ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE UMA NOVA FOSFOLIPASE A₂ (Bp-12) DO VENENO DE Bothrops pauloensis

CAMPINAS Unicamp 2008

i

PRISCILA RANDAZZO DE MOURA

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE UMA NOVA FOSFOLIPASE A₂ (Bp-12) DO VENENO DE Bothrops pauloensis

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

ORIENTADORA: PROFa. DRa. LÉA RODRIGUES SIMIONI

CAMPINAS Unicamp 2008

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

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

M865i	 Moura, Priscila Randazzo de Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de uma nova fosfolipase A2 (Bp-12) do veneno de <i>Bothrops pauloensis /</i> Priscila Randazzo de Moura. Campinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientador: Léa Rodrigues Simioni Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	 Bothrops. 2. Junção neuromuscular. 3. Eletrofisiologia. Simioni, Léa Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Isolation, Purification and Pharmacological and Biochemical Characterization of a new PLA2 (Bp-12) from Bothrops pauloensis venom

Keywords: • Bothrops

- Neuromuscular junction
- Electrophysiology

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

- Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
- Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci
- Profa. Dra. Márcia Gallacci
- Profa. Dra. Stella Regina Zamunér
- Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Data da defesa: 22 - 07 - 2008



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:
Profe Dro L és Podrigues Simioni
Profa. Dra. Lea Rourigues Simioni
Profa. Dra. Márcia Gallacci Maicia Gallacu
Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci
Profa. Dra. Yoko Oshima Franco Jost Shime June .

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

Data: 22/07/2008

A DEUS,

SENHOR, acima de tudo, obrigada pela existência, a partir dela tudo se iniciou. Tu, SENHOR, conheces todo o meu pensamento e sabe o quanto te adoro e sou temente a ti. Faltam-me palavras para agradecer tudo de bom que faz por mim!

Aos meus pais, Claudimir e Sandra

Obrigada por acreditarem em mim e sempre me apoiarem nos estudos. Vocês foram base dessa construção, sem vocês é como se não existisse um alicerce. Obrigada por tudo que fizeram por mim. Sei dos muitos dias que choraram pela minha ausência. Eu os amo muito!

Ao meu irmão, Sandro

San,

se eu nascesse por mais cem vezes,

eu queria em todas elas ser sua irmã!

Obrigada por ser meu fiel amigo nas horas felizes e difíceis.

Quantos momentos compartilhamos juntos e

eles foram imprescindíveis!

Eu te amo muito... muito!

Ao meu noivo, André

Há quase oito anos atrás eu te conheci, a partir daí o amor foi nascendo, amadurecendo e se fortalecendo, e agora falta pouco para que possamos juntos viver como uma família. Sei o quanto foi paciente com os meus estudos, principalmente nos finais de semana e feriados que ficamos separados. Obrigada pelo seu amor, por me apoiar e acreditar em mim. Eu te amo demais!

Aos meus avós,

José, Paulo e Zuleika

Ai como são lindos! São orgulhosos dos meus estudos e isso já me faz feliz. Sei quantos dias e noites oraram por mim e podem ter certeza de que isso foi fundamental para que todos os obstáculos fossem ultrapassados. Amo muito vocês! Ai, ai, ai... eu não posso esquecer das minhas princesas,

Paula, Ava e Ivi.

Aos mestres...

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pela oportunidade de realizar esse meu sonho de adolescente, um dia chegar a ser doutora. Agradeço também pela amizade, dedicação e conhecimento a mim proporcionado. Nunca me esquecerei disso tudo!

À Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, minha grande amiga, agradeço do fundo do meu coração por ter me apresentado a Unicamp, a Dra. Léa, e ter sido a chave para que eu pudesse ingressar no mundo científico, agora já estou "envenenada". Você é muito especial para mim e serei sempre grata por tudo o que fez por mim! Muito obrigada minha amiga!

À Profa. Dra. Marli Gerenutti, minha grande amiga, agradeço por me apresentar a pesquisa, lá na Iniciação Científica, ainda na graduação. Nossa amizade nasceu de uma relação docente-aluno, mas hoje me sinto a vontade para dizer que somos grandes amigas. Tenho muito a agradecer, pois continua me dando muitas oportunidades e confiando no meu trabalho. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling, pela enriquecedora contribuição no estudo morfológico e auxílio na interpretação dos resultados. Obrigada também pela atenção dispensada em todos os momentos em que a procurei.

À Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci, pela rica contribuição científica e oportunidade de aprendizado em seu laboratório. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Caroline Borja de Oliveira, pela contribuição científica, amizade, sugestões e companheirismo. Você é um exemplo de profissionalismo!

хi

À Profa. Dra. Saraguaci Hernandez de Oliveira e Silva, minha índia Saraguaçu, obrigada pela amizade e companheirismo. Admiro sua força, determinação, coragem e acima de tudo, o seu bom humor.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto, por tornar possível a realização deste trabalho, através da doação da Bp-12. Agradeço também pela paciência, amizade e grande contribuição bioquímica.

Ao Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, pela amizade, pelos conselhos, pela confiança e ensinamentos sobre a eletrofisiologia. Você me mostrou a eletro e eu me apaixonei por ela! Exemplo de sabedoria e profissionalismo!

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, pela amizade, simpatia, por toda a atenção e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela atenção e rica contribuição científica dispensada ao trabalho, além das infinitas correções de inglês.

Aos amigos...

Aos meus grandes amigos, tia Kátia, Geni, Júnior, Fâni, Paula, Priscila, Juliana, Carol e Letíssia, pela amizade, companheirismo e por compartilharem nas horas difíceis e felizes. Vocês moram no meu coração!

À Silsa, Raimundo e Raiamerson, obrigada pela amizade e abrigo, vocês são maravihosos, é impossível retribuir tudo que fizeram por mim. Nunca esquecerei de vocês! Vocês são mais que especiais!

À minha querida amiga Profa. Eni de Jesus Rolim, pela amizade, confiança e por todo ensinamento que me proporcionou. Te admiro muito!

Gildo Bernardo Leite, difícil expressar toda a minha gratidão a um amigo tão formidável, mas vou resumir que... sem a sua ajuda este trabalho não teria sido finalizado. Mil vezes, muito obrigada!

Valdemir de Abreu, grande amigo e companheiro, sempre pronto para ouvir e aconselhar da melhor maneira possível. Um verdadeiro paizão! Foi uma ótima convivência e aprendizado com você. Obrigada pelas infinitas orações!

Charlene Galbiatti, dedicada, preocupada e muito responsável. Uma verdadeira amiga, valeu muito ter a sua amizade. Nunca me esquecerei dos momentos engraçados e felizes! Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim!

À família Galbiatti, Juliana, Tânia e Aleixo, obrigada pela amizade e abrigo, vocês são sensacionais, é impossível recompensar tudo que fizeram por mim. Nunca esquecerei de vocês! Vocês sempre terão um lugar especial no meu coração!

хv

Georgina Sucasaca Mónzon (Perla paraguaia), nunca me esquecerei dessa peruana que mais parece uma paraguaia. O seu jeito calmo de ser sempre nos tranqüiliza, foi muito agradável a nossa convivência. Obrigada pelos ensinamentos bioquímicos!

Mariana Cintra Francischinelli, foi pouco o tempo que convivemos no laboratório, mas o suficiente para marcar uma verdadeira amizade. Torço muito pelo seu sucesso aí na Itália!

Sandro Rostelato, amigo, companheiro, prestativo e muito dedicado. Muitos foram os momentos que passamos juntos, muitas risadas, piadas e cafezinhos na copa. Obrigada pela amizade!

Thomáz Rocha e Silva, um verdadeiro "Indiana Jones", um biólogo nato, companheiro, prestativo e divertido. Obrigada pela amizade!

Mário Oshima, Dimas e Thiago, trio inseparável, o verdadeiro "Clube do Bolinha". Obrigada pela amizade e convivência agradável, vocês são muito divertidos. As terças-feiras são sempre muito agradáveis e descontraídas!

Aos amigos do Laboratório de Histologia, Marta Leonardo, Thalita, Karina, Catarina, Gabriela, Carol e Esdras, agradeço pela contribuição na parte prática de histologia, alegria e companheirismo. Muito obrigada!

Aos amigos do Laquip, Paulinho, Andrana e Frey, sou grata pelos grandes ensinamentos sobre técnicas usadas em bioquímica.

Aos amigos do Laboratório de Edema, Glaúcia, Tatiane e Fábio, agradeço pelos grandes ensinamentos e auxílio na execução do edema de pata.

Aos amigos Wanderlei, Elaine, Fran, Bruna, José Ilton, Toninho, Agnaldo, Adilson, Miguel, Marcos, obrigada pela disposição, ajuda e saudável convivência.

xvii

À Diretoria do Apoio Didático, Científico e Computacional e a Câmara de Pesquisa (Serviço de Estatística) da FCM, pelos excelentes serviços prestados. Sou muito grata aos amigos: Mercedes, Alexandre, Marcos, Mário, Cleide e Helymar.

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.

Aos animais que doaram a vida à pesquisa.

À Unicamp, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao CNPQ pelo suporte financeiro concedido.

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

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!

(SI. 139: 1-17)

	Pág.
RESUMO	xxxix
ABSTRACT	xliii
1- INTRODUÇÃO	47
1.1- Aspectos epidemiológicos	49
1.2- Gênero <i>Bothrops</i>	50
1.3- Bothrops neuwiedi	52
1.4- Bothrops pauloensis	54
1.5- Fosfolipase A ₂ homólogas Lys49	60
1.6- Miotoxinas	61
2- OBJETIVOS	65
2.1- Objetivo geral	67
2.2- Objetivos específicos	67
3- MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1- Venenos e reagentes	71
3.2- Animais	71
3.3- Ensaios bioquímicos	71
3.3.1- Purificação em HPLC de fase reversa	71
3.3.2- Eletroforese em SDS-PAGE	72
3.3.3- Espectrometria de massa por Maldi-Tof	72
3.3.4- Determinação da atividade fosfolipásica	72
3.3.5- Análise de aminoácidos	73

3.3.6- Determinação da estrutura primária	73
3.4- Ensaios farmacológicos	74
3.4.1- Preparação biventer cervicis de pintainho	74
3.4.2- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo	75
3.4.3- Estudo eletrofisiológico	76
3.4.3.1- Registro do potencial de membrana em repouso	76
3.4.3.2- Registro do potencial de placa terminal	77
3.4.3.2.1- Técnica <i>cut muscle</i>	77
3.4.3.2.2- Análise dos potenciais de placa terminal	77
3.4.4- Análise histológica quantitativa (microscopia óptica)	79
3.4.5- Determinação da atividade de CK plasmático em camundongos	79
3.4.6- Determinação da atividade edematogênica	80
3.5- Análise estatística	80
4- RESULTADOS	83
4.1- Ensaios bioquímicos	85
4.1.1- Perfis cromatográfico e eletroforético	85
4.1.2- Espectrometria de massa por Maldi-Tof	86
4.1.3- Determinação da atividade fosfolipásica	87
4.1.4- Análise de aminoácidos	88
4.1.5- Estudo de homologia seqüencial	91
4.2- Ensaios farmacológicos	93
4.2.1- Preparação biventer cervicis de pintainho	93
4.2.2- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo	94

4.2.3- Estudo eletrofisiológico	
4.2.3.1- Medida e análise do potencial de membrana em	
repouso	99
4.2.3.2- Medida e análise do potencial de placa terminal	100
4.2.4- Análise histológica quantitativa	102
4.2.5- Determinação da atividade de CK plasmático em	
camundongos	105
4.2.6- Determinação da atividade edematogênica em ratos	106
5- DISCUSSÃO	109
6- CONCLUSÃO	119
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
8- ANEXO	141

ACh	Acetilcolina
a.a.	Aminoácido
ATF	Ácido trifluoroacético
B. n. pauloensis	Bothrops neuwiedi pauloensis
B. pauloensis	Bothrops pauloensis
BCP	Biventer cervicis de pintainho
BthTX-I	Bothropstoxina-I
Ca ²⁺	Íon cálcio
СК	Creatinoquinase
d-Tc	d-Tubocurarina
DTT	Ditiotreitol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
JNM	Junção neuromuscular
КСІ	Cloreto de potássio
m	Conteúdo quântico
Maldi-Tof	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
NFD	Nervo frênico-diafragma
pl	Ponto isoelétrico

PLA ₂	Fosfolipase(s) A ₂		
PM	Potencial de membrana em repouso		
PPT	Potencial de placa terminal		
РРТМ	Potencial de placa terminal em miniatura		
PsPT	Potenciais de placa terminal		
PsPTM	Potenciais de placa terminal em miniatura		
PTC	Feniltiocianato		
PTH	Feniltiohidantoína		
q	Tamanho quântico		
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida		

Pág.

Tabela 1	Incidência de acidentes ofídicos por regiões brasileiras, ano de 2003	49
Tabela 2	Características gerais das diferentes PLA ₂ isoladas do veneno de <i>B. pauloensis</i>	59
Tabela 3	Composição de aminoácidos da Bp-12	89
Tabela 4	Lista de abreviaturas dos aminoácidos	90
Tabela 5	Tempo necessário para obtenção de 50 % de bloqueio da resposta contrátil em preparação NFD, sob estimulação elétrica indireta, incubada com a Bp-12	97
Tabela 6	Tempo necessário para obtenção de 50 % de bloqueio da resposta contrátil e % de contratura em preparação NFD, incubada com Bp-12	99
Tabela 7	Efeito da Bp-12 sobre o conteúdo quântico dos PsPT obtido em preparação NFD de camundongo em temperatura ambiente	101
Tabela 8	Efeito da Bp-12 sobre o tamanho quântico dos PsPT obtido em preparação NFD de camundongo em temperatura ambiente	102
Tabela 9	Efeito da Bp-12 sobre a amplitude dos PsPT obtido em preparação NFD de camundongo em temperatura ambiente	102
Tabela 10	Determinação da porcentagem de fibras lesadas em músculo diafragma, após 120 min de exposição aos tratamentos	105
Tabela 11	Comparação das características gerais da Bp-12 com as diferentes PLA ₂ isoladas do veneno de <i>B. pauloensis</i>	108

Pág.

Figura 1	Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos	
	por venenos das serpentes da família Viperidae	51
Figura 2	A serpente Bothrops pauloensis	55
Figura 3	Distribuição geográfica da serpente <i>B. pauloensis</i> no Brasil	56
Figura 4	Classificação e características gerais de miotoxinas de venenos ofídicos	63
Figura 5	Perfil cromatográfico do veneno de <i>B. pauloensis</i> em HPLC de fase reversa otimizada	86
Figura 6	Espectrometria de massa da Bp-12	87
Figura 7	Atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. pauloensis</i> e da Bp-12	88
Figura 8	Alinhamento da seqüência completa de aminoácidos da Bp-12 com outras PLA ₂ Lys49	92
Figura 9	Efeito da Bp-12 em preparação BCP, sob estimulação elétrica indireta, a 37 °C	94
Figura 10	Curva da resposta contrátil da preparação NFD, sob estimulação elétrica indireta, após a adição de Bp-12, a 37 °C	96
Figura 11	Bloqueio neuromuscular de preparações NFD incubadas com Bp-12 (▲) ou solução de Tyrode (●)	98
Figura 12	Medida do PM da preparação músculo diafragma de camundongo incubada com Bp-12	100
Figura 13	Morfologia do músculo diafragma em corte transversal, incubados com solução de Tyrode, <i>B. pauloensis</i> ou Bp-12	104

Figura 14	Representação gráfica da atividade miotóxica da Bp-12 injetada		
	pelas vias i.m. (miotoxicidade local) e i.v. (miotoxicidade		
	sistêmica) em camundongos10		
Figura 15	Determinação da atividade edematogênica em ratos induzida		
	pela Bp-12	107	

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 estudo foi o de contribuir para o conhecimento sobre a caracterização bioquímica e farmacológica da Bp-12, uma nova miotoxina do veneno de *B. pauloensis*. O perfil cromatográfico do veneno evidenciou 18 picos, o pico 12 (Bp-12) refere-se a nova fração estudada, uma vez que em ensaios preliminares apresentou efeito sobre a JNM. O perfil eletroforético da Bp-12 mostrou a presença de uma única banda protéica com aproximadamente 14 kDa, confirmado pela espectrometria de massa (13.789,56 Da). A composição de aminoácidos apresentou alto conteúdo dos resíduos, Lys, Tyr, Gly, Pro e Cys, típicos de PLA₂ básicas. A Bp-12 possui 122 resíduos de a.a.: SLFELGKMIL QETGKNPAKS LGAFYCYCGW GSQGQPKDAV DRCCYVHKCC YKKITGCNPK KDRYSYSWKD KTLVCGEDNS CLKELCECDK AVAICLRENL NTYNKKYRYF LKPLCKKADA AC, com pl de 8,55 e uma alta homologia com outras PLA₂ Lys49 botrópicas (92,6 %).

A preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo foi mais sensível à ação da toxina do que a preparação biventer cervicis de pintainho. Em preparações NFD, a Bp-12 (3,6 μ M) induziu 50% de bloqueio em 17 ± 7 min, inibindo completamente a resposta contrátil a estímulos indiretos (120 min, 37 °C); o bloqueio neuromuscular irreversível também foi observado, quando o Ca²⁺ foi substituído pelo Sr²⁺ na solução de Tyrode, quando a preparação foi curarizada (estímulo direto) ou quando submetida à baixa temperatura (22 °C). O registro do PM mostrou que a partir de 15 min de incubação com a Bp-12 (3,6 μ M) ocorreu uma progressiva despolarização da membrana, com valores de -20,2 ± 1 mV (90 min, p<0,05). Após 60 min de incubação, o efeito da Bp-12 (3,6 μ M) sobre os valores do conteúdo e tamanho quântico e amplitude média foram respectivamente: 50 ± 8; 0,09 ± 0,01 e 3,0 ± 0,3 mV, estes não foram significativamente diferentes quando comparados com os valores controle (68 ± 9; 0,07 ± 0,01 e 3,3 ± 0,2 mV).

Nos estudos de miotoxicidade, após 120 min de incubação com 50 μ g/mL de veneno de *B. pauloensis* ou de Bp-12, o músculo diafragma apresentou áreas de mionecrose da ordem de 26 ± 2 % e 27 ± 1 % (p<0,05), respectivamente. Os níveis de CK plasmático aumentaram significativamente após a administração intramuscular de Bp-12, sendo: 827 ± 92 U/L (50 μ g) e 225 ± 36 U/L (20 μ g) *versus* 48,3 ± 8 U/L (controle), entretanto, com a via intravenosa não houve aumento significativo, mostrando que a Bp-12 não produz miotoxicidade sistêmica.

A Bp-12 (2,5; 5,0 e 10,0 μ g/pata) induziu edema de pata dependente da dose, caracterizada por apresentar início de ação rápido, em torno de 30 min, sendo: 0,4 \pm 0,02 mL; 0,6 \pm 0,05 mL e 0,7 \pm 0,07 mL, respectivamente; também foi calculada a área sob a curva para cada dose injetada, cujos valores foram (mL.h): 0,5 \pm 0,02 (salina); 0,9 \pm 0,11; 1,3 \pm 0,15 e 1,7 \pm 0,19, respectivamente.

Conclui-se que a Bp-12 é uma nova PLA₂ Lys49 miotóxica, de caráter básico, com baixa atividade catalítica, que induz bloqueio neuromuscular irreversível dependente do tempo e da concentração e que apresenta atividades farmacológica e bioquímica características de miotoxinas botrópicas.

ABSTRACT

The myotoxic effects caused by bothropics venoms are unquestionable by their exuberant clinic manifestation and are extensively related in literature, since the neurotoxic effects have been described *in vitro* conditions, in nerve-muscle preparations, with little or neither clinic evidence. The aim of this study was to contribute for the knowledge about the pharmacological and biochemical characterization of Bp-12, a new myotoxin from *B. pauloensis* snake venom.

The elution profile of *B. pauloensis* crude venom after purification in one chromatographic step presented eighteen peaks ranging from Bp-1 to Bp-18. Peak 12 was named Bp-12 and resulted in one small peak with a retention time of 37 min, eluting at 56% of buffer B. The SDS-PAGE gel showed one electrophoretic band, indicating that this toxin was obtained with high homogeneity and a molecular mass of around 14 kDa, confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry, which showed that the protein had a molecular mass of 13789.56 Da. The amino acids composition showed that Bp-12 presented high content of Lys, Tyr, Gly, Pro, and 14 half-Cys residues, typical of a basic PLA₂. The sequence of Bp-12 contains amino acid residues: SLFELGKMIL QETGKNPAKS LGAFYCYCGW 122 GSQGQPKDAV DRCCYVHKCC YKKITGCNPK KDRYSYSWKD KTLVCGEDNS CLKELCECDK AVAICLRENL NTYNKKYRYF LKPLCKKADA AC, with a pl value of 8.55 and with a high homology with Lys49 PLA₂ from other bothropics venoms. In mouse phrenic nerve-diaphragm (PND), the time needed for 50% paralysis was 17 ± 7 min (3.6 µM). Bp-12 can induce indirect and directly blocked evoked twitches, even in the preparations in which Ca^{2+} is replaced by Sr^{2+} or low temperature (22 °C), being the addition of d-tubocurarine required for direct blocking. The resting membrane potential showed that after 15 min of incubation with Bp-12 (3.6 μ M), progressive despolarization decreased from -83.9 \pm 1 mV to $-20.2 \pm 1 \text{ mV}$ (90 min, p<0.05). Intracellular recordings of endplate potentials (EPPs) from mouse diaphragm preparations revealed that Bp-12 did no alter the quantal content (50 \pm 8, t₆₀, p>0.05 of the control).

Incubation with Bp-12 (50 μ g/mL) or *B. pauloensis* (50 μ g/mL) for 120 min damaged 26 ± 2 % and 27 ± 1 % (p<0,05), respectively. Bp-12 (20 and 50 μ g/50 μ L) has significantly increased the release of CK levels in the serum after 60 min of i.m. administration, being the values: 827 ± 92 U/L and 225 ± 36 U/L (20 μ g/mL). However, i.v. administration has not presented significant increased.

Bp-12 (2.5 - 10.0 μ g/paw) induced local oedema formation in rat paw *in vivo* at around 30 min, being found the values of: 0.4 ± 0.02 mL (2.5 μ g/paw), 0.6 ± 0.05 mL (5.0 μ g/paw) and 0.7 ± 0.07 mL (10.0 μ g/paw).

In conclusion, Bp-12 is a new myotoxic PLA₂ (Lys49), with low catalitic activity, that is able to induce irreversible neuromuscular blockade and presents biochemical and pharmacological activities characteristic of bothropics miotoxins.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos epidemiológicos

O número de notificações de ofidismo vem aumentando ano a ano. Em 2003, por exemplo, foram registrados 25.478 acidentes, correspondendo à incidência de 15 casos por 100 mil habitantes (Brasil, 2005).

Regiões	N° de notificações
Norte	7.073
Nordeste	6.117
Sudeste	6.840
Sul	2.741
Centro-Oeste	2.627
Total	25.478

Tabela 1- Incidência de acidentes ofídicos por regiões brasileiras, ano de 2003(Brasil, 2005)

Obs.: 80 casos sem identificação.

Uma vez que nem sempre é possível identificar a serpente causadora do acidente, o diagnóstico do tipo de envenenamento é baseado em critérios clínico e epidemiológico. Assim, dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas (*Micrurus, Crotalus, Lachesis* e *Bothrops*) verifica-se o predomínio do acidente botrópico, que corresponde a 87,5 % dos casos ofídicos notificados no país, seguidos pelo crotálico (9,2 %), laquético (2,7 %) e elapídico (0,6 %), com pequenas variações de acordo com a região e distribuição geográfica das serpentes (Brasil, 2005).

Os viperídeos representam o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria e pelos mais graves acidentes ofídicos registrados, não só no Brasil, mas também em outros países americanos (Melgarejo, 2003).

1.2- Gênero Bothrops

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

Essas serpentes habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas, 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 ruídos. São conhecidas popularmente por "jararaca", "jararacuçu", "urutu-cruzeiro", "cotiara", "jararaca-do-rabo-branco", "malha-de-sapo", "patrona", "surucucurana", "combóia", "caiçara", 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 sangüínea, 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 maneira geral, o quadro clínico dos pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops* consiste, sobretudo, de distúrbios da coagulação, edema e necrose local (Brazil, 1911; Homma e Tu, 1971; Rosenfeld, 1971; Jiménez-Porras, 1973). As principais causas de óbito estão relacionadas à insuficiência renal aguda e choque (Rothschild e Rothschild, 1979; Amaral et al., 1986; Kouyoumdjian et al., 1991). Indiscutivelmente, ainda há uma série de incógnitas com relação à patogênese destes efeitos, que ainda permanecem como um desafio para a pesquisa toxinológica na América Latina (Gutiérrez e Lomonte, 2003) (Figura 1).



Figura 1- Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos das serpentes da família Viperidae (Gutiérrez e Lomonte, 2003).

Entretanto, estudos têm demonstrado que a peçonha de veneno botrópico pode apresentar efeitos específicos sobre preparações neuromusculares isoladas, induzindo bloqueio da resposta muscular evocada, ou ainda, produzindo sinais de neurotoxicidade em aves *in vivo* (Zamunér et al., 1996). Esses efeitos passaram a ser descritos a partir do estudo do veneno de *Bothrops jararacussu* (*B. jararacussu*) em preparações neuromusculares de rã (Rodrigues-Simioni et al., 1983), no qual os autores observaram que o veneno inibia as contrações musculares evocadas direta e indiretamente e abolia o potencial de ação composto do nervo e do músculo. Após o fracionamento do veneno, estas atividades foram reproduzidas por uma subfração, denominada Pool IV, composta de dois polipeptídios com um peso molecular de aproximadamente 14 kDa, que continha 30 % do conteúdo protéico do veneno total. A fração ativa

apresentava baixos níveis de atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂), era desprovida de atividade proteolítica e induzia um rápido e pronunciado efeito despolarizante. Este último foi considerado o responsável pelo bloqueio do potencial de ação composto. Mais tarde, o Pool IV foi purificado e caracterizado como uma miotoxina, a bothropstoxina-I (BthTX-I), com estrutura PLA₂, desprovida de atividade catalítica, componente responsável pela atividade miotóxica do veneno bruto (Homsi-Brandeburgo et al., 1988; Cintra et al., 1993).

A partir do início de 1980, vários estudos demonstraram que além do efeito miotóxico associado à atividade PLA₂ (Gutiérrez e Lomonte, 1995), os venenos de várias espécies botrópicas, incluindo: *B. jararacussu* (Rodrigues-Simioni et al., 1983, 1995; Heluany et al., 1992), *B. insularis* (Cogo et al., 1993, 1998; Rodrigues-Simioni et al., 2004), *B. lanceolatus* (Lôbo-de-Araújo et al., 2002), *B. neuwiedi* (Zamunér et al., 1996, 2004), *B. pirajai* (Costa et al., 1999), *B. leucurus* (Prianti et al., 2003) induziram também um bloqueio neuromuscular na preparação nervo-músculo *in vitro*.

1.3- Bothrops neuwiedi

A serpente *Bothrops neuwiedi* (*B. neuwiedi*) agrupa na verdade, um complexo de espécies, tradicionalmente tratado como uma única espécie com 12 subespécies (inclusive a atual *Bothrops pauloensis*, anteriormente denominada *Bothrops neuwiedi pauloensis*), a maioria presente no Brasil. Um estudo eletroforético de proteínas do plasma das seis subespécies mais comuns do Brasil mostrou a existência de dois grandes grupos, que, segundo os autores, também se diferenciam na morfologia externa (Melgarejo, 2003). Silva (2000) fez ampla revisão morfológica de mais de 1.050 exemplares das 71 amostras mais representativas da área de ocorrência dessa espécie, incluindo na análise, a espécie *Bothrops iglesiasi*. Esse autor propôs a sinonimização em 7 espécies, incluindo uma nova, atualmente em fase de descrição, a *Bothrops* sp ("marmoreado").

Resumidamente, **Bothrops** neuwiedi reúne agora as antigas subespécies Bothrops neuwiedi goyazensis, Bothrops neuwiedi meridionalis, Bothrops neuwiedi paranaensis e Bothrops neuwiedi urutu, distribuídas nos estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Paraná; com **Bothrops diporus** eleva à espécie a subespécie homônima, distribuída na Argentina e nos estados do Sul do Brasil; Bothrops lutzi, distribuída principalmente nos estados do Piauí e da Bahia, sinonimiza, além da homônima, as subespécies Bothrops neuwiedi neuwiedi, Bothrops neuwiedi piahuyensis, e a espécie Bothrops iglesiasi; Bothrops mattogrosensis compreende as subespécies Bothrops neuwiedi mattogrosensis e Bothrops neuwiedi bolivianus, e se distribui pelos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, além da Bolívia; **Bothrops pauloensis** eleva à espécie a subespécie homônima, encontrada principalmente em São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul; Bothrops pubescens compreende a subespécie homônima e se distribui no Rio Grande do Sul e no Uruguai; e finalmente a Bothrops sp ("marmoreado") compreende a espécie em descrição, distribuída em Goiás, Tocantins e parte de Minas Gerais. Este complexo, como visto, está presente numa vasta extensão territorial da América do Sul, que, além de boa parte do Brasil, com exceção da bacia Amazônica, compreende a Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Melgarejo, 2003).

Estas serpentes habitam ambientes úmidos (como matas e áreas cultivadas), locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferia de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos e são consideradas importantes do ponto de vista epidemiológico, pelo número de acidentes registrados (Melgarejo, 2003).

Vários estudos têm sido realizados com o veneno total de *B. neuwiedi*, visando conhecer suas propriedades e composição. Nestes estudos, diversas PLA₂ com diferentes características e atividades biológicas foram isoladas desse veneno. Inicialmente, Vidal e Stoppani (1971), purificaram desse veneno duas proteínas com atividades PLA₂ (P-1 e P-2), correspondentes ao segundo e terceiro picos do perfil cromatográfico.

Mais tarde, Moura-da-Silva et al. (1991) isolaram proteínas básicas com atividades PLA₂ e miotóxica de alguns venenos botrópicos, incluindo o de *B. neuwiedi*. Em seguida, três PLA₂ enzimaticamente ativas, com importante atividade edematogênica foram isoladas do veneno de *B. neuwiedi*, sendo seqüenciadas suas regiões N-terminal. As seqüências determinadas apresentaram alta homologia com PLA₂ isoladas de *Crotalus atrox* e os autores sugeriram sua inclusão no grupo II de PLA₂ (Daniele et al., 1995, 1997).

Zamunér et al. (1996), verificaram que o veneno de *B. neuwiedi* causava flacidez do pescoço, perda do tônus muscular e insuficiência respiratória em ave, além de bloqueio da resposta contrátil em preparações isoladas de aves, sem afetar os receptores nicotínicos.

Continuando os estudos de purificação bioquímica do veneno total de *B. neuwiedi*, Geoghegan et al. (1999) purificaram uma PLA₂ miotóxica, a qual denominaram miotoxina-I, que apresentou atividade edematogênica e não foi letal quando injetada via intraperitoneal em camundongos. A miotoxina-I não apresentou atividade enzimática e sua seqüência N-terminal exibiu uma alta homologia com as miotoxinas Lys49 de crotalídeos do grupo II de PLA₂. Este breve histórico ressalta a importância dos acidentes causados por esta serpente.

1.4- Bothrops pauloensis

A *Bothrops pauloensis* é uma serpente de pequeno a médio porte, dificilmente ultrapassando um metro de comprimento; são nervosas e muito ágeis, embora pequenas, produzem um bom número de acidentes (Figura 2). São encontradas principalmente em São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Melgarejo, 2003) (Figura 3).



Figura 2- A serpente Bothrops pauloensis¹

¹Fonte: Copyrigth by Ricardo J. Sawaya



Figura 3- Distribuição geográfica da serpente *B. pauloensis* no Brasi²

²Fonte: http://www.proto.ufsc.br/manualpeconhentos.pdf

Na última década, vários estudos sobre a ação farmacológica da Bp-12 foram acrescentados, trazendo uma rica contribuição para a compreensão da fisiopatologia deste veneno. Borja-Oliveira et al. (2002) confirmaram as observações feitas por Zamunér et al. (1996) em preparações neuromusculares isoladas de aves sobre o efeito pré-sináptico do veneno de *B. neuwiedi*, verificando que esse efeito não era encontrado em todos os lotes de veneno de diferentes procedências, mas da mesma espécie. Os autores observaram também que, os venenos mais potentes em produzir bloqueio neuromuscular apresentavam em seu perfil eleroforético uma banda extra.

Continuando os estudos, Borja-Oliveira et al. (2003) demonstraram a neurotoxicidade do veneno de *B. neuwiedi pauloensis*, agindo primariamente em sítios pré-sinápticos, e que a atividade enzimática poderia estar envolvida nesta ação farmacológica. Posteriormente, evidenciando a ação pré-juncional do veneno de *B. neuwiedi pauloensis*, Durigon et al. (2005) relataram aumento da freqüência de PPTM e a presença de PsPTM gigantes em músculo diafragma isolado de camundongo, incubado com o veneno total. Esses achados demonstraram que, na verdade, alguns venenos botrópicos podem ser capazes de produzir neurotoxicidade, ainda que esse fato não tenha sido evidenciado clinicamente.

Numa outra linha, Izidoro et al. (2003) verificaram que o extrato aquoso das folhas de *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae), uma planta brasileira, possui componentes capazes de inibir algumas alterações hematológica e sistêmica induzidas pelo veneno total de *B. neuwiedi pauloensis*.

O estudo do modo de ação dos venenos ofídicos sofreu um grande progresso, quer pelo emprego de variados métodos e técnicas de investigação farmacológica, quer pela separação dos constituintes das peçonhas em estado de pureza. No que se refere a este último item, o veneno de *B. pauloensis*, em particular, foi fracionado pela primeira vez por Rodrigues et al. (1998) que relataram a presença de duas proteínas com estruturas PLA₂ homólogas Lys49, denominadas BnSP-6 e BnSP-7, capazes de bloquear a resposta contrátil na junção neuromuscular, de induzir severa mionecrose e de induzir atividade
edematogênica. Posteriormente, a miotoxina BnSP-7 foi cristalizada, e verificaram que esta é constituída por duas móleculas na unidade assimétrica e que promove ruptura da membrana celular independente da atividade catalítica (Fontes et al., 1999; Soares et al., 2000; Magro et al., 2003).

Soares et al. (2000) deram continuidade aos achados de Rodrigues et al. (1998), revelando algumas características funcionais da BnSP-7 (PLA₂ Lys49 miotóxica) como, por exemplo, o bloqueio neuromuscular irreversível, bem como a neutralização total desse efeito pela heparina, a ruptura da membrana celular independente de cálcio, as atividades bactericida e edematogênica, e a liberação de CK plasmático dependente da dose.

Mais tarde, outras duas proteínas foram isoladas do veneno de *B. pauloensis*, a BnpTX-I e a BnpTX-II (ambas PLA₂ Asp49 miotóxicas), as quais induziram bloqueio neuromuscular irreversível em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, mionecrose, significativa liberação de CK plasmático, efeito citotóxico *in vitro*, edema de pata em rato e atividade bactericida, sugerindo que a atividade enzimática é importante para esses efeitos farmacológicos (Rodrigues et al., 2004).

Recentemente, duas PLA_2 (Asp49) pré-sinápticas, denominadas NeuTX-I e NeuTX-II foram isoladas do veneno de *B. pauloensis*, ambas produziram bloqueio neuromuscular irreversível em preparação biventer cervicis de pintainho, sob estímulo indireto, sem afetar o receptor nicotínico. Os autores sugeriram que a NeuTX-I e -II fossem incluídas em duas classes de toxinas: (1) no grupo II de PLA₂ de venenos, que agrupa aquelas encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae e (2) no grupo das β-neurotoxinas, que agrupa as PLA₂ neurotóxicas pré-sinápticas com atividade enzimática (Borja-Oliveira et al., 2007).

Nessa mesma linha, Rodrigues et al. (2007) isolaram e caracterizaram bioquímica e farmacologicamente uma nova PLA₂ Asp49 miotóxica do veneno de *B. pauloensis*, denominada Bp-PLA₂, e verificaram que esta toxina induziu

atividades hemolítica indireta, edematogênica e miotóxica, e inibiu a agregação plaquetária; além disso, os autores sugeriram que a conservação do resíduo His48 nessa miotoxina é essencial para a expressão de todas as atividades observadas.

Como se percebe, muitos esforços têm sido envidados para o entendimento do modo de ação das PLA₂ obtidas do veneno de *B. pauloensis*, com o objetivo de contribuir para o estudo das toxinas em geral (Tabela 2). Neste sentido, o presente projeto consistiu em prosseguir as investigações sobre esse veneno, estudando uma nova PLA₂, com o objetivo de contribuir para o esclarecimento da gênese do efeito tóxico do veneno de *B. pauloensis* no acidente ofídico.

Tovinas PLA.		Carátar	Da	nl	Atividade	Atividade	Bloqueio	Mianaaraaa	Atividade	Poforôncio		
TOXINAS	FLA ₂	Caraler	Da	μ	Catalítica	edematogênica	neuromuscular	MIONECIOSE	СК	nelerencia		
BnSP-6	Lys49	básico	~14.000	8,6	-	+	BCP	+	nd	Rodrigues		
										et al., 1998		
BnSP-7	Lys49	básico	13.727	8,9	-	+	BCP	+	+	Rodrigues		
										et al., 1998;		
										Soares		
										et al., 2000		
BnpTX-I	Asp49	básico	~14.000	7,8	+	+	NFD	+	+	Rodrigues		
										et al., 2004		
BnpTX-	Asp49	básico	~14.000	nd	+	+	NFD	+	+	Rodrigues		
П										et al., 2004		
NeuTX-I	Asp49	nd	~14.000	nd	+	nd	BCP	nd	nd	Borja-Oliveira		
										et al., 2007		
NeuTX-	Asp49	nd	~14.000	nd	+	nd	BCP	nd	nd	Borja-Oliveira		
П										et al., 2007		
Bp-	Asp49	ácido	15.800	4,3	+	+	nd	+	+	Rodrigues		
PLA ₂										et al., 2007		

Tabela	2-	Características	gerais	das	diferentes	PLA_2	isoladas	do	veneno	de
		B. pauloensis.								

nd = não determinado; (+) com atividade; (-) sem atividade.

1.5- Fosfolipases A₂ homólogas Lys49

As fosfolipases A₂ (PLA₂) de venenos de serpentes exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos, entre eles, neurotoxicidade pré- e pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos anticoagulantes, atividade hemolítica, atividade edematizante, entre outras (Kini, 2003; Gutiérrez e Lomonte, 2003).

As PLA₂ são macromoléculas que possuem aproximadamente 110 a 135 resíduos de aminoácidos e são divididas em: PLA₂ miotóxica Asp49 (D49), cataliticamente ativas e as PLA₂ homólogas ou "like" que têm no lugar de Asp49, uma Lys49 (K49) e que são cataliticamente inativas (Fletcher et al., 1996).

O modo de ação muscular de ambas, Lys49 e Asp49 é diferente, mas, em geral, elas podem causar rápida lise do sarcolema levando a um estado de mionecrose. O papel da atividade catalítica destas miotoxinas é controverso e não está totalmente esclarecido, já que as miotoxinas PLA₂ homólogas Lys49 não possuem uma atividade lipolítica, portanto, outros mecanismos devem estar envolvidos na expressão da atividade miotóxica (Fletcher et al., 1996).

Várias miotoxinas isoladas nestes últimos anos têm sido caracterizadas como proteínas de massa molecular em torno de 13 kDa. Estas PLA₂ homólogas (tanto Asp49 como Lys49) possuem um potente efeito miotóxico e se caracterizam pelo seu forte caráter associativo em dímeros, que é a forma mais comum de polimerização encontrada para as PLA₂ miotóxicas, e eventualmente em tetrâmeros (Arni e Ward, 1996).

As PLA₂ miotóxicas têm sido objeto de muitos estudos, pois correspondem aproximadamente a 30 % do veneno total, sendo as toxinas mais abundantes que existem no veneno das serpentes botrópicas. Apesar da homologia, as PLA₂ de venenos ofídicos possuem diferenças biológicas extremamente acentuadas, desde sua atividade tóxica até ao evento farmacológico desencadeados nos sistemas biológicos.

Até o presente momento, existem poucas PLA₂ sem ou com baixa atividade catalítica, que foram intensamente estudadas em modelos biológicos, para a compreensão de diversos eventos farmacológicos, como por exemplo, a miotoxicidade. Desta forma, o isolamento e a caracterização de PLA₂ Lys49 é importante como uma ferramenta molecular e modelo para ilustrar aspectos que ajudem a elucidar os eventos farmacológicos ligados a ação de venenos e de suas toxinas.

1.6- Miotoxinas

Miotoxinas são componentes de venenos que atuam especificamente sobre o músculo esquelético, sem afetar outras estruturas, como o tecido conjuntivo e o nervo. A rápida ruptura das células musculares é seguida por uma série de eventos degenerativos, os quais são similares para várias PLA₂ miotóxicas, independentemente de sua fonte e da presença ou ausência de atividade catalítica (Mebs e Ownby, 1990).

O termo miotoxicidade local pode ser aplicado a toxinas que produzem degeneração do músculo no local da injeção ou após a incubação em preparações neuromusculares isoladas (Gopalakrishnakone et al., 1997). Como exemplo, a BthTX-I, uma miotoxina PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, que produz contratura, bloqueio da resposta contrátil a estímulo elétrico indireto e direto, despolarização do sarcolema em preparações neuromusculares isoladas de camundongo, bem como alterações morfológicas das fibras musculares de rã, preservando terminal nervoso (Rodrigues-Simioni 1983; 0 et al., Homsi-Brandeburgo et al., 1988; Heluany et al., 1992).

Em vários casos, a mionecrose local pode provocar seqüelas drásticas, como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação do membro afetado (Milani et al., 1997; Otero et al., 2002).

Por outro lado, a miotoxicidade sistêmica pode provocar mioglobinúria e insuficiência renal aguda, uma causa freqüente de morte por picada de serpente do gênero *Crotalus* (Azevedo-Marques et al., 1985).

As miotoxinas dos venenos de serpentes são classificadas em três grupos principais que constituem famílias de proteínas estruturalmente distintas (Harris e Cullen, 1990; Lomonte et al., 2003). Estas incluem: (1) pequenas miotoxinas, (2) cardiotoxinas e (3) miotoxinas PLA₂ (Figura 4). As miotoxinas PLA₂ formam um grande grupo que pode ser subdividido em miotoxinas neurotóxicas e não-neurotóxicas (Mebs e Ownby, 1990). Gutiérrez e Cerdas (1984) acrescentaram um quarto grupo, as (4) toxinas hemorrágicas, que podem danificar indiretamente as fibras musculares esqueléticas, provavelmente por isquemia.

As miotoxinas não-neurotóxicas são mais comumente encontradas em venenos viperídeos e crotalídeos, podendo ser classificadas em: PLA₂ Asp49, que catalisa ligações éster na posição *sn*2 de glicerofosfolipídios e PLA₂ Lys49 ou "PLA₂-like" que são desprovidas de atividade catalítica (Lomonte et al., 2003). Em contraste com as miotoxinas neurotóxicas, as miotoxinas não-neurotóxicas possuem altos valores de DL₅₀ (Gutiérrez et al., 1986; Rosenberg, 1990; Ângulo et al., 1997; Andrião-Escarso et al., 2000; Soares et al., 2000), por isso seu efeito letal é de pouca relevância (Lomonte et al., 1985).

As miotoxinas neurotóxicas são comumente encontradas em venenos elapídicos, possuem valores de DL_{50} extremamente baixos, característica importante no efeito letal, exibem potente efeito pré-sináptico na junção neuromuscular (Rosenberg, 1990), um exemplo bem característico deste grupo de miotoxinas PLA₂ neurotóxicas é a notexina do veneno de *Notechis scutatus scutatus*, uma serpente elapídica australiana (Harris et al. 1975; Dixon e Harris, 1996).





Figura 4- Classificação e características gerais de miotoxinas de venenos ofídicos (Lomonte et al., 2003)

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

• Fracionar o veneno de *Bothrops pauloensis* e selecionar uma nova fração ativa na junção neuromuscular.

2.2- Objetivos específicos

- Isolar, purificar e caracterizar bioquimicamente a nova fração (Bp-12) obtida do veneno de *Bothrops pauloensis*.
- Estudar os efeitos da fração Bp-12 em mamíferos (*in vivo* e *in vitro*), através dos estudos:
 - da atividade miotóxica;
 - da atividade neurotóxica;
 - da atividade edematogênica.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Veneno e reagentes

O lote de veneno de *Bothrops pauloensis* utilizado neste trabalho foi resultante de um "pool" da mesma espécie, adquirido do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda. (Fazenda Boa Esperança, Batatais/São Paulo). Todos os reagentes e sais com alto grau de pureza foram obtidos dos laboratórios: Sigma-Aldrich Chemicals, Synth, Merck e Bio Rad. Kits de creatinoquinase CK-NAC (Bioclin/Quibasa, Brasil) e de historesina (Leika NuBloch/Heidelberg, Alemanha).

3.2- Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando de 18 a 25 g, ratos machos da linhagem Wistar, pesando de 150 a 180 g, ambos fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp; e pintainhos da linhagem HY LINE W36, pesando de 40 a 50 g (4 a 8 dias), fornecidos pela Globo Aves Ltda. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (protocolo nº 939-2, anexo 1).

3.3- Ensaios bioquímicos

3.3.1- Purificação em HPLC de fase reversa

A quantidade de 20 mg do veneno total de *B. pauloensis* foi aplicada em uma coluna HPLC de fase reversa. O sistema cromatográfico utilizado foi o HPLC PDA-991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um "loop" de 2,0 mL e uma coluna μ -Bondapak C18 0,78 X 30 cm (analítica), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1 %, pH 3,5 (Tampão A). Inicialmente, a eluição das amostras foi realizada por meio de um gradiente linear com acetonitrila 66,5 % (Tampão B). O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações coletadas foram liofilizadas, estocadas a -20 °C.

3.3.2- Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), as placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5 % e um gel de corrida de 12,5 % de acrilamida estoque. Para o gel de concentração foi usado o tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, enquanto para o gel de corrida foi usado o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1 % (v/v) de SDS (dodecilsulfato de sódio) 20 %.

A corrida eletroforética foi realizada em um Sistema High Small II SE 250 (Hoefer Scientific). As amostras e os marcadores foram dissolvidos no tampão de amostra (Tris-HCI, 0,075 M, pH 6,8; 10 % glicerol; 4 % SDS; 0,001 % azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada usando-se uma amperagem constante de 30 mA, durante 60 min. Ao final da eletroforese, os géis foram corados com solução azul de Coomassie 0,05 % a 37 °C e o excesso do corante removido com ácido acético 7 %.

3.3.3- Espectrometria de massa por Maldi-Tof

A massa molecular da Bp-12 foi analisada utilizando um espectrômetro de massa Voyager De Pro Maldi-Tof (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 μ L da amostra foi dissolvido em ATF 0,1 % e misturado em 2 μ L da matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinnamico, 60 % acetonitrila e 0,1 % ATF). A massa foi analisada sob as seguintes condições: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/com² em 300 ns e o modo de análise linear.

3.3.4- Determinação da atividade fosfolipásica

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo os métodos descritos por Cho e Kédzy (1991) e Holzer e Mackessy (1996), modificado por Ponce-Soto et al. (2002).

Foram utilizadas amostras (*B. pauloensis* e Bp-12) na concentração de 1 mg/mL. 20 μ L da amostra foram incubadas com 200 μ L de tampão (Tris-HCl 10mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), 20 μ L de substrato (ácido 4-nitro-3octanoiloxibenzóico 3 mM), 20 μ L de água deionizada, num volume final de 260 μ L, por 20 min a 37 °C. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e a atividade enzimática monitorada a 425 nm e expressa em nmol/min/mg.

3.3.5- Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada segundo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984), utilizando um analisador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters). Os aminoácidos derivatizados (PTC aminoácidos) das amostras foram identificados em uma coluna de fase reversa, de acordo com o tempo de retenção dos PTC aminoácidos padrões. Para estimativa da composição global, a análise de composição de aminoácidos foi realizada de acordo com o método descrito por Toyama et al. (1995).

3.3.6- Determinação da estrutura primária

Redução e carboximetilação

A Bp-12 foi repurificada em HPLC de fase reversa (Waters PDA-991) usando uma coluna μ -Bondapak C18 (analítica). A toxina pura foi dissolvida em 6M guanidina/HCI, 0,4 M Tris (pH 8,15), 2 mM EDTA (ácido tetracético etilenodiamino), reduzida com ditiotreitol (DTT) e carboximetilada com ¹⁴C-ácido iodo acético (Marangoni et al., 1995). A dessalificação da amostra foi realizada em uma coluna G-25 (previamente equilibrada com ácido acético glacial 1M).

• Digestão enzimática e purificação dos fragmentos peptídicos

A Bp-12 liofilizada, reduzida e carboximetilada foi digerida por duas enzimas, primeiro com a protease V8 de *Staphilococcus aureus* (por 16h a 37 °C), a reação foi interrompida e, em seguida, a amostra foi liofilizada de acordo com o método descrito por Houmard e Drapeau (1972). Posteriormente, foi digerida com Clostripaina por 8h a 37 °C, segundo o processo descrito por Cintra et al. (1993), após a interrupção da reação as amostras foram liofilizadas.

A Bp-12 digerida foi repurificada em HPLC de fase reversa (Waters PDA-991) usando uma coluna μ-Bondapak C18. A separação dos peptídeos foi feita com um gradiente de acetonitrila em 0,1 % ATF.

Seqüenciamento N-terminal

A seqüência de aminoácidos da Bp-12 (reduzida e carboximetilada) foi obtida dos peptídeos resultantes da hidrólise enzimática, utilizando um seqüenciador automático modelo Procise f (Applied Biosystem). Os PTH aminoácidos foram identificados em um analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrões. Os peptídeos contendo Cys foram identificados como PTH carboximetilcisteína marcada e confirmada por contagem radioativa (Modelo Beckman L-8 250).

3.4- Ensaios farmacológicos

3.4.1- Preparação biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados com halotano (via inalatória) e após a dissecação, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 25,0 e C₆H₁₂O₆ 11,65. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37 °C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 g, estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo) com pulsos supramaximais (estimulador Grass S48; 5 V, 0,1 Hz, 0,2 ms). As contrações musculares e as contraturas em resposta à adição de KCl (20 mM) e acetilcolina (110 μ M) exógena foram registradas em fisiógrafo (Gould RS 3400), por meio de transdutores isométricos (Load Cell BG-10 GM). Os registros das contraturas para o KCl e para a ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica no início (antes da adição da Bp-12) e no final do experimento (após 120 min de incubação com a toxina ou após bloqueio total). Após um período de estabilização de 20 min foi adicionada a Bp-12 (0,7 μ M ou 3,6 μ M).

3.4.2- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

Os camundongos foram anestesiados com halotano (via inalatória) e posteriormente exsangüinados. Após a dissecação, para a retirada dos hemidiafragmas e isolamento dos nervos frênicos correspondentes (Bülbring, 1946), as preparações foram fixadas em cuba contendo 5 mL da solução nutritiva de Tyrode, com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e C₆H₁₂O₆ 11,1. A solução foi aerada constantemente com carbogênio (mistura de 95 % O₂ e 5 % CO₂) e mantida a 37 °C. O músculo diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante de 5g. A preparação foi exposta à estimulação elétrica indireta (estimulador Grass S48; 3 V, 0,1 Hz, 0,2 ms,) ou direta (50 V, 0,1 Hz, 2 ms) e as contrações musculares foram registradas em um fisiógrafo (Gould RS 3400), por meio de transdutor isométrico (Load Cell BG-10 GM). Após um período de estabilização de 20 min foi adicionada a Bp-12 (0,7; 1,4; 3,6 ou 7,2 μ M); ainda alguns experimentos foram realizados substituindo Ca²⁺ por Sr²⁺ na solução

nutritiva de Tyrode ou em temperatura de 22 °C. A ação muscular sob estimulação direta foi ensaiada tratando a preparação com *d*-tubocurarina (7,3 μM), seguida por estimulação direta.

3.4.3- Estudo eletrofisiológico

A preparação hemidiafragma de camundongo com sua face torácica voltada para cima, fixada horizontalmente por meio de alfinetes, em cuba revestida de resina e silicone, preenchida com 2 mL de solução nutritiva de Tyrode (composição descrita) e aerada com carbogênio (mistura de 95 % O₂ e 5 % CO₂) a 28 °C. Para a realização do registro de parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina do microscópio estereoscópio (Wild M7 S - Switzerland) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Utilizando a técnica convencional de registro com microeletrodo (Fatt e Katz, 1951), os microeletrodos de vidro foram preparados através do Vertical Pipete Puller (modelo 700D - David Kopf Instruments) e preenchidos com KCI 3 M, com uma resistência entre 10 – 25 MΩ. Os microeletrodos foram introduzidos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador (Leitz) para as medidas dos potenciais de membrana em repouso (PM) e de placa terminal (PPT). Os biopotenciais foram obtidos por meio de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram 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 foi capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise.

3.4.3.1- Registro do potencial de membrana em repouso

Para a medida do potencial de membrana das fibras musculares, os microeletrodos foram inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio, fazendo a medida do deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Além disso, o potencial de membrana foi monitorado digitalmente por intermédio do software já descrito. O mesmo procedimento foi repetido em 5 fibras distintas em um período máximo de 1 minuto. O estudo dos efeitos induzido pela Bp-12 sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi efetuado nos tempos t_0 (controle), t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{90} min e após a lavagem da preparação.

3.4.3.2- Registro do potencial de placa terminal

3.4.3.2.1- Técnica cut muscle

A técnica *cut muscle* proposta primeiramente por Barstad (1962) e modificada para camundongo por Banker et al. (1983) foi utilizada para evitar a deflagração de potenciais de ação, quando o nervo motor for estimulado para gerar o potencial de placa terminal. Essa técnica consiste em cortar perifericamente, em toda a sua extensão, as fibras musculares da preparação hemidifragma de camundongo com seu respectivo nervo frênico (descrita no item 3.4.2.). Este procedimento causa queda do potencial de membrana celular (em torno de -40 mV), com inativação inicial dos canais de sódio, o que impede a deflagração do potencial de ação e conseqüentemente paralisia muscular, assegurando assim, o registro de PPT isentos de potencial de ação (Prior et al., 1993).

Os registros dos potenciais de placa terminal (PsPT) foram feitos em resposta à estimulação elétrica (supramaximal). Para tal, utilizou-se a estimulação elétrica indireta por meio de eletrodo de platina posicionado de modo a sugar o coto distal do nervo frênico (10 - 15 V, 0,2 ms, 1 Hz).

3.4.3.2.2- Análise dos potenciais de placa terminal

• Tamanho quântico

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

Então, para o cálculo do tamanho quântico foram utilizados 30 PsPT gerados a 1 Hz por 1 min. Em cada tempo, 3 séries de 1 min de PsPT foram registradas em cada preparação fazendo-se a média aritmética desses registros.

Conteúdo quântico

O conteúdo quântico do PPT corresponde ao número de "unidades quânticas" cuja somatória deu origem a esse PPT. No presente trabalho, o "tamanho quântico" foi a estimativa do valor unitário. Assim, uma vez obtido numa dada célula esse tamanho quântico, o conteúdo quântico do PPT correspondeu ao quociente entre a sua amplitude e o tamanho quântico.

Os cálculos relativos ao conteúdo quântico e o tamanho quântico dos PsPT foram realizados após a correção dos PsPT para a somatória não-linear de quanta, de acordo com a fórmula de Elmqvist e Quastel (1965):

PPT' = [(PPT x (PM-PE)] / (**PM-PE-PPT**)

Onde:

PPT'= PPT corrigido

PPT= PPT observado

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

PM= potencial de membrana

3.4.4- Análise histológica quantitativa (microscopia óptica)

O músculo diafragma após 120 min de incubação com a Bp-12 (50 μ g/mL), com o veneno *B. pauloensis* (50 μ g/mL) ou com a solução nutritiva de Tyrode (controle) foi fixado em solução de Boiun (24 h) e processado para posterior análise histológica. Em seguida, os músculos foram desidratados e incluídos em historesina para confecção dos blocos. Estes foram cortados em micrótomo (Leika RM 2035) em secções de 2 μ m, montados em lâminas e coradas com azul de Toluidina 0,5 % (Vetec, São Paulo) e Bórax 5 % (Quimesp, São Paulo).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BX51) acoplado a um microcomputador (Microtec, São Paulo) e carregado com um software para a captura das imagens (Image Pro Plus 6.0, Mídia Cybernetics, Inc.). Análise foi realizada por três examinadores. As alterações morfológicas foram quantificadas pela contagem do número de células lesadas e expressas como porcentagem do número total de célula em três áreas não superpostas, não adjacentes de cada músculo (alteração morfológica = [(nº de células lesadas: nº total de células) X 100]). Foram consideradas <u>células lesadas</u> as que apresentaram alterações, como: região muscular lesada em sua extensão, caracterizadas por vacúolos, aglutinação condensada de miofibrilas, fibras edemaciadas e com perda de material nuclear; <u>células normais</u> as que se apresentaram íntegras, sem nenhum comprometimento no mecanismo contrátil pelo parâmetro miográfico, com perfil poligonal celular e núcleo periférico.

3.4.5- Determinação da atividade de CK plasmático em camundongos

O procedimento foi realizado em camundongos com a administração via intramuscular ou intravenosa de Bp-12 nas concentrações de 20-50 μ g dissolvidos em 50 ou 500 μ L de PBS, respectivamente. Após a administração da Bp-12, o sangue foi coletado da veia caudal nos intervalos de 30 min, 1, 3, 6, 9, 12 e

24 horas, com o auxílio de capilares heparinizados e, em seguida, centrifugados para a obtenção do plasma. A atividade enzimática foi determinada utilizando um kit comercial (CK-Nac, Bioclin/Quibasa, Brasil), conforme orientações do fabricante. Os resultados de CK foram expressos em U/L. Uma unidade de CK corresponde a fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 37 °C.

3.4.6- Determinação da atividade edematogênica

Os animais (150 – 200 g) foram anestesiados com isoflurano (via inalatória) e submetidos à injeção subcutânea na região plantar de 0,1 mL de salina ou da Bp-12 (2,5; 5,0 e 10,0 μ g/pata; dissolvida em solução salina) na pata posterior esquerda. O volume da pata foi medido por meio de um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália), imediatamente antes da injeção (basal) e em intervalos regulares (15, 30, 60, 120, 180, 240 min) após a injeção da toxina Bp-12.

Os resultados foram expressos como variação do volume da pata (mL) em relação ao valor basal. Também foram calculados os valores de área sob a curva (ASC) para cada dose injetada.

3.5- Análise estatística

Para comparar as medidas variáveis num único tempo entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, devido à ausência de distribuição normal das variáveis. Para comparar os tratamentos e as medidas ao longo do tempo foi utilizada a Análise de Variância para medidas repetidas (ANOVA) com transformação por postos. A comparação entre os tratamentos foi realizada com o teste post-hoc de Tukey e a comparação entre os tempos foi utilizado o teste de perfil por contrastes (*Profile Test*). As variáveis foram transformadas em arco-seno da raiz quadrada da proporção, devido à ausência de distribuição normal para os testes estatísticos (Conover, 1971; Siegel, 1975; Milliken e Johnson, 1984; Montgomery, 1991).

Os resultados, quando apropriado, foram representados pela média de experimentos \pm erro padrão da média. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de p<0,05.

4- RESULTADOS

4.1- Ensaios bioquímicos

4.1.1- Perfis cromatográfico e eletroforético

O perfil cromatográfico do veneno total de *B. pauloensis* evidenciou a presença de 18 picos, denominados Bp-1 a Bp-18. A nova fração estudada, a Bp-12, foi eluída aos 58,6 \pm 3 % de tampão B, num tempo de retenção de 36,8 \pm 0,4 min (Figura 5). A análise em HPLC de fase reversa otimizada mostra também que a fração apresenta um grau de homogeneidade molecular ao redor de 95 % de pureza.

O perfil eletroforético da fração Bp-12 foi realizado em condições reduzida (com DTT) e não reduzida, que mostrou a presença de duas bandas protéicas com massas moleculares de aproximadamente 14 e 28 kDa, respectivamente, em relação aos marcadores de massa molecular (perfil eletroforético inserido na Figura 5). A fração Bp-12 representa 3,3 % do conteúdo protéico do veneno total de *B. pauloensis.*



Figura 5- Perfil cromatográfico do veneno de *B. pauloensis* em HPLC de fase reversa otimizada. Note que a toxina estudada refere-se ao pico 12 (* Bp-12). A eluição da amostra foi realizada em um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B. Também está inserido o perfil eletroforético da Bp-12 em condições reduzida (R) e não reduzida (NR). Observe que a Bp-12 apresentou massa molecular em torno de 14 kDa. (MM, marcador de peso molecular (x 10⁻³)).

4.1.2- Espectrometria de massa por Maldi-Tof

A espectrometria de massa por Maldi-Tof confirmou a pureza da Bp-12 que apresentou uma massa molecular de 13.789,56 Da (Figura 6), portanto, não mostrou diferença significativa entre a massa determinada por eletroforese em SDS-PAGE e a massa real determinada por espectrometria de massa.



Figura 6- Espectrometria de massa da Bp-12. Note que a massa molecular da Bp-12 (*) é de 13.789,56 Da. Observe que 6.859,20 Da é a forma di-ionizada e 27.265,75 Da é a forma dimérica.

4.1.3- Determinação da atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica do veneno total de *B. pauloensis* foi de $2,2 \pm 0,01$ nmoles/min e para a nova fração Bp-12 foi de $0,5 \pm 0,001$ nmoles/min, demonstrando que essa nova fração tem uma baixa atividade catalítica (Figura 7).



Figura 7- Atividade fosfolipásica do veneno total de *B. pauloensis* e da Bp-12. Observe a baixa atividade catalítica da Bp-12 (* p<0,05, em relação ao VT Bp). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam a média ± E.P.M. VT Bp, veneno total de *B. pauloensis* (controle positivo).

4.1.4- Análise de aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos mostrou que a Bp-12 possui 122 resíduos de aminoácidos: Asp/10, Thr/7, Ser/5, Glu/7, Pro/7, Gly/8, Ala/5, Cys/14, Val/4, Met/1, Ile/3, Leu/11, Tyr/12, Phe/2, Lys/19, His/2 and Arg/5, com um alto conteúdo de Lys, Tyr, Gly, Pro e Cys, típico de PLA₂ básicas; com esta análise obtém-se uma estimativa da composição global da proteína (Tabela 3). O valor do ponto isoelétrico (*pl*) desta toxina é de 8,55, teoricamente calculado com base na dedução da seqüência de aminoácidos. A Tabela 4 apresenta a lista de abreviaturas dos aminoácidos.

Aminoácidos	Bp-12
Asp	10
Glu	7
Ser	5
Gly	8
His	2
Arg	5
Thr	7
Ala	5
Pro	7
Tyr	12
Val	4
Met	1
Cys	14
lle	3
Leu	11
Phe	2
Lys	19
Trp	nd
Total	122

Tabela 3- Composição de aminoácidos da Bp-12. Note que a Bp-12 contém 122aminoácidos, de acordo com o método Pico Tag (Waters). nd, não
determinado.

Aminoácidos										
Ácido Aspártico	Asp	D								
Ácido Glutâmico	Glu	Е								
Alanina	Ala	A								
Arginina	Arg	R								
Asparagina	Asn	Ν								
Cisteína	Cys	С								
Fenilalanina	Phe	E								
Glicina	Gly	G								
Glutamina	Gln	Q								
Histidina	His	H								
Isoleucina	lle	I								
Leucina	Leu	E .								
Lisina	Lys	К								
Metionina	Met	Μ								
Prolina	Pro	Ρ								
Serina	Ser	S								
Tirosina	Tyr	Υ								
Treonina	Thr	Т								
Triptofano	Trp	W								
Valina	Val	V								

Tabela 4- Lista de abreviaturas dos aminoácidos. Em destaque, as abreviaturas já convencionais, as quais foram utilizadas na apresentação deste trabalho.

4.1.5- Estudo de homologia seqüencial

A análise da seqüência completa de aminoácidos da Bp-12 mostrou tratar-se de uma PLA₂ do tipo Lys49 ou K49. Assim, a Bp-12 exibiu uma alta homologia seqüencial (92,6 %) com outras PLA₂ Lys49 botrópicas. Essa homologia diminui quando comparada com outras PLA₂ Asp49 também provenientes de venenos botrópicos (dado não mostrado). A seqüência completa da Bp-12 possui 122 resíduos de aminoácidos: SLFELGKMIL QETGKNPAKS LGAFYCYCGW GSQGQPKDAV DRCCYVHKCC YKKITGCNPK KDRYSYSWKD KTLVCGEDNS CLKELCECDK AVAICLRENL NTYNKKYRYF LKPLCKKADA AC (Figura 8).

										10									- 2	20										30									4	.0				
Bp_12 BaTX P24605 Q90249 P82287 P58399 Q9IAT9 Q9I834	ទេ ទេ ទេ ទេ ទ	L L L L L L L	н н н н н н н	EEEEEE		0000000000	K K K K K K	M M M M M M	I I I I I I I I		0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	EEEEEE	T T T T T T T	6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	K K K K K K	N N N N N N	P P P P P P P	A A A A A A A	K K K K K K	5 5 5 5 5 5 5 5 5	L Y H Y Y Y Y		A A A A A V	F Y Y Y Y Y Y Y	Y G G G G G G G G G	00000000	Y Y N N N N N	00000000	000000000	W W V V V V V V V	G G L L L L L G	s G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	Q Q R R R R R R R R		Q Q K K K K K	P P P P P P P P P	K K K K K K		A A A A A A A					
						*		50									,	60										70									;	80						
Bp_12 BaTX P24605 Q90249 P82287 P58399 Q9IAT9 Q9I834	00000000	00000000	Y Y Y Y Y Y Y		H H H H H H K49	K K K K K K K K	00000000	000000000	Y Y Y Y Y Y Y Y	K K K K K K	K K K K K K	I L L L L L L L L	T T T T T T T	666666666		и и и и и и и и и и	P P P P P P P P	K K K K K K K	K K K K K K		R R R R R R R R	Y Y Y Y Y Y Y	ទទទទទទទ	Y Y Y Y Y Y Y	ទទទទទទទ	W W W W W W	K K K K K K		K K K K K K	T T T T T T T	L I I I I I I I I	V V V V V V V	00000000	GGGGGGGGG	EEEEEE	D N N N N N N	N N N N N N	S S P P P P S	00000000			1		
						90									1	00										1	110)								1	.20)		í	(%	Id€	enti	ty)
Bp 12	L	С	E	С	D	ĸ	A	v	A	I	С	L	R	E	N	L	N	Т	Y	N	K	K	Y	R	Y	- [F	L	K	P	L	С	K	К.	A	D	A	A	С	12:	2	1/	0.00)
BaTX	L	С	E	С	D	Κ	А	v	А	Ι	С	L	R	E	N	L	N	т	Y	Ν	K	K	Y	R	Y	-	Υ	L	Κ	Ρ	L	С	ĸ	К.	А	D	A	С		12:	1	9	92.0	5
P24605	L	С	Е	С	D	Κ	А	v	А	Ι	С	L	R	E	Ν	L_	N	т	Y	Ν	K	K	Y	R.	Y	-	Y	L	K	Ρ	L	С	ĸ	К.	А	D	A	С		12:	1	ſ	37.6	ī
Q90249	L	С	Е	С	D	К	А	v	А	Ι	С	L	R	E	Ν	L	G	т	Υ	Ν	К	К	Y	R.	Y	-	Н	L	К	Ρ	F	С	ĸ	К.	А	D.	А	С		12:	1	ſ	34.3	}
P82287	L	С	Е	С	D	К	А	v	А	Ι	С	L	R	E	Ν	L	G	т	Y	Ν	К.	K	Y	R.	Y	-	Н	L	ĸ	Ρ	F	С	ĸ	К.	А	D	D	С		12:	1	ſ	34.3	}
P58399	L	С	Е	С	D	К	А	ν	А	Ι	С	L	R.	E	Ν	L	G	т	Υ	Ν	ĸ	L	Y	R.	Υ	-	Н	L	ĸ	Р	F	С	ĸ	К.	A	D	D	С		12:	1	{	33.5)
Q9IAT9	L	С	Е	С	D	К	А	ν	А	Ι	С	L	R	E	N	L	G	т	Y	Ν	K	ĸ	Υ	R.	Y	-	Н	L	К	Ρ	F	С	ĸ	к.	A	D	Ρ	С		119	9	ſ	33.2	:
Q9I834	L	С	E	С	D	Κ	А	V	А	Ι	С	L	R	E	Ν	L	D	т	Υ	Ν	Κ	Κ	Y	R	Y	Ν	Y	L	Κ	Ρ	F	С	K	К.	A	D	Ρ	С		122	2	ſ	32.8	ł

Figura 8- Alinhamento da seqüência completa de aminoácidos da Bp-12 com outras PLA₂ Lys49, obtidas do banco de dados BLAST (PubMed-Medline): BaTX: Bothropsalternatustoxina de *B. alternatus* (Ponce-Soto et al., 2007); P24605: Miotoxina-II de *B. asper* (Francis et al., 1991); Q90249: Bothropstoxina-I de *B. jararacussu* (Cintra et al., 1993); P82287: Piratoxina-II de *B. pirajai* (Toyama et al., 2000); P58399: Piratoxina-I de *B. pirajai* (Toyama et al., 1998); Q9IAT9: BnSP-7 de *B. pauloensis* (Rodrigues et al., 1998); Q9I834: Miotoxina-II de *B. moojeni* (Soares et al., 1998). A porcentagem de homologia está demonstrada na parte inferior direita. * indica o resíduo conservado em PLA₂ Lys49 homólogas e os traços (-) correspondem aos gerados pelo software durante o alinhamento.

4.2- Ensaios farmacológicos

4.2.1- Preparação biventer cervicis de pintainho

A preparação biventer cervicis de pintainho (BCP) mostrou-se menos sensível à ação bloqueadora neuromuscular da toxina Bp-12 em comparação com a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD), quando submetida a estímulo elétrico indireto. As concentrações utilizadas foram de 0,7 μ M e 3,6 μ M, a 37 °C por 120 min. Observou-se que a concentração de 3,6 μ M de Bp-12 produziu uma redução parcial da amplitude das contrações musculares de 24 ± 5 % (Figura 9A), justificando a escolha da preparação NFD para os estudos na junção neuromuscular.

A Bp-12 (0,7 μ M e 3,6 μ M) reduziu significativamente as contraturas em resposta à ação da ACh exógena (27 ± 3 % e 26 ± 4 %, respectivamente) e em resposta à ação do KCl (26 ± 9 % e 23 ± 5 %, respectivamente) (Figura 9B).



Figura 9- Efeito da Bp-12 em preparação BCP, sob estimulação elétrica indireta, a 37 °C. (A) Gráfico representativo da resposta contrátil. Note que houve discreto bloqueio neuromuscular induzido pela Bp-12 nas 0,7 μM e 3,6 μM, os concentrações de quais não foram significativamente diferentes do controle Krebs. Os pontos representam a média ± E.P.M. dos experimentos. (B) Respostas das contraturas à ACh e ao KCI. Note que a toxina reduziu significativamente as contraturas em resposta à ação da ACh exógena e em resposta à ação do KCI. Os resultados (média ± E.P.M.) foram expressos como porcentagem do valor antes da adição do veneno, como 100 % (* p<0,05).

4.2.2- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

Na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD), após a adição da Bp-12 ocorreu um progressivo bloqueio neuromuscular irreversível e dependente da concentração, com contratura inicial característica dos venenos botrópicos. A toxina nas concentrações de 0,7 e 1,4 μ M causou bloqueio parcial de 30 ± 8 % e 69 ± 7 %, respectivamente, após 120 min de incubação. Já em concentrações maiores (3,6 e 7,2 μ M) causou bloqueio completo em torno de 60 e

40 min, respectivamente (Figura 10). A Tabela 5 apresenta o tempo necessário para obtenção de 50 % de bloqueio em cada concentração estudada.

Em preparações curarizadas, em que a d-tubocurarina (d-Tc) se liga ao receptor nicotínico, causando bloqueio neuromuscular, sob estímulo elétrico indireto, a resposta contrátil foi garantida pelo estímulo elétrico direto; portanto, quando o músculo foi estimulado, houve uma contração muscular fisiológica, não afetando a condução do estímulo elétrico pela membrana da fibra muscular. Após a adição da Bp-12 (3,6 μ M), instalou-se um progressivo bloqueio das contrações musculares (aproximadamente aos 50 min) mesmo após a lavagem. Isto evidencia a ação da toxina diretamente sobre o sarcolema (Figura 11A).

Alguns experimentos foram realizados, substituindo-se o Ca²⁺ (1,8 mM) pelo Sr²⁺ (4,0 mM) na solução de Tyrode. A adição de Bp-12 (3,6 μ M) neste protocolo, provocou bloqueio neuromuscular completo e irreversível (aproximadamente aos 50 min) em resposta ao estímulo elétrico indireto, como visto em experimentos com solução de Tyrode normal, mostrando que o bloqueio ocorre independente da presença de Ca²⁺ (Figura 11 B).

Nos ensaios realizados a 22 °C, o bloqueio completo e irreversível da resposta contrátil ao estímulo elétrico indireto, instalou-se em aproximadamente 50 min, após a adição da Bp-12 (3,6 μ M), demonstrando que a ação da toxina independe da temperatura (Figura 11C).

A Tabela 6 compara os efeitos da Bp-12 (3,6 μ M) em relação ao tempo necessário para obtenção de 50 % de bloqueio da resposta contrátil e % de contratura em preparação NFD de camundongo, na presença dos seguintes protocolos: solução de Tyrode normal; solução de Tyrode à temperatura de 22 °C; solução de Tyrode + d-Tc e solução de Tyrode, substituindo-se Ca²⁺ por Sr²⁺.



Figura 10- Curva da resposta contrátil da preparação NFD, sob estimulação elétrica indireta, após a adição de Bp-12, a 37 °C. Note o bloqueio dependente da concentração provocada pela toxina. Os pontos representam média ± E.P.M. dos experimentos (* p<0,05 no ponto indicado e nos demais subseqüentes, em relação ao controle).</p>

Tabela 5- Tempo necessário para obtenção de 50 % de bloqueio da resposta
contrátil em preparação NFD, sob estimulação elétrica indireta,
incubada com a Bp-12. Na concentração de 0,7 μ M, a toxina induziu
bloqueio parcial inferior a 50 %, após 120 min de incubação.
Os resultados foram expressos pela média \pm E.P.M. dos experimentos.

Bp-12 (μM)	Tempo para 50 % de bloqueio (min)	n
0,7	-	4
1,4	45 ± 7	6
3,6	17 ± 7 *	5
7,2	12 ± 1 *	4

*p<0,05 comparado a Bp-12 (1,4 μM).



Figura 11- Bloqueio neuromuscular de preparações NFD incubadas com Bp-12 (▲) ou solução de Tyrode (●). (A) A preparação foi estimulada diretamente (D) após tratamento com d-Tc (7,3 µM) e antes da adição de toxina, a 37 °C. (B) Efeito na resposta contrátil, pela substituição de Ca²⁺ por Sr²⁺ na solução de Tyrode, a 37 °C. (C) Influência da temperatura (22 °C) na resposta contrátil. Note que em todos os experimentos houve bloqueio neuromuscular irreversível, confirmado registros pelo pós-lavagem apresentado pelos miográficos representativos. Cada ponto representa a média ± E.P.M. (4-6 experimentos para A, B e C). * p<0,05 comparado ao controle. I, estimulação elétrica indireta; L, lavagem. Setas: momentos de adição das substâncias.

Tabela 6- Tempo necessário para obtenção de 50 % de bloqueio da resposta contrátil e % de contratura em preparação NFD, incubada com Bp-12. Os resultados foram expressos pela média ± E.P.M. dos experimentos.

Tratamentos	Temp.	Tempo para 50 % de	Contratura	n
(com adição de 3,6 μM Bp-12)	(°C)	bloqueio (min)	(%)	
Tyrode normal	37	$17\pm~7,0$	$17 \pm 3{,}5$	5
Tyrode normal	22	$19\pm~0,4$	$\textbf{38} \pm \textbf{3,9} ~ \textbf{*}$	4
Tyrode normal + d-Tc	37	$15\pm\ 1,3$	$25 \pm 9,9~^{\boldsymbol{*}}$	5
Tyrode (substituição de Ca ²⁺ por Sr ²⁺)	37	$15\pm~2,1$	$21\pm4,\!0$	6

4.2.3- Estudo eletrofisiológico

4.2.3.1- Medida e análise do potencial de membrana em repouso

As medidas do potencial de membrana em repouso (PM) da preparação músculo diafragma de camundongo foram realizadas em solução de Tyrode (controle) ou incubadas com Bp-12 nas concentrações de 1,4 μ M e 3,6 μ M, porém usando-se a menor concentração não foi observada nenhuma ação despolarizante (dado não mostrado). Os valores dos PM ao longo de 90 min, nas preparações-controle mostraram-se homogêneos, dentro do esperado (-83,9 ± 1 mV). Quando as preparações foram tratadas com Bp-12 (3,6 μ M), observou-se uma progressiva e acentuada despolarização da membrana a partir dos 15 min, com valores de até -20,2 ± 1 mV (90 min) e -24,1 ± 2 mV pós-lavagem (* p<0,05) (Figura 12).




4.2.3.2- Medida e análise do potencial de placa terminal

A ação da Bp-12 foi avaliada em preparação NFD de camundongo, através dos parâmetros eletrofisiológicos, realizados para verificar seu possível efeito sobre o conteúdo quântico (m) e o tamanho quântico (q). Essa preparação foi previamente submetida à técnica *cut muscle*, que impede a contração muscular. As preparações foram estimuladas a 1 Hz de freqüência durante 1 min.

Em todos os experimentos foi utilizada a concentração de 3,6 μ M de Bp-12. A escolha desta concentração foi baseada em resultados obtidos anteriormente, através da técnica miográfica e da medida do PM de preparação isolada de camundongo, e também em função de possibilitar o empalamento das fibras musculares. Ensaios com baixa concentração da toxina (1,4 μ M) não mostraram qualquer alteração do conteúdo quântico (dado não mostrado).

A medida do conteúdo quântico antes e após o tratamento das preparações com a Bp-12 (3,6 μ M) mostrou valores de m respectivamente iguais a: 68,0 ± 8,9 (controle) e 50,0 ± 7,8 (60 min, após a adição da toxina); portanto, não houve diferença significativa entre o valor-controle e pós-tratamento (Tabela 7). Nestes experimentos, os valores de q foram de 0,07 ± 0,01 (controle) e 0,09 ± 0,01 (60 min, após a adição da toxina), igualmente semelhantes entre si (Tabela 8).

As amplitudes médias dos PsPT foram de $3,3 \pm 0,2$ mV (controle) e $3,0 \pm 0,3$ mV (60 min, após a adição da toxina), também não mostraram diferença significativa entre si (Tabela 9).

Tabela 7- Efeito da Bp-12 sobre o conteúdo quântico dos PsPT obtido em preparação NFD de camundongo em temperatura ambiente.
Os resultados foram expressos pela média ± E.P.M. dos experimentos.

Conteúdo quântico dos PsPT								
Controle Tyrode Bp-12 (3,6 µM)								
0 min	15 min	30 min	45 min	60 min				
$\textbf{68} \pm \textbf{8,9}$	$59\pm7{,}4$	$\textbf{57} \pm \textbf{7,3}$	$\textbf{47} \pm \textbf{5,4}$	$50\pm7,\!8$	18			

Tabela 8- Efeito da Bp-12 sobre o tamanho quântico dos PsPT obtido em preparação NFD de camundongo em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos pela média ± E.P.M. dos experimentos.

Tamanho quântico dos PsPT							
Controle Tyrode	Bp-12 (3,6 μM)						
0 min	15 min	30 min	45 min	60 min			
$\textbf{0,07} \pm \textbf{0,01}$	$\textbf{0,08} \pm \textbf{0,01}$	$0{,}08\pm0{,}01$	$\textbf{0,08} \pm \textbf{0,1}$	$\textbf{0,09} \pm \textbf{0,01}$	18		

Tabela 9- Efeito da Bp-12 sobre a amplitude dos PsPT obtido em preparação NFD de camundongo em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos pela média ± E.P.M. dos experimentos.

Amplitude dos PsPT (mV)							
Controle Tyrode	Bp-12 (3,6 μM)						
0 min	15 min	30 min	45 min	60 min			
$\textbf{3,3} \pm \textbf{0,2}$	$\textbf{3,1} \pm \textbf{0,3}$	$\textbf{3,0} \pm \textbf{0,3}$	$\textbf{3,0} \pm \textbf{0,3}$	$\textbf{3,0} \pm \textbf{0,3}$	18		

4.2.4- Análise histológica quantitativa

Através do uso da técnica histológica (microscopia óptica) foi avaliado o número de fibras lesadas dos músculos (diafragma de camundongo), resultantes do registro miográfico, sob estimulação elétrica indireta, incubados com solução de Tyrode (controle), com veneno de *B. pauloensis* (50 μg/mL) ou com Bp-12 (50 μg/mL).

O músculo diafragma, sem tratamento, foi analisado após 120 min de incubação em solução de Tyrode (controle), submetido a estímulos elétricos indiretos. As fibras musculares, em corte transversal, mostraram-se íntegras, exibindo núcleos periféricos e preservação da disposição poligonal das células

(Figura 13). Algumas fibras musculares periféricas foram afetadas, com ruptura do sarcolema, provavelmente decorrente da dissecação do músculo, sendo o valor dessa alteração de $1,1 \pm 0,2$ % (Tabela 10).

Após 120 min de incubação com *B. pauloensis* ou Bp-12, o músculo diafragma apresentou áreas de mionecrose (Figura 13), que afetaram $25,8 \pm 2,0\%$ e $27,3 \pm 1,1 \%$, respectivamente, ambos os resultados foram significativamente diferentes quando comparados ao controle Tyrode, porém não são significativamente diferentes entre si (Tabela 10).

Considerando que a Bp-12 representa 3,3 % do conteúdo protéico do veneno total (VT) de *B. pauloensis*, então a procentagem de fibras lesadas por essa toxina corresponde a aproximadamente 0,9 % dos $25,8 \pm 2,0$ % de lesão que foram exibidas pelo VT.



Figura 13- Morfologia do músculo diafragma em corte transversal, incubados com solução de Tyrode, *B. pauloensis* ou Bp-12. Note que as fibras musculares incubadas com solução de Tyrode mostraram-se íntegras, com perfil poligonal preservado. Preparações incubadas com *B. pauloensis* ou Bp-12 exibiram áreas de mionecrose (flechas). Note também a presença de fibras musculares vacuolizadas (v) e edemaciadas (e). Barra = 50 μm.

Tabela 10- Determinação da porcentagem de fibras lesadas em músculo diafragma, após 120 min de exposição aos tratamentos. Os resultados foram expressos pela média ± E.P.M. dos experimentos.
* p<0,05 comparado ao controle Tyrode.

Tratamentos		Alterações morfológicas (%)	n
Solução de Tyrode (controle)		1,1 ± 0,2	6
B. pauloensis	(50 μg/mL)	25,8 \pm 2,0 *	4
Bp-12	(50 μg/mL)	27,3 ± 1,1 *	5

4.2.5- Determinação da atividade de CK plasmático em camundongos

Os estudos para determinar o efeito miotóxico (*in vivo*) da Bp-12 foram realizados em camundongos, injetando-se a toxina (20 μ g/mL e 50 μ g/mL) pelas vias intramuscular (i.m.) e intravenosa (i.v.).

Os resultados mostraram que os níveis de CK plasmáticos aumentaram significativamente na primeira hora após o tratamento pela via intramuscular, atingindo 225 \pm 36 U/L (20 µg/50 µL) até 827 \pm 92 U/L (50 µg/50 µL), e posteriormente redução gradativa até atingir os níveis normais, após aproximadamente 12 horas de experimento. Quando a Bp-12 (20µg ou 50 µg/500 µL) foi injetada pela via intravenosa, os valores não foram significativamente diferentes do controle (PBS) durante as 24 horas de observação (Figura 14).



Figura 14- Representação gráfica da atividade miotóxica da Bp-12 injetada pelas vias i.m. (miotoxicidade local) e i.v. (miotoxicidade sistêmica) em camundongos. Note que a Bp-12 injetada via i.m. induziu uma liberação imediata de CK seguida pela sua gradual redução ao longo das 24 h. Os pontos representam a média ± E.P.M. de 5 experimentos. * p<0,05 em relação ao controle e a miotoxicidade sistêmica.</p>

4.2.6- Determinação da atividade edematogênica em ratos

A Figura 14 mostra que a injeção subcutânea na região plantar de Bp-12 (2,5 – 10,0 μ g/pata, n=5) induziu edema de pata dependente da dose. O edema caracterizou-se por apresentar um rápido início de ação, aproximadamente 30 min para todas as doses empregadas, com resultados de: 0,44 ± 0,02 mL (2,5 μ g/pata); 0,59 ± 0,05 mL (5,0 μ g/pata) e 0,67 ± 0,07 mL (10,0 μ g/pata) (Figura 15A). Também foram calculados os valores de área sob a curva (ASC) para cada dose injetada (mL.h): 0,55 ± 0,02 (salina); 0,93 ± 0,11 (2,5 μ g/pata); 1,35 ± 0,15 (5,0 μ g/pata) e 1,70 ± 0,19 (10,0 μ g/pata) (Figura 15B).



Figura 15- Determinação da atividade edematogênica em ratos induzida pela Bp-12. (A) Curva dose-resposta do edema de pata induzido pela Bp-12 (2,5; 5,0 e 10 μg/pata). O edema foi expresso como o aumento de volume (mL) da pata em relação volume basal. (B) Representação gráfica da área sob a curva obtida a partir da curva dose-resposta. Cada ponto representa a média de 5 experimentos ± E.P.M. * p<0,05, em comparação com o controle salina. A Tabela 11 mostra uma síntese dos resultados dos estudos bioquímico e farmacológico da Bp-12 e de outras PLA₂ Lys49 e Asp49 isoladas do veneno de *B. pauloensis* descritas na literatura até o momento.

Tabela 11- Comparação das características gerais da Bp-12 com as diferentesPLA2 isoladas do veneno de *B. pauloensis*

Toxinas	PLA ₂	Caráter	Da	pl	Atividade Catalítica	Atividade edemato gênica	Bloqueio neuromuscular	Mionecrose	Atividade CK	Referência
BnSP-6	Lys49	básico	~14.000	8,6	-	+	BCP	+	nd	Rodrigues et al., 1998
BnSP-7	Lys49	básico	13.727	8,9	-	+	BCP	+	+	Rodrigues et al., 1998; Soares et al., 2000
BnpTX-I	Asp49	básico	~14.000	7,8	+	+	NFD	+	+	Rodrigues et al., 2004
BnpTX- II	Asp49	básico	~14.000	nd	+	+	NFD	+	+	Rodrigues et al., 2004
NeuTX-I	Asp49	nd	~14.000	nd	+	nd	BCP	nd	nd	Borja- Oliveira et al., 2007
NeuTX- II	Asp49	nd	~14.000	nd	+	nd	BCP	nd	nd	Borja-Oliveira et al., 2007
Bp-PLA ₂	Asp49	ácido	15.800	4,3	+	+	nd	+	+	Rodrigues et al., 2007
Bp-12	Lys49	básico	13.789	8,5	-	+	NFD	+	+	Randazzo- Moura et al., <i>in press</i>

nd = não determinado; (+) com atividade; (-) sem atividade.

5- DISCUSSÃO

As PLA₂ presentes nos venenos de serpentes são os componentes mais abundantes e interessantes do ponto de vista biológico (Kini, 2003). Os venenos das serpentes da família Viperidae contêm proteínas e peptídeos que afetam diferentes sistemas fisiológicos, além de desempenharem diferentes atividades farmacológicas. Neste estudo, uma nova miotoxina, a Bp-12 (PLA₂ Lys49), ainda não descrita na literatura, obtida do veneno de *B. pauloensis* foi isolada, purificada e caracterizada bioquímica e farmacologicamente.

Com relação à caracterização físico-química da Bp-12 foi confirmado o grau de pureza da proteína, utilizando-se técnicas como: eletroforese, espectrometria de massa e determinação da estrutura primária para a caracterização físico-química da toxina, com o intuito de compreender a intricada relação estrutura-atividade.

A Bp-12 foi purificada a partir de uma metodologia otimizada (Bonfim et al., 2006; Ponce-Soto et al., 2007; Calgarotto et al., 2008) que apresentou um grau de homogeneidade molecular ao redor de 95 % de pureza.

A literatura tem relatado a presença de formações diméricas em PLA₂ homólogas Lys49 de venenos botrópicos, como por exemplo: miotoxina-II de *Bothrops asper* (Francis et al., 1991), piratoxina-I e piratoxina-II de *Bothrops pirajai* (Toyama et al., 1995), miotoxina-II de *Bothrops moojeni* (Soares et al., 1998) e BaTX de *Bothrops alternatus* (Ponce-Soto et al., 2007), corroborando assim com o resultado obtido no perfil eletroforético da Bp-12, mostrando sua tendência em formar agregados. Segundo Yamaguchi et al. (1997), em algumas PLA₂ homólogas Lys49 a região dos resíduos 74 – 85 que compreendem a α -hélice N-terminal e a região das folhas β -antiparalelas são as que desempenham papel importante para a formação dos dímeros.

A Bp-12 demonstrou uma baixa atividade catalítica quando comparada com a do veneno de *B. pauloensis*, característica similar as PLA₂ Lys49 que são desprovidas ou apresentam baixa atividade catalítica (Ownby et al., 1999; Lomonte et al., 2003). A substituição do aminoácido aspartato (D) por lisina (K) na posição 49 é decisiva para a perda da atividade catalítica (van den Bergh et al., 1988; Arni et al., 1995, Arni and Ward, 1996; Bonfim et al., 2006), portanto, as PLA₂ Lys49 são incapazes de se ligarem ao cálcio, mas, segundo Pedersen et al. (1994), têm sido demonstrado que algumas PLA₂ Lys49 apresentam uma limitada, porém ainda presente, atividade catalítica, como por exemplo a BaTX de *B. alternatus* (Ponce-Soto et al., *in press*).

A composição de aminoácidos da Bp-12 demonstrou um alto conteúdo dos resíduos de Lys, Tyr, Gly, Pro e Cys, típico de PLA₂ básicas (Dua e Cho, 1994), corroborando com a de outras miotoxinas botrópicas relatadas na literatura (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Selistre et al., 1996; Ponce-Soto et al., 2007).

A Bp-12 possui 122 resíduos de aminoácidos e revelou uma alta homologia com outras PLA₂ Lys49 provenientes de venenos botrópicos, como: BaTX de *B. alternatus* (Ponce-Soto et al., 2007); miotoxina-II de *B. asper* (Francis et al., 1991); BthTX-I de *B. jararacussu* (Cintra et al., 1993); piratoxina-II de *B. pirajai* (Toyama et al., 2000); piratoxina-I de *B. pirajai* (Toyama et al., 1998); BnSP-7 de *B. pauloensis* (Rodrigues et al., 1998); miotoxina-II de *B. moojeni* (Soares et al., 1998). Este achado fortemente sugere, do ponto de vista bioquímico, que a Bp-12 é uma PLA₂ homóloga Lys49.

Via de regra, as PLA₂ Lys49 (K49) possuem o aminoácido fenilalanina na posição 5 (L5) e glutamina na posição 11 (Q11), como nas toxinas: BthTX-I de *B. jararacussu* (Cintra et al., 1993), piratoxina-I e piratoxina-II de *B. pirajai* (Toyama et al., 1998, 2000), miotoxina-II de *B. asper* (Francis et al., 2001) e na BnSP-7 de *B. pauloensis* (Rodrigues et al., 1998; Soares et al., 2000). Esses mesmos resíduos mostraram-se conservados na seqüência da estrutura primária da Bp-12, sendo assim mais um achado que sugere que esta toxina pertence ao grupo das PLA₂ Lys49. Além disso, as PLA₂ Asp49 (D49) possuem o aminoácido glutamina na posição 4 (Q4) e fenilalanina na posição 5 (F5), como nas toxinas: agkistrodotoxina de *Agkistrodon halys pallas* (Kondo et al., 1989), mojavetoxina de *Mojave* rattlesnake (Aird et al., 1990) e NeuTX-I de *B. n. pauloensis* (Borja-Oliveira et al., 2007). O alinhamento da seqüência de aminoácidos da Bp-12 com outras PLA₂ Lys49 demonstrou a presença de algumas mutações: L \rightarrow Y(21), S \rightarrow G(32), V \rightarrow T(40), I \rightarrow L(54), L \rightarrow I(73) e D \rightarrow N(78), porém estas substituições não afetaram os efeitos biológicos estudados neste trabalho, que são característicos das PLA₂ Lys49.

Embora os acidentes ofídicos por *Bothrops*, de modo geral, não produzam nenhum sinal clínico de neurotoxicidade, os venenos e alguns componentes isolados de várias espécies afetam a junção neuromuscular in vitro (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Cogo et al., 1993, 1998, 2006; Zamunér et al., 1996; Soares et al., 2000; Borja-Oliveira et al., 2003, 2007; Rodrigues et al., 2004; Oshima-Franco et al., 2004; Durigon et al., 2005; Randazzo-Moura et al., 2006). As espécies de B. jararacussu e B. pauloensis foram satisfatoriamente investigadas sobre suas atividades, incluindo o isolamento de componentes neurotóxico е miotóxico ativos (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Homsi-Brandeburgo et. al., 1988; Soares et al., 2000; Rodrigues et al., 2004; Oshima-Franco et al., 2004; Randazzo-Moura et al., 2006; Borja-Oliveira et al., 2007; Rodrigues et al., 2007). Alguns desses autores demonstraram que os efeitos neurotóxico e miotóxico do veneno de B. pauloensis são devido principalmente à presença de PLA₂ como um de seus componentes essenciais.

Em estudos recentes realizados com as toxinas isoladas do veneno de *B. pauloensis* foram observados que a miotoxina II (BnSP-7), uma PLA₂ Lys49, induziu bloqueio neuromuscular em preparação isolada de ave (Soares et al., 2000); e, mais recentemente, Borja-Oliveira et al. (2007) estudando as frações NeuTX-I e NeuTX-II (ambas PLA₂ Asp49), afirmaram que estas toxinas são responsáveis pela neurotoxicidade *in vitro* causado pelo veneno total por uma ação pré-sináptica. Estes relatos caracterizaram alguns efeitos neurotóxicos induzidos pelo veneno de *B. pauloensis*, independentemente do tipo de PLA₂ (Lys49 ou Asp49) envolvida.

A preparação neuromuscular isolada de camundongo foi muito mais sensível a ação da Bp-12 do que a preparação de ave, isto pode estar relacionado às diferenças na composição do músculo, no que diz respeito à arquitetura, ultra-estrutura, distribuição de enzimas e receptores envolvidos na fisiologia das mesmas (Padykula e Gauthier, 1970; Melo e Ownby, 1996). O estudo miográfico permitiu apontar as diferenças entre elas.

Assim, o efeito miotóxico da Bp-12 manifestou-se através do bloqueio neuromuscular em resposta a estímulos direto e indireto, como ocorre com a BthTX-I (PLA₂ Lys49) de *B. jararacussu* (Oshima-Franco et al., 2004). Borja-Oliveira et al. (2003) relataram que o veneno de *B. pauloensis* causou bloqueio neuromuscular parcial das contrações evocadas diretamente, provavelmente a presença da Bp-12 contribui significativamente para esse bloqueio neuromuscular *in vitro*.

O efeito bloqueador neuromuscular dependente da concentração e a presença de contratura induzidos pela Bp-12, em preparação isolada de mamífero, são características típica de miotoxinas botrópicas. A ação sobre o sarcolema também foi investigada, com o emprego de d-tubocurarina, substância capaz de ocupar reversivelmente o receptor nicotínico, bloqueando a neurotransmissão (sob estímulo elétrico indireto) de forma não despolarizante. A estimulação elétrica direta do músculo produziu um potencial de ação muscular que foi bloqueado pela adição da Bp-12, mostrando uma ação direta da toxina sobre membranas, uma vez que o receptor nicotínico estava 'ocupado' pela d-Tc, corroborando com os achados de Heluany et al. (1992) e Oshima-Franco et al. (2005) para a BthTX-I, também uma PLA₂ Lys49.

Diversos íons divalentes, incluindo o Sr^{2+} são capazes de substituir o Ca^{2+} no processo de liberação do neurotransmissor (Miledi, 1966; Meiri e Rahamimoff, 1971; Meiri, 1975), embora seja menos efetivo do que o Ca^{2+} na transmissão neuromuscular (Katz e Miledi, 1969; Augustine e Eckert, 1984; Schiavo et al., 2000). No entanto, o Sr^{2+} não pode substituir o Ca^{2+} no processo catalítico (Miledi, 1966; Meiri e Rahamimoff, 1971; Rasgado-Flores et al., 1987; Hawgood e Bon, 1991).

Na ausência de Ca²⁺, a Bp-12 manteve seu efeito característico na JNM. É sabido que as fosfolipases Asp49 necessitam de Ca²⁺ como co-fator para exercerem atividade catalítica, o que não acontece com fosfolipases Lys49,

o que explica o fato de serem estas desprovidas de atividade enzimática (Hawgood e Bon, 1991; Arni et al., 1995), isto indica que a Bp-12 exerceu seu efeito bloqueador neuromuscular por um mecanismo independente de Ca²⁺, similar às outras PLA₂ Lys49 (van den Berg et al., 1988; Arni et al., 1995, Rodrigues-Simioni et al., 1995; Arni e Ward, 1996; Lomonte et al., 2003; Kini, 2003; Gutiérrez e Ownby, 2003). Este achado também está de acordo com o resultado da baixa atividade catalítica observado no ensaio bioquímico, corroborando com os achados de Rodrigues-Simioni et al. (1983, 1995) para a BthTX-I, e em contraste, com as NeuTX-I e -II (PLA₂ Asp49) que são dependentes de Ca²⁺ (Borja-Oliveira et al., 2007).

Em virtude da baixa/ausente atividade enzimática das PLA₂ homólogas Lys49, é evidente que o mecanismo dos efeitos farmacológicos não depende diretamente da hidrólise dos fosfolipídios (Gutiérrez e Ownby, 2003; Kini, 2003; Lomonte et al., 2003), mas da ação de mecanismos diferentes exercidos por regiões distintas do sítio catalítico, como por exemplo a região C-terminal que contempla os resíduos da posição 115-119, que podem interagir superficialmente com a interface da membrana, e assim, inserir parcialmente o resíduo da posição 125 na membrana lipídica, causando transtornos na bicamada fosfolipídica (Ward et al., 2002; Chioato et al., 2002).

A Bp-12 induziu bloqueio neuromuscular irreversível em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo tanto a 37 °C quanto a 22 °C, mostrando que o efeito bloqueador neuromuscular desta toxina independe da temperatura, o que reforça a sugestão de que a atividade catalítica não está envolvida nesta ação neuromuscular produzida pela toxina, corroborando com os achados de Rodrigues-Simioni et al. (1995).

Os estudos detalhados de dois parâmetros eletrofisiológicos, potencial de membrana em repouso (PM) e potencial de placa terminal (PPT) em preparação neuromuscular de mamífero, permitiram a interpretação dos resultados com a Bp-12. Esta produziu despolarização do sarcolema, visto nos experimentos da medida do PM, resultado este suportado pelo bloqueio

neuromuscular com contratura observado na miografia; similar aos achados de Rodrigues-Simioni et al. (1983) para a BthTX-I.

Com relação ao PPT, não houve significativa variação da amplitude dos PsPT, o que confirma que esta toxina não tem ação pós-sináptica, já que variação da amplitude pode evidenciar ação pós-sináptica, como ocorre com anticolinesterásicos e curare, com aumento e diminuição da amplitude, respectivamente (Fatt e Katz, 1952). A Bp-12 também não alterou o valor do conteúdo quântico, que corresponde ao somatório do número de "unidades quânticas", o que novamente sugere que o terminal nervoso não foi o sítio alvo de sua ação, corroborando com os resultados de que esta fração é uma miotoxina com ação predominante em músculo. Já a BthTX-I, uma miotoxina PLA₂ Lys49, também tem ação predominante em músculo, porém em baixa concentração altera o valor do conteúdo quântico, sugerindo um efeito primário no terminal présináptico (Oshima-Franco et al., 2004); a Bp-12 mesmo em baixas concentrações não alterou o conteúdo quântico (dado não mostrado).

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 da atividade 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 Bp-12 foi avaliada pelas técnicas bioquímica e histológica. A análise histológica evidenciou intensa mionecrose do músculo diafragma de camundongo, com presença de fibras edemaciadas, vacuolizadas e perda de material nuclear, características de miotoxinas botrópicas (PLA₂ Lys49), como a BnSP-6 e BnSP-7 de *B. pauloensis* (Rodrigues et al., 1998; Soares et al., 2000) e a BthTX-I de *B. jararacussu* (Randazzo-Moura et al., 2006).

A determinação de uma enzima intracelular como a CK que é liberada após injúria celular tem sido usada nos estudos de miotoxicidade *in vivo*, a partir de injeção intramuscular ou, *in vitro*, por meio da incubação com músculos esqueléticos diferenciados (Melo e Suarez-Kurtz, 1988; Rodrigues et al., 1998; Oshima-Franco et al., 1999, 2000; Soares et al., 2000; Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003; Damico et al., 2005; Randazzo-Moura et al., 2006; Gutiérrez et al., 2008).

A creatinoquinase é uma enzima intracelular, situada entre os filamentos de miosina, na região M da fibra muscular e transfere grupos fosfato da fosfocreatina ao ADP (difosfato de adenosina), transformando-o em ATP (trifosfato de adenosina) (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).

As miotoxinas PLA₂ de venenos botrópicos geralmente têm baixa ou nenhuma toxicidade sistêmica. Assim, o estudo de miotoxicidade local e sistêmica *in vivo* mostrou que a Bp-12 apresentou ação local, mas sem atividade sistêmica, como demonstrado pelos níveis de CK plasmático, quando esta toxina foi administrada pela via intravenosa em camundongos. Este fato, reforça a hipótese de ação diferenciada para miotoxinas que agem local ou sistemicamente, proposta por Gutiérrez e Ownby (2003).

Como um marcador bioquímico quantitativo de dano do músculo esquelético, a determinação da atividade de CK, geralmente, representa um parâmetro adicional para confirmar os resultados histológicos (Mebs et al., 1983) e, realmente, houve uma correlação positiva entre os níveis de CK e as alterações fisiológicas observadas nas preparações incubadas com Bp-12.

Nos quadros de envenenamento causados por serpentes botrópicas a inflamação e a dor são características marcantes, pois estes venenos são ricos em PLA₂ miotóxicas. A inflamação e um evento complexo e multifatorial em que o aumento da permeabilidade vascular e o edema são um dos primeiros passos da resposta inflamatória, seguida por outros mecanismos responsáveis pela ampliação da resposta inflamatória e do dano tecidual (Vane, 1993). O mecanismo

pelos quais os venenos e seus componentes isolados induzem o edema de pata *in vivo* não está totalmente elucidado, mas tem sido sugerido que sejam por produtos da lipooxigenase (Lôbo-de-Araújo et al., 2000; de Faria et al., 2001) ou por meio de produtos da ciclooxigenase, pois é possível que as PLA₂ exerçam função na expressão dessa enzima (Serhan, 1994; Lôbo-de-Araújo et al., 2000).

A habilidade de administrar PLA₂ exogenamente para gerar resposta inflamatória local, foi primeiramente reportada por Brain e Whittle (1977), que mostraram que PLA₂ isoladas a partir de venenos de *Vipera russeli* e *Crotalus durissus terrificus* induziam edema de pata *in vivo* e liberavam histamina dos mastócitos *in vitro*. Estudos sugeriram que além de histamina e serotonina, substâncias vasoativas tais como prostaglandinas também poderiam mediar a formação de edema local em resposta a PLA₂ dos venenos ofídicos (Bonta et al., 1979; Landucci et al., 1998, 2000; de Faria et al., 2001; Rodrigues et al., 2007).

A Bp-12 apresentou atividade edematogênica *in vivo* dependente da dose, cooroborando com outras miotoxinas obtidas do veneno de *B. pauloensis*, como a BnSP-6 e a BnSP-7 (Rodrigues et al., 1998). Também tem sido demonstrado que PLA₂ homóloga Lys9 procedente do veneno de *Bothrops atrox*, induziu tanto um efeito edematogênico como aumentou os níveis de interleucina-6 (Núñez et al., 2004). Já uma PLA₂ Asp49, a BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, induziu edema de pata e de pele em ratos, bem como a liberação *in vitro* de serotonina a partir de mastócitos peritoniais (Landucci et al., 2000). Esses resultados sugeriram que, em algumas PLA₂ a atividade catalítica possui um papel importante, mas não determinante no efeito edematogênico, e também de que as PLA₂ apresentam sítios farmacológico independentes do sítio catalítico, já estabelecido por Kini (2003).

Enfim, pelos resultados obtidos, conclui-se que a Bp-12, é uma nova PLA₂ Lys49 miotóxica, que apresenta características bioquímica e farmacológica próprias das miotoxinas botrópicas. Assim, o efeito tóxico predominante de fato, é sua ação miotóxica sobre o sarcolema, pois venenos de serpentes botrópicas são constituídos por uma mistura complexa de proteínas e induzem relevantes efeitos locais.

6- CONCLUSÃO

- A metodologia otimizada de purificação em HPLC de fase reversa permitiu isolar e purificar uma nova fração do veneno de *B. pauloensis*, denominada Bp-12, com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular e sem perda da atividade biológica.
- A Bp-12, uma PLA₂ Lys49, de caráter básico, apresentou baixa atividade catalítica, massa molecular de 13.789,56 Da e alto grau de homologia com outras PLA₂ Lys49 miotóxicas de venenos botrópicos.
- A Bp-12 induziu bloqueio neuromuscular irreversível, dependente do tempo e da concentração, das respostas musculares a estímulo elétrico indireto e direto em preparações curarizadas, sugerindo um efeito miotóxico.
- Ação bloqueadora neuromuscular induzida pela Bp-12, também foi independente da temperatura e do Ca²⁺, sugerindo que sua atividade farmacológica não depende da atividade catalítica.
- A toxina apresentou contratura e despolarização do sarcolema; e também não exibiu diferença significativa nos valores do conteúdo quântico e tamanho quântico em relação ao controle, corroborando com os achados de ação predominante em músculo, efeitos característicos das miotoxinas botrópicas.
- A Bp-12 induziu miotoxicidade, que foi observada por meio dos seguintes resultados: efeito miotóxico local (elevada liberação de CK), mionecrose (27% de lesão); e efeito edematogênico dependente da dose.

Conclui-se que a Bp-12 é uma nova PLA₂ Lys49 miotóxica, de caráter básico, com baixa atividade catalítica, que induz bloqueio neuromuscular irreversível dependente do tempo e da concentração e que apresenta atividades farmacológica e bioquímica características de miotoxinas botrópicas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aird SD, Kruggel WG, Kaiser II. Amino acid sequence of the basic subunit of mojave toxin from the venom of the *Mojave* rattlesnake (*Crotalus s. scutulatus*). Toxicon 1990; 28:669-73.

Amaral CF, De Rezende NA, Da Silva OA, Ribeiro MM, Magalhães RA, Dos Reis RJ, et al. Acute kidney failure secondary to ophidian bothropic and crotalid accidents. Analysis of 63 cases. Rev Inst Med Trop São Paulo 1986; 28(4): 220-7.

Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, 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 2000; 82: 755-63.

Angulo Y, Chaves E, Alape A, Rucavado A, Gutiérrez JM, Lomonte B. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis* (*Bothrops*) *schlegelii* from Costa Rica. Arch Biochem Biophys 1997; 339: 260-7.

Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A₂ - a structural review. Toxicon 1996; 34: 827-41.

Arni RK, Ward RJ, Cintra AC, Giglio JR. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin-I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. Toxicon 1995; 33(3): 383-6.

Assakura MT, Reichl AP, Asperti MCA, Mandelbaum FR. Isolation of the proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). Toxicon 1985; 23: 691-5.

Augustine GJ, Eckert R. Divalent cations differentially support transmitter release at the squid giant synapse. J Physiol 1984; 346:257-71.

Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. Toxicon 1985; 23: 631-6. Banker BQ, Kelly SS, Robbins N. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. J Physiol 1983; 339: 355-77.

Barstad JA. Presynaptic effect of the neurotransmitter. Experientia 1962; 18: 579-80.

Bonfim VL, Ponce-Soto LA, Novello JC, Marangoni S. Structural and Functional Properties of Cr 5, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. Protein J 2006; 25(7-8): 492-502.

Bonta IL, Vargattig BB, Böhm GM. Handbook of experimental pharmacology. In: Lee CY. Snake Venoms. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1979. p. 629-83.

Borja-Oliveira CR, Soares AM, Zamunér SR, Hyslop S, Giglio JR, Prado-Franceschi J, et al. Intraspecific variation in the neurotoxic and myotoxic activities of *Bothrops neuwiedi* snake venoms. J Venom Anim Toxins 2002; 8: 88-101.

Borja-Oliveira CR, Durigon AM, Vallin ACC, Toyama MH, Souccar C, Marangoni S, et al. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararacapintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. Braz J Med Biol Res 2003; 36: 617-24.

Borja-Oliveira CR, Kassab BH, Soares AM, Toyama MH, Giglio JR, Marangoni S, et al. Purification and N-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂ Neuwieditoxin-I and Neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) venom. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2007; 13(1): 103-21.

Brain S, Lewis GP, Whittle BJ. Actions of phospholipase A on mast cell histamine release and paw oedema in rat. Br J Pharmacol 1977; 59: 440P-1P.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília/DF. 6^a ed. 2005.

Brazil V. La défense contre l'ophidisme. São Paulo: Pocai & Weiss; 1911. p.181.

Bülbring, E. Observations on the isolated phrenic-nerve diaphragm preparation of the rat. Br J Pharmacol 1946; 1: 38-61.

Calgarotto AK, Damico DCS, Ponce-Soto LA, Baldasso PA, Da Silva SL, Souza GHMF, et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. Toxicon 2008; 51: 1509-19.

Chioato L, de Oliveira AH, Ruller R, Sá JM, Ward RJ. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the c-terminal region of a Lys49 phospholipases A₂. Biochem J 2002; 366: 971-6.

Cho W, Kézdy FJ. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. Methods Enzymol 1991; 197: 75-9.

Cintra AC, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. J Protein Chem 1993; 12(1): 57-64.

Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. Toxicon 1993; 31(10): 1237-47.

Cogo JC, Prado-Franceschi J, Giglio JR, Corrado AP, Cruz-Hofling MA, Donato JL, et al. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. Toxicon 1998; 36(10): 1323-32.

Cogo JC, Lilla S, Souza GH, Hyslop S, de Nucci G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). Biochimie 2006; 88(12): 1947-59.

Conover WJ. Practical Nonparametric Statistic. New York: Ed. John Wiley & Sons; 1971. p.462.

Costa PD, Toyama MH, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L, da Cruz-Höfling MA. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. Toxicon 1999; 37(8): 1143-53.

Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, da Cruz-Höfling MA, Novello JC. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. Toxicon 2005; 46: 222-9.

Daniele JJ, Bianco ID, Fidelio GD. Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. Arch Biochem Biophys 1995; 318(1): 65-70.

Daniele JJ, Bianco ID, Delgado C, Carrillo DB, Fidelio GD. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (Yarará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. Toxicon 1997; 35(8): 1205-15.

de Faria L, Antunes E, Bon C, Lôbo-de-Araújo A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom. Toxicon 2001; 39: 825-30.

Dixon RW, Harris JB. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. J Neuropathol Exp Neurol 1996; 55:1230-7.

Dua R, Cho W. Inhibition of human secretory class II phospholipase A_2 by heparin. Eur J Biochem 1994; 221:481-90.

Durigon AM, Borja-Oliveira CR, Dal Belo CA, Oshima-Franco Y, Cogo JC, Lapa AJ, et al. Neuromuscular activity of *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom in mouse nerve-muscle preparations. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2005; 11(1): 22-33.

Elmqvist D, Quastel DMJ. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. J Physiol 1965; 178: 505-29.

Fatt P, Katz B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. J Physiol 1951; 115: 320-70.

Fatt P, Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. J Physiol 1952; 117: 109-28.

Fletcher JE, Hubert M, Wieland SJ, Gong QH, Jiang MS. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. Toxicon 1996; 34(11-12): 1301-11.

Fontes MRM, Soares AM, Rodrigues VM, Fernandes AC, Da Silva RJ, Giglio JR. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. Biochim Biophys Acta 1999; 1432: 393-5.

Francis B, Gutiérrez JM, Lomonte B, Kaiser JI. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. Arch Biochem Biophys 1991; 284: 352-9.

Geoghegan P, Angulo Y, Cangelosi A, Díaz M, Lomonte B. Characterization of a basic phospholipase A₂-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedi* (yarará chica) from Argentina. Toxicon 1999; 37(12): 1735-46.

Ginsborg BL, Warriner J. The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. Br J Pharmacol Chemother 1960; 15: 410-1.

Gopalakrishnakone P, Ponraj D, Thwin MM. Myotoxic phospholipases from snake venoms: general myoglobinuric and local myonecrotic toxins. In: Kini RM. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism. England: Wiley, 1997. p. 287-320.

Gutiérrez JM, Cerdas L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. Rev Biol Trop 1984; 32(2): 213-22.

Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Isolation of myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. Toxicon 1984; 22(1): 115-28.

Gutiérrez JM, Lomonte B, Cerdas L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. Toxicon 1986; 24: 885-94.

Gutiérrez JM, Chaves F, Gené JA, 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 1989; 27(7): 735-45.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 1995; 33: 1405-24.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad JR. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p.310-23.

Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 2003; 42: 915-31.

Gutiérrez JM, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Lomonte B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. Toxicon 2008; 51: 80-92.

Harris JB, Johnson MA, Karlsson E. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake. *Notechis scutatus scutatus*. Clin Exp Pharmacol Physiol 1975; 2: 383-404.

Harris JB, Cullen MJ. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. Electron Microsc Rev 1990; 3(2): 183-211.

Hawgood B, Bon C. Snake venom presynaptic toxins. In: Tu AT. Handbook of Natural Toxins. New York: Marcel Dekker, 1991. p.3-52.

Heinrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reverse-phase highperformance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Anal Biochem 1984; 136(1): 65-74.

Heluany NF, Homsi-Brandeburgo MI, Giglio JR, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L. Effects induced by Bothropstoxin a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. Toxicon 1992; 30: 1203-10.

Hofmann H, Bon C. Blood coagulation induced by venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. Biochemistry 1987; 26(3): 780-7.

Hoge AR, Romano SARWL. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. Mem Inst Butantan 1972; 36: 109-207.

Hoge AR, Romano-Hoge SARWL. Poisonous snakes of the world. Part I. Checklist of the pit vipers, Viperoidea, Viperidae, Crotalinae. Mem Inst Butantan 1978; 42/43: 179-309.

Holzer M, Makessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. Toxicon 1996; 34: 1149-55.

Homma M, Tu AT. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. Br J Exp Pathol 1971; 52(5): 538-42.

Homsi-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial Chemical Characterization and Biological Activity of Bothropstoxin. Toxicon 1988; 26(7): 615-27.

Houmard J, Drapeau GR. Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. Proc Natl Acad Sci USA 1972; 69(12): 3506-9.

Hubbard JI, Llinás R, Quastel DMJ. Electrical properties of nerve and muscle. In: Arnold E. Electrophysiological analysis of synaptic transmission. Baltimore: Williams & Wilkins, 1969. p.112-43. Izidoro LFM, Rodrigues VM, Rodrigues RS, Ferro EV, Hamaguchi A, Giglio JR, et al. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). Biochimie 2003; 85: 669-75.

Jiménez-Porras JM. Reptile toxins. In: Biolog Data Book. 2nd ed. USA: Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB); 1973 p. 697.

Katz B, Miledi R. The effect of divalent cations on transmission in the squid giant synapse. Publ Staz Zool Napoli 1969; 37: 303-10.

Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes.Toxicon 2003; 42: 827-40.

Kondo K, Zhang J, Xu K, Kagamiyama H. Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin, agkistrodotoxin, from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. J Biochem 1989; 105: 196-203.

Kouyoumdjian JA, Polizelli C, Lobo SM, Guimarães SM. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85(4): 552.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-5.

Landucci EC, Castro RC, Pereira MF, Cintra AC, Giglio JR, Marangoni S, et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. Eur J Pharmacol 1998; 343(2-3): 257-63.

Landucci ECT, Toyama MH, Marangoni S, Benedito O, Giuseppe C, Antunes E, et al. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. Toxicon 2000; 38: 199-208.

Lôbo-de-Araújo A, Souza AO, da Cruz-Höfling MA, Flores CA, Bon C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. Toxicon 2000; 38: 209-21.

Lôbo-de-Araujo A, Donato J, Leite G, Prado-Franceschi J, Fontana M, Bon C, et al. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. Toxicon 2002; 40(9): 1283.

Lomonte B, Gutiérrez JM, Mata E. Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. Toxicon 1985; 23: 807-13.

Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon 2003; 42: 885-901.

Magro AJ, Soares AM, Giglio JR, Fontes MRM. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. Biochem Biophys Res Com 2003; 311: 713-20.

Mandelbaum FR, Reichl AP, Assakura MT. 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.

Mandelbaum FR, Assakura MT, Reichl AP. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). Toxicon 1984; 22: 193-206.

Marangoni S, Toyama MH, Arantes EC, Giglio JR, da Silva CA, Carneiro EM, et al. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. Biochim Biophys Acta 1995; 1243(3): 309-14. Mebs D, Ehrenfeld M, Samejima Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. Toxicon 1983; 21(3): 393-404.

Mebs D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. Pharmacol Ther 1990; 48(2): 223-36.

Meiri U, Rahamimoff R. Activation of transmitter release by strontium and calcium ions at the neuromuscular junction. J Physiol 1971; 15: 709-26.

Meiri U. Divalent ions and synaptic transmission at the neuromuscular junction. [Tese – Doutorado] Jerusalém: Hebrew University; 1975.

Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Júnior V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p.33-61.

Melo PA, 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 1988; 26(1): 87-95.

Melo PA, Ownby CL. Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. Toxicon 1996; 34(6): 653-69.

Milani JR, Jorge MT, De Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JL, et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. QJM 1997; 90(5): 323-34.

Miledi R. Strontium as a substitute for calcium in the process of transmitter release at the neuromuscular junction. Nature 1966; 212: 1233-4.

Milliken GA, Johnson DE. Analysis of Messy Data. New York: Ed. Van Nostrand Reinhold Company; 1984. p.473.

Miyamoto M. Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junction. J Physiol 1975; 250: 121-42.

Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. 3rded. New York: Ed. John Wiley & Sons; 1991. p.649.

Moura-da-Silva AM, Desmond H, Laing G, Theakston RD. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. Toxicon 1991; 29(6): 713-23.

Nahas L, Kamiguti AS, Barros MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. Thromb Haemost 1979; 41(2): 314-28.

Núñez V, Arce V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue of the snake *Bothrops atrox*. Toxicon 2004; 44(1): 91-101.

Oshima-Franco Y, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, 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 1999; 37(10): 1341-57.

Oshima-Franco Y, Hyslop S, Cintra ACO, Giglio JR, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. Muscle Nerve 2000; 23: 1832-9.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Dal-Belo CA, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cintra ACO, et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004; 95: 175-82.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Dal-Belo CA, Rodrigues-Simioni L. Effects of manganese ions in the neuromuscular junction. Rev Bras Toxicol 2005; 18(1): 17-26.

Otero R, Gutiérrez JM, Mesa MB, Duque E, Rodríguez O, Arango JL, et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. Toxicon 2002; 40: 1107-14. Ownby CL, Gutiérrez JM, Colberg TR, Odell GV. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Toxicon 1982; 20(5): 877-85.

Ownby CL, 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 1990; 28(7): 837-46.

Ownby CL, Selistre-de-Araujo HS, White SP, Fletcher J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. Toxicon 1999; 37, 411-45.

Padykula HA, Gauthier GF. The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white, and intermediate skeletal muscle fibers. J Cell Biol 1970; 46: 27-41.

Pedersen JZ, de Arcuri BF, Moreno RD, Rufini S. Phospholipase-like myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. Biochim Biophys Acta 1994; 1190(1): 177-80.

Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. J Protein Chem 2002; 21(3): 131-6.

Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. Biochim Biophys Acta 2007; 1770: 585-93.

Ponce-Soto LA, Barros JC, Marangoni S, Hernandes S, Dal-Belo C, Corrado AP, et al. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. Toxicol Appl Pharmacol 2008; *in press*.

Prianti AC Jr, Ribeiro W, Lopes-Martins RA, Lira-Da-Silva RM, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L, et al. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. Toxicon 2003; 41(5): 595-603. Prior C, Dempster J, Marshall G. Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. J Pharmacol Toxicol Methods 1993; 30: 1-17.

Randazzo-Moura P, Leite GB, Silva GH, Paffaro Jr VA, Cintra ACO, Cruz-Höfling MA, et al. A study of the myotoxicity of bothropstoxin-I using manganese in mouse phrenic nerve-diaphragm and extensor digitorum longus preparations. Braz J Morphol Sci 2006; 23(2): 237-46.

Randazzo-Moura P, Ponce-Soto LA, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A₂ homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. Protein J 2008; *in press*.

Rasgado-Flores H, Sanchez-Armass S, Blaustein MP, Nachshen DA. Strontium, barium, and manganese metabolism in isolated presynaptic nerve terminals. Am J Physiol 1987; 252: C604-10.

Rodrigues RS, Izidoro LF, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homsi-Brandeburgo MI, et al. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. Toxicon 2007; 50: 153-65.

Rodrigues VM, Soares AM, Mancin AC, Fontes MRM, Homsi-Brandeburgo MI, Giglio JR. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. Comp Biochem Physiol 1998; 121: 215-22.

Rodrigues VM, Marcussi S, Cambraia RS, de Araújo AL, Malta-Neto NR, Hamaguchi A, et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. Toxicon 2004; 44: 305-14.

Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience 1983; 10: 475-89.

Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J, Cintra ACO, Giglio JR, Jiang MS, Fletcher JE. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. Toxicon 1995, 33: 1479-89.

Rodrigues-Simioni L, Zamunér SR, Cogo JC, Borja-Oliveira CR, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, et al. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). Toxicon 2004; 43:633-8.

Rosenberg P. Phospholipases. In: Shier WT, Mebs D. Handbook of toxinology. New York: Marcel Dekker; 1990. p.68-223.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Bücherl W, Buckley EE. Venomous Animals and their Venoms. New York: Academic Press; 1971. p.345-84.

Rothschild AM, Rothschild Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Lee CY. Snake venoms. Berlin: Springer Verlag; 1979. p.541.

Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol Rev 2000; 80: 717-66.

Selistre de Araujo HS, White SP, Ownby CL. cDNA cloning and sequence analysis of a lisine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. Arch Biochem Biophys 1996; 326(1): 21-30.

Serhan CN. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. Biochim Biophys Acta 1994; 1212(1): 1-25.

Siegel S. Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento. São Paulo: Ed. McGraw-Hill; 1975. p.350.

Silva VX. Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) [Tese - Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2000.

Soares AM, Rodrigues VM, Homsi-Brandeburgo MI, Toayma MH, Lombardi FR, Arni RK, et al. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity.Toxicon 1998; 36(3): 503-14.

Soares AM, Guerra-Sá R, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. Arch Biochem Biophys 2000; 378: 201-9.

Suarez-Kurtz, G. Enzyme release from skeletal muscle. Braz J Med Biol Res 1983; 16(4): 283-90.

Tanizaki MM, Zingali RB, Kawazaki H, Imajoh S, Yamazaki S, Suzuki K. Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). Toxicon 1989; 27(7): 747-55.

Toyama MH, Mancuso LC, Giglio JR, Novello JC, Oliveira B, Marangoni S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. Biochem Mol Biol Int 1995; 37: 1047-55.

Toyama MH, Soares AM, Vieira CA, Novello JC, Oliveira B, Giglio JR, et al. Amino acid sequence of Piratoxin-I, a Myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-Bromophenacyl bromide. J Protein Chem 1998; 17(7): 713-8.

Toyama MH, Soares AM, Wen-Hwa L, Polikarpov I, Giglio JR, Marangoni S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. Biochimie 2000; 82: 245-50.

van den Bergh CJ, Slotboom AJ, Verheij HM, de Haas GH. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A₂. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A₂ and the rationale of the enzymatic activity of [lysine 49] phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. Eur J Biochem 1988; 176: 353-7.
Vane J. Control of the circulation by endothelial mediators. Inaugural GB West Memorial Lecture. Int Arch Allergy Immunol 1993; 101: 333-45.

Vidal JC, Stoppani AOM. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. Arch Biochem Biophys 1971; 145: 543-56.

Ward RJ, Chioato L, Oliveira AH, Ruller R, Sá JM. Active-site mutagenesis of a Lys49 phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. Biochem J 2002; 362: 89-96.

Yamaguchi Y, Shimohigashi Y, Chiwata T, Tani A, Chijiwa T, Lomonte B, et al. Lys49-phospholipase A_2 as active enzyme for beta-arachidonoylphospholipid bilayer membranes. Biochem Mol Biol Int 1997; 43(1): 19-26.

Zamunér SR, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L. The screening of *Bothrops* venoms for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparation. Toxicon 1996; 34: 314-5.

Zamunér SR, da Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. Toxicon 2004; 44(3): 259-71.

8- ANEXO



Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº <u>939-2</u>, sobre "<u>PURIFICAÇÃO DE UMA PLA2</u> <u>HOMÓLOGA (Lys49) DE BOTHROPS PAULOENSIS – CARACTERIZAÇÃO</u> <u>BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA</u>" sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Léa Rodrigues</u> <u>Simioni / Priscila Randazzo de Moura</u> 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 <u>07 de fevereiro de 2006</u>.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº <u>939-2</u>, entitled "<u>PURIFICATION OF A HOMOLOGOUS</u> <u>PLA2 (Lys49) FROM BOTHROPS PAULOENSIS – BIOCHEMICAL AND BIOLOGIC</u> <u>CHARACTERIZATION</u>", 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 <u>February 7, 2006</u>.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

Campinas, 07 de fevereiro de 2006.

Fátima Alonso Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

TELEFONE 55 19 3788-6359 FAX 55 19 32893124

