

CHARLENE GALBIATTI

**ESTUDO DAS ATIVIDADES NEUROTÓXICA E
MIOTÓXICA DE UMA FOSFOLIPASE A₂ BÁSICA
ISOLADA DO VENENO TOTAL DE *Bothrops marajoensis***

CAMPINAS

Unicamp

2008

CHARLENE GALBIATTI

**ESTUDO DAS ATIVIDADES NEUROTÓXICA E
MIOTÓXICA DE UMA FOSFOLIPASE A₂ BÁSICA
ISOLADA DO VENENO TOTAL DE *Bothrops marajoensis***

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

ORIENTAÇÃO: 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

G131e Galbiatti, Charlene
Estudo das atividades neurotóxicas e miotóxicas de uma fosfolipase A2 básica isolada do veneno total de *Bothrops marajoensis* / Charlene Galbiatti. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

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

1. *Bothrops*. 2. Junção neuromuscular. 3. Eletrofisiologia. 4. Toxinas. I. Simioni, Léa Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Study of neurotoxic and myotoxic activities of a phospholipase A2 isolated from the *Bothrops marajoensis* venom

Keywords: • *Bothrops*
• Neuromuscular Junction
• Electrophysiology
• Toxins

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Data da defesa: 28 -08 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Handwritten signatures in black ink are placed over the names of the examiners. The signature for Léa Rodrigues Simioni is at the top, followed by Yoko Oshima Franco, and Eliane Candiani Arantes Braga at the bottom. The signatures are fluid and cursive.

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

Data: 28/08/2008

DEDICATÓRIA

A Deus,

pois é quem nos concede o privilégio da vida e oferece o necessário para alcançarmos nossas metas. Agradeço por tudo.

A meus pais, Tânia e Aleixo,

que abdicaram dos seus sonhos para fazer com que os meus pudessem se tornar realidade. Chegou a hora de colher comigo os frutos que plantamos. Obrigada pelo carinho, amor, paciência, pelas palavras de conforto, pelo exemplo de vida e saibam que, por mais longe que eu possa ir, levarei sempre vocês em meu coração.

Juliana,

obrigada pela paciência e ajuda.

Davidson,

obrigada pela compreensão, paciência, conselhos e carinho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pelo voto de confiança, oportunidade, pelo espaço, tempo e paciência dispensada, obrigada pelo imenso aprendizado de vida.

À Profa. Dra. Maria Alice Cruz – Höfling, obrigada por abrir as portas do laboratório e contribuir com a histologia e auxílio científico. Obrigada pela atenção e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, apesar do pequeno convívio, agradeço pela oportunidade de trabalhar neste projeto e pelo aprendizado de novas técnicas.

Ao Prof. Dr. Luis Ponce Soto, obrigada pela contribuição no estudo bioquímico.

À Prof. Dra. Yoko Oshima Franco, apesar do pouco convívio, agradeço pela atenção e carinho dispensados e a rica contribuição com as orientações na banca de qualificação.

À Prof. Dra Saraguaci, agradeço por me apresentar a pesquisa. Você tornou possível a realização deste trabalho. Admiro sua força, coragem e simpatia. Obrigada pela amizade, atenção e carinho.

À Prof. Dra Elen Cristina Landucci, obrigada pelas contribuições da banca de qualificação.

À Prof. Dra Caroline Ribeiro de Borja Oliveira, inteligente, atenciosa, responsável e pronta para ajudar.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela excelente coordenação do curso de pós-graduação e muito obrigada pela oportunidade de reapresentação da qualificação.

Ao Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, que apesar da distância, sempre contribui com sua experiência e disponibilidade. Admiro-o como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira, pela contribuição nas correções de inglês.

Ao Gildo Bernardo Leite, obrigada pelo aprendizado, paciência, conselho e amizade.

À Priscila, uma professora maravilhosa, sempre pronta para oferecer auxílio e dividir seus conhecimentos. Agradeço por todas as explicações, pela paciência, pela amizade.

À Georgina. Dividimos momentos bons e outros não muito. Só tenho a agradecer por tudo, pela paciência, sei que teve muita, pelas aulas de bioquímica, pela companhia, ajuda nos experimentos, obrigada.

Ao Valdemir, obrigada pelos conselhos, paciência, explicações, sugestões e amizade. Admiro sua força de vontade.

Ao Sandro, obrigada pela convivência, amizade. Trabalhou com muita garra e vontade de vencer. Boa sorte no Doutorado.

Ao Mário, obrigada pela amizade e conselhos de como ser mestre.

Ao Dimas e Thiago, obrigada pela amizade.

À Mariana, obrigada pela ajuda nos estudos da disciplina de farmacologia e pela amizade.

Ao Walter, obrigada pela amizade e colaboração com dados sobre o veneno total.

À Profa. Dra. Maricene, obrigada pela amizade e auxílio com o inglês.

À Lourdes, obrigada pela amizade e incentivo.

Ao Thomaz, obrigada pela amizade, apoio e pelas aulas de bioquímica.

À Thalita, obrigada pela amizade, pela ajuda, paciência pelo incentivo.

À Marta Leonardo, Catarina, Karina e Carol obrigada pelo auxílio na parte prática da histologia.

Aos amigos do Laquip, Paulinho, Andrana, Vera, Frey, Augusto e Salomão, obrigada pelo auxílio bioquímico.

Aos funcionários da secretaria, Elaine, Fran, Bruna e Wanderlei, obrigada pelo auxílio.

Ao Miguel e Marcos do biotério, obrigada pela ajuda com os animais.

Aos técnicos Toninho, Zé Ilton, Agnaldo e Adilson que, através de um simples gesto, ajudaram de alguma forma, a realização deste trabalho.

Ao Elimar (estatístico) e à Mercedes (apoio visual) obrigada pela compreensão e serviços prestados.

À Professora Elaine (inglês), obrigada pela amizade e pela ajuda com a prova de inglês.

À Giovana, Nathália, Camila e Michele, acharam que eu esqueceria? De jeito nenhum! Obrigada pela amizade.

À Alexandra Sandrin obrigada pela foto da serpente.

Obrigada a todos os docentes, funcionários da Unicamp, amigos e alunos do curso de Pós-graduação do departamento de Farmacologia.

A todos que colaboraram direta e indiretamente com a realização deste trabalho.

À Unicamp, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.

Confúcio

	PÁG.
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRACT	<i>xix</i>
1- INTRODUÇÃO	22
1.1- Epidemiologia do gênero <i>Bothrops</i>	23
1.2- Gênero <i>Bothrops</i>	23
1.3- <i>Bothrops marajoensis</i>	26
1.3.1- Distribuição.....	26
1.3.2- Descrição.....	27
1.4- Caracterização bioquímica do veneno de <i>Bothrops marajoensis</i>	28
2- OBJETIVOS	32
3- MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- Animais	35
3.2- Venenos, toxina e reagentes	35
3.3- Técnica miográfica	36
3.3.1- Preparação biventer cervicis de pintainho.....	36
3.3.2- Preparação nervo frênico diafragma de camundongo.....	37
3.4- Técnica eletrofisiológica	37
3.4.1- Registro do potencial de membrana em repouso.....	38
3.4.2- Registro do potencial de placa terminal.....	38
3.4.2.1- Técnica “cut muscle”.....	38
3.4.2.2- Análise dos potenciais de placa terminal.....	39
3.4.2.3- Tamanho quântico.....	39
3.4.2.4- Conteúdo quântico.....	39
3.5- Análise histológica quantitativa	40
3.5.1- <i>In vitro</i>	40
3.5.2- <i>In vivo</i>	41

3.6- Determinação da atividade de CK	42
3.6.1- <i>In vitro</i>	42
3.6.2- <i>In vivo</i>	42
3.7- Análise estatística	43
4- RESULTADOS	44
4.1- Técnica miográfica	45
4.1.1- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular à temperatura de 37 °C na preparação BCP.....	45
4.1.2- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular a temperatura de 22 °C na preparação BCP.....	48
4.1.3- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica direta.....	49
4.1.4- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular à temperatura de 37 °C na preparação NFD.....	50
4.2- Técnica eletrofisiológica	51
4.2.1- Medida e análise do potencial de membrana.....	51
4.2.2- Medida e análise dos potenciais de placa terminal.....	52
4.3- Análise histológica quantitativa	53
4.3.1- <i>In vitro</i>	53
4.3.2- <i>In vivo</i>	55
4.4- Determinação da atividade de CK	57
4.4.1- <i>In vitro</i>	57
4.4.2- <i>In vivo</i>	58
5- DISCUSSÃO	60
6- CONCLUSÃO	66
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8- ANEXOS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
BCP	biventer cervicis de pintainho
d-Tc	d-Tubocurarina
CK	Creatinoquinase
PM	Potencial de membrana em repouso
PPT	Potencial de placa terminal
PsPT	Potenciais de placa terminal
HPLC	High performance liquid chromatography
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time of Flight
NFD	nervo frênico diafragma
PLA₂	Fosfolipase A ₂
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio – Gel de poliacrilamida

Tabela 1-	Composição de aminoácidos da Bmaj-9. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteínas. ND não foi determinado pelo sistema PICO-TAG (Waters).....	30
Tabela 2-	Efeito da Bmaj-9 sobre o conteúdo quântico dos PsPT obtido em preparação nervo frênico diafragma de camundongo em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média dos experimentos. $p < 0,05$ comparado com controle Tyrode.....	52
Tabela 3-	Efeito da Bmaj-9 sobre o tamanho quântico dos PsPT obtido em nervo frênico diafragma de camundongo em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média dos experimentos. $p < 0,05$ comparado com controle Tyrode.....	52
Tabela 4-	Índice de alterações morfológicas em porcentagem na preparação biventer cervicis de pintainho, após 120 minutos de exposição à fração ativa. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média de 5 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com controle Krebs.....	55
Tabela 5-	Índice de alterações morfológicas em porcentagem no músculo gastrocnêmio após 1, 6 e 24 horas de tratamento com Bmaj-9. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média de 5 experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle	57

	PÁG.
Figura 1- Distribuição geográfica da <i>Bothrops marajoensis</i>	26
Figura 2- Foto <i>Bothrops marajoensis</i>	27
Figura 3- Perfil cromatográfico do veneno total de <i>Bothrops marajoensis</i> e inserida Eletroforese em SDS-PAGE	28
Figura 4- A massa molecular da Bmaj-9 (*) analisada por Espectrometria de massa MALDI-TOF	29
Figura 5- Medida da atividade fosfolipásica do veneno total de <i>Bothrops marajoensis</i> e da Bmaj-9	31
Figura 6- Curvas da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho incubada com Bmaj-9 (estímulo elétrico indireto) *p<0,05, comparado com controle Krebs. Os pontos representam a média ± erro padrão da média de 6 experimentos.....	46
Figura 7- Efeito contraturante da ACh e KCl*p<0,05 comparado com o controle.....	47
Figura 8- Gráfico referente à resposta contrátil da preparação biventer cervicis de pintainho (estímulo elétrico indireto), incubada com Bmaj-9 (10 µg/mL), a 22 °C e após 70 minutos, a temperatura foi alterada para 37 °C (↓). Os pontos representam a média ± erro padrão da média de 6 experimentos.....	48
Figura 9- Curva da resposta contrátil na preparação biventer cervicis de pintainho (estímulo elétrico direto), incubada com Bmaj-9 (10 e 20 µg/ mL) e controle Krebs. Após a curarização (d-Tc 5 µg/mL) da preparação adicionou-se a toxina. Os pontos representam a média ± erro padrão da média de 6 experimentos. Foram inseridas na figuras os registro miográfico representativo das concentrações de 10 µg/mL (A) e 20 µg/mL (B).....	49

Figura 10-	Curvas da resposta contrátil na preparação nervo frênico diafragma de camundongo (estímulo elétrico indireto), incubada com Bmaj-9. Os pontos representam a média \pm erro padrão da média de 6 experimentos.....	50
Figura 11-	Valores do potencial de membrana em repouso no músculo hemidiafragma de camundongo incubada com Bmaj-9. Note que a toxina não alterou a polaridade da membrana próxima ou na região de placa terminal. Cada ponto indica a média \pm erro padrão da média de 5 experimentos.....	51
Figura 12-	Fotos representativas do aspecto morfológico do músculo biventer cervicis incubado com solução de Krebs (controle) e Bmaj-9 (1, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 120 min de estimulação elétrica indireta, (A) controle Krebs, (B) Bmaj-9 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (C) Bmaj-9 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D) Bmaj-9 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (E) Bmaj-9 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Notar que há preservação do perfil poligonal das células nos tratamentos com 1, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; nos músculos tratados com 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ começa a aparecer algum dano morfológico (*) na periferia. Barra = 10 μm	54
Figura 13	Aspecto morfológico do músculo gastrocnêmio após a injeção de Bmaj-9 (10 μg) ou controle PBS. (A) controle 1 hora, (B) tratado 1 hora, (C) controle 6 horas (D) tratado 6 horas (E) controle 24 horas e (F) tratado 24 horas. Notar que há preservação do perfil poligonal das células nos controle e nos músculos tratados a presença de algumas células edemaciadas (e), hipercontraídas (h) e lesões do tipo delta (d) Barra = 20 μm	56
Figura 14-	Atividade enzimática de creatinoquinase na preparação biventer cervicis de pintainho após 120 minutos de incubação com a Bmaj-9 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média, * $p < 0,05$ comparado com o controle de 6 experimentos.....	58

Figura 15- Atividade miotóxica local da Bmaj-9 em camundongos. Atividade enzimática foi medida em 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas, após a injeção intramuscular de Bmaj-9 ou PBS (*apresentam diferença significativa em relação ao PBS). Os valores estão representados pela média \pm erro padrão da média de 5 experimentos..... 59

RESUMO



No presente trabalho foram estudados os efeitos neuromusculares da toxina Bmaj-9 isolada do veneno de *Bothrops marajoensis* no laboratório de química de proteínas da Unicamp. Esta toxina foi ensaiada: nas preparações biventer cervicis de pintainho, nervo frênico diafragma de camundongo e no músculo gastrocnêmio de camundongo. Em preparações de ave, a Bmaj-9 causou bloqueio neuromuscular completo irreversível nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, sem afetar as contraturas evocadas pela adição exógena de ACh (110 µM). Além disso mostrou-se pouco ativa na preparação nervo frênico diafragma de camundongo. A Bmaj-9 não interferiu na resposta muscular a estímulos elétricos direto em preparações de biventer cervicis de pintainho previamente curarizadas.

Ensaio bioquímico mostraram que a Bmaj-9 exibiu uma pronunciada atividade fosfolipásica quando comparada a do veneno bruto. Assim, submetendo-se preparações incubadas com a toxina a baixa temperatura (22 °C), observou-se a ausência do seu característico efeito bloqueador neuromuscular.

A análise histológica *in vitro* mostrou que esta fração em baixas concentrações não causou alteração morfológica significativa embora tenha determinado um leve aumento na liberação da enzima creatinoquinase. Em altas concentrações, no entanto, foi observado algum dano muscular na região periférica do músculo.

In vivo, a Bmaj-9 causou uma discreta alteração morfológica e também um leve aumento nos níveis de CK após injeção intramuscular, mostrando uma correlação positiva entre os efeitos dos parâmetros estudados – lesão muscular e liberação de CK, esses dados, em nada se comparam aos efeitos de venenos ou toxinas tipicamente botrópicas.

O registro do PM mostrou que a Bmaj-9 (10 µg/mL) não produziu despolarização da membrana muscular, e a medida do conteúdo e do tamanho quânticos, em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, mostrou que houve um leve aumento nos valores do conteúdo quânticos após 15 minutos de incubação. Após 60 minutos de incubação, o efeito da Bmaj-9 sobre os valores do conteúdo e tamanho quânticos foram, respectivamente: 70,5 ± 11 e 0,21 ± 0,06 mV. Estes não foram significativamente diferentes quando comparados com os valores controle (68,0 ± 8,9 e 0,17 ± 0,04 mV).

Estes resultados sugerem que o bloqueio da transmissão neuromuscular, causado por esta toxina em baixas concentrações, seja muito provavelmente devido a uma ação pré-sináptica, resultado de sua interação com a membrana do terminal nervoso motor.

ABSTRACT



In the present work, the neuromuscular effects of the toxin Bmaj-9 isolated from the venom of *Bothrops marajoensis* in the laboratory of chemistry of proteins at Unicamp were studied. This toxin was assayed in biventer cervicis preparations of little chicken, phrenic diaphragm nerve of mice and in gastrocnemius muscles of mice. In birds preparation, Bmaj-9 caused irreversible complete neuromuscular blockade in the concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ not affecting the contractures caused by the exogenous addition of Ach (110 μM). Moreover, Bmaj-9 was not very active in the phrenic diaphragm preparation of mice. It has not interfered in the muscular response to direct electrical stimuli in biventer cervicis preparations of little chicken previously curarized.

Biochemical assays showed that Bmaj-9 exhibited pronounced phospholipase activity when compared to crude venom. Thus, when preparations incubated with the toxin were submitted to low temperatures (22°C), the absence of the characteristic neuromuscular blocking effect of the fraction was observed.

The histological analysis *in vitro* showed that even having determined a low increase on the release of the creatino-kinase enzyme, low concentrations of this fraction did not cause significant morphological alteration. Nevertheless, in high concentrations some muscular damages in the peripheral region of the muscle were observed.

In vivo, Bmaj-9 caused a slight morphological alteration and also a discrete increase on the CK levels after intramuscular injection, showing a positive correlation among the effects of the parameters studies – muscular lesion and CK release. These data obtained with Bmaj-9 are extremely inferior to the ones obtained with bothropic venoms or toxins.

The registration of the resting membrane potential showed that Bmaj-9 (10 $\mu\text{g/mL}$) did not produce depolarization of the muscular membrane and the measurement of the content and quantum size, in phrenic diaphragm preparation of mice, showed that a slight increase on the quantum amount was detected after 15 minutes of incubation. After 60 minutes of incubation, the effect of Bmaj-9 over the content and quantum size values was 70.5 ± 11 and 0.21 ± 0.06 mV, respectively; these values were not significantly different when compared to control values (68.0 ± 8.9 and 0.17 ± 0.04 mV).

These values suggest that the blockade of the neuromuscular transmission caused by this toxin in low concentrations is probably due to a pre-synaptic action resulting from the interaction of the toxin with the membrane of the motor nerve terminal.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia gênero *Bothrops*

O perfil dos acidentes ofídicos se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos no Brasil, e a maioria deles é atribuída ao gênero *Bothrops* (Bochner e Struchiner, 2003). Assim, dados mais recentes revelam que 87,5 % das notificações de acidentes ofídicos feitas ao Ministério da Saúde referem-se ao gênero *Bothrops* (Brasil, 2005).

1.2- Gênero *Bothrops*

Serpentes do gênero *Bothrops* habitam, preferencialmente, ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferia de grandes cidades. Esses animais têm hábito predominantemente noturno, podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçados (Melgarejo, 2003).

O envenenamento por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* resulta principalmente em efeitos locais como dor, edema, mionecrose e efeitos sistêmicos como hemorragia (Brasil, 2005).

Os venenos ofídicos consistem de uma mistura de proteínas, dotadas de atividades enzimáticas e (ou) tóxicas e de outros constituintes. Estudos de mecanismo de ação dos venenos ofídicos vêm atingindo grande progresso, pelo emprego de diversas ferramentas farmacológicas, como também pela separação dos constituintes das peçonhas no estado de pureza. No que se refere a este último item, a estrutura e atividade biológica desses constituintes é em geral intrigante, tanto que algumas toxinas puras têm sido estudadas e descritas na literatura com uso potencial como ferramenta farmacológica ou mesmo como modelo de droga para uso terapêutico.

Para exemplificar pode ser citado um medicamento que é comercializado desde os anos 70 e que surgiu a partir de estudos com um veneno de uma serpente do gênero *Bothrops*, o captopril, cujo nome comercial é capoten. Este medicamento foi o resultado do estudo de um peptídeo isolado do veneno da serpente, *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva et al., 1949).

Em um estudo recente, pesquisadores do Instituto Butantan anunciaram a existência de uma substância presente no veneno da jararaca que poderia prevenir e combater a pré-eclâmpsia, mal que atinge 10 % das gestantes (Cabral, 2008).

O primeiro estudo sistemático sobre o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* bem como o seu fracionamento com a obtenção de uma fração, a de maior massa denominado pelos autores de “pool IV”, a qual mostrou-se ser responsável pela ação bloqueadora da junção neuromuscular, por inibição do potencial composto de nervo e músculo e, portanto, bloqueando as respostas musculares a estímulos elétricos indiretos e também direto mais tardiamente. Esta fração reproduzia os efeitos do veneno total embora exibisse uma baixa atividade fosfolipásica e nenhuma atividade proteolítica (Rodrigues-Simioni et al. 1983). Mais tarde, a partir do mesmo veneno, foi isolada a fração S_{III}SP_V, correspondente ao “pool IV”. Fruto da colaboração de ambos os grupos a fração purificada “pool IV” ou S_{III}SP_V foi denominada bothropstoxina (Honsi-Brandeburgo et al., 1988).

O veneno de *Bothrops insularis* foi o primeiro veneno botrópico identificado como sendo neurotóxico, quando ensaiado em preparações de pintainho (Cogo et al., 1993). A jararaca ilhoa é uma serpente que sofreu um isolamento geográfico e desta forma tem hábito arborícola e se alimenta principalmente de aves, pois os roedores estão ausentes na ilha de Queimada Grande onde ela habita. É provável que, pelo fato da distribuição dessa serpente ser restrita a esta ilha, seu veneno tenha se tornado muito potente diferenciando-se dos outros venenos botrópicos que em geral mostram atividade miotóxica.

Outra serpente botrópica encontrada na literatura que apresentou em seu veneno características semelhante ao veneno de *Bothrops insularis*, foi a *Bothrops neuwiedi*. Seu veneno foi capaz de causar bloqueio neuromuscular em baixas concentrações sem qualquer efeito sobre o músculo (Rodrigues-Simioni et al., 2004).

Um estudo, comparando os efeitos neurotóxico e miotóxico de venenos botrópicos, revelou que o veneno de *Bothrops neuwiedi* se comportou diferente dos outros venenos estudados. Assim este veneno mostrou-se ser duas vezes mais potente em causar bloqueio da junção-neuromuscular. Com os resultados obtidos os autores sugeriram que o

bloqueio neuromuscular e a miotoxicidade são eventos provavelmente distintos mas concomitantes (Zamunér et al., 2004).

O veneno de *Bothrops marajoensis* pertencia a um complexo da *Bothrops atrox*, o qual compreendia as serpentes *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops asper* e *Bothrops leucurus*. Na década de 60, as serpentes incluídas neste complexo, foram divididas em espécies distintas de acordo com sua localização geográfica e a composição dos venenos (Hoge, 1965)

A clínica da *Bothrops marajoensis* é semelhante às manifestações clínicas do envenenamento botrópico, de modo geral (Pardal et al., 2004), e os pacientes picados são tratados com soro antibotrópico. No entanto, estudos experimentais na junção neuromuscular mostrou que o veneno de *Bothrops marajoensis* apresentou, em baixas concentrações, um marcante efeito neurotóxico. Assim como os venenos descritos acima, este veneno causou uma ação paralisante em preparações neuromusculares de ave e de camundongo e a preparação de ave é a mais sensível à sua ação.

Baseado nos resultados obtidos, os autores identificaram o bloqueio neuromuscular em baixas concentrações devido a uma ação pré-sináptica (Cavalcante et al., 2007).

Em todos os venenos botrópicos estudados com elevada toxicidade na junção neuromuscular foi observado comportamento farmacológico que sugeria fortemente a presença de alguma fração com atividade catalítica envolvida na atividade neurotóxica do veneno total. Assim, o veneno total de *Bothrops insularis* foi fracionado e identificada uma toxina com atividade fosfolipásica que produzia um efeito similar àquele observado no veneno total (Cogo et al., 1998). Mais tarde, a partir do veneno da *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada), foram purificadas (Borja-Oliveira et al., 2007), duas toxinas com características semelhantes ao veneno total, as quais foram chamadas de neuwieditoxin I e II. A neuwieditoxin I, em baixa concentração, causou bloqueio neuromuscular completo sem afetar as contraturas pela acetilcolina e cloreto de potássio adicionados exogenamente. A neuwieditoxin II produziu efeito semelhante (bloqueio neuromuscular completo) mas reduziu parcialmente a contratura muscular em resposta à adição exógena de KCl sem afetar a da ACh.

Neste sentido, o presente estudo se propõe investigar os efeitos de uma toxina isolada do veneno de *Bothrops marajoensis*, que apresenta efeito neurotóxico provavelmente relacionado à atividade paralisante observada no veneno total.

1.3- *Bothrops marajoensis*

1.3.1- Distribuição

É dito que esta serpente seja restrita à ilha de Marajó, embora possa, eventualmente, ser encontrada também no Amapá e nas regiões equatoriais do estado do Maranhão (Hoge e Romano, 1972; Campbell e Lamar, 2004) (Figura 1).

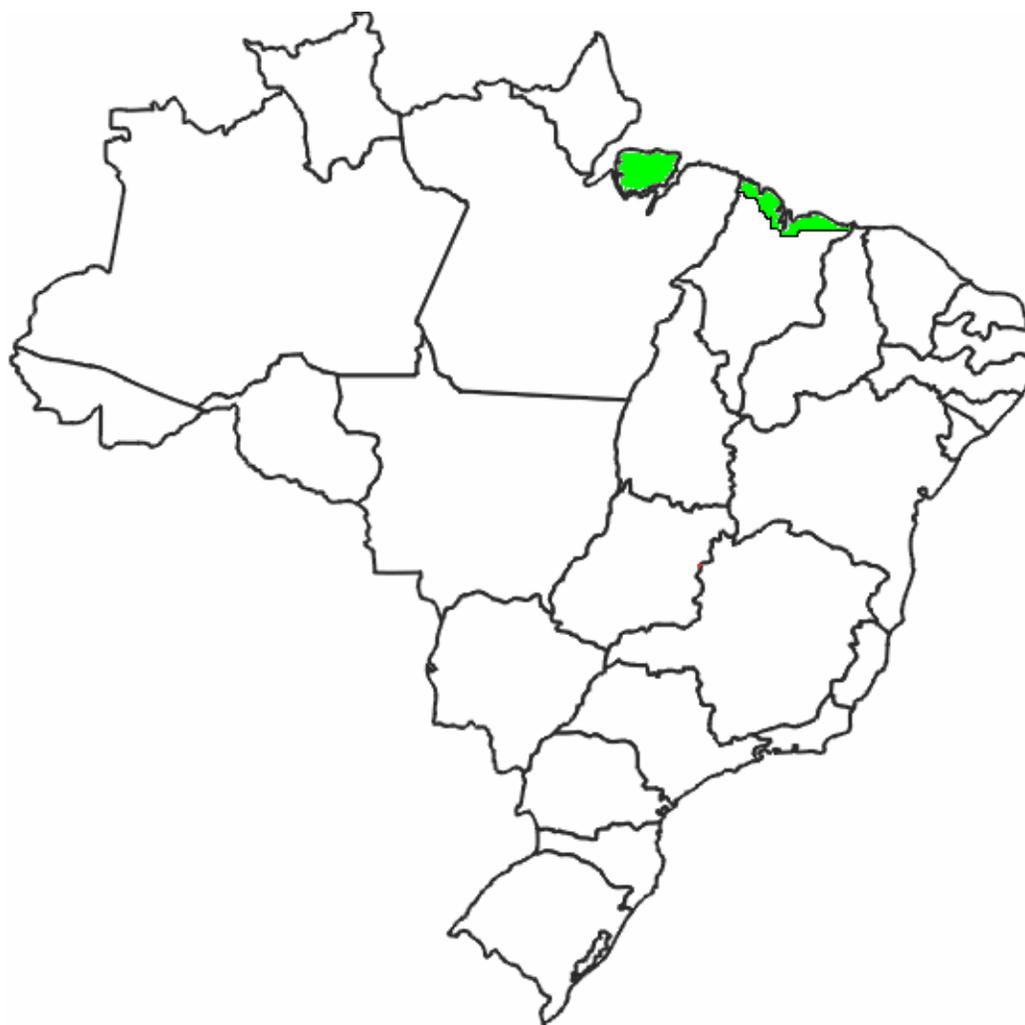


Figura 1- Distribuição geográfica da *Bothrops marajoensis*.

1.3.2- Descrição

Um dos primeiros relatos sobre a *Bothrops marajoensis* foi em 20 de agosto de 1958, por Hoge et al., (1965).

A *Bothrops marajoensis* é uma serpente terrestre de cabeça pontiaguda de porte médio que alcança um comprimento de aproximadamente 1,5 metros.

O dorso da cabeça e do corpo são marrom oliva, geralmente mais escuro na região dorsal desde a cabeça até a cauda. A íris é bronze, tornando-se pálida perifericamente. De modo geral os espécimes exibem de 19-21 marcas de cor marrom para preto sobre o corpo em formato triangular para trapezóide formando 4 manchas, 2 superiores unidas e 2 inferiores separadas entre si e separadas das 2 manchas superiores (Figura 2).

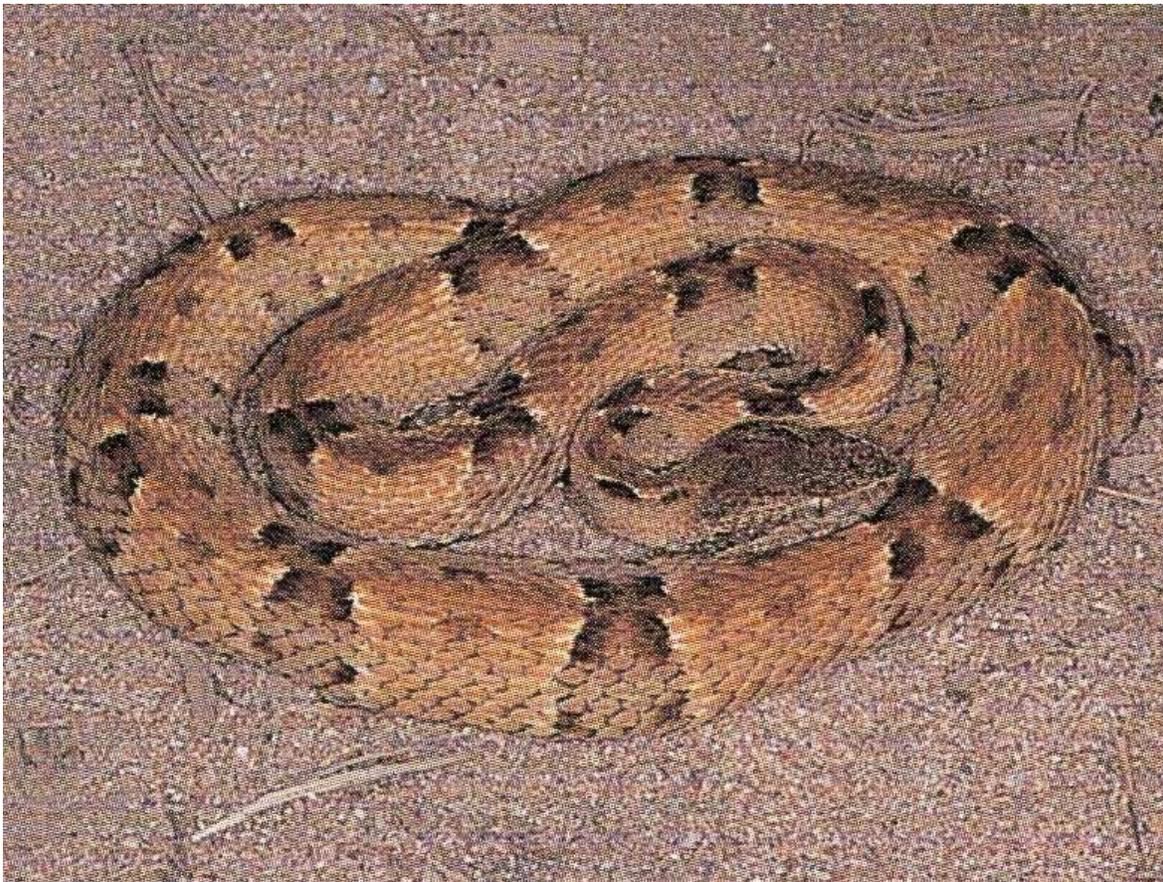


Figura 2- Foto da *Bothrops marajoensis*. Produção de Jack W. Sites Jr.

1.4- Caracterização bioquímica do veneno de *Bothrops marajoensis*

Para obtenção da fração ativa na junção neuromuscular, ensaios bioquímicos foram realizados no laboratório de química de proteínas da Unicamp.

O veneno de *Bothrops marajoensis* foi fracionado por *High performance liquid chromatography* (HPLC) de fase reversa, resultando na presença de 18 picos, os quais foram denominados como Bmaj-1 a Bmaj-18. A nova fração (Bmaj-9), alvo do presente estudo, refere-se ao pico 9 (negrito), o qual elui da coluna em um tempo de retenção de $35,6 \pm 0,2$ minuto em uma concentração de 56,8 % de tampão B (acetonitrila 66 % em 0,1 % de ácido trifluoroacético) (Figura 1).

A eletroforese mostrou que a Bmaj-9 possui uma massa molecular em torno de 14 kDa (Figura 1 inserida).

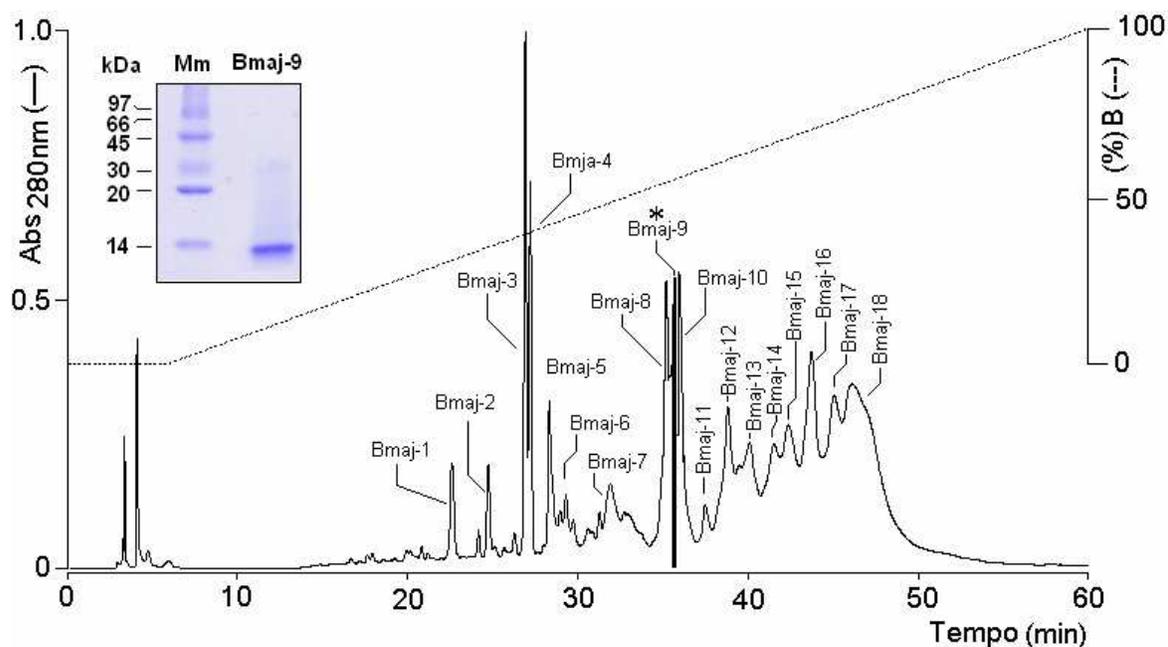


Figura 3- Perfil cromatográfico do veneno total de *Bothrops marajoensis* (5 mg) em HPLC de fase reversa usando uma coluna μ -Bondapck C-18 (Waters). O monitoramento foi realizado a 280 nm. O fluxo foi mantido constante a 1 mL/min. Inserida observa-se a eletroforese em SDS-PAGE.

Para constatar o grau de pureza da Bmaj-9, obtida a partir da cromatografia em HPLC de fase reversa, foi determinada a massa molecular por espectrometria de massa MALDI-TOF. A Bmaj-9 apresentou uma massa molecular de 13.679,33 Da (Figura 4). A determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massa determinada por eletroforese em SDS-PAGE e a análise por espectrometria de massa.

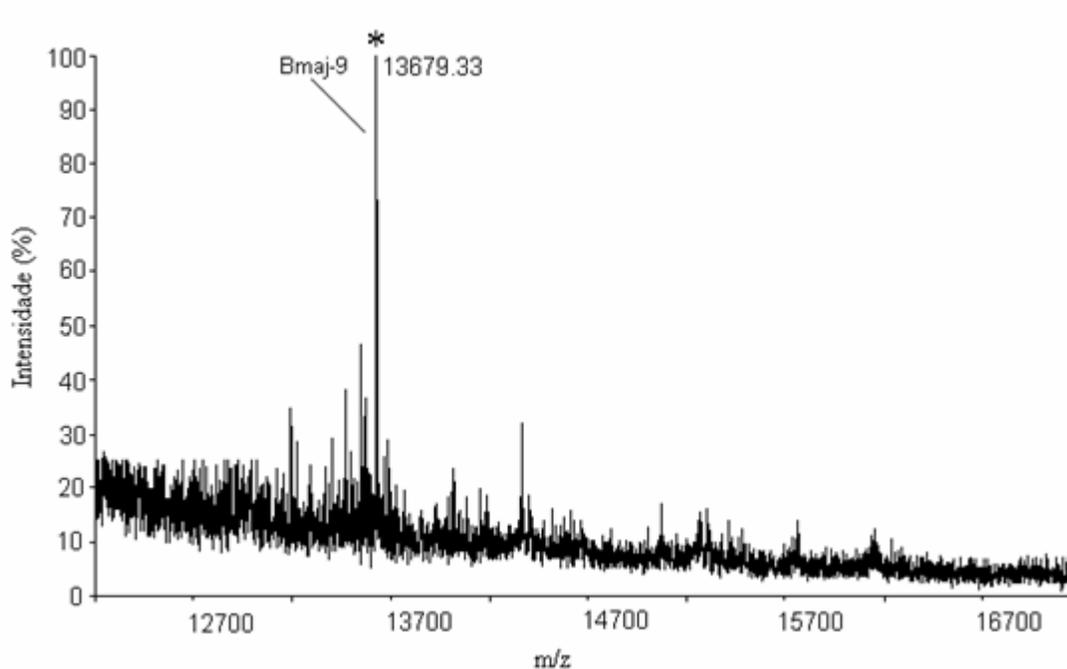


Figura 4- A massa molecular da Bmaj-9 (*) analisada por espectrometria de massa MALDI-TOF .

A análise da composição de aminoácidos da Bmaj-9 de *Bothrops marajoensis* (Tabela 1) mostra uma composição de 124 aminoácidos e trata de uma proteína de caráter básico pela elevada presença dos aminoácidos Lys, His e Arg.

Tabela 1- Composição de aminoácidos da Bmaj-9. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteínas. ND, não determinado determinado pelo sistema PICO-TAG (Waters).

Aminoácidos	Número de Aminoácidos
Asp	8
Glu	9
Ser	6
Gly	13
His	2
Arg	11
Thr	8
Ala	7
Pro	6
Tyr	9
Val	3
Met	1
Cys	14
Ile	5
Leu	6
Phe	6
Lys	10
Trp	ND
Total	124

A medida da atividade fosfolipásica foi realizada (Cho e Kézdy, 1991; Holzer e Mackessey, 1996) e modificada para placa de 96 poços (Ponce-Soto et al., 2002).

A atividade PLA₂ da Bmaj-9 demonstrada foi de $7,9 \pm 0,5$ nmoles/min e do veneno total de *Bothrops marajoensis* $2,3 \pm 1,1$ nmoles/min (Figura 5).

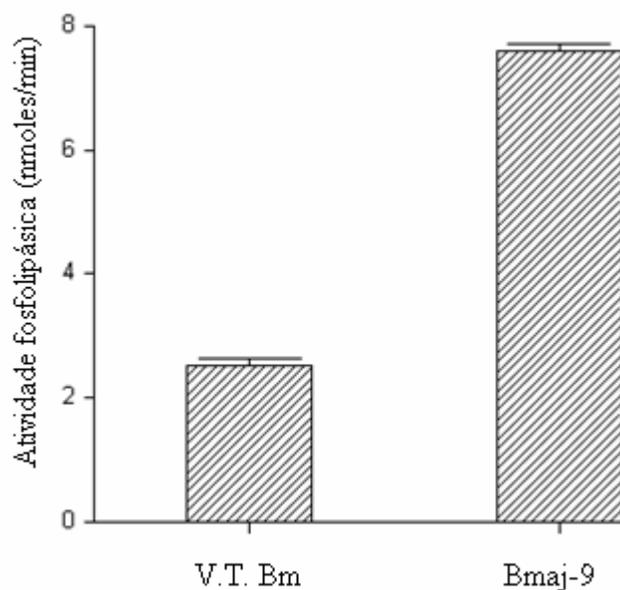


Figura 5- Medida da atividade fosfolipásica do veneno total (VT) de *Bothrops marajoensis* (Bm) e da Bmaj-9.

2- OBJETIVOS

Estudar os efeitos da Bmaj-9 na transmissão neuromuscular, em preparações de ave (biventer cervicis de pintainho) e de mamífero (nervo frênico músculo diafragma de camundongo).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY LINE W 36 de 4 a 8 dias, e camundongos da linhagem Swiss pesando entre 18 a 25 g, fornecidos pela granja Globo Aves e pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, respectivamente.

Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em temperatura ambiente e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Este projeto, sob o protocolo n.º (1027-1) foi submetido e aprovado integralmente pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEE/IB/ UNICAMP) (Anexo 1).

3.2- Veneno, toxina e reagentes

O veneno total de *Bothrops marajoensis* foi obtido do Serpentário de Proteínas Bioativas Ltda (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo-Brasil). A toxina foi obtida como resultado do fracionamento do veneno total de *Bothrops marajoensis* no laboratório de química de proteína Unicamp.

Os produtos químicos e reagentes utilizados foram de alto grau de pureza, obtidos da Sigma, Aldrich Chemicals, Merk e Bio Rad.

Nos ensaios com preparação nervo frênico diafragma de camundongo foi utilizado solução de Tyrode com a seguinte composição: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; CaCl₂ 1,8 mM; MgCl₂ 0,49 mM; NaH₂PO₄ 0,42 mM; glicose 11,1mM e NaHCO₃ 11,9 mM e nos ensaios com a preparação biventer cervicis de pintainho foi utilizado solução de Krebs com a seguinte composição: NaCl 118,7 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂ 1,8 mM; KH₂PO₄ 1,17 mM; MgSO₄ 7H₂O 1,17 mM; glicose 11,65 mM e NaHCO₃ 25 mM.

O cloridrato de acetilcolina foi adquirido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), d-tubocurarina da Abbott e o halotano, do laboratório Cristália (Itapira, SP, Brasil). Kit Historesina (Leika Instruments GmbH, NuBLoch/Heidelberg, Alemanha) e um kit comercial de creatinoquinase CK-NAC cinético da marca Bioclin, linha Crystal, fabricante Quibasa Química Básica Ltda.

3.3- Técnica miográfica

3.3.1- 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 por via inalatória com halotano e, após o isolamento do músculo biventer, este foi suspenso em uma cuba de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (mistura 95 % O₂ e 5 % CO₂) e mantida a 37 °C. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 1 g e estimulado por meio de eletrodos bipolares posicionados na região entre o tendão e o músculo, com o objetivo de estabelecer estimulação de campo (6 V, 0,1 Hz, 0,2 ms) ou estimulação elétrica direta (20 V, 0,1 Hz, 0,2 ms), provenientes de estimulador (Grass S48).

As contrações musculares e as contraturas em resposta à adição exógena de KCl (20 mM) e ACh (110 µM) foram registradas em um fisiógrafo (Gould RS 3400), por meio de um transdutor isométrico (Load Cell BG-10 GM), durante 120 minutos. O registro das contraturas para KCl e ACh foi realizado na ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição da toxina) e ao final do ensaio (após 120 minutos de incubação com a toxina). Três a cinco lavagens foram efetuadas sempre após a adição de KCl e de ACh.

Após um período de estabilização de 20 minutos, foram realizados os seguintes tratamentos: incubação com fração de *Bothrops marajoensis* (Bmaj-9) nas seguintes concentrações: 1, 5, 10 e 20 µg/mL. Em alguns experimentos (10 µg/mL) a temperatura do banho de incubação foi de 22 °C ao invés de 37 °C. Também foram realizados experimentos (10 e 20 µg/mL) em preparações previamente curarizadas com d-tubocurarina (5 µg/mL), sob estimulação elétrica direta.

Os experimentos controle foram realizados com solução nutritiva de Krebs a 37 °C durante 120 minutos.

3.3.2- Preparação nervo frênico diafragma de camundongo

Os camundongos foram anestesiados por via inalatória com halotano, sacrificados, por secção e sangria dos vasos cervicais. Após a dissecação para a retirada dos hemidiafragmas esquerdo e direito e isolamento dos nervos frênicos correspondentes (Bülbring, 1946), as preparações foram fixadas em cubas com capacidade de 5 mL e banhadas em solução nutritiva de Tyrode com abastecimento de carbogênio (mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂) e mantidos à temperatura constante (37 °C). O músculo diafragma foi fixado, por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina que mantinha em contato com a superfície da solução nutritiva. O transdutor isométrico (Load Cell BG-10 GM) foi acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400) para o registro da força de contração muscular. A preparação, então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico (estimulador Grass S48), usando-se estímulos com pulsos supramaximais (3 V, 0,1 Hz, 0,2 ms), por um período de 20 minutos de estabilização. No fim deste período, a preparação recebeu tratamento com a fração de *Bothrops marajoensis* (Bmaj-9) nas seguintes concentrações: 1, 10 e 20 µg/mL.

Os experimentos controle foram realizados com solução nutritiva de Tyrode a 37 °C durante 120 minutos.

3.4 -Técnica eletrofisiológica

A preparação hemidiafragma de camundongo com sua face torácica voltada para cima, foi fixada horizontalmente por meio de alfinetes, em cuba revestida de resina e silicone, preenchida com 2 mL de solução nutritiva de Tyrode 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 – Swtzerland) 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 Pipeta Puller (modelo 700D- David Kopf Instruments) e preenchidos com KCI 3 M, com uma

resistência entre 10 – 25 M Ω . Os microeletrodos foram introduzidos intracelularmente nas fibras musculares superficiais, com auxílio de micromanipulador (Leitz) para a medida do potencial de membrana em repouso (PM) e do potencial de placa terminal (PPT). Os biopotenciais foram obtidos através de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram feitos em um microcomputador (Microtec, São Paulo, SP) carregado com um software para aquisição de dados (AqDados, Lynx, São Paulo, SP). O computador munido de uma placa conversora A/D foi capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise.

3.4.1- 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 auxílio do microscópio, fazendo a medida do PM a partir do deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Além disso, o potencial de membrana foi monitorado digitalmente por intermédio de software já descrito. O mesmo procedimento foi repetido em 5 fibra distintas em um período máximo de 1 minuto. O estudo dos efeitos induzidos pela Bmaj-9 sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi efetuado nos tempos T₀ (controle), T₁₅, T₃₀, T₆₀ e T₉₀ min.

3.4.2- Registro do potencial de placa terminal

3.4.2.1- Técnica “cut muscle”

A técnica “cut muscle” proposta primeiramente por Barstad (1962) e modificada para camundongos 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 periféricamente, em toda a sua extensão, as fibras musculares da preparação hemidiafragma de camundongo com seu respectivo nervo frênico. Esse 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, 0,02 ms, 1 Hz).

3.4.2.2- Análise dos potenciais de placa terminal

3.4.2.3- 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 de variância (Hubbard et al., 1969). Este método pressupõe que numa salva de PsPT gerados a uma determinada frequência, 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.

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.

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

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

Onde:

$PPT' = PPT$ corrigido

$PPT =$ observado

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

$PM =$ Potencial de membrana

3.5- Análise histológica quantitativa

3.5.1- In vitro

Após 120 minutos de incubação com a Bmaj-9 nas concentrações de 1, 10, 20 e 40 µg/mL ou solução nutritiva de Krebs (controle), o músculo biventer cervicis de pintainho foi fixado em solução Bouin, por 24 horas. Após esse período os músculos foram lavados com água e amônia e colocados em álcool 70 %. A fixação seguiu o procedimento de desidratação (80 % 90 % e 100 %) e inclusão em historesina Leika (Nubloch/Heidelberg, Alemanha). Em seguida, foram confeccionados os blocos. Estes foram cortados em micrótomo Leika RM 2035 e as secções (3 µm de espessura) foram montadas em lâmina e coradas com uma mistura de azul de toluidina 0,5 % (Vetec, São Paulo) e bórax 5 % (Quimesp, São Paulo). A análise e contagem de todas as células presentes em um corte foram feitas por dois examinadores através do microscópio

Olympus BX51 acoplado a um microcomputador carregado com um programa para captura das imagens (Image Pro Plus 6.0 (Mídia Cybernetics, Inc.)).

O índice de alteração morfológica foi quantificado pela contagem do número de células lesadas e expresso como porcentagem do número total de células de cada músculo (índice de alteração morfológica = $[(\text{número de células lesadas} : \text{número total de células}) \times 100]$). Foram consideradas células lesadas as que apresentaram alterações como: região lesada em sua extensão, caracterizadas por hipercontração, fibras edemaciadas e células do tipo delta, células normais as que se apresentaram íntegras, com perfil poligonal e núcleos periféricos. Este procedimento foi usado em todos os ensaios nos grupos controles e tratados.

3.5.2- *In vivo*

O procedimento foi realizado em camundongos, com a injeção via intramuscular (gastrocnêmio) de Bmaj-9 na concentração de 10 µg/50µL ou controle PBS 50 µL. Após a administração da Bmaj-9, os músculos foram isolados nos intervalos de 1, 6, 24 horas e fixados em solução de Bouin, por 24 horas. Após esse período as preparações foram lavadas com água e amônia e colocadas em álcool 70 %. À fixação seguiu-se o procedimento de desidratação (80 % 90 % e 100 %) e inclusão em historesina Leika (Nubloch/Heidelberg, Alemanha). Em seguida, foram confeccionados os blocos. Estes foram cortados em micrótomo Leika RM 2035 e as secções (3 µm de espessura) foram montadas em lâmina e coradas com azul de toluidina 0,5 % (Vetec, São Paulo) e bórax 5 % (Quimesp, São Paulo). A análise e contagem de todas as células presentes em um corte foram feitas por dois examinadores através do microscópio Olympus BX51, acoplado a um microcomputador carregado com um programa para captura das imagens (Image Pro Plus 6.0 (Mídia Cybernetics, Inc.)).

O índice de alteração morfológica foi quantificado pela contagem do número de células lesadas e expresso como porcentagem do número total de células de cada músculo (índice de alteração morfológica = $[(\text{número de células lesadas} : \text{número total de células})$

X 100]). Foram consideradas células lesadas as que apresentaram alterações como: região muscular lesada em sua extensão, caracterizadas por hipercontração, células do tipo delta e fibras edemaciadas, células normais, as que apresentaram-se íntegras, com perfil poligonal e núcleos periféricos. Este procedimento foi usado em todos os ensaios nos grupos controle e tratados.

3.6- Determinação da atividade de CK

3.6.1- In vitro

O procedimento foi realizado em preparação biventer cervicis de pintainho incubados com Bmaj-9 (10 µg/mL) ou solução nutritiva de Krebs (controle), para posterior determinação da atividade enzimática. Aliquotas de 50 µL foram retiradas do banho nos tempos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, com reposição de igual volume de solução nutritiva de Krebs. As alíquotas foram mantidas a 4 °C até o momento da dosagem da atividade enzimática e então analisadas utilizando-se um kit comercial CK-NAC Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda – lote 0107), conforme orientação do fabricante.

Os resultados sobre liberação de CK foram expressos em U/L. Uma unidade de CK corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 37 °C.

3.6.2- In vivo

O procedimento foi realizado em camundongos, com a administração via intramuscular, de Bmaj-9 na concentração de 10 µg dissolvido em 50 uL de PBS. Após a administração da Bmaj-9 o sangue do animal foi coletado através da veia caudal em intervalos de 0,5, 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-se um kit comercial CK-NAC Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda – lote 0107), conforme orientações do fabricante.

Os resultados de sobre a liberação de CK foram expressos em U/L. Uma unidade de CK corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 37 °C.

3.7- Análise estatística

Para descrever o perfil da amostra, segundo as variáveis em estudo, foram feitas estatística descritiva das variáveis contínuas. Foram utilizados os seguintes testes: Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn e análise de variância para medidas repetidas (Repeated Measures ANOVA, teste Post-hoc de Tukey).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5 %, ou seja, $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Técnica miográfica

4.1.1- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular à temperatura de 37 °C na preparação biventer cervicis de pintainho

Na preparação biventer cervicis de pintainho, após a adição da Bmaj-9 (1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$), observou-se um progressivo bloqueio neuromuscular irreversível. Os resultados mostram que na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ a Bmaj-9 produziu um bloqueio neuromuscular parcial e que 5 $\mu\text{g/mL}$ representa a concentração maximal, pois, nas outras concentrações ensaiadas (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$), observou-se bloqueio neuromuscular completo em período de tempo que foram semelhantes entre si. As curvas correspondentes às diferentes concentrações (5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) ensaiadas mostraram-se praticamente sobrepostas de modo que os valores de T 50 % foram respectivamente 40 ± 6 ; 30 ± 3 e 42 ± 1 min, ou seja, não significativamente diferentes entre si. Além disso, não se observou diferença significativa entre os tempos necessários para causar bloqueio neuromuscular completo (90, 70 e 60 minutos) nas concentrações ensaiadas que foram 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Fig. 6).

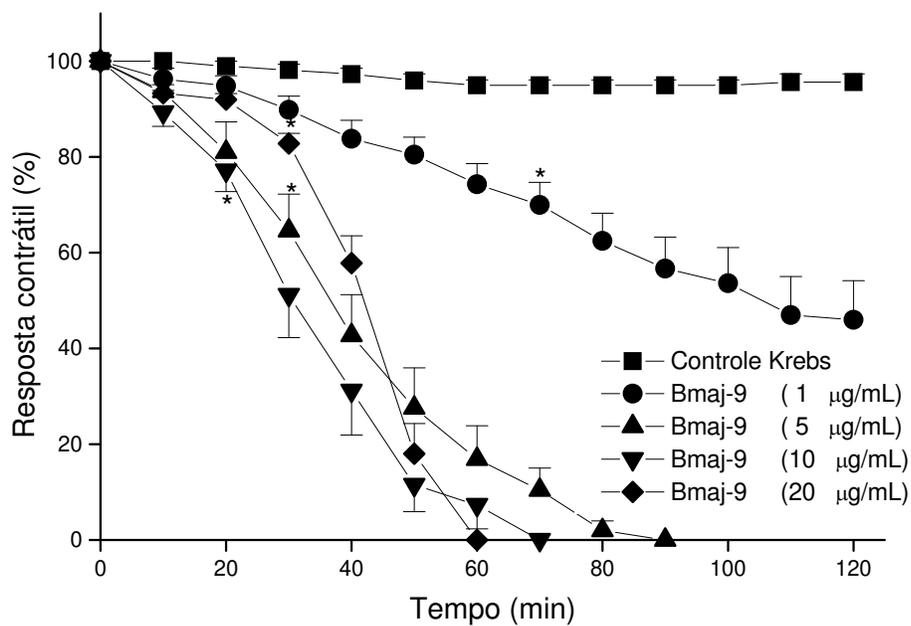


Figura 6- Curvas da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho incubada com Bmaj-9 (estímulo elétrico indireto), * $p < 0,05$, comparado com controle Krebs. Os pontos representam a média \pm erro padrão da média de 6 experimentos.

Independente da concentração estudada, a Bmaj-9 não afetou significativamente a contração da ACh (110 μ M). No entanto, a contração em resposta à adição exógena do KCl (20 mM) foi alterada parcialmente apenas na concentração de 20 μ g/mL quando comparado ao controle (Figura 7).

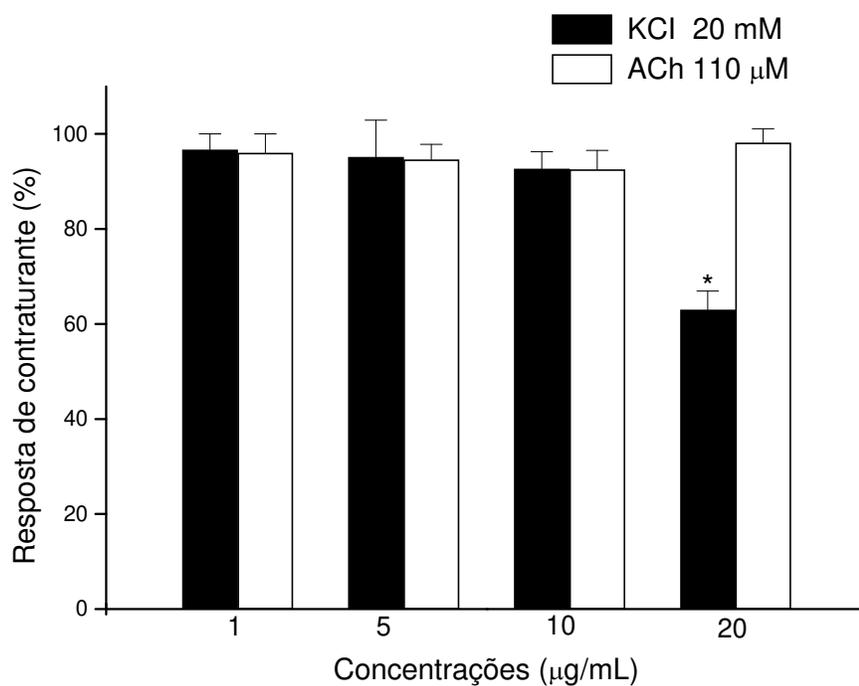


Figura 7- Efeito da contração da ACh e KCl * $p < 0,05$ comparado com o controle.

4.1.2- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho à temperatura de 22 °C

A concentração de 10 µg/mL foi escolhida para a realização dos ensaios miográficos à temperatura de 22 °C. Os resultados mostraram que o efeito bloqueador da junção neuromuscular causado pela Bmaj-9 é dependente da temperatura (Figura 10).

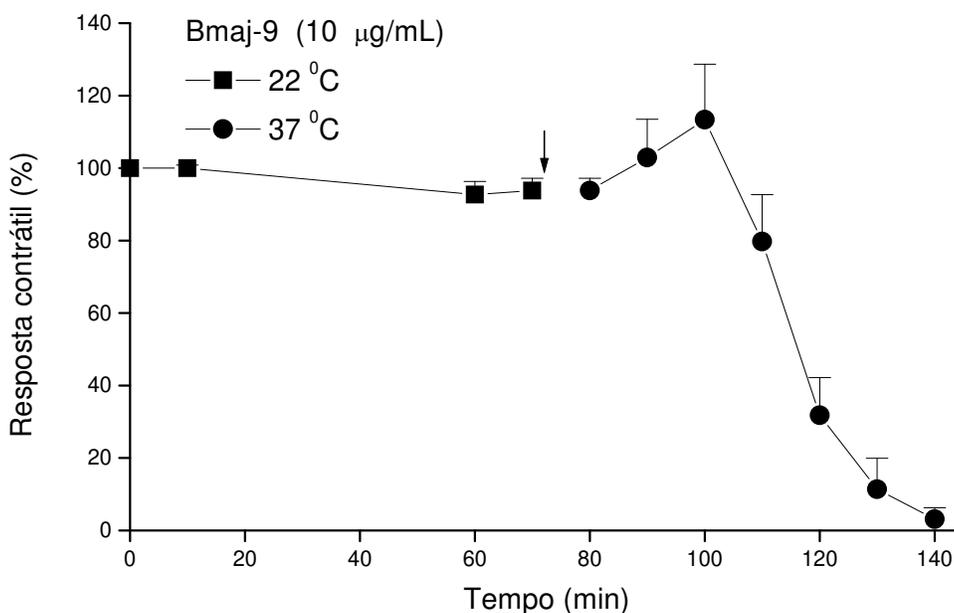


Figura 8- Gráfico referente à resposta contrátil da preparação biventer cervicis de pintainho (estímulo elétrico indireto), incubada com Bmaj-9 (10 µg/mL), a 22 °C e após 70 minutos, a temperatura foi alterada para 37 °C (↓). Os pontos representam a média ± erro padrão da média de 6 experimentos.

4.1.3- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular na preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica direta

A preparação foi curarizada com d-tubocurarina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os resultados mostraram que Bmaj-9 não produziu efeito significativo sobre o músculo (Figura 9).

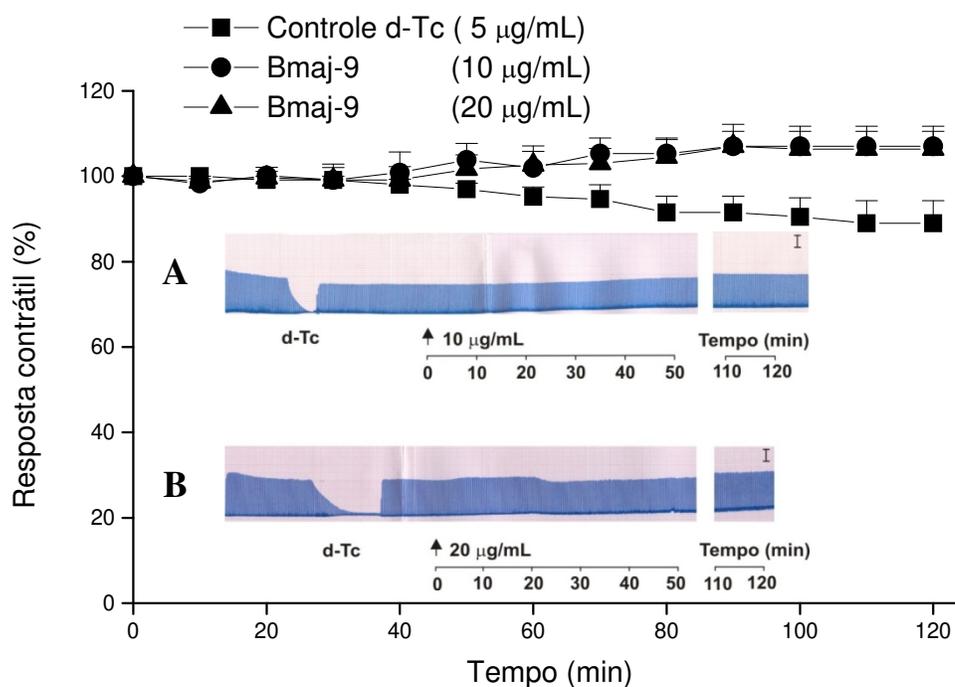


Figura 9- Curva da resposta contrátil na preparação biventer cervicis de pintainho (estímulo elétrico direto), incubada com Bmaj-9 (10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e controle Krebs. Após a curarização (d-Tc 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) da preparação adicionou-se a toxina. Os pontos representam a média \pm erro padrão da média de 6 experimentos. Foram inseridas na figuras os registro miográfico representativo das concentrações de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A) e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B).

4.1.4- Atividade da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular na preparação nervo frênico diafragma de camundongo à temperatura de 37 °C

Os ensaios foram realizados nas concentrações de 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, conforme mostrado na figura 10.

A toxina, nas concentrações ensaiadas, não exibiu qualquer efeito significativo sobre a força de contração muscular do músculo diafragma de camundongo sob estimulação elétrica indireta.

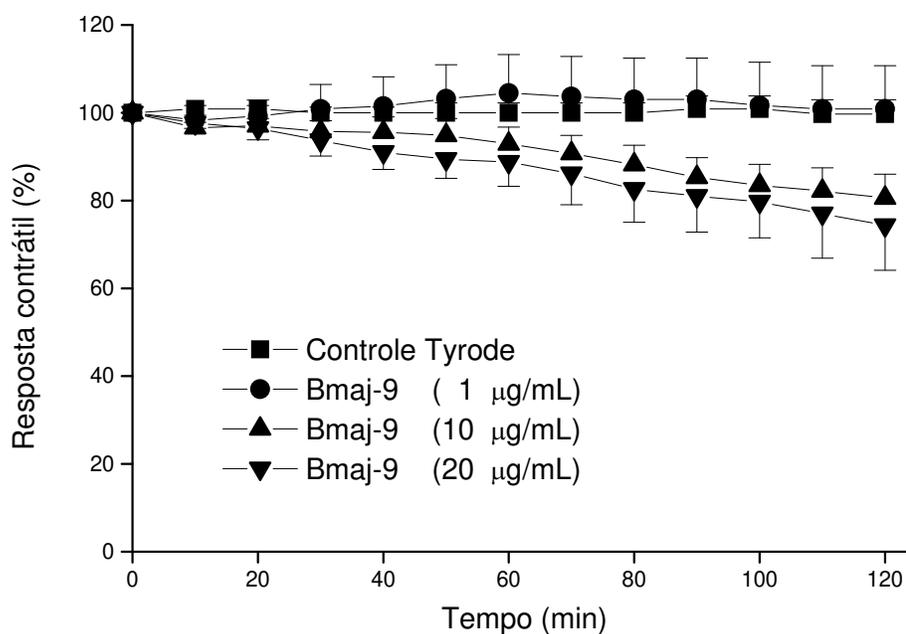


Figura 10- Curvas da resposta contrátil na preparação nervo frênico diafragma de camundongo (estímulo elétrico indireto), incubada com Bmaj-9. Os pontos representam a média \pm erro padrão da média de 6 experimentos.

4.2- Técnica eletrofisiológica

4.2.1- Medida e análise do potencial de membrana

As medidas de PM foram feitas no músculo hemidiafragma de camundongo, incubado com Bmaj-9 (10 $\mu\text{g/mL}$) ou em solução de Tyrode (controle) .

As preparações controle e tratadas mantiveram os valores dos PM em torno de $80,5 \pm 1,3$ e $83,9 \pm 1,1$ respectivamente ao longo de 90 minutos de observação.

Não houve diferença significativa entre as preparações sob tratamento com a fração e as controle. Assim, a Bmaj-9 aparentemente não produziu qualquer alteração mensurável sobre a polaridade da membrana da fibra muscular (Fig 11).

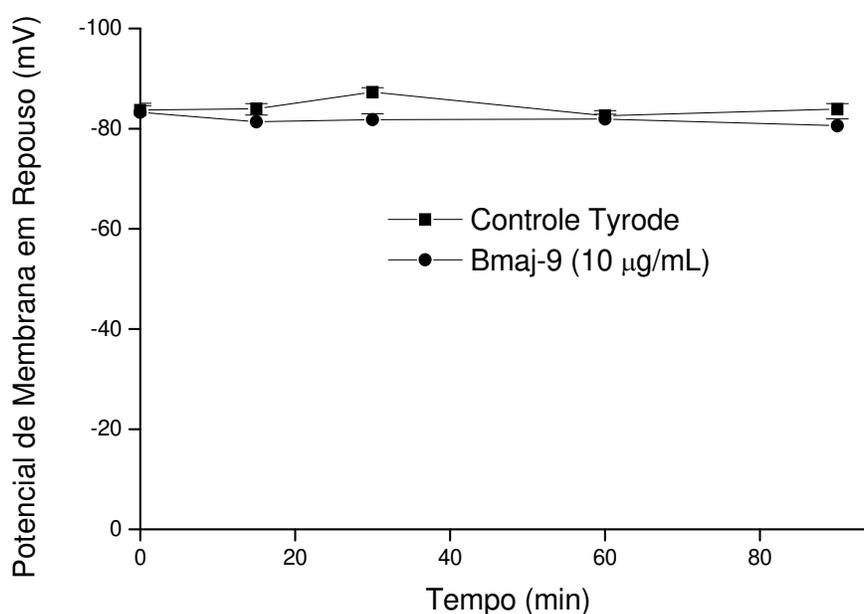


Figura 11- Valores do potencial de membrana em repouso no músculo hemidiafragma de camundongo incubada com Bmaj-9. Note que a toxina não alterou a polaridade da membrana próxima ou na região de placa terminal. Cada ponto indica a média \pm erro padrão da média de 5 experimentos.

4.2.2- Medida e análise dos potenciais de placa terminal

Estudos eletrofisiológicos foram realizados para identificar o sítio de ação da Bmaj-9 na junção neuromuscular.

A medida do conteúdo e do tamanho quânticos, em preparação nervo frênico diafragma de camundongo, mostrou que houve um leve aumento nos valores do conteúdo quântico após 15 minutos de incubação com a Bmaj-9 (10 µg/mL) (Tab. 2). No entanto nos outros períodos de observação como 30 e 60 minutos os valores não se mostraram diferentes dos valores controle. Assim os valores do conteúdo quântico dos PsPT foram de $68,0 \pm 8,9$ (T_0 controle) e $70,5 \pm 11,5$ (T_{60}), e os valores do tamanho quântico foram de $0,17 \pm 0,04$ (T_0 controle) e $0,21 \pm 0,06$ (T_{60}), demonstrando que não houve diferença significativa em relação ao controle (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2- Efeito da Bmaj-9 sobre o conteúdo quântico dos PsPT, obtido em preparação nervo frênico diafragma de camundongo. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média dos experimentos. $p < 0,05$ comparado com controle Tyrode.

Conteúdo quântico dos PsPT				
Controle Tyrode		Bmaj-9 (10 µg/mL)		
0 min	15 min	30 min	60 min	
$68,0 \pm 8,9$	$93,8 \pm 19,4$	$79,2 \pm 8,4$	$70,5 \pm 11,5$	

Tabela 3- Efeito da Bmaj-9 sobre o tamanho quântico dos PsPT, obtido em nervo frênico diafragma de camundongo. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média dos experimentos. $p < 0,05$ comparado com controle Tyrode.

Tamanho quântico dos PsPT				
Controle Tyrode		Bmaj-9 (10 µg/mL)		
0 min	15 min	30 min	60 min	
$0,17 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,10$	$0,15 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,06$	

4.3- Análise histológica quantitativa

4.3.1- In vitro

A Figura 12 mostra secções transversais (3 μm) do músculo biventer cervicis de pintainho após 120 minutos de incubação com Bmaj-9 (1, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) e controle Krebs.

Nos músculos controle e tratados com Bmaj-9 (1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$) verificou-se que as fibras musculares mantiveram-se com aparência normal, tendo poucas fibras alteradas, as quais não apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). No entanto, o tratamento com Bmaj-9 na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ causou alteração na morfologia de algumas células que se mostraram edemaciadas e hipercontraídas na periferia do músculo.

Os índices das alterações morfológicas como resultado da incubação das preparações com a toxina estão representados na Tabela 4.

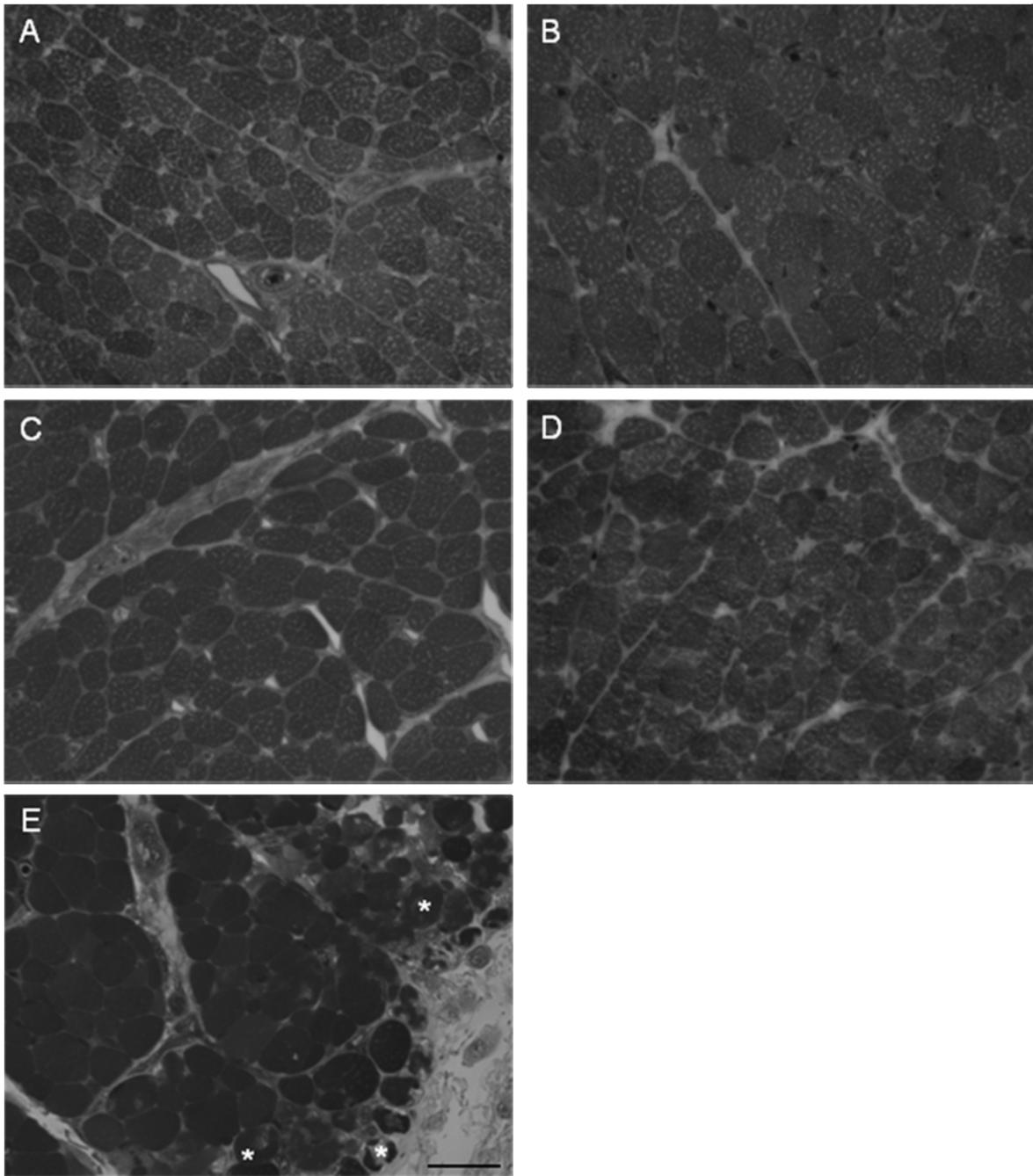


Figura 12- Fotos representativas do aspecto morfológico do músculo biventer cervicis incubado com solução de Krebs (controle) e Bmaj-9 (1, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$). Após 120 min de estimulação elétrica indireta, (A) controle Krebs, (B) Bmaj-9 1 $\mu\text{g/mL}$, (C) Bmaj-9 (10 $\mu\text{g/mL}$) (D) Bmaj-9 (20 $\mu\text{g/mL}$) e (E) Bmaj-9 (40 $\mu\text{g/mL}$). Notar que há preservação do perfil poligonal das células nos tratamentos com 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$; nos músculos tratados com 40 $\mu\text{g/mL}$ começa a aparecer algum dano morfológico (*) na periferia. Barra = 10 μm .

Tabela 4- Índice de alterações morfológicas em porcentagem na preparação biventer cervicis de pintainho, após 120 minutos de exposição à fração ativa. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média de 5 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com controle Krebs.

Concentrações de Bmaj-9 ($\mu\text{g/mL}$)	Alterações morfológicas (%)
Controle Krebs	$0,90 \pm 0,41$
1	$0,11 \pm 0,08$
10	$0,70 \pm 0,60$
20	$0,01 \pm 0,01$
40	$3,56 \pm 1,40^*$

4.3.2- *In vivo*

A Figura 13 mostra secções transversais ($3 \mu\text{m}$) do músculo gastrocnêmio de camundongo 1, 6 e 24 horas após a injeção de Bmaj- 9 ($10 \mu\text{g}$). A análise das lâminas mostrou que as fibras musculares apresentaram pequenas áreas de lesão, representadas por: $6,3 \% \pm 0,6$; $7,8 \% \pm 1,5$ e $6,6 \% \pm 1,8$ após 1, 6 e 24 horas de tratamento, respectivamente. Estes resultados foram significativamente diferentes quando comparados aos do controle, porém não são significativamente diferentes entre si, ou seja, o grau de alteração morfológica causado pela fração parece não ser dependente do tempo de observação.

Os índices das alterações morfológicas estão representados na Tabela 5.

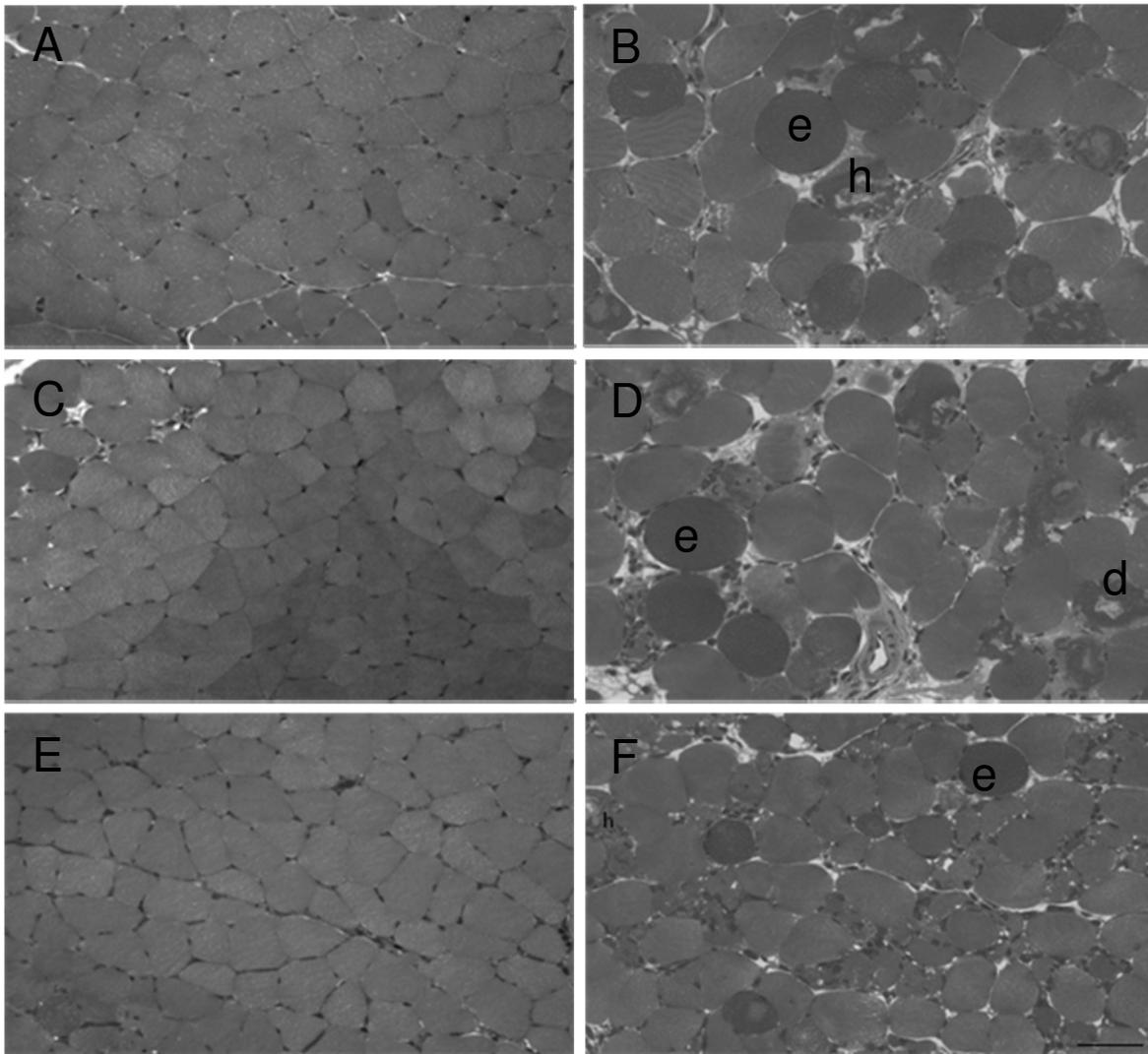


Figura 13- Aspecto morfológico do músculo gastrocnêmio após a injeção de Bmaj-9 (10 μ g) ou controle PBS. (A) controle 1 hora, (B) tratado 1 hora, (C) controle 6 horas (D) tratado 6 horas (E) controle 24 horas e (F) tratado 24 horas. Notar que há preservação do perfil poligonal das células nos controle e nos músculos tratados a presença de algumas células edemaciadas (e), hipercontraídas (h) e lesões do tipo delta (d) Barra = 20 μ m

Tabela 5- Índice de alterações morfológicas em porcentagem no músculo gastrocnêmio após 1, 6 e 24 horas de tratamento com Bmaj-9. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média de 5 experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

Grupos	Alterações morfológicas (%)		
	1 hora	6 horas	24 horas
Controle	0,4 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
Tratado	6,3 \pm 0,6*	7,8 \pm 1,5*	6,6 \pm 1,8*

4.4- Determinação da atividade de CK

4.4.1- *In vitro*

A Figura 14 mostra um gráfico representativo da atividade da enzima creatinoquinase medida através das amostras coletadas do banho em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos).

Após a adição de Bmaj-9 (10 $\mu\text{g/mL}$), houve aumento significativo na liberação de CK somente após 90 e 120 minutos de incubação.

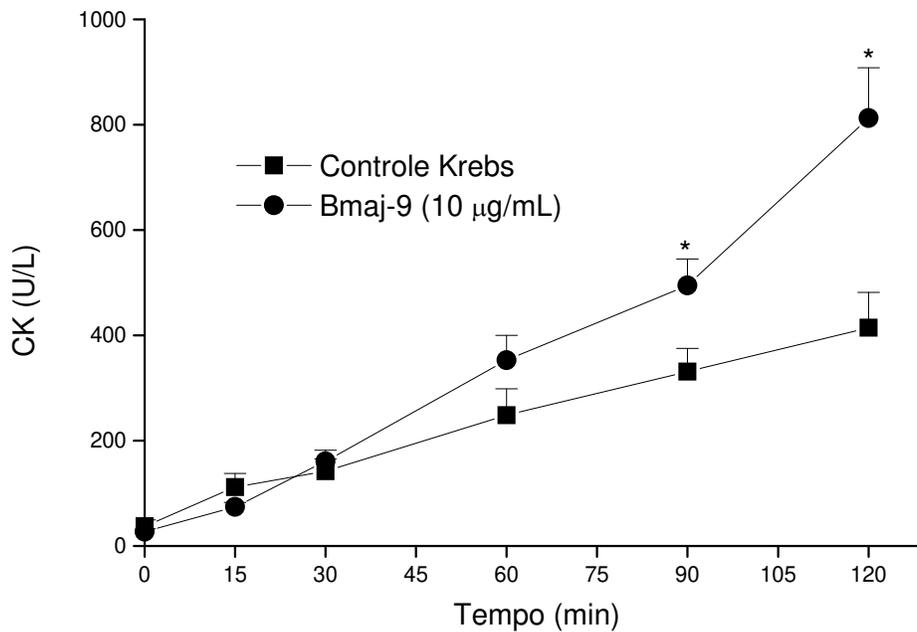


Figura 14- Atividade enzimática de creatinoquinase na preparação biventer cervicis de pintainho após 120 minutos de incubação com a Bmaj-9 (10 µg/mL). Cada ponto representa a média ± erro padrão da média, *p<0,05 comparado com o controle de 6 experimentos.

4.4.2- *In vivo*

A Figura 15 representa os resultados da atividade miotóxica local medida através da atividade CK após injeção intramuscular (gastrocnêmio) de Bmaj-9 (10 µg/50 uL de PBS). A Bmaj-9 provocou um aumento significativo dos níveis de CK sérico no período de uma a seis horas.

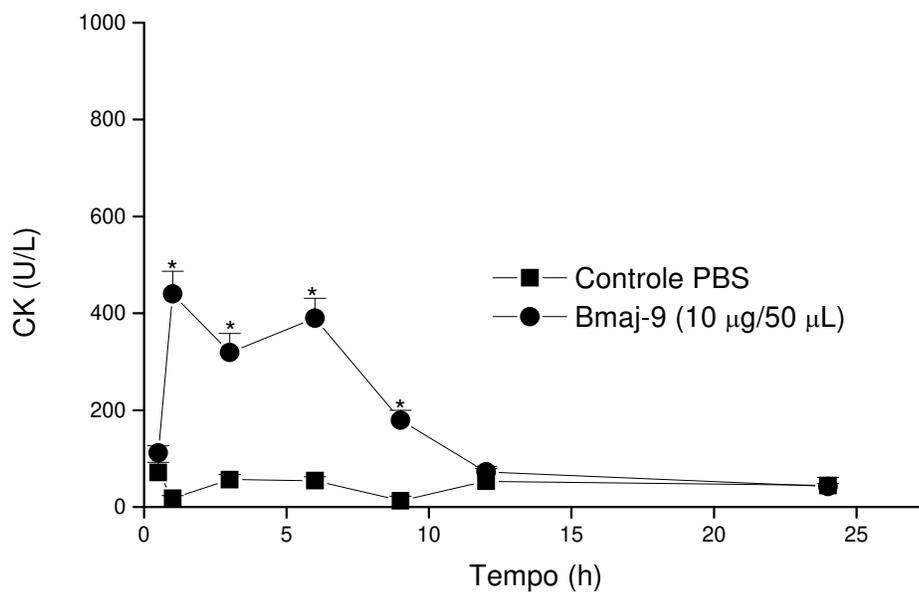


Figura 15- Atividade miotóxica local da Bmaj-9 em camundongos. Atividade enzimática foi medida em 0,5, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas, após a injeção intramuscular de Bmaj-9 ou PBS (*apresentam diferença significativa em relação ao PBS). Os valores estão representados pela média \pm erro padrão da média de 5 experimentos.

5- DISCUSSÃO

Os venenos ofídicos são uma mistura de proteínas ativas com diferentes propriedades tóxicas. Alguns autores têm descrito os processos de separação e de purificação de frações ativas na junção neuromuscular, a partir de venenos pertencentes ao gênero *Bothrops* (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Cogo et al., 1998; Borja-Oliveira et al., 2007; Ponce-Soto et al., 2006, Ponce-Soto et al., 2007; Cogo et al., 2006), porém pouco é conhecido sobre o veneno de *B. marajoensis* (Cavalcante et al., 2007).

No presente trabalho foi estudada uma nova neurotoxina, Bmaj-9, obtida do veneno de *B. marajoensis*; a qual foi isolada, purificada e caracterizada bioquimicamente, com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular e sem perda da atividade biológica.

Nos estudos sobre venenos, a ação pré-sináptica tem sido freqüentemente identificada como uma característica das famílias Elapídica e Crotálica; no entanto alguns autores observaram esse efeito também em algumas espécies do gênero *Bothrops*. Assim, os venenos de *B. insularis* e *B. pauloensis* exibiram atividade bloqueadora neuromuscular que foi interpretada pelos autores como uma ação primariamente no sítio pré-sináptico interferindo na liberação do neurotransmissor (Borja-Oliveira et al., 2002, Borja-Oliveira et al., 2003; Zamunér et al., 2004; Rodrigues-Simioni et al., 2004; Durigon et al., 2005).

Neurotoxinas de venenos de serpentes causam paralisia neuromuscular por atuar em sítios pré-sinápticos, inibindo a liberação de acetilcolina ou pós-sinápticos, bloqueando os receptores colinérgicos nicotínicos. Estes diferentes mecanismos de atuação podem ser diferenciados usando-se preparação biventer cervicis de pintainho (Harvey et al., 1994).

A Bmaj-9 induziu efeito bloqueador neuromuscular irreversível em concentrações muito baixas (1 µg/mL), sem afetar as contraturas produzidas pela adição exógena de acetilcolina sugerindo que esta neurotoxina atua em sítios pré-sinápticos, corroborando os achados de Borja-Oliveira et al. (2007) que isolaram neurotoxinas do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e observaram que a neuwieditoxina-I (NeuTX-I) induziu bloqueio neuromuscular sem inibir as contraturas, de ACh ou de KCl,

mostrando-se ser totalmente desprovida de ação tóxica sobre o músculo. No entanto, a Bmaj-9 em elevadas concentrações (20 µg/mL) exibiu discreto, porém significativo efeito sobre o sarcolema identificado pela redução da resposta muscular ao KCl exógeno sem, no entanto, causar qualquer aparente alteração morfológica.

A Bmaj-9 exibiu uma pronunciada atividade PLA₂, sugerindo uma correlação direta entre a atividade catalítica e a farmacológica, confirmada através de ensaios com baixa temperatura, cujo bloqueio neuromuscular característico foi impedido em experimentos em que a preparação foi mantida a 22 °C ao invés de 37 °C. Resultados semelhantes também foram observados por Cogo et al. (1998), que isolaram do veneno de *B. insularis* uma fração com atividade PLA₂ e demonstraram que esta fração atuava bloqueando a junção neuromuscular por agir preferencialmente no sítio pré-sináptico e ainda observaram que esse efeito era dependente da temperatura. Em um outro estudo realizado com β- bungarotoxina, Crotoxina e Taipoxina, os autores também observaram que a atividade neuromuscular pré-sináptica destas toxinas foi reduzida de 70 % ou mais quando a temperatura foi alterada de 37 °C para 27 °C (Su et al., 1984).

O envolvimento da atividade PLA₂ no bloqueio neuromuscular é sugerido por achados em que a baixa temperatura e substituição na solução de Tyrode de Ca²⁺ (1.8 mM) por Sr²⁺ (4.0 mM) previne o bloqueio neuromuscular (Chang e Lee 1977; Cogo et al., 2006).

A preparação nervo frênico diafragma isolada de camundongo mostrou-se resistente ao efeito da Bmaj-9. Este dado justifica o uso da preparação biventer cervicis de pintainho nestes experimentos. Assim, há estudos que demonstraram que a preparação de ave é mais sensível que a de mamífero a diferentes venenos ou toxinas (Chang e Lee, 1977; Cogo et al., 1993; Serafim et al., 2002; Damico et al., 2005; Durigon et al., 2005 e Borja-Oliveira et al.; 2007) Este fato pode estar relacionado às diferenças na composição do músculo, no que diz respeito ao tipo de fibra muscular, distribuição de enzimas e receptores envolvidos na fisiologia das mesmas (Padykula e Gauthier, 1970; Melo e Ownby, 1996). No entanto o veneno total mostrou-se ativo em preparação de nervo frênico diafragma de camundongo embora menos potente que em preparação de biventer cervicis de pintainho.

A Bmaj-9 não afetou a resposta muscular a estímulos elétricos direto em preparações curarizadas, ou seja, não exerceu efeito significativo sobre o sarcolema. Este resultado corrobora a discreta liberação de CK e ausência de alteração morfológica causada por esta fração nas condições experimentais utilizadas no presente estudo.

As serpentes do gênero botrópico são caracterizadas por exibirem efeitos no local da picada sendo que o efeito mais complexo é a necrose, resultado da ação de fatores específicos e/ou combinação de reações secundárias (Ownby et al., 1982, Ownby et al., 1990). Por esta razão, a combinação de diferentes técnicas como a determinação da atividade da enzima creatinoquinase e a análise morfológica são recomendadas para detectar e avaliar a miotoxicidade presentes em venenos e toxinas (Mebs e Ownby, 1990).

A análise morfológica *in vitro* feita no presente trabalho mostrou que a Bmaj-9 não induziu alterações morfológicas em baixas concentrações. Portanto, é possível afirmar que há uma correlação direta entre os achados miográficos sob estimulação direta e os dados morfológicos observados nas concentrações ensaiadas.

O efeito característico do gênero botrópico somente foi observado quando a Bmaj-9 foi ensaiada em altas concentrações. No entanto, o dano das fibras musculares não foi intenso como tem sido relatado em estudos com alguns veneno/toxinas botrópicas (Oshima-Franco et al., 2000, Oshima-Franco et al., 2001).

Na análise morfológica *in vivo* observaram-se algumas células edemaciadas e células com lesões do tipo delta; no entanto, quando se compara este efeito com os de outras frações botrópicas (Kanashiro et al., 2002), notou-se que as alterações morfológicas provocadas pela Bmaj-9 são muito discretas e em nada comparáveis com efeitos de venenos ou toxinas tipicamente botrópicas.

A creatinoquinase é uma enzima que se situa nas linhas M nos filamentos de miosina, na e transfere grupos fosfato da fosfocreatina ao ADP, transformando-o em ATP, que é rapidamente utilizado pela célula como fonte imediata de energia para a contração muscular (Suarez-Kurt, 1983).

A leve ação liberadora da enzima intracelular creatinoquinase, pela Bmaj-9 nos ensaios *in vitro*, pode ser explicada pelo fato de que nem sempre a liberação de CK está diretamente relacionada à lesão da célula muscular. Assim, Ownby et al. (1982) estudaram a correlação entre a quantificação de mionecrose através de análise histológica e a análise dos níveis de CK plasmático; a análise estatística demonstrou uma correlação entre os dois métodos para 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a administração da toxina, embora não houvesse correlação nas primeiras horas (1, 3 h); os níveis de CK foram significativamente diferentes em relação ao nível de alteração morfológica, os autores atribuíram o aumento dos níveis de CK a alterações bioquímicas do músculo que podem ou não estarem associados à mionecrose.

Segundo Ownby et al., (1982), a questão de se utilizar ensaios que determinam a atividade de CK como estimador de mionecrose é o fato de que esta enzima pode ser liberada não somente em condições de dano irreversível ou morte celular.

Portanto, não há incoerência nos dados observados desde que, a não ser pela discreta liberação de CK após 90 minutos de incubação, a Bmaj-9 não interferiu com as respostas à estimulação elétrica direta em preparações previamente curarizadas, não exibiu qualquer efeito sobre a morfologia das fibras musculares analisadas e nem mesmo impediu as respostas da contração à ACh ou KCl. Além disso, o bloqueio neuromuscular completo causado pela toxina ocorreu precocemente (em 70 min.) quando a atividade de CK não era diferente do controle, corroborando a proposta de que não há correlação direta entre bloqueio neuromuscular e liberação de CK no início da intoxicação por baixa concentração.

Resultados semelhantes ao da Bmaj-9 nos ensaios de CK *in vitro* foram observados por Damico et al. (2006), que estudaram uma PLA₂ de *Lachesis muta muta*, a LmTX-I (PLA₂ Asp49) que liberou uma quantidade de CK semelhante ao da Bmaj-9 (na mesma concentração) e ambas as toxinas aparentemente não induziram qualquer alteração morfológica. Por outro lado, em um estudo com veneno de *Notechis s. scutatus* os autores observaram que este veneno não apresentou nenhum aumento significativo nos níveis de CK, embora manifestasse severas reações locais, com vários estágios de necrose muscular (Mebs et al., 1983). Ainda, em um estudo com veneno de *Polybia paulista*,

também foi demonstrado que o veneno foi capaz de causar dano muscular sem liberar quantidades significativas de CK (Rocha et al., 2007).

Os experimentos *in vivo* mostram que embora tenha sido observado um aumento da atividade de CK, pela Bmaj-9, esses dados quando comparados a relatos na literatura usando outras frações botrópicas (Kanashiro et al., 2002, Núñez et al., 2004), demonstram que a Bmaj-9 pode ser incluída entre as toxinas isoladas de veneno botrópico que causa a menor atividade liberadora de CK. Assim, pode-se afirmar que a referida liberação de CK e os dados resultantes da análise morfológica *in vivo* mostram uma correlação positiva entre si.

Estudos eletrofisiológicos foram realizados na tentativa de elucidar o mecanismo de ação da Bmaj-9; estes experimentos foram feitos em preparação na qual a Bmaj-9 se mostrou particularmente pouco ativa, pois a preparação que é sensível à ação da toxina (BCP) o procedimento é tecnicamente difícil. Dois parâmetros eletrofisiológicos, potencial de membrana em repouso (PM) e potencial de placa terminal (PPT), permitiram estudar a ação da Bmaj-9 sobre a junção neuromuscular. A ausência de ação despolarizante sobre o sarcolema, semelhante aos resultados obtidos com o veneno total de *B. marajoensis* (Cavalcante et al., 2007) reforça a sugestão de que esta toxina, em concentrações que cause bloqueio neuromuscular completo não atua sobre a polaridade da membrana muscular e nem mesmo sobre os receptores nicotínicos subsinápticos da placa motora.

O fato de a Bmaj-9 ter alterado o valor do conteúdo quântico do PPT à que corresponde a somatória do número de unidades quânticas no tempo de 15 minutos de incubação sugere que essa toxina age nas primeiras fases de intoxicação aumentando a liberação do neurotransmissor, antes de causar bloqueio neuromuscular completo e irreversível.

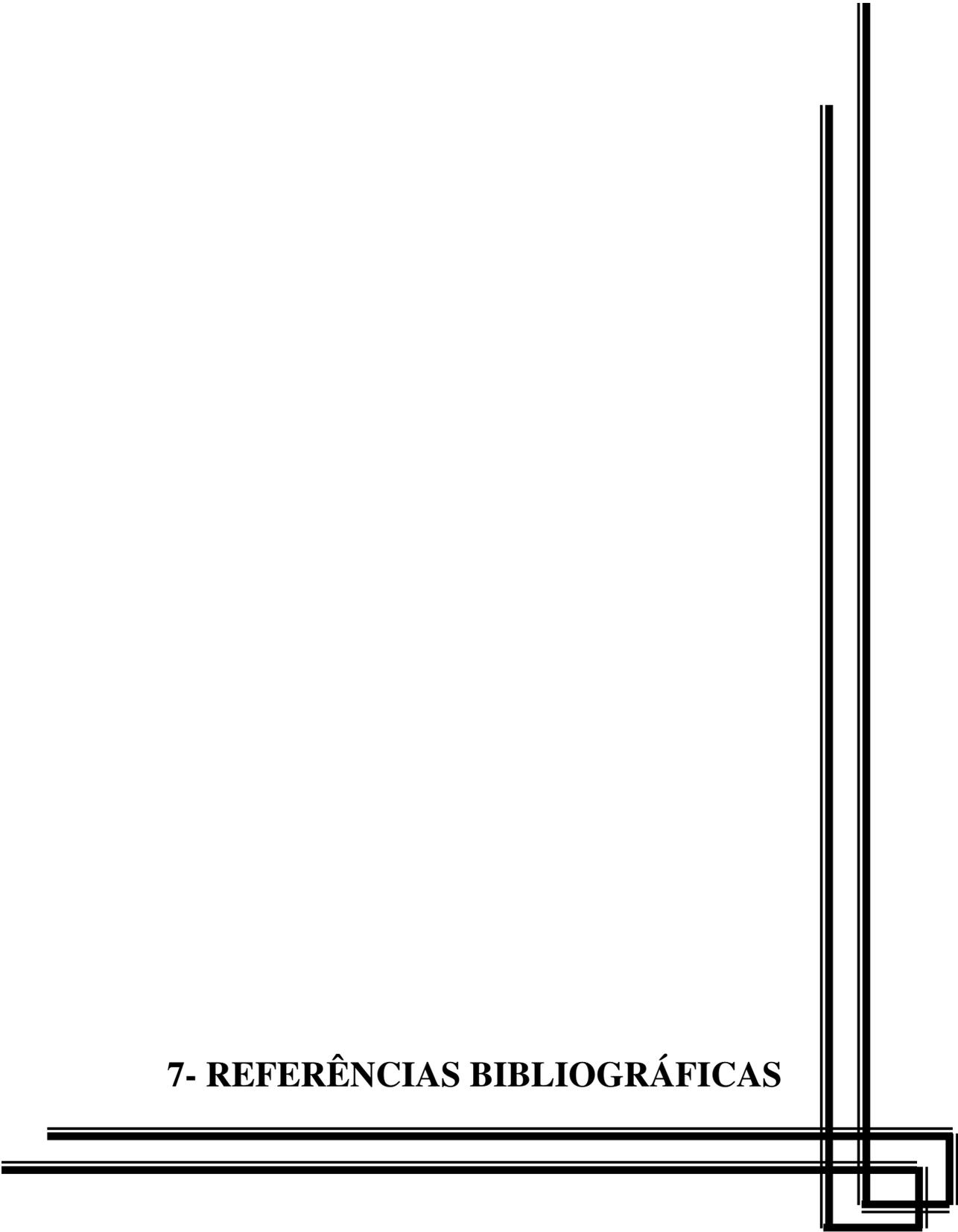
Resumindo, os resultados sobre a Bmaj-9 sugerem que o bloqueio da transmissão neuromuscular causado por esta toxina seja muito possivelmente devido a uma ação pré-sináptica, semelhante ao que tem sido referido na literatura para outros venenos/toxinas botrópicas (Cogo et al., 1993, Borja-Oliveira et al., 2003, Borja-Oliveira et al., 2007).

6- CONCLUSÃO

A fração Bmaj-9, isolada do veneno de *Bothrops marajoensis*:

- é mais ativa em preparação biventer cervicis de pintainho.
- induz efeito bloqueador neuromuscular irreversível a estímulos elétricos indiretos sem alterar as respostas musculares ao estímulos elétricos diretos ou o valor do potencial de membrana em repouso e não causa alterações morfológicas significativas nas fibras musculares em baixas concentrações sugerindo uma ação neurotóxica pré-sináptica preponderante.
- Experimentos *in vivo* (camundongo) mostraram que a baixa liberação de CK corrobora a leve alteração morfológica observada em músculo gastrocnêmio injetado com a toxina; portanto Bmaj-9 apresenta características que a diferenciam de outras fosfolipases botrópicas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Banker BQ, Kelly SS, Robbins N. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol* 1983; 339: 355-375.

Barstad JAB. Presynaptic effect of the neurotransmitter. *Experientia* 1962; 18: 579-580.

Bochner R, Struchiner C J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil. *Caderno Saúde Pública* 2003; 19 (1): 7-16.

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. *Journal of Venom and Animals Toxins* 2002; 8: 88-101.

Borja-Oliveira CR, Durigon AM, Vallin ACC, Toyama MH, Souccar C, Marangoni S and Rodrigues-Simioni L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. *Brazilian journal of Medical and biological Research* 2003; 36: 617-624.

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): 103-121.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 2005; 103-126.

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

Cabral R . Instituto Butantan pesquisa medicamento contra pré – eclâmpsia mal que atinge 10 % das gestantes [on line] 2008 [Acesso 20 março 2008]. Disponível em: http://oglobo.globo.com/vivermelhor/mulher/mat/2008/01/16/instituto_butantan_pesquisa_medicamento_contra_pre-eclampsia_mal_que_atinge_10_das_gestantes-328046483.asp

Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of Latin America 2004; 2: 400.

Cavalcante WLG, Hernandez-Oliveira S, Leite GB, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L. Effects of *Bothrops marajoensis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* 2007; 13: 423.

- Chang CC, Lee JD. The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with β -bungarotoxin and crotoxin. *Toxicon* 1977; 15: 571-576.
- Cho W, Kézdy FJ. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymology* 1991; 197: 75-79.
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 1993; 31 (10): 1237-1247.
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Giglio JR, Corrado AP, Cruz-Höfling MA, Donato JL, et al. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicon* 1998; 36(10): 1323-1332.
- Cogo JC, Lilla S, Souza GHMF, Hyslop S, Nucci G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipase A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhêa). *Biochimie* 2006; 88: 1947-1959.
- Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, Cruz-Höfling MA, Novelo JC. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve–muscle preparations. *Toxicon* 2005; 46: 222-229.
- Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, Cruz-Höfling MA, Novelo JC. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A₂ (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). *Toxicon* 2006; 47: 759-765.
- 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: 505-529.
- Fatt P, Katz B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J Physiol* 1951; 115: 320-370.
- Ginsborg BL, Warriner JN. The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. *Br J Pharmacol* 1960; 15: 410-415.

Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, Harris J B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 1994; 32(3): 257-265.

Hoge AR. Preliminary account on neotropical Crotalinae (serpentes Viperidae). *Mem. Inst. Butantan* 1965; 32: 109-184.

Hoge AR, Romano SA. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan* 1972; 36: 137.

Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 1996; 34: 1149 – 1155.

Homsí-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo Neto H, Rodrigues-Simioni, L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization of biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988; 26: 615-627.

Hubbard JI, Linás R, Quastel DMJ. Investigation of presynaptic function. In: *Electrophysiological analysis of synaptic transmission*. Baltimore: Williams & Wilkins 1969; 112- 143.

Kanashiro MM, Escocard RCM, Petretski JH, Prates MV, Alves EW, Machado OLT et al.,. Biochemical and biological properties of phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 1179-1186.

Mebis 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.

Mebis D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their Biochemical and Biological activities. *Pharmac. Ther* 1990; 48: 223-236.

Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas d 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: Savier 2003; 33-61.

Melo PA, Ownby CL. Different sensitivity of fast and slow twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. *Toxicon* 1996; 34 (6): 653-669.

Miyamoto M. Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junction. *J Physiol* 1975; 250: 121-142.

Núñez V, Arce V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys 49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon* 2004; 44: 91-101.

Oshima-Franco Y, Hyslop S, Cintra ACO, Giglio JR, Cruz-Höfling, Rodrigues-Simioni. Neutralizing capacity of commercial Bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and Bothropstoxin-I. *Muscle & Nerve* 2000; 23 (12): 1832-1839.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Silva GH, Cardoso DF, Hyslop S, Giglio JR et al.,. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. *Toxicon* 2001; 39: 1477-1485.

Ownby CL, Gutiérrez JM, Colberg TR, George OV. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from *Prairie rattlesnake* (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 1982; 20 (5): 887-885.

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); 837-846.

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.

Pardal PPO, Souza S M, Monteiro MRCC, Fan HW, Cardoso JLC, França FOS, et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the North Eastern Amazon region of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; 98: 28-42.

Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. Isolation and Preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus collilineatus* venom. *Journal of Protein Chemistry* 2002; 21:131-136.

Ponce-Soto LA, Bonfim VL, Rodrigues-Simioni L, Novelo JC, Marangoni S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA2 D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. *The Protein Journal* 2006; 25: 147-155.

Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novelo JC, Marangoni S. Structure and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochimica Biophysica Acta* 2007; 1770: 585-593.

Prior C, Dempster J, Marshall G. Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1993; 30(1): 1-17.

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol* 1949; 156(2): 261-273.

Rocha T, Souza BM, Palma MS, Cruz-Höfling MA. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. *Toxicon* 2007; 50: 589-599.

Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* 1983; 10 (2): 475-489.

Rodrigues-Simioni L, Zamunér SR, Cogo JC, Borja-Oliveira CR, Franceschi J, Cruz-Höfling MA, et al. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhêa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* 2004; 43: 633-638.

Serafim, FG, Reali M, Cruz-Höfling MA, Fontana MD. Action of *Micrurus dumerilli carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon* 2002; 40: 167-174.

Su NJ, Chang CC. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A₂ activity (β -bungaratoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon* 1984; 22(4): 631-640.

Suarez-Kurtz, G. Enzyme release from skeletal muscle. *Braz J Med Biol Res* 1983; 16 (4): 283-290.

Zamunér SR, 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: 259-271.

8- ANEXO





Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

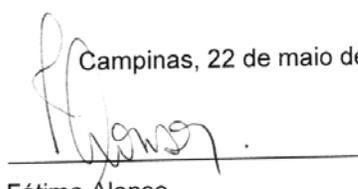
Certificamos que o Protocolo nº 1027-1, sobre "PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE UMA FOSFOLIPASE A2 BÁSICA ISOLADA DO VENENO TOTAL DE *BOTHRUPS MARAJOENSIS*: AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES NEUROTÓXICAS IN VITRO. MIOTOXICIDADE LOCAL E SISTÊMICA, E PRO-INFLAMATÓRIA" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Charlene Galbati 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 22 de maio de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1027-1, entitled "PHYSICAL CHEMICAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PHOSPHOLIPASES A2 ISOLATED FROM THE VENOM OF THE *BOTHRUPS MARAJOENSIS*: EVALUATION OF THE NEUROTOXICITY ACTIVITIES IN VITRO, LOCAL AND SYSTEMIC MYOTOXICITY AND PRO-INFLAMMATORY", 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 May 22, 2006.

Campinas, 22 de maio de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

