações musculares, despolarização e bloqueio do potencial de ação composto do músculo (HELUANY et al., 1992). Os autores verificaram que a atividade bloqueadora da junção neuromuscular não envolvia a participação do receptor nicotínico, nem a ativação do canal de Na⁺ e sugeriram a ação da toxina sobre os sítios de ligação de Ca²⁺ na membrana (sarcolema).

MELO et al. (1993) investigaram o antagonismo dos efeitos miotóxicos do veneno de Bjsu e da BthTX-I por poliânions (heparina, dextran sulfato e condroitina sulfato). A miotoxicidade foi estudada em camundongos, *in vivo* e *in vitro*, pela determinação enzimática de creatinoquinase (CK) liberada, proteína presente nas linhas M de células musculares intactas. Observaram que poliânions formavam complexos ácido-básicos com as miotoxinas básicas presentes em venenos botrópicos, neutralizando, desta forma, sua miotoxicidade. O pico de liberação da CK, em camundongos, ocorria entre a terceira e a sexta hora após a injeção da toxina (DOS-SANTOS et al., 1992), e era acompanhado de hemoglobinúria e intensa dor local.

CINTRA et al. (1993) descreveram a seqüência completa de aminoácidos da BthTX-I, toxina que correspondia a 15% das proteínas do veneno total. Tratava-se de uma proteína Lys-49, de estrutura homóloga à PLA₂, constituída por uma única cadeia polipeptídica, com 121 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 13.720 e 7 pontes dissulfeto.

ARNI et al. (1995) cristalizaram a miotoxina Lys-49 fosfolipásica BthTX-I. Análises preliminares revelaram a presença de quatro moléculas na unidade assimétrica, em comparação à miotoxina II da *B. asper*, que contém duas moléculas nesta unidade.

O seqüenciamento do código de cDNA da BthTX foi realizado por WARD et al. (1995), com o objetivo de entender a afinidade estrutura/função de dano à membrana, causado pela subfamília Lys-49 PLA₂. Tal estudo confirmou ser a BthTX-I uma Lys-49 e, em comparação com a já conhecida estrutura da miotoxina II da *B. asper*, demonstrou que

os aminoácidos (a.a.) envolvidos na formação de uma nova estrutura dimérica na proteína também foram conservados.

A função da atividade fosfolipásica foi investigada por RODRIGUES-SIMIONI et al. (1995), em cultura de miócitos, sobre a ação farmacológica da BthTX-I. Os resultados demonstraram que a baixa atividade fosfolipásica da BthTX-I não desempenhava papel relevante sobre o efeito bloqueador da atividade contrátil. Dos estudos com dantrolene, droga que impede a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, os autores concluíram que os mecanismos e (ou) “pools” de Ca^{2+} , que podem ser antagonizados por este agente, não estariam ligados aos efeitos da BthTX-I sobre a contração muscular.

As atividades enzimática e biológica da BthTX-I e da BthTX-II, fosfolipases A_2 homólogas, foram determinadas como sendo atividades dissociadas ou independentes (LANDUCCI et al., 1998). Estes autores sugeriram que a hidrólise de fosfolipídios pela PLA_2 não seria essencial para a formação de edema.

DA SILVA GIOTTO et al. (1998) caracterizaram a alteração conformacional da BthTX-I, cristalográfica e espectroscopicamente, e relacionaram a possível relevância na transição desta estrutura com uma atividade Ca^{2+} -independente de dano sobre membrana.

SPENCER et al. (1998) propuseram uma única etapa para a purificação da BthTX-I representando, principalmente, em um grande ganho de tempo. A pureza e a identidade foram comprovadas por SDS-PAGE que resultou em uma banda única, com massa molecular de cerca de 14kDa e pelo seqüenciamento N-terminal com os cinco primeiros resíduos na seqüência esperada S-L-F-E-L.

A capacidade neutralizante das atividades neurotóxica e miotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu* e BthTX-I, por meio da utilização de soros comerciais - antibotrópico e anticrotálico e específicos (anti-*B. jararacussu*, anti-*C. d. terrificus* e anti-crotoxina, produzidos em coelhos) - e heparina, foram estudadas por OSHIMA-FRANCO et al. (2000, 2001 e 2002). Os autores apontaram a superioridade do soro específico anti-*B. jararacussu* em neutralizar os efeitos neurotóxico e miotóxico do veneno bruto e da BthTX-I, bem como a eficiência do antiveneno específico anti-crotoxina

(AntiCrTX) e da heparina em neutralizar os efeitos neurotóxicos da BthTX-I. Contudo, a heparina não foi eficiente em neutralizar completamente os efeitos miotóxicos da toxina.

A partir do ano 2000, vários estudos enfocando a bioquímica da BthTX-I foram acrescentados (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; WARD et al., 2001; CINTRA et al., 2001; CHIOATO et al., 2002), trazendo uma rica contribuição científica para compreensão desta toxina. DE OLIVEIRA et al. (2001a, b) e RULLER et al. (2003), referiram ser a BthTX-I uma Lys-49 PLA₂ homodimérica, com um único resíduo Trp77 na interface do dímero. A forma dimérica da BthTX-I pode ser dissociada em pH - 5,0 com a conseqüente exposição do resíduo Trp77 ao solvente aquoso, confirmando que as interações eletrostáticas foram importantes para manter a estabilidade da BthTX-I dimérica. Verificaram, ainda, em estudos com lipossomos, que o dano à membrana foi facilitado quando a BthTX-I encontrava-se em sua forma dimérica (DE OLIVEIRA et al., 2001a, b).

Recentemente, um sistema de expressão genética para a BthTX-I foi descrito por WARD et al. (2002), propondo um mecanismo de dano à membrana, por um modelo independente de hidrólise, envolvendo uma interação da região C-terminal da BthTX-I com a membrana-alvo. A proposta foi corroborada por CHIOATO et al. (2002), que num outro estudo dissociaram as duas atividades da BthTX-I, a miotóxica e a atividade de dano à membrana. Os autores propuseram que a região que inclui os resíduos 115 – 119 interagiria superficialmente com a interface da membrana e que os resíduos da posição 125 parcialmente se inseririam na membrana lipídica, causando perturbações na bicamada fosfolipídica.

Um estudo comparativo entre os efeitos dos venenos de Bjssu nativo e irradiado foi realizado por SOUZA et al. (2002), que verificaram que a radiação gama ⁶⁰Co era capaz de abolir os efeitos paralisantes e miotóxicos da Bjssu na junção neuromuscular de camundongo. Os autores concluíram que o veneno irradiado seria uma importante ferramenta para melhorar a produção de anti-soro pela redução da toxicidade e manutenção da imunogenicidade.

Numa outra linha, DE OLIVEIRA et al. (2003) utilizando o suramim, um derivado naftilúreia polissulfonatado, verificaram ser este eficiente em antagonizar as atividades neurotóxicas e miotóxicas da BthTX-I na junção neuromuscular isolada de camundongo.

atividades neurotóxicas e miotóxicas da BthTX-I na junção neuromuscular isolada de camundongo.

SÁ et al. (2004) demonstraram que a topologia da região de ligação ao substrato da BthTX-I tem um efeito direto Ca^{2+} -independente sobre o dano à membrana, o que determina que a ligação ao substrato tem um importante papel neste processo.

Também por meio de estudos em preparações isoladas de camundongo, OSHIMA-FRANCO et al. (2004) evidenciaram a atividade pré-sináptica da BthTX-I. Medidas eletrofisiológicas demonstraram que baixas concentrações de BthTX-I causaram o aparecimento de potenciais de placa terminal em miniatura gigantes sem alteração do potencial de membrana. Os autores sugeriram que, em adição ao efeito miotóxico bem conhecido, a BthTX-I também teria uma ação pré-sináptica.

Como se percebe, muitos esforços têm sido envidados para o entendimento do modo de ação desta miotoxina, com o objetivo de contribuir para o estudo das toxinas em geral. Neste sentido, o presente projeto consistiu em prosseguir as investigações sobre a BthTX-I quanto à sua miotoxicidade e também quanto à sua ação pré-sináptica, por meio de novos parâmetros eletrofisiológicos, na tentativa de contribuir para a compreensão do efeito tóxico.

1.5-ÍONS MANGANÊS (Mn^{2+})

Íons manganês (Mn^{2+}) são agentes bloqueadores da transmissão sináptica na junção neuromuscular e seu principal sítio de ação é a terminação nervosa motora, onde esses íons reduzem a quantidade de neurotransmissor liberado por impulso nervoso, ou seja, diminuem a liberação quântica de acetilcolina. A inibição exercida pelo manganês é reversível (MEIRI e RAHAMIMOFF, 1972).

Segundo CUTHBERT (1970), a forma como os íons manganês (Mn^{2+}) produzem bloqueio neuromuscular está relacionada aos íons cálcio (Ca^{2+}), que exercem importante função em um grande número de processos biológicos. Após a despolarização de fibras nervosas, há um influxo de íons cálcio para dentro da célula. O influxo de íons cálcio, do ponto de vista farmacológico, pode ser dividido em dois componentes distintos:

Os íons manganês reverteram a necrose cardíaca causada pela fosfolipase Asp-49 do veneno da *Naja nigricollis* (FLETCHER et al., 1982), proporcionando grande interesse em se investigar a ação deste íon contra os efeitos miotóxicos da BthTX-I, pelo fato de ser esta uma fosfolipase Lys-49.

É sabido que fosfolipases Asp-49 necessitam de Ca^{2+} como co-fator para exercer atividade catalítica, o que não acontece com fosfolipases Lys-49, o que explica o fato de serem estas desprovidas de atividade enzimática. Isto tem levado alguns autores a sugerirem que a BthTX-I exerceria seus efeitos miotóxicos por um mecanismo Ca^{2+} -independente, não completamente compreendido (ARNI et al., 1995; DE OLIVEIRA et al., 2001a; WARD et al., 2002; CHIOATO et al., 2002; SÁ et al., 2004).

SOARES et al. (2002) descreveram sobre a ação protetora do Mn^{2+} contra a atividade farmacológica e enzimática da BthTX-I, com a redução do edema de pata e da miotoxicidade, antagonismo ao bloqueio neuromuscular característico desta toxina em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo.

Na mesma abordagem OSHIMA-FRANCO et al. (2004) estudaram o efeito protetor do exercido pelo Mn^{2+} por meio de técnicas eletrofisiológicas, em preparações neuromusculares isoladas nervo frênico-diafragma de camundongo. Os autores concluíram que preparações pré-tratadas com íons manganês protegem contra a ação despolarizante da BthTX-I. Com o uso Mn^{2+} também sugeriram um provável sítio de ligação da BthTX-I, o canal de cálcio, tanto do axolema como do sarcolema.

Assim, o manganês foi utilizado como a principal ferramenta farmacológica deste estudo, para se avançar no conhecimento do mecanismo de ação da BthTX-I, esclarecendo o papel deste íon contra o principal efeito tóxico da BthTX-I, a miotoxicidade.

2-OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 2.1-Avaliar o efeito protetor de íons manganês (Mn^{2+}) contra as atividades neurotóxica e miotóxica da Bothropstoxina-I (BthTX-I), em preparações neuromusculares isoladas nervo frênico-diafragma (NFD) e *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongos, por meio de técnicas miográfica, histológica (microscopia óptica) e bioquímica.
- 2.2-Desenvolver um estudo quantitativo para a medida do conteúdo quântico (CQ) da neurotransmissão de preparações NFD tratadas com BthTX-I em baixa concentração, por meio da técnica eletrofisiológica.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-ANIMAIS

Camundongos machos da linhagem SWISS foram fornecidos pela Central de Bioterismo da Unicamp e mantidos em gaiolas no biotério do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas (Unicamp), recebendo ração e água *ad libitum* até o momento do uso, quando atingiram peso aproximado entre 26 a 32 g. Este projeto, sob o protocolo nº 510-1 (Anexo 1), foi integralmente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-Unicamp).

3.2-TOXINA

BthTX-I, extraída de um “pool” de veneno de *Bothrops jararacussu*, conforme descrito por HOMSI-BRANDEBURGO et al. (1988), foi fornecida pelo Prof. Dr. José Roberto Giglio, Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto/SP.

3.3-REAGENTES

MnCl₂ • 4H₂O PM 197.9 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Solução nutritiva de Tyrode (pH 7,4) – composição em mM - NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e Glicose 11,1 - origem dos sais: Merck, Darmstadt, Germany; Mallinckrodt Baker, Inc., Paris, Kentucky; Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas, Rio de Janeiro; Synth, Labsynth, São Paulo. Historesin Embedding Kit (Leica Instruments GmbH, NuBloch/Heidelberg, Alemanha). Kit comercial de Creatinoquinase Randox[®] 335 (CK-NAC EC– método cinético), Inglaterra, Reino Unido.

3.4-PREPARAÇÕES BIOLÓGICAS (CAMUNDONGOS)

3.4.1-Nervo frênico-diafragma (NFD)

Após anestesia com hidrato de cloral a 10% (300 mg/kg, i.p.), os camundongos foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais. O diafragma com o nervo frênico (Figura 3) foi cuidadosamente retirado pelo método de BÜLBRING (1946) modificado para camundongo, colocado em cuba contendo 5 mL de solução nutritiva de

Tyrode e preso, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂).



Figura 3-Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. A seta ilustra a localização do nervo frênico esquerdo.

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos elétricos supramaximais, foi realizado por transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400 (Gould Inc., Cleveland, OHIO, USA).

O músculo foi submetido à tensão constante de 5 g/cm (por meio de um fio preso à porção tendinosa e ao transdutor isométrico) e à estimulação elétrica indireta (nervo frênico), com pulsos supramaximais, gerados por estimulador S48F (Grass Instruments, Quincy, MASS., USA), de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, por um período de 20 minutos para estabilização. Findo este período, a preparação recebeu vários tratamentos, descritos abaixo.

Procedimento: Mn²⁺ (0,9 mM) ou BthTX-I (1,4 μM) foram adicionados à cuba contendo a preparação, a fim de se conhecer a curva da resposta contrátil, a porcentagem de bloqueio, a reversão e a proteção. Pré-tratamento com Mn²⁺ (0,9 mM) seguida pela adição de BthTX-I (1,4 μM) foram realizados para determinar a capacidade neutralizante do Mn²⁺.

Em todos os experimentos foi utilizada a concentração de 1,4 μM de BthTX-I e de 0,9 mM de Mn^{2+} . A escolha das concentrações foram baseadas em resultados anteriormente obtidos por OSHIMA-FRANCO et al. (2001).

3.4.2-*Extensor digitorum longus* (EDL)

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (300 mg/kg, i.p.) e após atingir o nível cirúrgico, uma ampla incisão foi realizada sobre a face ântero-lateral de uma das patas posteriores do animal, com exposição dos tendões dos músculos EDL e tibial, bem como este último músculo. Procedeu-se à secção dos tendões e à retirada do músculo tibial, com exposição total do músculo EDL (Figura 4). Este foi dissecado, desde sua inserção tendínea distal até a proximal.



Figura 4-Preparação *extensor digitorum longus* de camundongo. A seta ilustra o músculo EDL.

Durante o procedimento, a preparação foi mantida umedecida com solução nutritiva de Tyrode. Retirada a preparação, o músculo EDL foi colocado em uma cuba contendo 3,5 mL de solução nutritiva de Tyrode e mantido sob aeração constante com carbogênio, a 37°C. O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos elétricos supramaximais, foi realizado pelo transdutor isométrico Load Cell BG – 10 GM,

acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400 (Gould Inc., Cleveland, OHIO, USA).

O músculo foi submetido à tensão constante de 0,5 g/cm (por meio de um fio preso à porção tendinosa e ao transdutor isométrico) e à estimulação elétrica, através de pulsos gerados por estimulador S48F (Grass Instruments, Quincy, MASS., USA). Um eletrodo bipolar de platina foi colocado em torno da preparação que continha o tronco do nervo peroneal, suprimindo o músculo. A preparação foi submetida à estimulação elétrica indireta, com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, por um período de 20 minutos para estabilização. Findo este período a preparação recebeu vários tratamentos, conforme descrito no item 3.4.1.

3.4.2.1-Determinação de Creatinoquinase (CK)

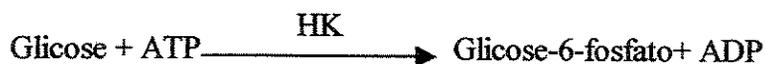
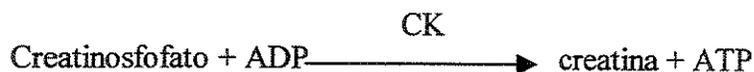
A contração de células musculares esqueléticas depende de ATP como fonte de energia, porém, o suplemento de ATP não é suficiente para sustentar a contração por um longo período de tempo. Então, para a célula estar ativa e manter a contração, o ATP precisa ser continuamente abastecido. Isto acontece pela metabolização da glicólise e pela ação do ciclo do ácido tricarboxílico. Enquanto o oxigênio está disponível, a célula muscular mantém uma elevada reserva de fosfato, na forma de creatinofosfato, composto rico em energia. A enzima que vai agir sobre o creatinofosfato é a CK, presente no citoplasma da célula muscular. Sua determinação é importante em alguns diagnósticos clínicos, em casos de danos tissulares, como nas distrofias musculares e infarto do miocárdio (NAKADA et al., 1984).

Neste estudo, a utilização da preparação EDL foi mais vantajosa do que a da NFD, por ser possível sua retirada de maneira integral, ao contrário da segunda, que, ao ser cortada ao meio (hemidiafragma), sofre lesão e conseqüente liberação de enzimas, como a CK.

Procedimento: Antes dos ensaios enzimáticos, as preparações sob estímulo indireto receberam os seguintes tratamentos: solução nutritiva de Tyrode (controle, 120 min) ou BthTX-I (1,4 μ M, 120 min) ou Mn^{2+} (0,9 mM, 120 min) ou Mn^{2+} (0,9 mM, 60 min) seguido da adição de BthTX-I (1,4 μ M, 60 min). Alíquotas de 100 μ L foram retiradas

do banho nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, com reposição de igual volume de solução nutritiva de Tyrode. As alíquotas foram mantidas a 4°C até o momento da dosagem enzimática, e então analisadas utilizando-se o Kit comercial Randox® 335 (CK-NAC – método cinético, Inglaterra – Reino Unido), para determinação da atividade enzimática, conforme orientações do fabricante.

Princípio:



A formação de NADPH é determinada fotometricamente e é diretamente proporcional à atividade de CK na amostra. O valor de CK foi expresso em unidades por litro (U/L).

ADP= Adenosina difosfato; ATP= Adenosina trifosfato; CK= ATP: creatino-N-fosfotransferase, EC 2.7.3.2; HK= ATP: D-hexose-6-fosfotransferase, EC 2.7.1.1; NADP⁺= Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH= Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida.

3.4.3-Técnica histológica (microscopia óptica)

3.4.3.1-Determinação da área lesada das fibras musculares

Para se avaliar a miotoxicidade de um componente de veneno, tem-se utilizado exame histológico do tecido muscular, em associação a métodos com a determinação de níveis de CK (MEBS e OWNBY, 1990).

As preparações nervo frênico-diafragma e *extensor digitorum longus* incubadas com – Solução nutritiva de Tyrode (controle) ou BthTX-I (1,4 μ M) ou Mn^{2+} (0,9 mM) ou Mn^{2+} (0,9 mM) seguido da adição de BthTX-I (1,4 μ M), foram fixadas em solução de Bouin, após o término do experimento (120 minutos) e processada para posterior análise histológica. Após fixação, os músculos foram desidratados e incluídos em historesina Leika (NuBloch/Heidelberg, Alemanha); em seguida, foram confeccionados os blocos. Estes foram cortados em micrótomo Leika RM 2035 e as secções (2 μ m de espessura) foram montadas em lâminas e coradas com uma mistura de azul de toluidina 0,5% (Vetec, São Paulo) e Borax 5% (Quimesp, São Paulo). O dano morfológico (índice de mionecrose) foi quantificado pela contagem do número de células lesadas e expresso como porcentagem do número total de células em seis áreas não superpostas, não adjacentes de cada músculo (índice de mionecrose = [(número de células lesadas : número total de células) X 100]. Foram consideradas células lesadas as que apresentavam alterações como: regiões da fibra muscular lesada na sua extensão, mionecroses caracterizadas por vacúolos, aglutinação condensada de miofibrilas, fibras sem estriações e intumescidas e perda de material nuclear; as células normais apresentavam-se íntegras, sem nenhum comprometimento no mecanismo contrátil, pelo parâmetro miográfico, fibras com estriações, perfil poligonal das células e núcleo periférico. Este procedimento foi usado em todos os experimentos-controle e preparações tratadas nos dois músculos estudados.

3.4.3.2-Determinação da área transversal das fibras musculares

Para quantificar a área transversal das fibras musculares do diafragma e EDL foram analisadas as mesmas lâminas confeccionadas no item 3.4.3.1. As lâminas com cortes transversais dos músculos foram examinadas em microscópio Nikon Eclipse E8000 e as imagens foram capturadas pelo sistema de imagem digital (CoolSnap-Pro Color, Media Cybernetics, USA) para posterior determinação da área transversal das fibras musculares.

A determinação da área transversal das fibras musculares foi quantificada pela contagem da área de 25 fibras/animal em áreas não superpostas, não adjacentes à área de cada fibra, sendo cinco animais por tratamento. As medidas morfométricas foram realizadas em um microcomputador carregado com o software Image Pro Plus, capaz de

digitalizar o contorno das áreas e gravá-los para posterior análise. Este procedimento foi usado em todos os experimentos-controle e preparações tratadas nos dois músculos estudados.

3.5-ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

O registro do potencial de placa terminal (PPT) foi feito em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (obtida conforme descrito no item 3.4.1.). Foi eleita a preparação NFD devido às suas características estruturais, como: músculo delgado, o que facilita o empalamento do microeletrodo e possui região de placa terminal bem definida quando comparada ao músculo EDL.

A preparação com sua face torácica voltada para cima (hemidiafragma esquerdo), foi fixada, horizontalmente, por meio de alfinetes entomológicos, em cuba revestida de resina e silicone, (“Dow Corning-Sylgard”). A cuba foi preenchida com 2 mL de solução de Tyrode de composição já descrita e a preparação mantida a temperatura ambiente e areada com o borbulhamento de carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Para a observação dos parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina de microscópio estereoscópico (Wild M7 S-Switzerland) com capacidade para aumento de até 40 vezes.

Foi usada a técnica convencional de registro com microeletrodo (FATT e KATZ, 1951). Os microeletrodos de vidro, preparados com o auxílio do Vertical Pipete Puller (modelo 700 D-David Kopf Instruments; CA, USA), foram preenchidos com KCl 3 M, tendo uma resistência entre 15-25 MΩ. As micropipetas foram introduzidas intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador Leitz. O eletrodo indiferente constitui-se de um fio de platina. Os biopotenciais foram obtidos através de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram feitos em um microcomputador (Microtec, São Paulo, SP) carregado com um software para aquisição de dados (AqDADOS, Lynx, São Paulo, SP). O computador munido de uma placa conversora A/D é capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise.

3.5.1-Registro do potencial de placa terminal (PPT)

3.5.1.1-Desacoplamento excitação-contração

Para o registro dos potenciais de placa terminal torna-se necessário evitar a deflagração de potenciais de ação quando o nervo motor for estimulado para gerar o potencial de placa terminal. Para tanto submeteu-se a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo ao tratamento com solução hipertônica de glicerol.

Tal procedimento consiste em incubar a preparação por um período de cerca de 1 hora em solução nutriente tornada hipertônica (500 a 700 milimoles/L) pela adição de glicerol e posteriormente retornar a mesma à solução nutriente isotônica. Com isso ocorre um colapso do sistema de túbulos "T", com a conseqüente interrupção do acoplamento excitação-contração muscular (GAGE e EISENBERG, 1969). Este tratamento também causa queda do potencial de membrana celular, de forma que muitas células apresentam um potencial de membrana sob o qual não é possível deflagrar uma corrente degenerativa de sódio (KORDAS, 1969), assegurando assim, o registro de PsPT isentos de potenciais de ação. Os registros dos PsPT foram feitos em resposta à estimulação elétrica (supramaximal). Para tal, utilizou-se estimulação elétrica indireta por meio de eletrodo de platina posicionado de modo a sugar o coto distal do nervo frênico (1Hz por 1 min). Da mesma forma que nos outros experimentos eletrofisiológicos, o sinal passa por um amplificador (Getting Microelectrode Amplifier Model 5, MA, USA) sendo então captado pelo osciloscópio e registrado em computador.

3.5.1.2-Análise dos PsPT

3.5.1.2.1-Tamanho quântico (TQ)

O tamanho quântico corresponde à despolarização promovida por um "quantum" de acetilcolina, um quantum é definido como a quantidade de acetilcolina contida numa vesícula sináptica (HUBBARD et al., 1969).

No presente trabalho o tamanho quântico foi estimado pelo método da variância (HUBBARD et al., 1969). Este método pressupõe que numa salva de PsPT gerados a uma determinada freqüência, o número de unidades quânticas que integra cada PPT varia, de PPT a PPT, segundo o processo estatístico de Poisson (MIYAMOTO, 1975). Neste caso o

quociente entre a variância e a média das amplitudes dos PsPT fornece uma estimativa do tamanho quântico (ELMQVIST e QUASTEL, 1965). Este corresponde então à “despolarização unitária” ou “despolarização quântica”, ou seja, aquela unidade da qual o PPT é um múltiplo inteiro.

Desta forma, o tamanho quântico, como calculado neste trabalho, é uma maneira indireta de se obter a mesma informação que é fornecida de maneira direta pela medida dos potenciais de placa terminal em miniatura.

No presente trabalho foram utilizados, para o cálculo do tamanho quântico, de 30 a 60 PsPT gerados a 1 Hz. Em cada tempo três séries de 1 min de PsPT em diferentes placas foram registradas em cada preparação fazendo-se a média aritmética desses três registros.

3.5.1.2.2-Conteúdo quântico (CQ)

O conteúdo quântico do PPT, como o próprio nome indica, corresponde ao número de “unidades quânticas” cujo somatório deu origem a esse PPT. No caso do presente trabalho, o “tamanho quântico” é a estimativa daquele valor unitário. Assim, uma vez obtido numa dada célula, esse tamanho quântico, o conteúdo quântico do PPT corresponde ao quociente entre a sua amplitude e o tamanho quântico.

Os cálculos relativos ao tamanho quântico e o conteúdo quântico dos PsPT foram realizados após a correção dos PsPT para a somação não-linear de quanta, de acordo com a seguinte fórmula (ELMQVIST e QUASTEL, 1965).

$$PPT' = [(PPT \times (PM - PE)) / (PM - PE - PPT)]$$

Onde:

PPT' = PPT corrigido

PPT = PPT observado

PE = potencial de equilíbrio, que foi considerado -5mV (MIYAMOTO, 1975)

PM = potencial de membrana

Para permitir a comparação entre células de variáveis que dependem do potencial de membrana, como a amplitude dos PsPT e o tamanho quântico, estes foram corrigidos para um potencial de membrana padrão de -65 mV.

3.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não-pareado “*t*-Student”, com valor $p < 0,05$, considerado como significativo.

4-RESULTADOS

4.1-ESTUDO MIOGRÁFICO

4.1.1-Preparação nervo frênico-diafragma (NFD)

4.1.1.1-Ensaio miográficos com íons manganês e BthTX-I

Observe-se o controle Tyrode nas Figs. 5A e 5B (n=8), com total manutenção da resposta basal ao longo de 120 min.

Adotou-se a concentração de 0,9 mM de Mn^{2+} baseada em resultados anteriormente obtidos por OSHIMA-FRANCO (2001). Essa concentração aboliu completamente em torno de 10 minutos a contração muscular evocada pela estimulação indireta do nervo (n=13, Figura 5A). No entanto, a reversão espontânea foi constante e homogênea ao longo dos 120 min.

A concentração de 1,4 μM de BthTX-I foi definida em função do efeito bloqueador exercido, ideal para se contrapor à ação do Mn^{2+} (OSHIMA-FRANCO, 2001). Observou-se bloqueio irreversível da junção neuromuscular (Figura 5A), sendo que em dois experimentos de seis realizados, foi observada uma discreta contratura logo após a adição da toxina ao banho. O tempo para um bloqueio de 50% foi de $32,8 \pm 3,3$ min (n=6).

O pré-tratamento com Mn^{2+} (0,9 mM), como esperado, aboliu a resposta contrátil com posterior reversão espontânea. Após 60 min foi adicionada a BthTX-I (1,4 μM) por mais 60 min, totalizando 120 min de experimento. A resposta bloqueadora característica da BthTX-I não se manifestou (Figura 5B).

A Fig. 6 representa registros típicos dos efeitos mais representativos do controle Tyrode (A), Mn^{2+} (B), BthTX-I (C) e pré-tratamento com Mn^{2+} seguido da adição de BthTX-I (D) nas preparações NFD. Na Fig. 6D após a lavagem da preparação, observou-se o retorno na amplitude da força de contração muscular, $97 \pm 5,7\%$ (n=7) em relação à amplitude inicial, evidenciando a ação protetora do Mn^{2+} .

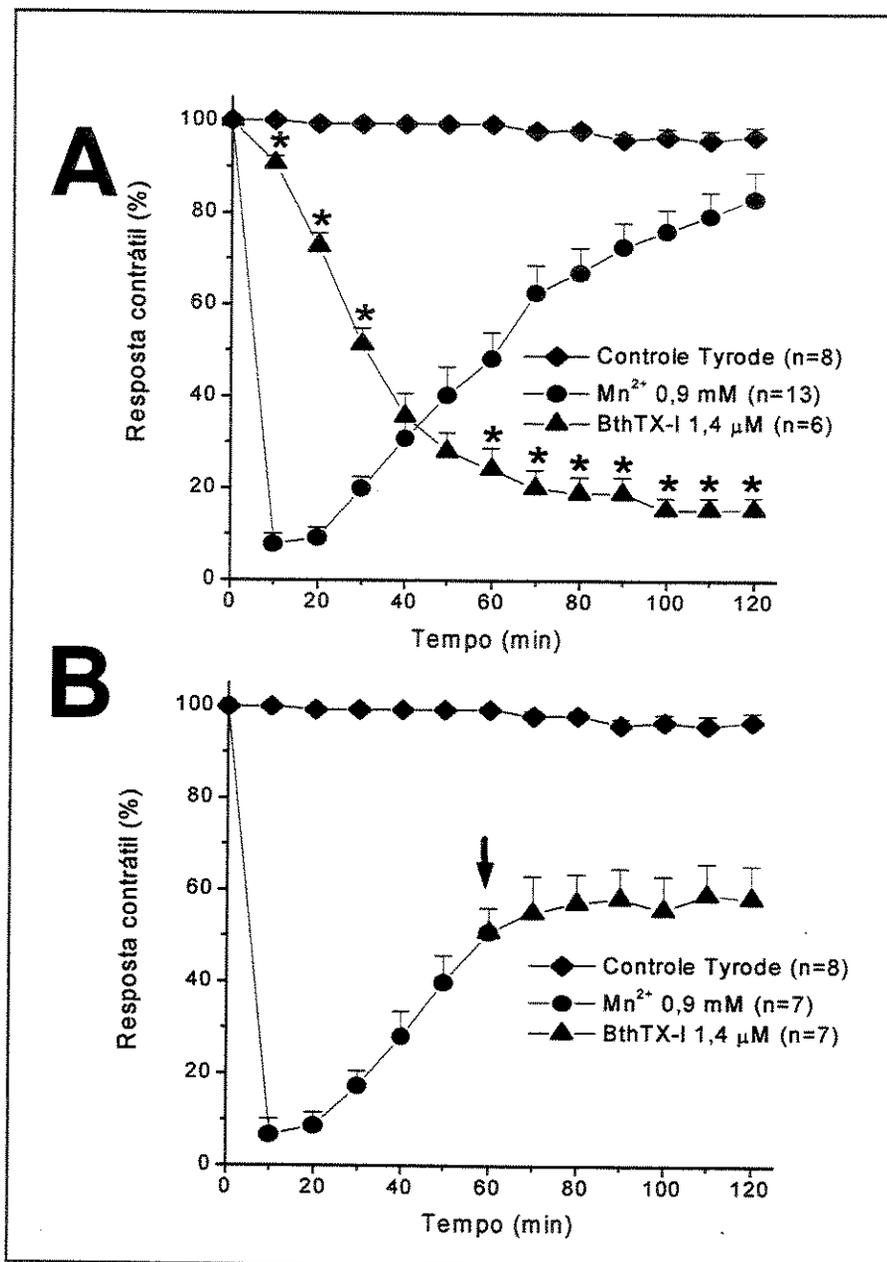


Figura 5-Curva da resposta contrátil da preparação neuromuscular NFD, sob estimulação elétrica indireta, após a adição de Mn²⁺ (0,9 mM) e da BthTX-I (1,4 μM) (A). Preparações neuromusculares tratadas com Mn²⁺ e posterior adição de BthTX-I (B). Note-se a proteção exercida pelo Mn²⁺ sobre o característico bloqueio neuromuscular induzido pela toxina. Os pontos representam a média ± erro padrão da média. **p*<0,05 (“*t-Student*”) em relação ao Mn²⁺ (0,9 mM). Seta: momento da adição de BthTX-I (1,4 μM).

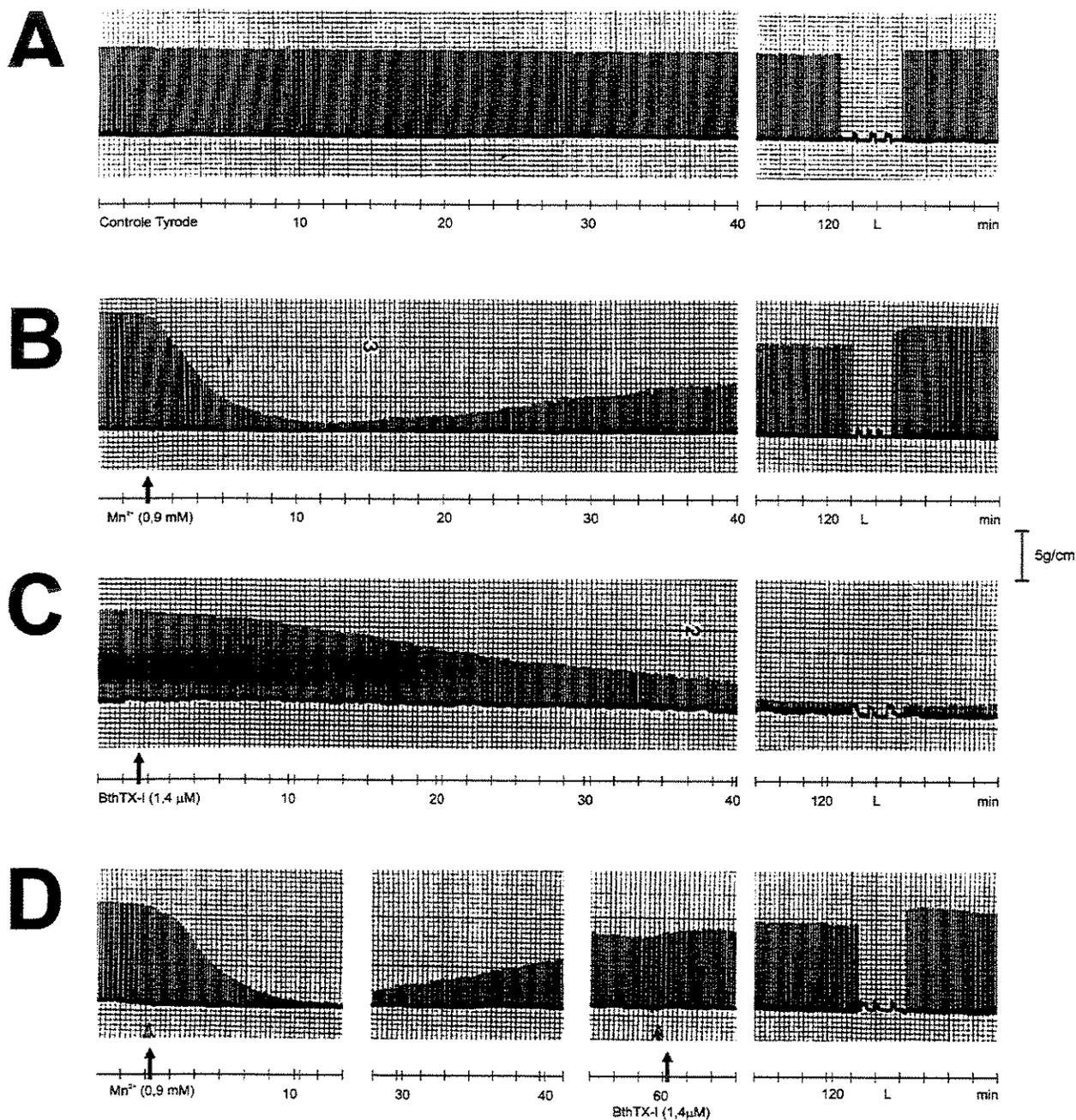


Figura 6-Registros da força de contração muscular de preparações NFD (estímulo elétrico indireto) expostas à solução de Tyrode (controle) (A); tratadas com Mn^{2+} (B), com bloqueio seguido pela reversão espontânea da resposta contrátil; tratadas com BthTX-I (C), com bloqueio irreversível, mesmo após a lavagem da preparação; e tratadas com Mn^{2+} seguido da adição de BthTX-I (D), onde o Mn^{2+} impediu o característico bloqueio neuromuscular determinado pela toxina. A condição pós-lavagem confirma tal proteção. L, lavagem. Setas: momentos da adição das substâncias.

A hipótese de que a BthTX-I em presença do Mn^{2+} pudesse ligar-se estavelmente a ele, mesmo após a lavagem, foi descartada quando misturas de BthTX-I ($1,4 \mu M$): Mn^{2+} ($0,9 \text{ mM}$) foram previamente incubadas por 30 min a $37^\circ C$. A sua adição à preparação resultou em um rápido e total bloqueio neuromuscular, antecipando o inicial efeito bloqueador exercido pelo Mn^{2+} , não houve reversão espontânea deste íon e após a lavagem (considerando que todo o íon foi removido) houve um retorno da amplitude da contração muscular ($80,4 \pm 8,5\%$, $n=3$) seguido do característico bloqueio neuromuscular irreversível da BthTX-I ($11,8 \pm 6,8\%$, $n=3$) (Figura 7).

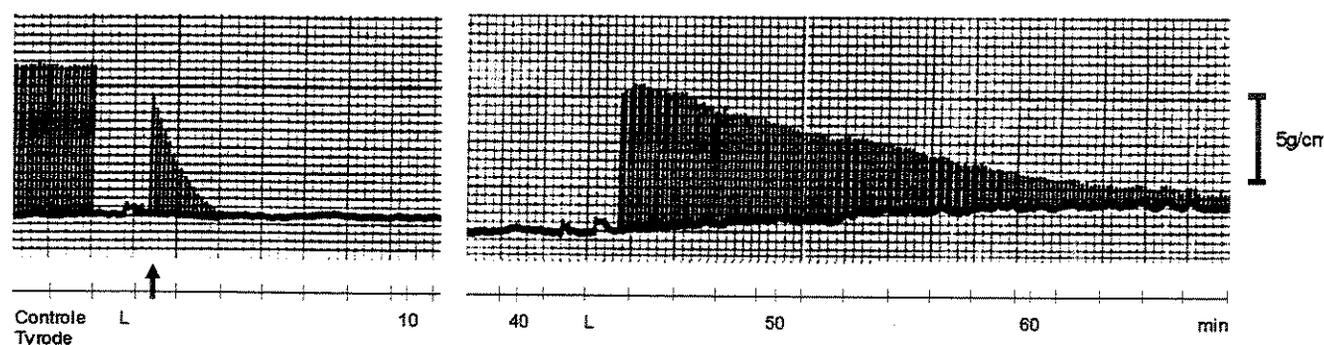


Figura 7-Registro da força de contração muscular de ensaio com Mn^{2+} e BthTX-I.

Preparação nervo frênico-diafragma (estímulo elétrico indireto) exposta à mistura de BthTX-I ($1,4 \mu M$): Mn^{2+} ($0,9 \text{ mM}$) previamente incubadas por 30 min a $37^\circ C$. Note-se o rápido e mantido bloqueio neuromuscular e após a lavagem o retorno da amplitude da contração muscular seguido do característico bloqueio neuromuscular irreversível da BthTX-I. L, lavagem. Seta: momento da adição da mistura de BthTX-I ($1,4 \mu M$): Mn^{2+} ($0,9 \text{ mM}$).

4.1.2-Preparação *extensor digitorum longus* (EDL)

4.1.2.1-Ensaio miográficos com íons manganês e BthTX-I

Observe-se o controle Tyrode nas Figs. 8A e 8B ($n=6$), sem alteração da resposta basal ao longo de 120 min.

Foram ensaiadas doses de 0,9, 1,8 e 2,7 mM de manganês, com o propósito de encontrar uma concentração que produzisse efeitos semelhantes causados na preparação

NFD, mas a resposta desta preparação frente ao Mn^{2+} foi totalmente diferente, não sendo possível produzir o mesmo efeito. As concentrações ensaiadas de manganês não produziram diferenças significativas (resultados não mostrados). Então, adotou-se a mesma concentração de 0,9 mM de Mn^{2+} usada na preparação NFD. Essa concentração induziu um bloqueio parcial mantido ao longo dos 120 min (Figura 8A).

Assim como na preparação NFD, adotou-se a concentração de 1,4 μ M de BthTX-I. Observou-se bloqueio irreversível da junção neuromuscular (Figura 8A), e em quatro experimentos de 11 realizados, foi observada uma discreta contratura logo após a adição da toxina ao banho. O tempo para um bloqueio de 50% foi de $32,9 \pm 3,2$ min ($n=11$).

O pré-tratamento com Mn^{2+} (0,9 mM), como esperado, induziu um bloqueio parcial mantido, transcorridos 60 min foi adicionada a BthTX-I (1,4 μ M) por mais 60 min, totalizando 120 min de experimento. A resposta bloqueadora característica da BthTX-I não se manifestou (Figura 8B).

A Fig. 9 representa registros típicos dos efeitos mais representativos do controle Tyrode (A), Mn^{2+} (B), BthTX-I (C) e pré-tratamento com Mn^{2+} seguido da adição de BthTX-I (D) nas preparações. No registro miográfico do Mn^{2+} (B), após a lavagem da preparação a amplitude da contração muscular retornou $79,9 \pm 4,9\%$ ($n=19$) em relação à amplitude inicial.

O pré-tratamento das preparações com Mn^{2+} preveniu significativamente ($p<0,05$) o bloqueio característico induzido pela BthTX-I, o qual foi confirmado após a lavagem, pela amplitude obtida de $78,8 \pm 6,9\%$ ($n=11$), evidenciando a ação protetora do Mn^{2+} (Figura 9D).

Comparando-se as preparações NFD e EDL tratadas com BthTX-I não houve diferença significativa no tempo para um bloqueio neuromuscular de 50% (Tabela 2).

Tabela 2-Tempo de bloqueio neuromuscular entre as preparações

Toxina	Tempo para 50% de bloqueio (min)	
	Preparação NFD	Preparação EDL
BthTX-I 1,4 μM	32,8 \pm 3,3 (n=6)	32,9 \pm 3,2 (n=11)

Os resultados estão expressos pela média de experimentos \pm erro padrão da média.

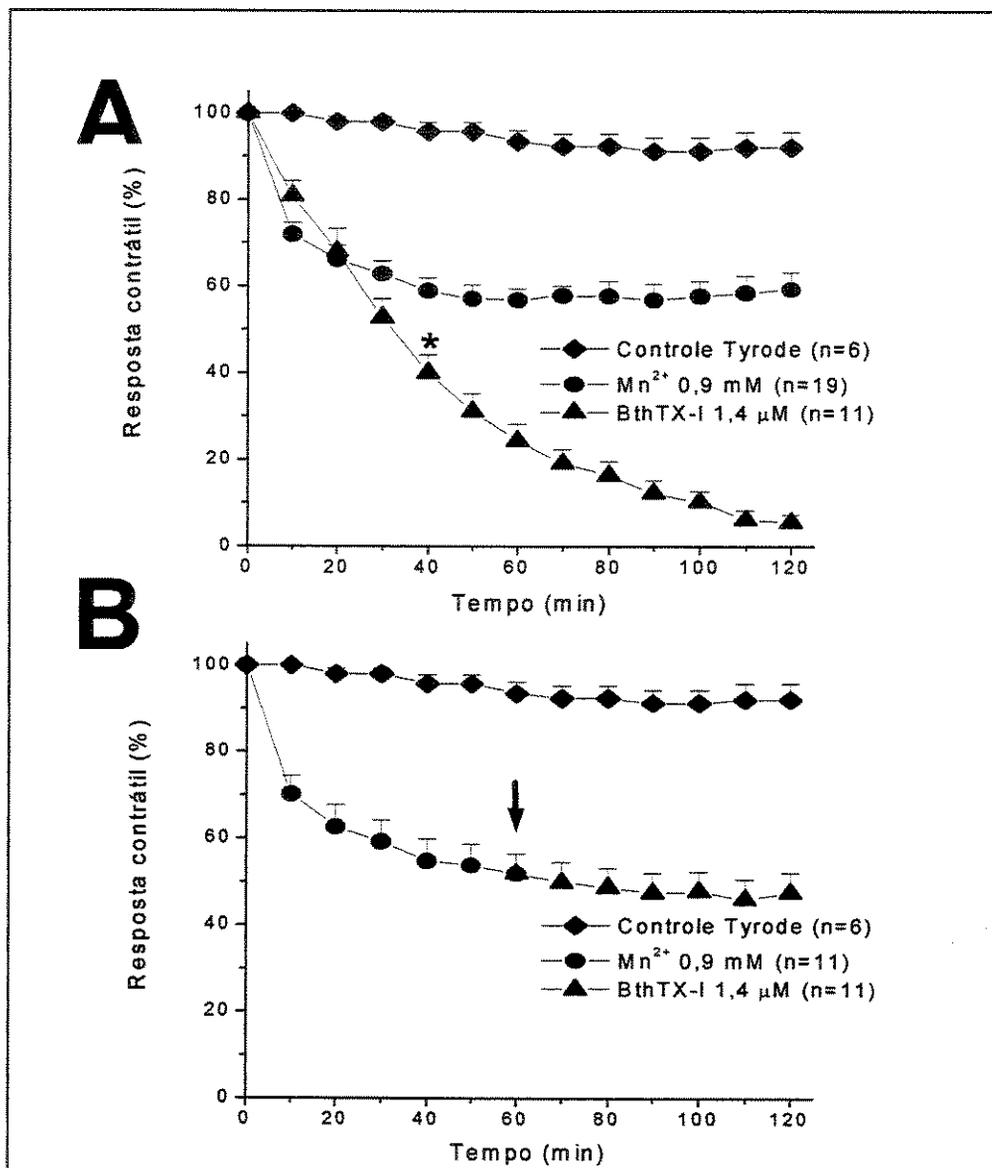


Figura 8-Curva da resposta contrátil da preparação neuromuscular EDL, sob estimulação elétrica indireta, após a adição de Mn²⁺ (0,9 mM) ou BthTX-I (1,4 μM) (A). Preparações tratadas com Mn²⁺ e posterior adição de BthTX-I (B). Observe-se a proteção exercida pelo Mn²⁺ que impede o característico bloqueio neuromuscular induzido pela BthTX-I. Os pontos representam a média ± erro padrão da média. **p*<0,05 (“*t-Student*”), no ponto indicado e nos demais tempos subsequentes, em relação ao Mn²⁺ (0,9 mM). Seta: momento da adição de BthTX-I (1,4 μM).

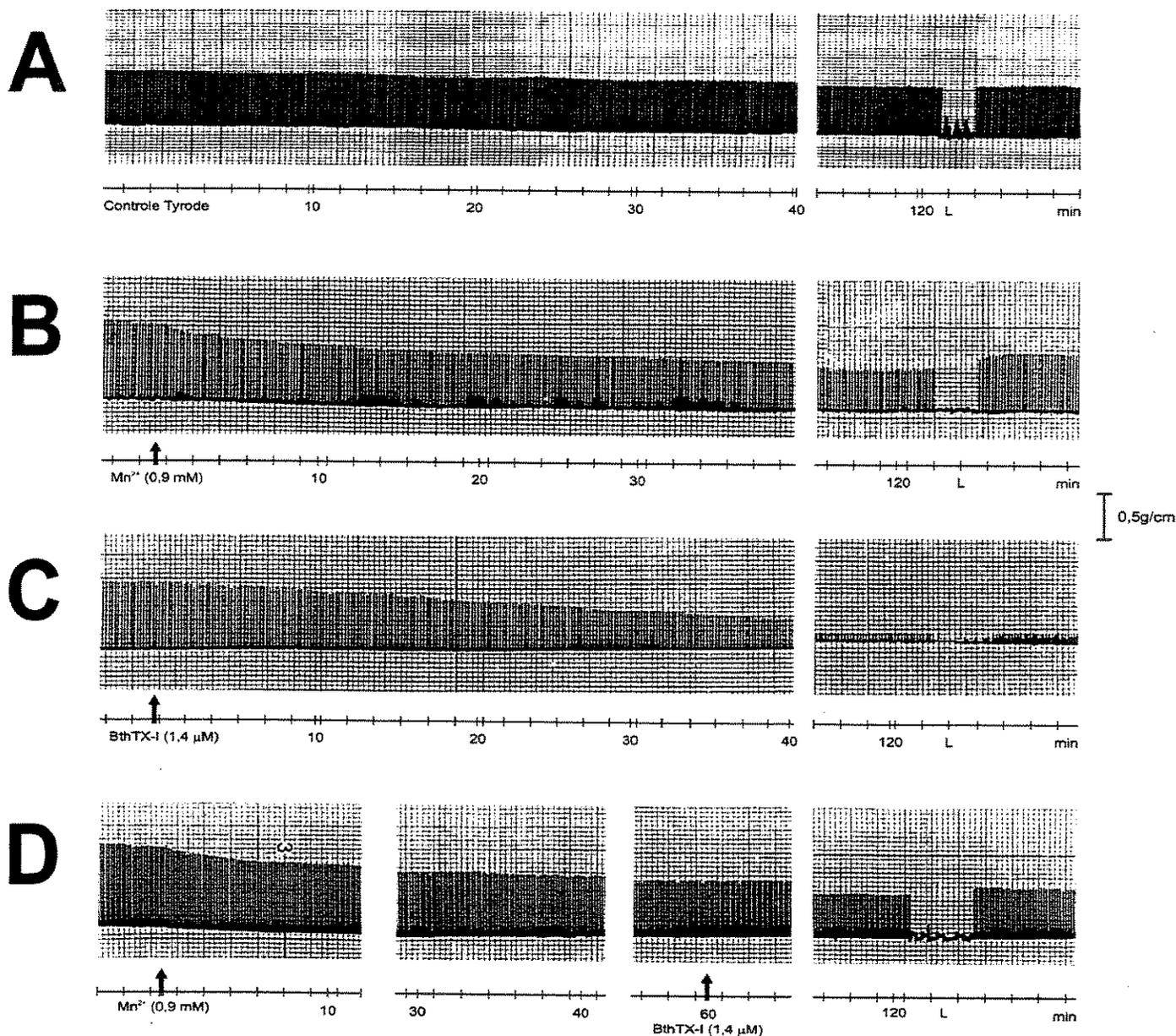


Figura 9-Registros da força de contração muscular de preparações EDL (estímulo elétrico indireto) expostas à solução de Tyrode (controle) (A); tratadas com Mn^{2+} (B), com bloqueio parcial mantido ao longo dos 120 min; tratadas com BthTX-I (C), com bloqueio irreversível, mesmo após várias lavagens da preparação; e tratadas com Mn^{2+} seguido da adição de BthTX-I (D), este íon impediu o característico bloqueio neuromuscular promovido pela toxina. A condição pós-lavagem confirma tal proteção. L, lavagem.

4.2-MIOTOXICIDADE

Na aplicação da técnica histológica (microscopia óptica) dois parâmetros morfométricos foram avaliados, a quantidade de fibras lesadas e a medida da área transversal das fibras musculares de preparações NFD e EDL, resultantes da técnica miográfica.

4.2.1-Preparação nervo frênico-diafragma (NFD)

O músculo diafragma normal (sem nenhum tratamento) foi analisado após 120 min de incubação em solução nutritiva de Tyrode e submetido a estímulos elétricos indiretos. As fibras musculares em ambos os cortes transversal e longitudinal do diafragma mostraram-se íntegras, exibindo estriação transversal e fibras com núcleos periféricos localizados abaixo do sarcolema (Figuras 10A e 10B).

As preparações incubadas com Mn^{2+} (0,9 mM) mostraram-se também em ambos os cortes transversal e longitudinal, fibras musculares com aparência normal muito semelhante às fibras controle (Figuras 10C e 10D).

Preparações incubadas com BthTX-I (1,4 μ M) revelaram que a toxina têm alto poder miotóxico, levando as fibras a apresentarem diferentes estágios patológicos dentro do processo mionecrótico, culminando com aglutinação das miofibrilas e/ou sua desintegração (Figuras 11A e 11B). A pré-incubação com Mn^{2+} (0,9 mM, 60 min) seguido da adição de BthTX-I (1,4 μ M, 60 min) protegeu parcialmente ($40 \pm 4,5\%$, $n=10$) o aparecimento das alterações mionecróticas (Figuras 11C e 11D).

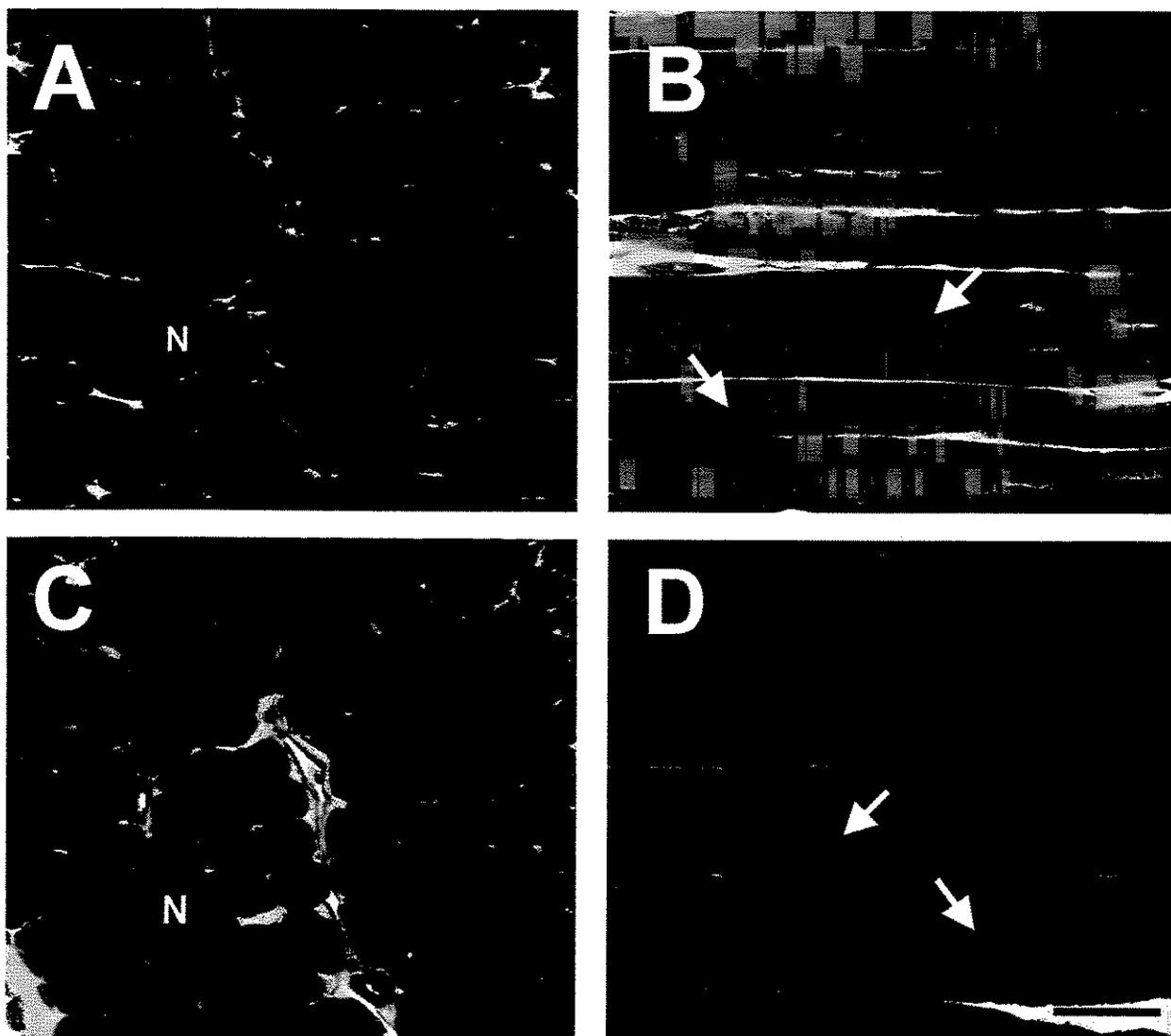


Figura 10-Morfologia do músculo diafragma incubado com solução de Tyrode (controle) e Mn^{2+} (0,9 mM). Após 120 min de estimulação elétrica indireta, preparações incubadas com solução de Tyrode (controle) (A e B), e com Mn^{2+} 0,9 mM (C e D). As fibras musculares em cortes transversal e longitudinal, em ambos os tratamentos, mostram-se íntegras. Os núcleos (N) encontram-se localizados periféricamente, estriações estão presentes (flechas) e há preservação do perfil poligonal das células. Barra = 50 μm (A – D).

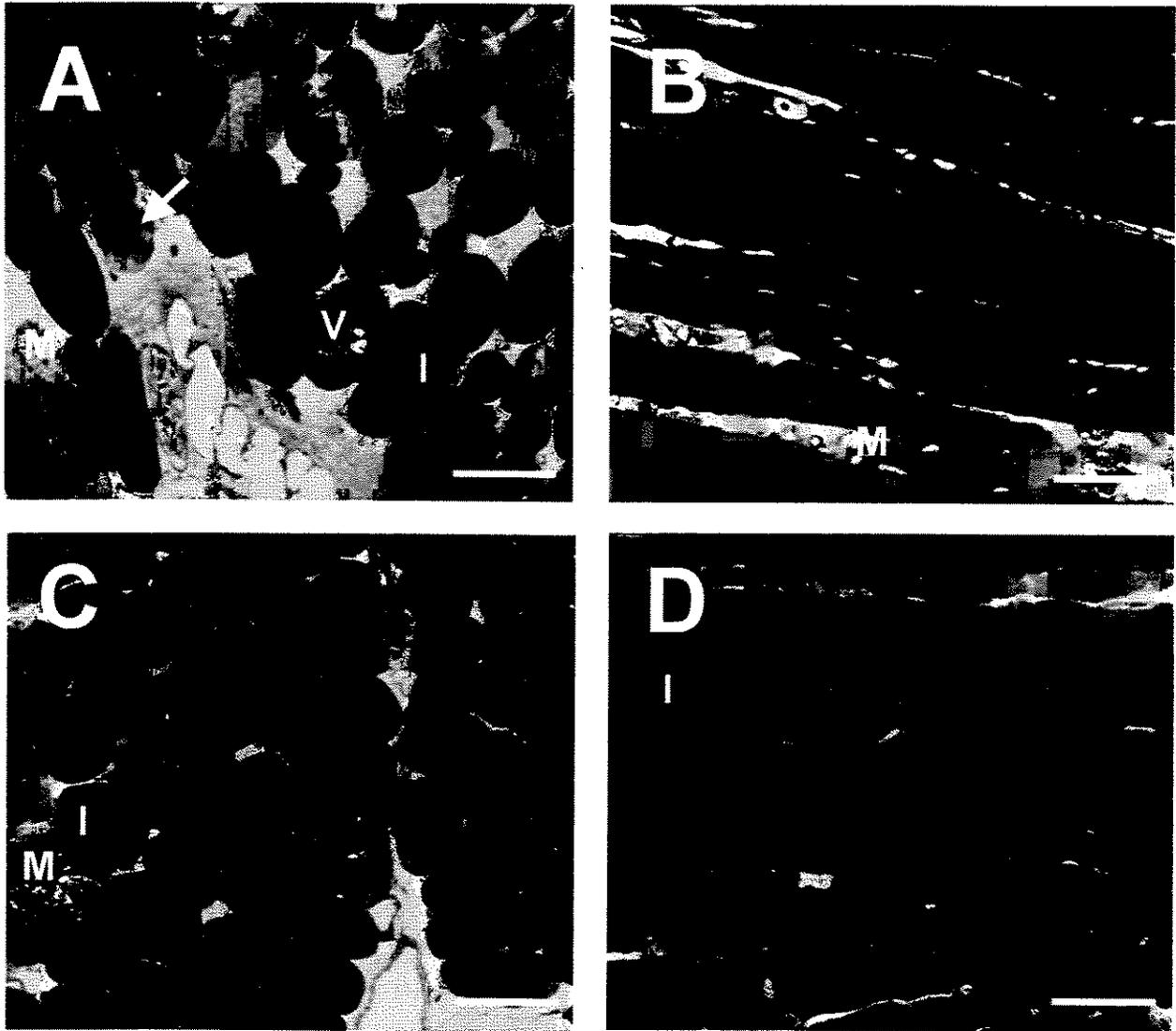


Figura 11-Morfologia do músculo diafragma incubado com BthTX-I (1,4 μ M) e pré-tratado com Mn^{2+} (0,9 mM). Preparações incubadas com BthTX-I (1,4 μ M, 120 min) (A e B) exibiram áreas de intensa mionecrose (M). Note-se fibras com vacúolos (V), aglutinação condensada de miofibrilas (flechas) e fibras sem estriações e intumescidas (I). A pré-incubação com o Mn^{2+} (C e D) protegeu parcialmente o aparecimento das alterações mionecróticas ($p < 0,05$, quando comparado a BthTX-I). Barra = 50 μ m (A – D).

4.2.2-Preparação *extensor digitorum longus* (EDL)

A preparação EDL normal (sem nenhum tratamento) foi analisada após 120 min de incubação em solução de Tyrode e submetida à estimulação elétrica indireta. Observam-se fibras musculares com aparência normal, fibras com estriações, núcleos periféricos e preservação da disposição poligonal das células em ambos os cortes transversal e longitudinal (Figuras 12A e 12B).

As preparações incubadas com Mn^{2+} (0,9 mM) mostraram fibras musculares morfológicamente normais comparadas ao controle em ambos os cortes transversal e longitudinal (Figuras 12C e 12D).

A BthTX-I (1,4 μ M) após 120 min de incubação lesou significativamente as fibras musculares e ilustrou os diferentes estágios patológicos dentro do processo mionecrótico, condensação de miofibrilas até o desaparecimento de fibras (Figuras 13A e 13B)

O pré-tratamento com o Mn^{2+} (0,9 mM) seguido da adição de BthTX-I(1,4 μ M, 60 min) reduziu parcialmente ($39,7 \pm 2,9\%$, $n=6$) a extensão do dano muscular (Figuras 13C e 13D).

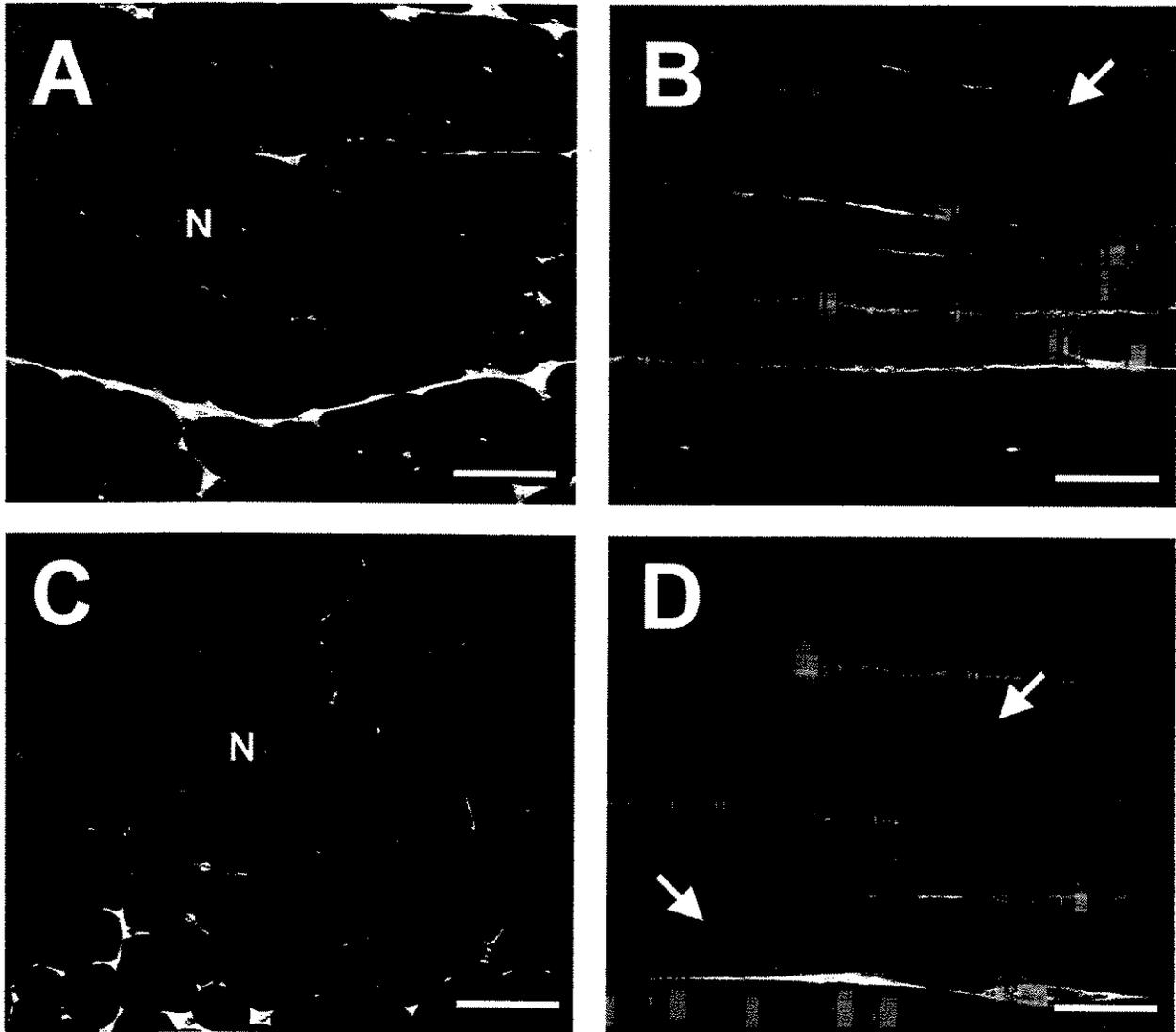


Figura 12-Morfologia do músculo EDL incubado com solução de Tyrode (controle) e Mn^{2+} (0,9 mM). Após 120 min de estimulação elétrica indireta, preparações incubadas com solução de Tyrode (controle) (A e B), e com Mn^{2+} 0,9 mM (C e D). As fibras musculares, em ambos os tratamentos, mostram-se íntegras em cortes transversal e longitudinal. Os núcleos (N) encontram-se localizados na periferia, estão presentes fibras com estriações (flechas) e arranjo poligonal das células. Barra = 50 μ m (A – D).

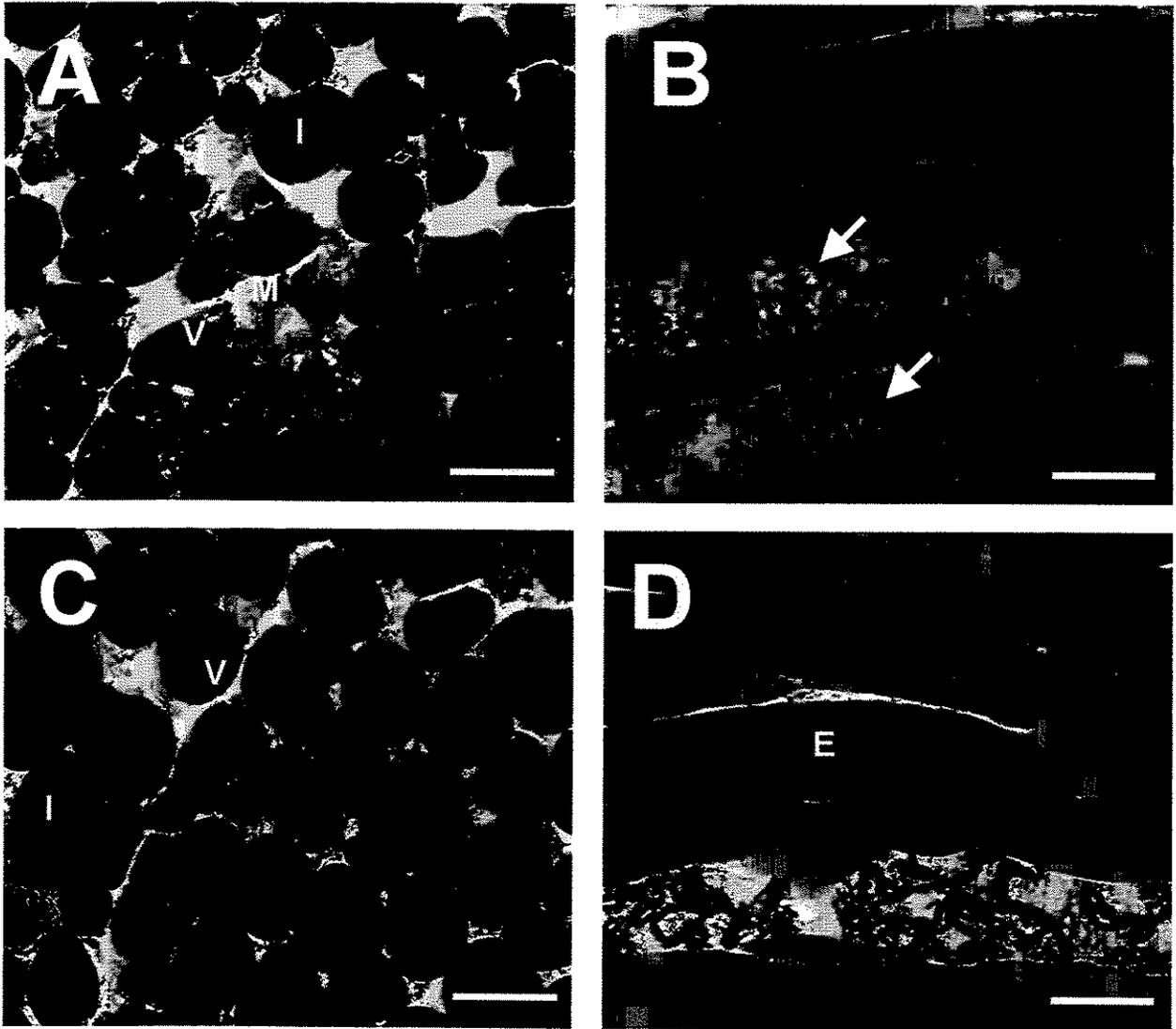


Figura 13-Morfologia do músculo EDL incubado com BthTX-I (1,4 μ M) e pré-tratado com Mn^{2+} (0,9 mM). As preparações incubadas com BthTX-I (1,4 μ M, 120 min) (A e B) apresentaram áreas de intensa mionecrose (M). Observem-se fibras com vacúolos (V), fibras intumescidas (I) e aglutinação condensada de miofibrilas (flechas). A pré-incubação com o Mn^{2+} (C e D) protegeu parcialmente o aparecimento das alterações mionecróticas, apresentando algumas fibras com estriações (E) ($p < 0,05$, quando comparado à BthTX-I). Barra = 50 μ m (A – D).

4.2.3-Análise morfométrica em músculo diafragma

Os músculos foram analisados após 120 min de incubação em solução nutritiva de Tyrode e não apresentaram nenhuma lesão muscular (Figura 14) e a área transversal foi de $1.887 \pm 93,2 \mu\text{m}^2$ (n=5) (Figura 15).

As preparações incubadas com Mn^{2+} (0,9 mM) revelaram apenas $1,7 \pm 1,2\%$ (n=6) de fibras lesadas (Figura 14) e a área transversal observada foi de $2.907 \pm 102,6 \mu\text{m}^2$ (n=5, $p < 0,05$, quando comparado ao controle Tyrode) (Figura 15).

Após 120 min de incubação com BthTX-I, na dose de $1,4 \mu\text{M}$, o músculo diafragma apresentou áreas de intensa mionecrose, que afetou $82 \pm 3,1\%$ (n=11) e a área transversal observada foi de $3.885 \pm 141 \mu\text{m}^2$ (n=5), ambos os resultados foram significativamente diferentes quando comparados ao controle Tyrode e ao Mn^{2+} (0,9 mM) (Figuras 14 e 15). Quanto à determinação da área transversal das fibras das preparações incubadas com Mn^{2+} ou com BthTX-I mostrou que o músculo diafragma é mais sensível do que o músculo EDL (Figura 15). As preparações incubadas com Mn^{2+} (0,9 mM, 60 min) seguido da adição de BthTX-I ($1,4 \mu\text{M}$, 60 min) revelaram que o pré-tratamento com o Mn^{2+} diminuiu em $40 \pm 4,5\%$ (n=10) o número de fibras lesadas assim como diminuiu também em $20 \pm 3,5\%$ (n=5) a medida da área transversal das fibras musculares observadas, ambos os resultados foram significativamente diferentes quando comparados a valores de preparações incubadas com BthTX-I (Figuras 14 e 15).

4.2.4-Análise morfométrica em músculo EDL

As preparações analisadas após 120 min de incubação em solução de Tyrode não apresentaram lesão muscular (Figura 14) e a área transversal das fibras observadas foi de $940 \pm 37 \mu\text{m}^2$ (Figura 15).

As preparações incubadas com Mn^{2+} (0,9 mM) apresentaram apenas $8,2 \pm 1,1\%$ (n= 6) de fibras lesadas ($p < 0,05$, quando comparado ao controle Tyrode) (Figura 14) e a área transversal das fibras musculares observadas foi de $993,6 \pm 34,8 \mu\text{m}^2$ (n=5) (Figura 15).

A BthTX-I (1,4 μM) após 120 min de incubação lesou $68,5 \pm 2,9\%$ ($n=6$) (Figura 14) e a área transversal observada foi de $1.573,8 \pm 58 \mu\text{m}^2$ ($n=5$) (Figura 15), ambos os resultados são significativamente diferentes quando comparados ao controle Tyrode e ao Mn^{2+} (0,9 mM). Em relação ao número de fibras lesadas o músculo diafragma é mais sensível à toxina do que o músculo EDL ($p<0,05$).

As preparações incubadas com Mn^{2+} (0,9 mM, 60 min) seguido da adição de BthTX-I (1,4 μM , 60 min) apresentaram área transversal das fibras musculares de $1.346,17 \pm 3,5 \mu\text{m}^2$ ($n=5$, $p<0,05$ quando comparado ao controle Tyrode e ao Mn^{2+}). A análise morfométrica demonstrou que o Mn^{2+} diminuiu em $39,7 \pm 2,9\%$ ($n=6$) o número de fibras alteradas (Figura 14) e preservou em $14,3 \pm 3,5\%$ ($n=5$) a área transversal (Figura 15), ambos os resultados são significativamente diferentes quando comparados à toxina. A proteção exercida pelo Mn^{2+} contra o número de fibras alteradas pela BthTX-I no músculo EDL não apresentou diferença significativa em relação ao músculo diafragma.

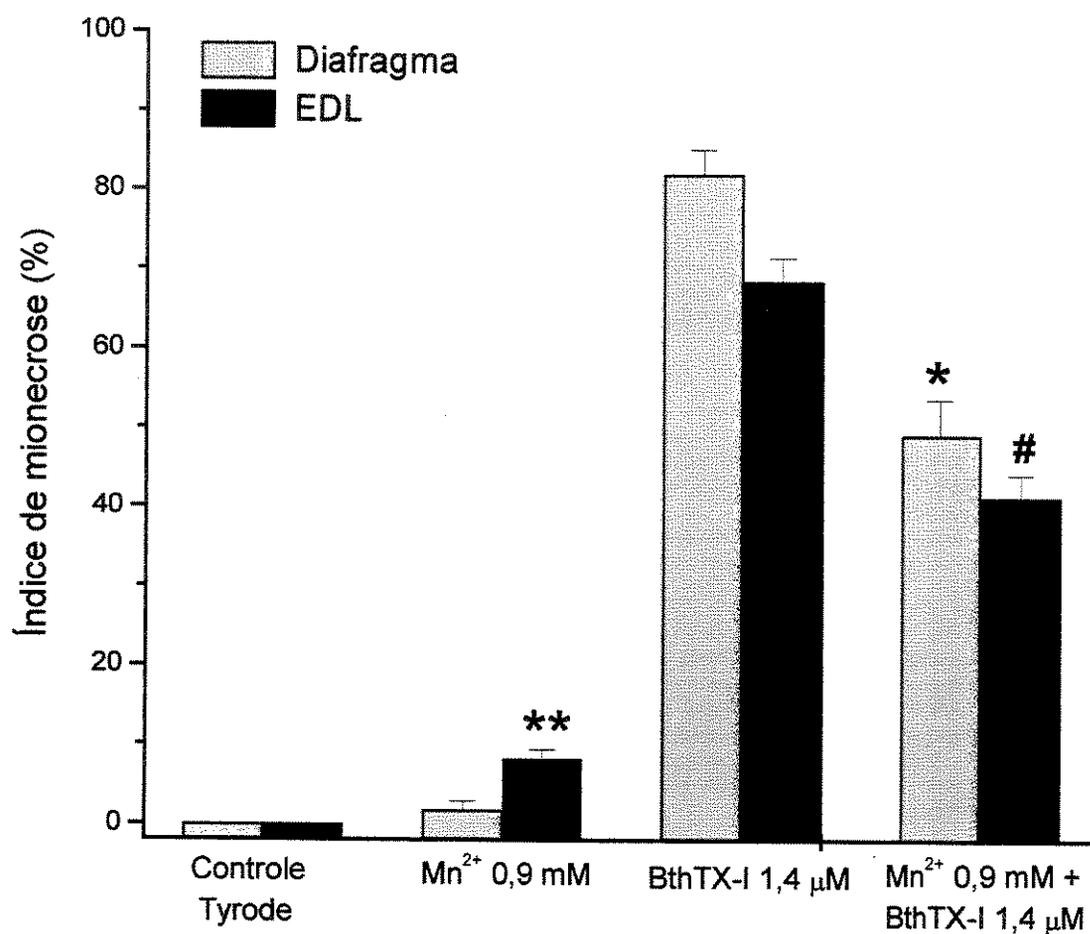


Figura 14-Determinação da porcentagem de fibras lesadas em músculos diafragma e EDL, após 120 minutos de exposição aos tratamentos. Os pontos representam a média \pm o erro padrão da média de seis a 11 experimentos. (), $p < 0,05$ (“*t-Student*”) comparado ao controle Tyrode em músculo EDL; (*) e (#), $p < 0,05$ (“*t-Student*”) comparado à BthTX-I (1,4 μ M) em músculos diafragma e EDL, respectivamente.**

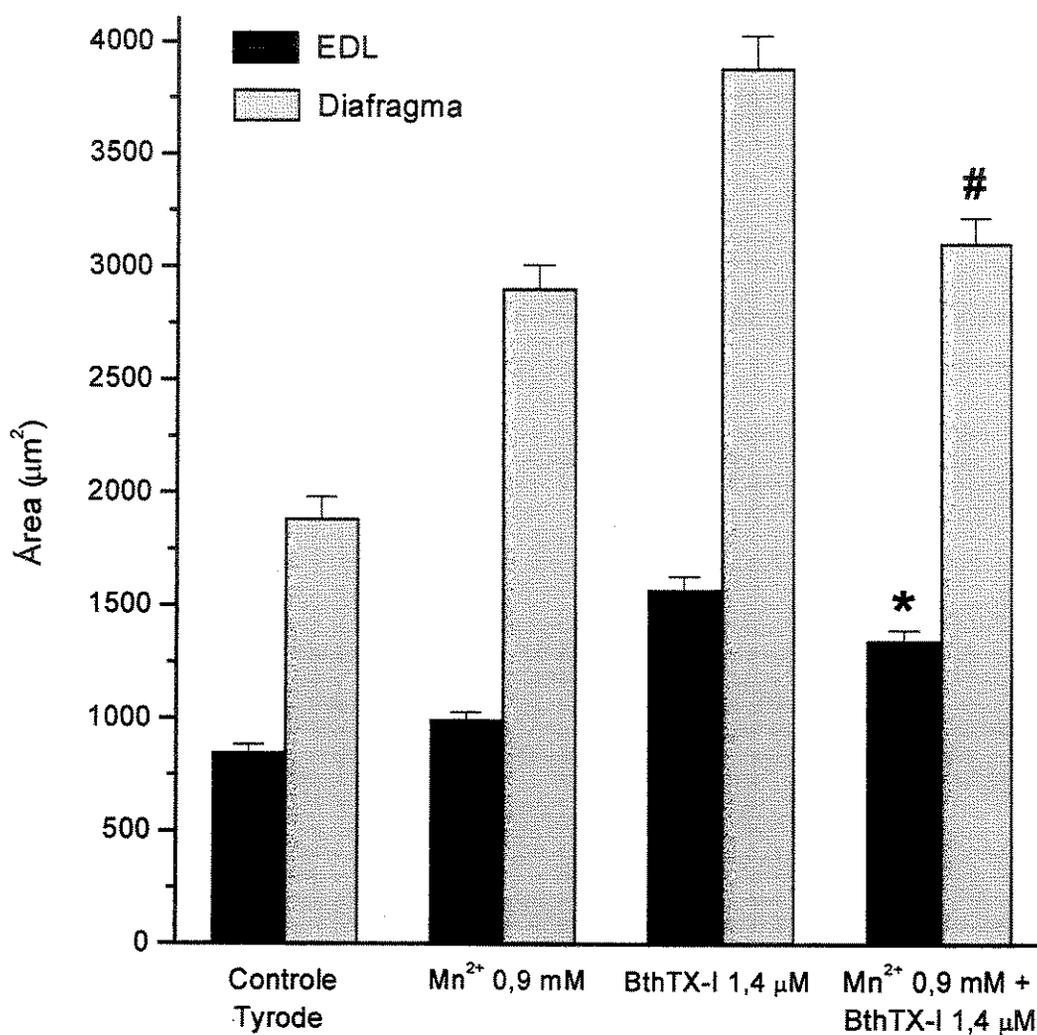


Figura 15-Determinação da área transversal das fibras em músculos diafragma e EDL, após 120 minutos de exposição aos tratamentos. Os pontos representam a média \pm o erro padrão da média de 5 experimentos. (*) $p < 0,05$ (“*t-Student*”), comparado à BthTX-I (1,4 μM) e ao Mn^{2+} (0,9 mM) em músculo EDL e (#) $p < 0,05$ (“*t-Student*”), comparado à BthTX-I (1,4 μM) em músculo diafragma.

4.2.5-Determinação enzimática de creatinoquinase em EDL

Neste estudo, como relatado, a utilização da preparação EDL foi a mais adequada, por ser possível sua retirada de maneira integral, sem lesão e conseqüente liberação de enzimas, como a creatinoquinase (CK).

As Figs. 16A e 16B ilustram o perfil de CK no controle Tyrode, Mn^{2+} (0,9 mM) e BthTX-I (1,4 μM). Observa-se a discreta liberação de CK provocada pelo Mn^{2+} , o qual é significativamente diferente somente aos 120 min em relação ao controle Tyrode.

A BthTX-I (1,4 μM) tem uma liberação quase imediata, observada aos 15 minutos, para depois liberar CK gradativamente ao longo dos 120 minutos de observação (1.261 ± 113 U/L, $n=20$). Foi significativamente diferente em relação ao controle Tyrode e ao Mn^{2+} (Figura 16A). O pré-tratamento com Mn^{2+} reduziu significativamente a liberação desta enzima intracelular pelo músculo para $94,5 \pm 17,5$ U/L ($n=17$, $p<0,05$, em relação a BthTX-I) (Figura 16B).

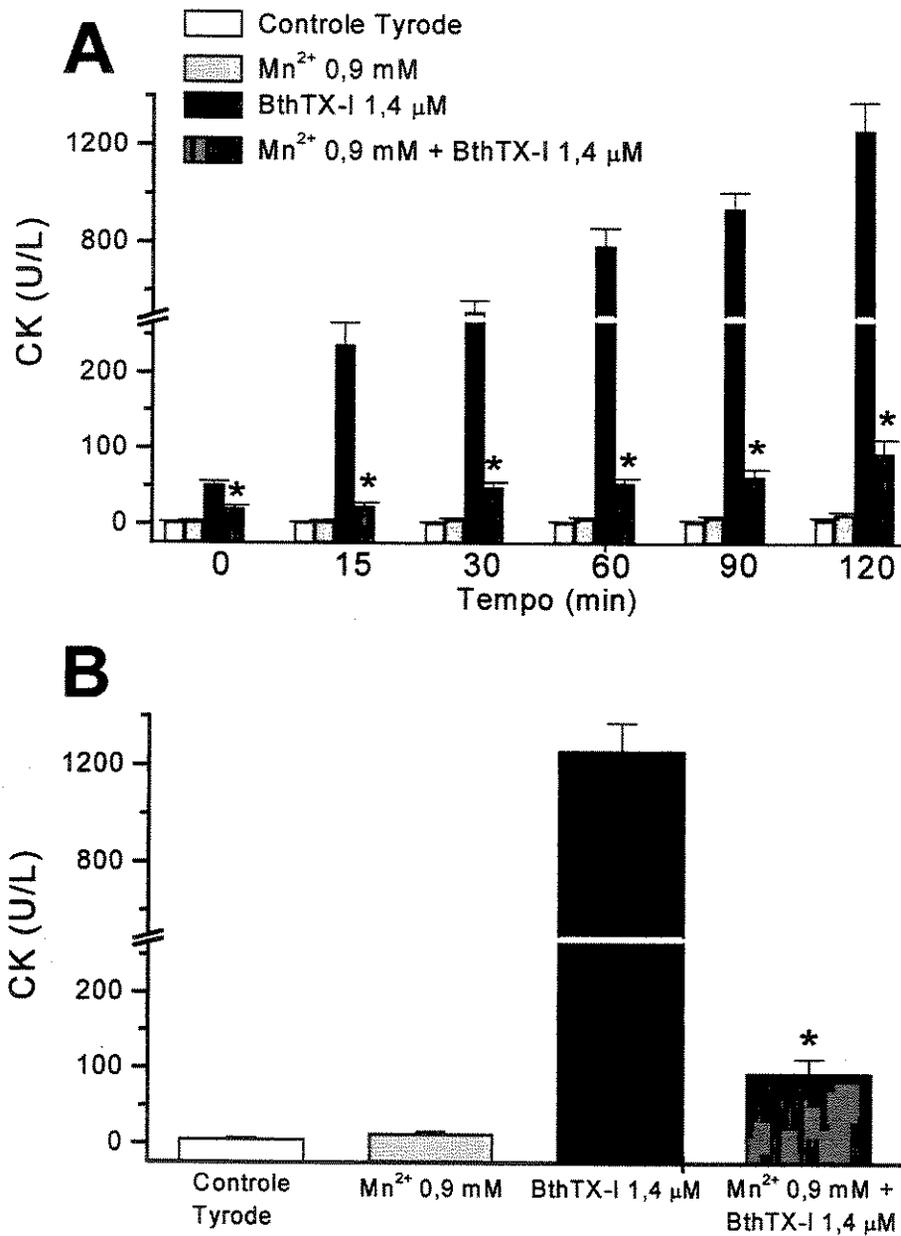


Figura 16-Determinação de CK em preparação EDL. O gráfico A ilustra o perfil de liberação de CK do controle Tyrode, Mn²⁺ (0,9 mM), BthTX-I (1,4 μM), e Mn²⁺ (0,9 mM) seguido da adição de BthTX-I (1,4 μM); B representa a liberação de CK, aos 120 minutos de exposição. Os pontos representam a média ± erro padrão da média de 12 a 20 experimentos. **p*<0,05 (“*t-Student*”), em relação à BthTX-I.

4.3-ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

4.3.1-Medida e análise dos potenciais de placa terminal (PsPT)

Utilizando-se a técnica eletrofisiológica, foram registradas a frequência e a amplitude dos potenciais de placa terminal para a medida do CQ em preparações NFD de camundongo tratadas com glicerol. As preparações foram estimuladas a 1Hz de frequência durante 1 min. Neste intervalo de tempo, de 30 - 60 potenciais, foram registrados para o cálculo do CQ em t_0 , t_{10} , t_{20} , t_{30} e t_{60} min.

Em todos os experimentos, foi utilizada a concentração de 0,35 μM de BthTX-I. A escolha desta dose foi baseada em resultados anteriormente obtidos por OSHIMA-FRANCO et al. (2004), em que essa concentração foi definida em função de facilitar o empalamento das fibras, da ausência de fibrilações e por não alterar os valores do potencial de membrana (PM) das fibras musculares.

As preparações incubadas com solução nutritiva de Tyrode (controle) exibiram um valor de CQ de 132 ± 24 ($n=15$) ao longo dos 60 minutos. A adição de BthTX-I (0,35 μM) ao banho, produziu um significativo aumento do valor do CQ de 132 ± 24 (controle) para $331,5 \pm 27$ ($n=9$, $p<0,05$ comparado ao controle) entre os primeiros 10 – 20 min de incubação. Este foi seguido de uma drástica diminuição a partir dos 30 min para 26 ± 5 ($n=9$, $p<0,05$ também comparado ao controle), sem alteração significativa nos valores do potencial de membrana (Tabela 3). A toxina foi capaz de diminuir significativamente o CQ durante 30 – 60 min, corroborando com o efeito neurobloqueador irreversível observado nos registros miográficos.

Tabela 3-Efeito da BthTX-I sobre o CQ dos PsPT

Tratamento	Tempo (min)	CQ	n
Controle Tyrode	0 - 60	$132,0 \pm 24$	15
BthTX-I 0,35 μM	10 - 20	$*331,5 \pm 27$	9
	30 - 60	$*26,0 \pm 5$	9

Os resultados estão expressos pela média de experimentos \pm erro padrão da média. $*p<0,05$ (“*t-Student*”) em relação ao controle.

5-DISCUSSÃO

Além do bloqueio neuromuscular irreversível, a BthTX-I induz vários efeitos farmacológicos que incluem mionecrose, rompimento de lipossoma, citotoxicidade (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000), edema e degranulação de mastócitos (LANDUCCI et al., 1998).

O Mn^{2+} , cátion divalente, mostrou efeito inibitório contra o bloqueio neuromuscular, edema e lise celular induzido pela BthTX-I (SOARES et al., 2002).

Neste estudo, avaliou-se a habilidade de íons manganês (Mn^{2+}) que compete com íons cálcio (Ca^{2+}) (MEIRI e RAHAMIMOFF, 1972; RASGADO-FLORES, et al., 1987), em neutralizar os efeitos neurotóxico e miotóxico da BthTX-I, a principal miotoxina do veneno de *Bothrops jararacussu*, em preparações neuromusculares isoladas nervo frênico-diafragma (NFD) e *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongo, por meio de técnicas miográfica, histológica e bioquímica.

A BthTX-I tem uma ação direta no sarcolema (HELUANY et al., 1992; MELO et al., 1993; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1995; OSHIMA-FRANCO et al., 2000, 2001), e os presentes registros miográficos corroboraram com este achado.

Os resultados demonstraram, nas preparações estudadas, que enquanto o Mn^{2+} aboliu efetivamente a neurotoxicidade da BthTX-I, o mesmo preveniu parcialmente a miotoxicidade, indicando uma possível dissociação entre estas duas atividades. Assim, os resultados sugerem que o tratamento com Mn^{2+} , antagonista do Ca^{2+} (MEIRI e RAHAMIMOFF, 1972; BALNAVE e GAGE, 1973), protege a preparação neuromuscular contra os efeitos bloqueadores da BthTX-I.

Aqui, tem-se assumido como atividade neurotóxica o bloqueio neuromuscular induzido pela BthTX-I, corroborando com os achados de OSHIMA-FRANCO et al. (2000).

Íons manganês são agentes bloqueadores da transmissão sináptica na junção neuromuscular. O principal sítio de ação é o terminal nervoso, onde os íons diminuem a quantidade de transmissor liberado por impulso nervoso (MEIRI e RAHAMIMOFF, 1972). A inibição produzida pelo Mn^{2+} é reversível (MEIRI e RAHAMIMOFF, 1972; SOARES et al., 2002). A reversibilidade foi explicada por OSHIMA-FRANCO et al. (2004) pela associação aos achados de RASGADO-FLORES et al. (1987) de que os íons manganês seriam avidamente seqüestrados pelas organelas tamponadoras do citossol, pelas

mitocôndrias e retículo endo/sarcoplasmático. Assim, a remoção citossólica do Mn^{2+} tornaria o Ca^{2+} novamente disponível no seu sítio de ação e a neurotransmissão seria restabelecida, portanto esta reversão depende da presença de cálcio (do meio externo), do contrário ela não se restabeleceria (OSHIMA-FRANCO, 2001). De fato, os íons manganês são bem tamponados no citoplasma e capazes de ligarem-se ao ATP e talvez a outras proteínas de ligação do cálcio (WOLFF et al, 1972; RASGADO-FLORES et al., 1987). De tal forma que, com a lavagem da preparação a solução nutritiva foi renovada, o cálcio contido nesta solução teve livre acesso ao terminal, determinando o restabelecimento da resposta contrátil, corroborando com os achados de OSHIMA-FRANCO (2001).

Dos estudos clássicos realizados com o Mn^{2+} sobre o terminal nervoso podem-se resumir os principais eventos: inibe a liberação evocada Ca^{2+} -dependente do neurotransmissor (KATZ e MILEDI, 1969; MEIRI e RAHAMIMOFF, 1972); é capaz de substituir parcialmente o cálcio na manutenção evocada da liberação (KITA et al., 1981; DRAPEAU e NACHSHEN, 1984) e desenvolve lentamente e com longa duração o aumento da liberação do neurotransmissor (BECHEM et al., 1981).

Uma explicação para o antagonismo da BthTX-I pelo Mn^{2+} foi descrito por SOARES et al. (2002). Os possíveis eventos seriam descritos como: a) Mn^{2+} inicialmente antagoniza o influxo de Ca^{2+} no terminal nervoso (MEIRI e RAHAMIMOFF, 1972), agindo como antagonista de Ca^{2+} ; b) Mn^{2+} entra no terminal (RASGADO-FLORES et al., 1987), agindo como agonista de Ca^{2+} . Na primeira etapa o Mn^{2+} inibe a contração muscular bloqueando a liberação do neurotransmissor pelos canais de Ca^{2+} -dependente. Na segunda etapa, depois da entrada do Mn^{2+} no terminal nervoso, Ca^{2+} extracelular substitui o Mn^{2+} armazenado restabelecendo a contração do músculo esquelético. SOARES et al. (2002) sugeriram que o uso do Mn^{2+} para estudos de ligação poderia levar à descoberta de um ou mais de um local de sítio de ligação para BthTX-I.

Os resultados deste trabalho apontam que o Mn^{2+} age sobre o terminal nervoso (ação pré-sináptica), inibindo o bloqueio neuromuscular induzido pela toxina; e também sobre o sarcolema extrajuncional (ação pós-sináptica), protegendo parcialmente a miotoxicidade, corroborando com os achados de OSHIMA-FRANCO (2001).

OSHIMA-FRANCO et al. (2004) demonstraram pelos parâmetros eletrofisiológicos, em preparação NFD, que o Mn^{2+} manteve estável o potencial de membrana (por cerca de 120 min), mas provocou uma diminuição inicial seguida por um aumento na frequência de PsPTM e nenhum PsPTM gigante foi observado, provavelmente por causa do seqüestro de Mn^{2+} pelas mitocôndrias e retículo sarcoplasmático liso (RASGADO-FLORES et al., 1987). A diminuição inicial (após 30 min) correspondeu ao bloqueio neuromuscular considerando que o aumento representou a restauração espontânea da atividade contrátil neuromuscular na presença de Mn^{2+} . Preparações pré-tratadas com Mn^{2+} foram protegidas contra a ação despolarizante da BthTX-I, além de anteciparem o efeito de disparo de PPTM que ocorria aos 120 min, com o Mn^{2+} sozinho.

A hipótese de que a BthTX-I em presença do Mn^{2+} pudesse formar um complexo estável foi descartada quando misturas de BthTX-I: Mn^{2+} foram adicionadas à preparação. Este resultado mostrou que o efeito protetor exercido pelo Mn^{2+} talvez ocorra por um mecanismo que envolve a preparação biológica, mostrando também que a toxina provavelmente permaneceu ligada à membrana. Em associação aos achados de WARD et al. (2002) que descreveram um mecanismo de dano à membrana pela BthTX-I, propondo, por um modelo independente de hidrólise e envolvendo uma interação da região C-terminal da BthTX-I com a membrana-alvo, sugere-se que a incubação com o Mn^{2+} impediu o efeito da BthTX-I talvez por competirem pelo mesmo sítio de ação (o canal de Ca^{2+}), mas não impediu a ligação da região C-terminal da BthTX-I à membrana-alvo. Em um outro estudo CHIOATO et al. (2002) corroboraram a proposta de WARD et al. (2002), dissociando as duas atividades da BthTX-I, a miotóxica e a de dano à membrana independente da presença de Ca^{2+} . Os autores propuseram que a região C-terminal que inclui os resíduos da posição 115 – 119 interagiriam superficialmente com a interface da membrana e que os resíduos da posição 125 se inseririam parcialmente na membrana lipídica, causando transtornos na bicamada fosfolipídica. Baseado nestas informações, pode-se hipotetizar que a incubação com o Mn^{2+} impediu a inserção dos resíduos da posição 125 da BthTX-I à membrana-alvo, mas não a interação dos resíduos da posição 115 – 119 da toxina na interface da membrana. Esta afirmação pôde ser confirmada após a lavagem da preparação com a remoção do Mn^{2+} do banho e conseqüente permanência da

BthTX-I que fica livre para então, inserir-se na membrana e produzir o bloqueio neuromuscular irreversível e sua miotoxicidade.

Trabalhos prévios mostraram que a heparina e poliânions relacionados são hábeis em inibir a mionecrose induzida por venenos de serpente que contêm miotoxinas PLA₂, incluindo a BthTX-I (MELO e SUAREZ-KURTZ, 1988; MELO et al., 1993; LOMONTE et al., 1994b; MELO e OWNBY, 1999). Este antagonismo foi designado à formação de complexos ácido-base entre os componentes polianiônicos e às miotoxinas básicas dos venenos (MELO et al., 1993; LOMONTE et al., 1994a). Porém, resultados opostos foram encontrados por OSHIMA-FRANCO et al. (2001), mostrando que a heparina protege contra o bloqueio neuromuscular da BthTX-I, mas não contra o miotoxicidade. Usando o suramin, um derivado naftiluréia polissulfonatado, DE OLIVEIRA et al. (2003) mostraram que esta substância previne ambos, o dano muscular e a paralisia da BthTX-I, em preparação isolada de camundongo. Estes resultados tomados em conjunto sobre a BthTX-I, incluindo os demonstrados no presente trabalho usando Mn²⁺, podem reforçar a hipótese de que as ações neurotóxica e miotóxica estão dissociadas nesta toxina.

As preparações utilizadas NFD e EDL apresentaram diferenças em relação ao diâmetro das fibras e de sensibilidade ao Mn²⁺ e à toxina. Esta discrepância mostradas aqui, pela primeira vez, pode estar relacionada à diferença na composição dos dois músculos. O diafragma é uma mistura muscular de fibras de contração rápida e lenta (60% vermelho, 20% branco e 20% intermediária), e eles podem ser distinguidos pelas diferenças no diâmetro das fibras, conteúdo mitocondrial, largura da linha Z e forma do retículo sarcoplasmático (PADYKULA e GAUTHIER, 1970). O EDL é um músculo predominantemente branco, fibras de contração rápida e elevada capacidade glicolítica (ELLISMAN et al., 1976; TAKEKURA et al., 1994). Músculos de contração rápida (EDL) e contração lenta (soleus) têm sensibilidades diferentes a alguns venenos e miotoxinas de serpente como avaliado pela liberação de CK e alterações morfológicas (MELO e OWNBY, 1996). Em particular, as propriedades bioquímicas e fisiológicas do EDL podem aumentar ou favorecer a ação miotóxica de venenos e toxinas de serpente (MELO e OWNBY, 1996). Com base no exposto sobre os estudos realizados em diferentes músculos esqueléticos, diafragma, EDL e soleus, é evidente que existem diferenças marcantes entre

as preparações aqui utilizadas (NFD e EDL), no que diz respeito à arquitetura, ultra-estrutura, distribuição de enzimas e receptores envolvidos na fisiologia das mesmas. Os estudos miográfico e histológico permitiram apontar as diferenças entre elas.

A necrose por picadas de serpentes é um fenômeno altamente complexo resultando da ação de fatores específicos e/ou da combinação de reações secundárias, não-específicas nos tecidos afetados (OWNBY et al., 1982, 1990). Por esta razão, a combinação de diferentes técnicas como determinação de CK e análise morfológica são recomendadas para detectar e avaliar a miotoxicidade (MEBS e OWNBY, 1990; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995).

A miotoxicidade causada pela BthTX-I foi avaliada pelas análises bioquímica e histológica usando a preparação EDL. A determinação de uma enzima intracelular como a CK, que é liberada no banho após a injúria celular, tem sido usada nos estudos de miotoxicidade (MELO e SUAREZ-KURTZ, 1988; OSHIMA-FRANCO et al., 1999, 2000).

A creatinoquinase é uma enzima que situa-se ao nível de pontes entre os filamentos de miosina, na região M da fibra muscular e transfere grupos fosfato da fosfocreatina ao ADP, transformando-o em ATP (Reação de Lohmann), que é rapidamente utilizado pela célula como fonte imediata de energia para a contração muscular. Esta é uma enzima essencialmente citoplasmática, e seu aparecimento no líquido nutritivo ou no soro de indivíduos pode indicar alterações na permeabilidade da membrana muscular ou mesmo lesão celular (SUAREZ-KURTZ, 1983).

Como a determinação de CK não foi possível em preparação NFD devido à necessidade de cortar o músculo diafragma ao meio (o que levaria à liberação espontânea de CK e conseqüentemente a valores basais altos), esta atividade foi medida somente em preparação EDL. Como um marcador bioquímico quantitativo de dano do músculo esquelético, a liberação de CK promoveu um parâmetro adicional para confirmar os resultados histológicos e, realmente, houve uma correlação positiva entre os níveis de CK e as alterações patológicas observadas nas preparações tratadas com Mn^{2+} ou BthTX-I sozinhos. Preparações pré-tratadas com Mn^{2+} preveniram marcadamente a liberação de CK induzida pela BthTX-I, diferentemente da análise histológica na qual este íon apresentou proteção parcial contra a ação miotóxica da toxina. A baixa eficiência do Mn^{2+} em prevenir

a ação miotóxica pelo parâmetro histológico (morfológico) da BthTX-I pode talvez significar que a liberação de CK nem sempre está diretamente relacionada à lesão da célula muscular, o que concorda com os dados de MEBS et al. (1983) e OSHIMA-FRANCO et al. (2000).

Portanto, estes achados sugerem que a mionecrose causada pela BthTX-I ocorre de forma mais intensa que as alterações na transmissão neuromuscular, uma conclusão que corrobora a principal ação de venenos botrópicos (CHANG, 1979; GUTIÉRREZ E CHAVES, 1980; MEBS et al., 1983; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; QUEIROZ et al., 1985).

Outra hipótese seria que o Mn^{2+} revelou que a BthTX-I induz seus efeitos neurotóxico e miotóxico por mecanismos diferentes. Estas conclusões concordam com os achados de LOMONTE et al. (1994b) que demonstraram uma dissociação entre as atividades miotóxica e enzimática da miotoxina III de *Bothrops asper*.

RODRIGUES-SIMIONI et al. (1983), usando pool IV do veneno de *Bothrops jararacussu* que contém a BthTX-I, e HELUANY et al. (1992), trabalhando com a toxina purificada, descreveram os efeitos farmacológicos da BthTX-I e sua ação despolarizante em membranas. Segundo OSHIMA-FRANCO (2001), a BthTX-I na concentração de 0,7 μM em preparação NFD provocou uma progressiva e acentuada despolarização da membrana a partir dos 30 minutos, em regiões de placa e fora de placa terminal. Na vigência dos baixos valores de PM não foi possível o registro dos PsPTM. Então com o uso de uma concentração menor de BthTX-I (0,35 μM) foi útil para monitorar as pequenas alterações de PM determinadas por esta toxina sobre as fibras musculares. A BthTX-I (0,35 μM) causou o aparecimento de PPTM gigante sem alteração no PM, sugerindo uma ação pré-sináptica desta toxina nas fases iniciais da intoxicação, mas só com a medida do CQ realizada neste trabalho esta ação foi confirmada. O aumento do CQ (10 – 20 min) seguido de uma drástica diminuição a partir dos 30 min, sem alteração significativa nos potenciais de membrana, confirmou a ação pré-sináptica da BthTX-I em baixa concentração, em adição aos resultados de OSHIMA-FRANCO (2001).

Conclui-se que a BthTX-I, embora seja uma miotoxina, em concentração em que não interfere com o potencial de membrana da fibra muscular, altera o conteúdo quântico, fato que denota que esta toxina age pré-sinápticamente e que suas atividades neurotóxica e miotóxica podem ser dissociadas, como demonstrado pelo uso do Mn^{2+} , importante ferramenta farmacológica no estudo de venenos e toxinas.

6-CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho conduziram às seguintes conclusões:

- 1) as preparações neuromusculares utilizadas NFD e EDL apresentaram comportamento distinto quanto à sensibilidade ao Mn^{2+} (sob parâmetro neurotóxico e miotóxico) e à BthTX-I (sob parâmetro miotóxico), provavelmente devido às diferenças morfológicas exibidas por estes músculos (PADYKULA e GAUTHIER, 1970; TAKEKURA et al., 1994);
- 2) Mn^{2+} protegeu completamente a neurotoxicidade e parcialmente a miotoxicidade, em ambas as preparações estudadas. Conclui-se que as atividades neurotóxica e miotóxica da BthTX-I podem ser dissociadas e o Mn^{2+} mostrou ser uma importante ferramenta farmacológica no estudo de venenos e toxinas;
- 3) Mn^{2+} preveniu significativamente a liberação de CK, mas protegeu somente parcialmente contra a ação miotóxica da BthTX-I. Portanto a liberação de CK nem sempre está diretamente relacionada à lesão da célula muscular (MEBS et al., 1983; OSHIMA-FRANCO et al., 2000);
- 4) por meio dos adicionais parâmetros eletrofisiológicos confirmou-se a natureza pré-sináptica da BthTX-I, detectada somente em baixas concentrações (OSHIMA-FRANCO, 2001).

***7-REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- AMARAL, C. F.; DA SILVA, O. A.; GOODY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, 23(6): 877-85, 1985.
- AMARAL, C. F.; DE REZENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M.; MAGALHÃES, R. A.; DOS REIS, R. J. et al. Acute kidney failure secondary to ophidian bothropic and crotalid accidents. Analysis of 63 cases. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 28(4): 220-7, 1986.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SAMPAIO, S. V.; CUNHA, O. A.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. **Toxicon**, 35(7): 1043-52, 1997.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B. et al. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 82: 755-63, 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; MANCIN, A. C.; REIS, M. L.; BALLEJO, G. et al. Isolation and characterization of an arginine ester hydrolase from *Bothrops jararacussu* venom which induces contractions of the isolated rat uterus. **Biochem Mol Biol Int**, 47(4): 699-706, 1999.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JÚNIOR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 6-12.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin-I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, 33(3): 383-6, 1995.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, 23(4): 691-706, 1985.
- BAKER, P. F.; HODGKIN, A. L.; RIDGWAY, E. B. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. **J Physiol**, 218(3): 709-55, 1971.

- BALNAVE, R. J.; GAGE, P. W. The inhibitory effect of manganese on transmitter release at the neuromuscular junction of the toad. **Br J Pharmacol**, 47(2): 339-52, 1973.
- BECHEM, M.; GLITSCH, H. G.; POTT, L. Facilitation of acetylcholine release from cardiac parasympathetic nerve endings. Effect of stimulation pattern of Mn ions. **Pflugers Arch**, 391(2): 105-11, 1981.
- BENVENUTI, L. A.; FRANCA, F. O.; BARBARO, K. C.; NUNES, J. R.; CARDOSO, J. L. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snakebite: a case report. **Toxicon**, 42(3): 331-4, 2003.
- BONFIM, V. L.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; HYSLOP, S.; OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. et al. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J Protein Chem**, 20(3): 239-45, 2001.
- BRAZIL, V. **La défense contre l'ophidisme**. São Paulo: Pocaí & Weiss, 1911. 181p.
- BRAZIL, V.; RANGEL PESTANA, B. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. **Rev Med de São Paulo**, 19, 21 e 22, 1909.
- BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Brit J Pharmacol**, 1: 38-61, 1946.
- CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A. M.; MELLO, P. A. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. **Histol Histopathol**, 17(2): 463-70, 2002a.
- CALIL-ELIAS, S.; THATTASSERY, E.; MARTINEZ, A. M.; MELO, P. A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Braz J Med Biol Res**, 35(10): 1233-5, 2002b.
- CHANG, C. C. The action of snake venoms on nerve and muscle. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**. New York: Springer-Verlag, 1979. p. 309-76.
- CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys 49-phospholipase A₂. **Biochem J**, 366(Pt 3): 971-6, 2002.

- CINTRA, A. C.; SAMPAIO, S. V.; RAGHUVIR, A. K.; GIGLIO, J. R. Assignment of the disulfide bridges in bothropstoxin-I, a myonecrotic Lys 49 PLA₂ homolog from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J Protein Chem**, 20(5): 377-82, 2001.
- CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem**, 12(1): 57-64, 1993.
- CUTHBERT, A. W. **Calcium and cellular function**. London: Macmillan and Co, 1970. 450p.
- DA SILVA GIOTTO, M. T.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys 49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, 30(4): 442-54, 1998.
- DE CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **J Protein Chem**, 21(1): 43-50, 2002.
- DE CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, 39(10): 1471-6, 2001.
- DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S.; WARD, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, 40(23): 6912-20, 2001a.
- DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; WARD, R. J. The effect of resonance energy homotransfer on the intrinsic tryptophan fluorescence emission of the bothropstoxin-I dimer. **Biochem Biophys Res Commun**, 284(4):1011-5, 2001b.
- DE OLIVEIRA, M.; CAVALCANTE, W. L.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A.; DAL-PAI SILVA, M.; GALLACCI, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon**, 42(4): 373-9, 2003.
- DE ROODT, A. R.; VIDAL, J. C.; LITWIN, S.; DOKMETJIAN, J. C.; DOLAB, J. A.; HAJOS, S. E. et al. Cross neutralization of *Bothrops jararacussu* venom by heterologous antivenoms. **Medicina (B Aires)**, 59(3): 238-42, 1999.

- DE SOUZA QUEIROZ, L.; MARQUES, M. J.; SANTO NETO, H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, 40(10): 1483-6, 2002.
- DOS-SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R.; FORTES-DIAS, C. L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. de F. The efficacy of the bothropic-crotalic antivenom in the neutralization of the main *Bothrops jararacussu* venom effects. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 34(2): 77-83, 1992.
- DRAPEAU, P.; NACHSHEN, D. A. Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J Physiol*, 348: 493-510, 1984.
- ELLISMAN, M. H.; RASH, J. E.; STAEHELIN, L. A.; PORTER, K. R. Studies of excitable membranes. II. A comparison of specializations at neuromuscular junctions and nonjunctional sarcolemmas of mammalian fast and slow twitch muscle fibers. *J Cell Biol*, 68(3): 752-74, 1976.
- ELMQVIST, D.; QUASTEL, D. M. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J Physiol*, 178(3): 505-29, 1965.
- FATT, P.; KATZ, B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J Physiol*, 115:320-70, 1951.
- FLETCHER, J. E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* snake venom: phospholipid hydrolysis and effects on electrical and contractile activity of the rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol*, 66: 39-54, 1982.
- FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JÚNIOR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 13-32.
- GAGE, P. W.; EISENBERG, R. S. Action potentials, afterpotentials, and excitation-contraction coupling in frog sartorius fibers without transverse tubules. *J Gen Physiol*, 53: 298-310, 1969.
- GONÇALVES, J. M. Purification and properties of crotamine. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1956. p.261-74.

- GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Rev Biol Trop**, 32(2): 213-22, 1984.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F. Proteolytic, hemorrhagic and myonecrotic effects of the venoms of Costa Rican snakes from the genera *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis*. **Toxicon**, 18(3): 315-21, 1980.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENÉ, J. A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, 27(7): 735-45, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33(11): 1405-24, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp Mol Pathol**, 55(3): 217-29, 1991.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, 22(1): 115-28, 1984.
- HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc Rev**, 3(2): 183-211, 1990.
- HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon**, 39(12): 1841-6, 2001.
- HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, 30(10): 1203-10, 1992.
- HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. **Biochemistry**, 26(3): 780-7, 1987.

- HOGUE, A. R.; ROMANO, S. A. R. W. D. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem Inst Butantan**, 36: 109-207, 1972.
- HOGUE, A. R.; ROMANO-HOGUE, S. A. R. W. D. L. Poisonous snakes of the world. Part I. Checklist of the pit vipers, Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. **Mem Inst Butantan**, 42/43: 179-309, 1978.
- HOMMA, M.; TU, A. T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br J Exp Pathol**, 52(5): 538-42, 1971.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26(7): 615-27, 1988.
- http://www.gifte.de/bothrops_jararacussu_bild02.htm. Acesso em: 22 jan. 2004.
- <http://www.proto.ufsc.br/manualpeconhentos.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2004.
- HUBBARD, J. I.; LLINÁS, R.; QUASTEL, D. M. J. Electrical properties of nerve and muscle. In: ARNOLD, E. **Electrophysiological analysis of synaptic transmission**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1969. p. 112-73.
- KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; ROBERTO, P. G.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; CINTRA, A. O. et al. cDNA sequence and molecular modeling of a nerve growth factor from *Bothrops jararacussu* venomous gland. **Biochimie**, 84(7): 675-80, 2002.
- KASSAB, B. H.; DE CARVALHO, D. D.; OLIVEIRA, M. A.; BAPTISTA, G. R.; PEREIRA, G. A.; NOVELLO, J. C. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. **Protein Expr Purif**, 35(2): 344-52, 2004.
- KATZ, B.; MILEDI, R. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. **J Physiol**, 192(2): 407-36, 1967.
- KATZ, B.; MILEDI, R. The effect of divalent cations on transmission in the squid giant synapse. **Publ Staz Zool Napoli**, 37: 303-10, 1969.

- KETELHUT, D. F.; DE MELLO, M. H.; VERONESE, E. L.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, 85(10): 983-91, 2003.
- KITA, H.; NARITA, K.; VAN DER KLOOT, W. Tetanic stimulation increases the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction in Mn²⁺-, CO²⁺-, and Ni²⁺-saline solutions. **Brain Res**, 205(1): 111-21, 1981.
- KORDAS, M. The effect of membrane polarization on the time course of the end-plate current in frog sartorius muscle. **J Physiol**, 204(2): 493-502, 1969.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon**, 24(6): 575-83, 1986.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M.; GUIMARÃES, S. M. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 85(4): 552, 1991.
- LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur J Pharmacol**, 343(2-3): 257-63, 1998.
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J Biol Chem**, 269(47): 29867-73, 1994a.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L. A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem Pharmacol**, 47(9): 1509-18, 1994b.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, 22(2): 193-206, 1984.

- MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAY, Y. **Animal, plant and microbial toxins**. New York: Plenum Press, 1976. p. 111-21.
- MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STABELI, R. G.; FRANCO, J. J.; TICLI, F. K. et al. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, 44(2): 215-23, 2004.
- McLOON, L. K.; BAUER, G.; WIRTSCHAFTER, J. Quantification of muscle loss in the doxorubicin-treated orbicularis oculi of the monkey. Effect of local injection of doxorubicin into the eyelid. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 32(5): 1667-73, 1991.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, 21(3): 393-404, 1983.
- MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther**, 48(2): 223-36, 1990.
- MEIRI, U.; RAHAMIMOFF, R. Neuromuscular transmission: inhibition by manganese ions. **Science**, 176: 308-9, 1972.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JÚNIOR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33-61.
- MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, 31(3): 285-91, 1993.
- MELO, P. A.; OWNBY, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**, 37(1): 199-215, 1999.
- MELO, P. A.; OWNBY, C. L. Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. **Toxicon**, 34(6): 653-69, 1996.

- MELO, P. A.; SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **Toxicon**, 26(1): 87-95, 1988.
- MILANI JUNIOR, R.; JORGE, M. T.; DE CAMPOS, F. P.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L. et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM**, 90(5): 323-34, 1997.
- MIYAMOTO, M. D. Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junctions. **J Physiol**, 250(1): 121-42, 1975.
- MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 29(6): 713-23, 1991.
- MOURA-DA-SILVA, A. M.; PAINE, M. J.; DINIZ, M. R.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. The molecular cloning of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A₂'s may imply gene duplications. **J Mol Evol**, 41(2): 174-9, 1995.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb Haemost**, 41(2): 314-28, 1979.
- NAKADA, K.; NAKADA, F.; ITO, E.; INOUE, F. Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. **Toxicon**, 22(6): 921-30, 1984.
- OSHIMA-FRANCO, Y. Nova abordagem no estudo da farmacologia da bothropstoxina-I (*Bothrops jararacussu*). Campinas, 2001. (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).
- OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **Muscle Nerve**, 23: 1832-9, 2000.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**, 37(10): 1341-57, 1999.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; DAL-BELO, C. A.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A. C. O. et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 2004. (in press)

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; SILVA, G. H.; CARDOSO, D. F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J. R. et al. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**, 39: 1477-85, 2001.

OSHIMA-FRANCO, Y. LEITE, G. B.; VALÉRIO, A. A.; HYSLOP, S.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.; GIGLIO, J. R. et al. Rabbit antivenom efficacy against myotoxic and neurotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **J Venom Anim Toxins**, 8(2): 226-43, 2002.

OWNBY, C. L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. **Handbook of Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 602-54.

OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). **Toxicon**, 26(5): 459-74, 1988.

OWNBY, C. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; COLBERG, T. R.; ODELL, G. V. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon**, 20(5): 877-85, 1982.

OWNBY, C. L.; NIKA, T.; IMAI, K.; SUGIHARA, H. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). **Toxicon**, 28(7): 837-46, 1990.

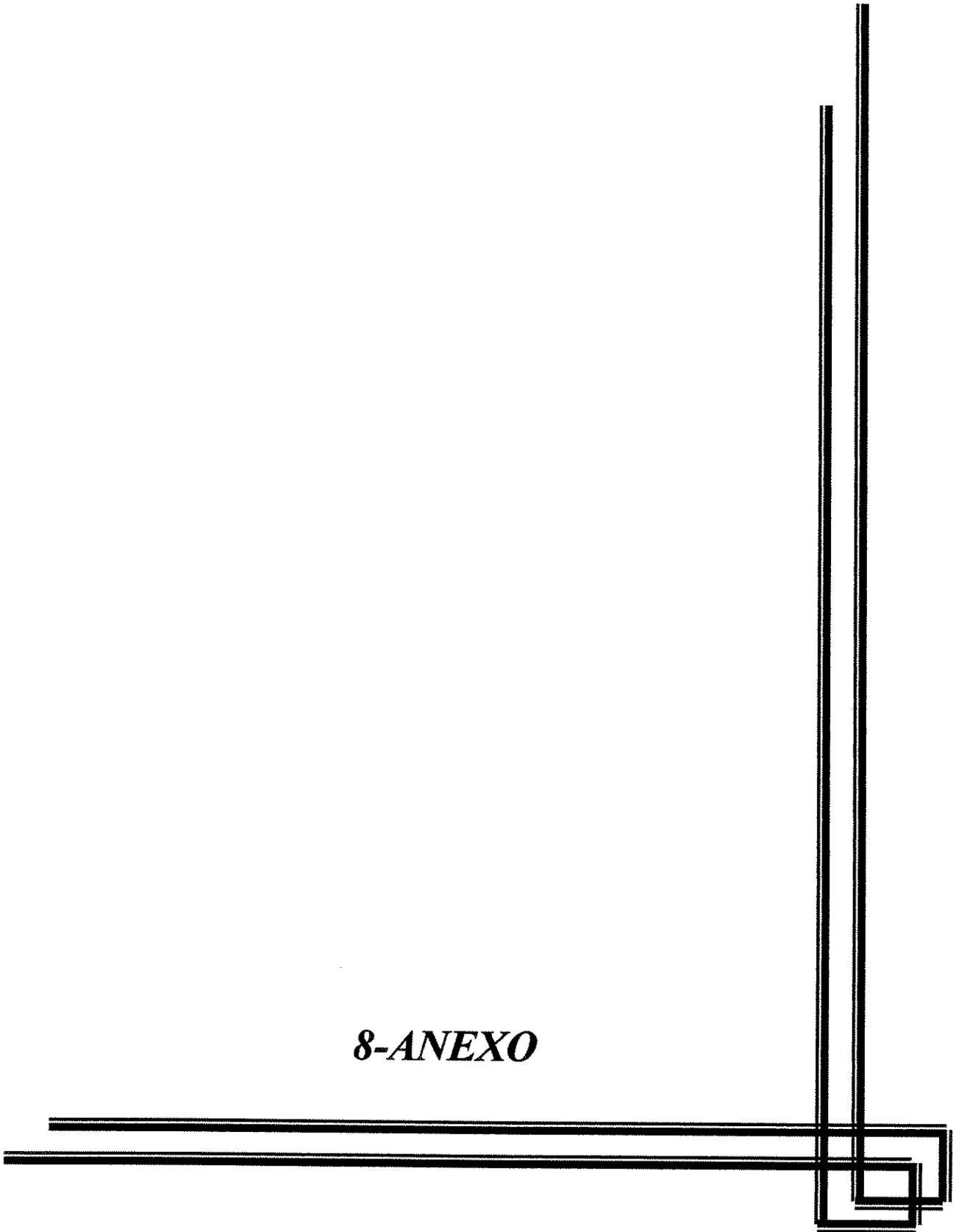
- PADYKULA, H. A.; GAUTHIER, G. F. The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white, and intermediate skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*, 46: 27-41, 1970.
- PEREIRA, M. F.; NOVELLO, J. C.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LANDUCCI, E. T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) venom with low phospholipase A₂ activity. *J Protein Chem*, 17(4): 381-6, 1998.
- PEREIRA-BITTENCOURT, M.; CARVALHO, D. D.; GAGLIARDI, A. R.; COLLINS, D. C. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res*, 19(5B): 4023-5, 1999.
- PRESTON, S. A.; DAVIS, C. E.; HARRIS, J. B. The assessment of muscle fibre loss after the injection of the venom of *Notechis scutatus* (Australian tiger snake). *Toxicon*, 28(2): 201-14, 1990.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 23(2): 341-5, 1985.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, 22(3): 339-46, 1984.
- RAPHAEL, S. S. **Lynch's medical laboratory technology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1983. 845p.
- RASGADO-FLORES, H.; SANCHEZ-ARMAS, S.; BLAUSTEIN, M. P.; NACHSHEN, D. A. Strontium, barium, and manganese metabolism in isolated presynaptic nerve terminals. *Am J Physiol*, 252(6 Pt 1): C604-10, 1987.
- ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S. PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A. et al. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein J*, 23(4): 273-85, 2004a.

- ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FACA, V. M.; FULY, A. et al. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A₂ cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr Purif**, 37(1): 102-8, 2004b.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, 10(2): 475-89, 1983.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; JIANG, M. S.; FLETCHER, J. E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys 49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon**, 33(11): 1479-89, 1995.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bite in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 345-84.
- RULLER, R.; FERREIRA, T. L.; OLIVEIRA, A. H.; WARD, R. J. Chemical denaturation of a homodimeric lysine-49 phospholipase A₂: a stable dimer interface and a native monomeric intermediate. **Arch Biochem Biophys**, 411(1): 112-20, 2003.
- SÁ, J. M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; ROSA, J. C. et al. Topology of the substrate-binding site of a Lys 49-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. **Biochem J**, 382(Pt 1): 191-8, 2004.
- SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C. A.; LEITE, G. B.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S. et al. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int J Biochem Cell Biol**, 34: 668-77, 2002.
- SOUZA, F. A. D.; SPENCER, P. J.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. ⁶⁰Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. **Toxicon**, 40: 1101-6, 2002.

- SPENCER, P. J.; AIRD, S. D.; BONI-MITAKE, M.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J. R. A single-step purification of bothropstoxin-I. **Braz J Med Biol Res**, 31(9): 1125-7, 1998.
- SUAREZ-KURTZ, G. Enzyme release from skeletal muscle. **Braz J Med Biol Res**, 16(4): 283-90, 1983.
- TAKEKURA, H.; KASUGA, N.; YOSHIOKA, T. Differences in ultrastructural and metabolic profiles within the same type of fibres in various muscles of young and adult rats. **Acta Physiol Scand**, 150(3): 335-44, 1994.
- TANIZAKI, M. M.; ZINGALI, R. B.; KAWAZAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S.; SUZUKI, K. Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, 27(7): 747-55, 1989.
- TEIBLER, P.; ACOSTA DE PEREZ, O.; MARUNAK, S.; SANCHEZ NEGRETTE, M.; ORTEGA, H. Muscular regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom from Argentina. **Biocell**, 25(3): 257-64, 2001.
- VIDAL, J. C.; STOPPANI, A. O. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch Biochem Biophys**, 145(2): 543-56, 1971.
- VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem Inst Butantan**, 33: 981-92, 1966.
- WARD, R. J.; CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SÁ, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys 49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem J**, 362(Pt 1): 89-96, 2002.
- WARD, R. J.; DE OLIVEIRA, A. H.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FACA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys 49-phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**, 21(1): 134-40, 2001.
- WARD, R. J.; MONESI, N.; ARNI, R. K.; LARSON, R. E.; PACO-LARSON, M. L. Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Gene**, 156(2): 305-6, 1995.
- WOLFF, D. J.; HUEBNER, J. A.; SIEGEL, F. L. Calcium-binding phosphoprotein of pig brain: effects of cations on the calcium binding. **J Neurochem**, 19(2): 2855-62, 1972.

ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R.; DE LIMA, M. E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon*, 34(7): 807-19, 1996.

8-ANEXO





Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 510-1 sobre "Bothropstoxina-I: uma Miotoxina com Ação Pré-Sináptica?", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni 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 na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 21 de Março de 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 510-1, entitled "Does Bothropstoxin-I have a Presynaptic Action?", 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 March 21, 2003.

Campinas, 21 de Março de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente
CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária Executiva
CEEA/IB/UNICAMP