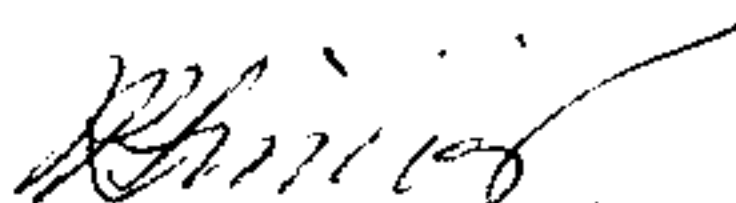


GEORGINA SUCASACA MONZÓN

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, da aluna Georgina Sucasaca Monzon

Campinas, 25 de agosto 2008.


Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

- Orientadora -

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UMA FOSFOLIPASE A₂ ASP 49 ISOLADA DO VENENO DE *Bothrops pauloensis*

CAMPINAS

2008

GEORGINA SUCASACA MONZÓN

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UMA FOSFOLIPASE
A₂ ASP 49 ISOLADA DO VENENO DE *Bothrops pauloensis***

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.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

CAMPINAS

2008

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

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

M769c Monzon, Georgina Sucasaca
Caracterização farmacológica de uma fosfolipase A2 ASP49 isolada do veneno de *Bothrops pauloensis* / Georgina Sucasaca Monzon. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

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

1. Bothrops. 2. Fosfolipase A2. 3. Junção neuromuscular. I. Simioni, Léa Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Pharmacological characterization of Asp 49 PLA2 isolated from *Bothrops pauloensis* venom

Keywords: • Bothrops
• Phospholipase
• Neuromuscular junction

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal
Profa. Dra. Stella Regina Zamunér**

Data da defesa: 25 - 08 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

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

Data: 25/08/2008

Dedico este trabalho...

*À minha mãe **Frida María**, que mesmo de lá do céu guia meus passos,
todos os dias da minha vida.*

*Ao meu avô **Benigno**, pelo carinho que me deste.*

*À **Georgina Rodriguez**, que com fé e sabedoria
soube aceitar e enfrentar os desafios da vida.*

*O amor que você me entrega
é fundamental na minha vida
Te amo muito mãe!*

*Ao meu pai **Antonio Raúl**, por me incentivar com o exemplo,
que me faz acreditar que tudo é possível.*

*Ao meu namorado **Daniel**, agradeço infinitamente tudo
o que você faz por mim, pela amizade, confiança e paciência.
Teu amor me faz bem. Obrigada!!!*

*Agradeço a **Deus** ...*

pela vida que me foi concedida,

pelas pessoas que me rodeiam e me ensinam,

pela força que dia a dia me incentiva a começar de novo.

Meu especial agradecimento à Dra. Léa Rodrigues Simioni, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório, a valiosa orientação, a compreensão, o apoio e confiança depositadas. Muito obrigada!!!.

À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling, por abrir as portas do seu laboratório, muito obrigada pela contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, por tornar possível esta pesquisa.

À Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, admiro muito você, a sua força, profissionalismo e rigor científico.

À Profa. Dra. Elen Landucci, pela contribuição científica e a aprendizagem em seu laboratório.

À Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal, muito obrigada pelas sugestões durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, obrigada pela participação no exame de qualificação, pela ajuda com o inglês e a disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto, pelo apoio e aprendizado ao longo deste trabalho.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite, muito obrigada pela imprescindível ajuda, paciência e amizade.

À Profa. Dra. Priscila Randazzo, exemplo de profissional, aplicada e estudiosa, muito sucesso na sua vida, você merece!!!

À Charlene, amiga e companheira, foi uma grande sorte te conhecer, muito obrigada pela amizade, por estar do meu lado nos momentos difíceis, agradeço muito tudo o que você fez por mim.

Ao Sandro, muito obrigada pela amizade, o agradável convívio, a ajuda e os conselhos. Desejo muito êxito no seu caminho científico.

Ao Dimas, Mario e Thiago obrigada pela amizade, me diverti muito com vocês.

Ao Prof. Dr. Valdemir muito obrigada pelos conselhos, sugestões e amizade.

À Profa. Dra. Maricene agradeço muito sua amizade e a contribuição na realização deste trabalho.

À Saraguaci, obrigada por nos transmitir a alegria que esta no seu coração.

Ao Juan, Javier e Pascual por tudo o que vocês proporcionaram com sua atenção, carinho e amizade, por me fazer sentir um alguém diferente, e por eu saber que sempre poderei contar com vocês, sou grata a Deus por ter conhecido pessoas boas, de coração aberto e firme.

Aos amigos do Laboratório da Histologia: Carol, Catarina, Karina, Marta e Thalita obrigada pelo companheirismo.

Aos amigos da Bioquímica, Andrana, Augusto, Frank, Frey, Paulinho, Salomón e Vera, pelo auxílio bioquímico, companheirismo e amizade.

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

À Diretoria do Apoio Didático, Científico e Computacional da FCM da Unicamp, pelos excelentes serviços prestados. Fico grata aos meus amigos Mercedes e Mário.

À Câmara de Pesquisa – Estatística da FCM da Unicamp, pela disposição e análises realizadas.

A todos os funcionários da Unicamp, amigos do curso de Pós-Graduação do departamento de Farmacologia.

À Unicamp, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAEPEX pelo apoio financeiro concedido.

*Já perdoei erros quase imperdoáveis,
tentei substituir pessoas insubstituíveis
e esquecer pessoas inesquecíveis.*

*Já fiz coisas por impulso,
já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me decepcionar,
mas também decepcionei alguém.*

*Já abracei pra proteger,
já dei risada quando não podia,
fiz amigos eternos,
amei e fui amado,
mas também já fui rejeitado,
fui amado e não amei.*

*Já gritei e pulei de tanta felicidade,
já vivi de amor e fiz juras eternas,
"quebrei a cara muitas vezes"!*

*Já chorei ouvindo música e vendo fotos,
já liguei só para escutar uma voz,
me apaixonei por um sorriso,
já pensei que fosse morrer de tanta saudade
e tive medo de perder alguém especial (e acabei perdendo).*

*Mas vivi, e ainda vivo!
Não passo pela vida...
E você também não deveria passar!*

*Viva!
Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é "muito" pra ser insignificante.*

Charles Chaplin

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. As serpentes	24
1.2. Gênero <i>Bothrops</i>	25
1.3. Fosfolipases A₂	26
1.4. <i>Bothrops pauloensis</i>	32
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Animais	41
3.2. Veneno	41
3.3. Reagentes	41
3.4. Determinação da atividade fosfolipásica	42
3.4.1. Efeito da temperatura na atividade fosfolipásica da Bp-13	42
3.4.2. Efeito de íons divalentes na atividade fosfolipásica da Bp-13.....	42
3.5. Ensaios Farmacológicos	43
3.5.1. Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> (BC) de pintainho	43
3.5.2. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo	43
3.5.3. Preparação <i>extensor digitorum longus</i> (EDL) de camundongo	44
3.5.4. Estudo Eletrofisiológico	45
Registro do potencial de membrana (PM).....	46
3.5.5. Análise Histológica Quantitativa.....	47
3.5.6. Determinação dos níveis de CK <i>in vivo</i>	47

	PÁG.
3.5.7. Determinação da atividade inflamatória	48
3.6. Análise Estatística	48
4. RESULTADOS	49
ESTUDO MIOGRÁFICO	50
4.1. Preparação <i>biventer cervicis</i> (BC) de pintainho	50
4.2. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo	53
4.2.1. Estimulação elétrica indireta	53
4.2.1.1. Substituição do Ca^{+2} e influência da temperatura ..	56
4.2.2. Estimulação elétrica direta	61
4.3. Preparação <i>extensor digitorum longus</i> (EDL) de camundongo	62
ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO	65
4.4. Potencial de Membrana (PM)	65
MIOTOXICIDADE	67
4.5. Análise Histológica Quantitativa	67
4.6. Determinação dos níveis de CK plasmático “ <i>in vitro</i> ”	71
4.7. Atividade Edematogênica	73
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8. ANEXO	92
9. APÊNDICE	94

Perfil cromatográfico obtido pelo fracionamento do veneno total da

	<i>PÁG.</i>
<i>Bothrops pauloensis</i>	95
Determinação da massa molecular da Bp-13 da <i>Bothrops</i>	96
Composição de Aminoácidos da Bp-13	97

ACh	Acetilcolina
aa	Aminoácido
BC	<i>Biventer cervicis</i>
BthTX-I	Bothropstoxina-I
BthTX-II	Bothropstoxina-II
Ca²⁺	Íon cálcio
CK	Creatinoquinase
d-Tc	d-Tubocurarina
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
HPLC	High (Pressure/ Performace) liquid chromatography
KCl	Cloreto de potássio
MP	Membrana plasmática
NFD	Nervo frênico diafragma
NeuTX-I	Neuwieditoxina I
NeuTX-II	Neuwieditoxina II
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PM	Potencial de membrana
RS	Retículo sarcoplasmático

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1. Classificação das PLA ₂ .	28
Tabela 2. Fosfolipases isoladas do veneno de <i>Bothrops pauloensis</i> .	36
Tabela 3. Porcentagem de alteração morfológica.	68

	PÁG.
Figura 1. Classificação e características gerais das miotoxinas de venenos de serpentes.	29
Figura 2. Seqüência hipotética dos eventos celulares degenerativos em células musculares esqueléticas induzidos pela ação de PLA ₂ miotóxicas de veneno.	31
Figura 3. Distribuição geográfica da serpente <i>Bothrops pauloensis</i> .	33
Figura 4. <i>Bothrops pauloensis</i> .	33
Figura 5. Efeito da Bp-13 em preparação BC de pintainho, sob estimulação elétrica de campo, a 37 °C.	51
Figura 6. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações BC de pintainho.	52
Figura 7. Curva da resposta contrátil da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta.	54
Figura 8. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo	55
Figura 9. Curva da resposta contrátil da preparação NFD de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, após a adição de Bp-13 e na substituição do Ca ⁺² (1,8 mM) pelo Sr ²⁺ (4 mM).	57
Figura 10. Curva da resposta contrátil da preparação NFD de camundongo, sob estimulação elétrica indireta a 24 °C	59
Figura 11. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo, sob estimulação elétrica indireta	60
Figura 12. Representação gráfica do efeito da Bp-13 sobre a resposta contrátil da preparação NFD de camundongo, sob estimulação elétrica direta	61

PÁG

Figura 13. Representação gráfica do efeito da Bp-13 sobre a resposta contrátil da preparação EDL de camundongo.	63
Figura 14. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações EDL de camundongo, sob estimulação elétrica indireta.	64
Figura 15. Potencial de membrana em repouso de preparações músculo diafragma de camundongo.	66
Figura 16. Fotomicrografias de cortes transversais (2 µm) de preparações NFD de camundongo após 120 min de incubação com a Tyrode ou veneno total.	69
Figura 17. Fotomicrografias de cortes transversais (2 µm) de preparações NFD de camundongo após 120 min de incubação com a toxina.	70
Figura 18. Níveis plasmáticos de creatinoquinase (CK).	72
Figura 19. Representação gráfica da ação inflamatória induzida pela Bp-13 em ratos.	74

RESUMO

O veneno botrópico possui uma mistura de substâncias protéicas necessárias para a sobrevivência da serpente, dentre elas, as mais amplamente estudadas são as fosfolipases A₂, que hidrolisam glicerofosfolipídios de membrana na posição *sn*-2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos, que além de desempenhar uma ação biológica no processo de digestão de lipídios, exibem também uma ampla variedade de efeitos farmacológicos.

O presente trabalho teve como objetivo, caracterizar farmacologicamente uma nova fosfolipase A₂ denominada Bp-13 do veneno de *Bothrops pauloensis*, serpente endêmica do cerrado brasileiro, avaliando sua ação sobre a junção neuromuscular, efeito miotóxico e atividade edematogênica.

A Bp-13 foi purificada utilizando-se o sistema cromatográfico HPLC de fase reversa em coluna μ -Bondapack C18; possuindo uma massa molecular de 14 035 Da e atividade catalítica de 2,43 nmol/min/mg (30-35 °C), dependente de Ca²⁺ porém inibida por Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺ e Sr²⁺.

A atividade neuromuscular foi avaliada em preparações *biventer cervicis* (BC) de pintainho, *extensor digitorum longus* (EDL) e nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo, sob estimulação elétrica indireta durante 120 min a 37 °C. A Bp-13 (3,56 μ M) induziu bloqueio neuromuscular completo e irreversível, nas preparações de mamífero, que se mostraram mais sensíveis à ação da toxina do que as preparações de ave. Em preparação BC de pintainho o bloqueio neuromuscular foi de 28 ± 2 % após 120 min de incubação com a Bp-13 (7,12 μ M) e a contratura evocada após a adição exógena de ACh foi parcialmente inibida. Concentrações menores (0,71 e 1,42 μ M) foram testadas na preparação NFD de camundongo, induzindo o bloqueio da resposta contrátil em 29 ± 5 % e 55 ± 6 %, respectivamente. Em alguns experimentos, onde o Ca²⁺ foi substituído pelo Sr²⁺ na solução de Tyrode houve ausência do bloqueio neuromuscular característico da Bp-13 (3,56 μ M); evento semelhante foi observado quando a temperatura do banho foi alterada de 37 °C para 24 °C, com bloqueio de $37,4 \pm 6$ % da resposta contrátil. A Bp-13 (3,56 μ M) foi capaz de inibir a resposta contrátil a estímulo elétrico direto em preparações NFD de camundongo previamente curarizadas.

Com o estudo eletrofisiológico realizado em preparação músculo hemidiafragma de camundongo, avaliaram-se os potenciais de membrana em repouso (PM). A Bp-13 (3,56 μM) causou uma despolarização progressiva do sarcolema, alcançando valores de -80 ± 1 mV (controle) até -37 ± 3 mV após 120 min de incubação com a toxina. Em preparações músculo diafragma pré-tratadas com d-Tubocurarina (10 μM), observou-se uma redução da despolarização induzida pela da Bp-13 (-37 ± 3 mV para -58 ± 2 mV).

A miotoxicidade foi avaliada *in vitro* através de análise morfológica do músculo diafragma de camundongo e *in vivo* através da determinação da atividade de creatinoquinase (CK). Na análise morfológica considerou-se fibras normais as que mantiveram íntegro o sarcolema com o formato poligonal e fibras alteradas as que apresentavam hipercontração das miofibrilas, células com lesão tipo delta, edemaciadas e vacuolizadas. A porcentagem de fibras lesadas de preparações incubadas com o veneno de *Bothrops pauloensis* (100 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foi de $14,4 \pm 3 \%$ e $8,7 \pm 3 \%$ respectivamente; e com a fração Bp-13 (20 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foi de $8,3 \pm 4 \%$ e $30,6 \pm 5 \%$, respectivamente. Quando as preparações foram mantidas em solução de Tyrode, onde o Ca^{2+} foi substituído pelo Sr^{2+} , as alterações morfológicas foram de $36,7 \pm 11 \%$, ou seja, semelhante aos valores observados com a Bp-13 na solução de Tyrode normal. O aumento nos valores de liberação de creatinoquinase, após 30 min da injeção da Bp-13, revelou o efeito miotóxico *in vivo*, valores que retornaram ao normal após 6 horas. A dose de 10 $\mu\text{g/pata}$ de Bp-13 injetada em ratos via intraplantar induziram a formação de edema de pata após 15 min de injeção da toxina.

Conclui-se, então, que a Bp-13 é uma miotoxina, que inibe a resposta neuromuscular dependente de temperatura e de Ca^{2+} , em preparações isoladas EDL e NFD de camundongo, sugerindo que a atividade catalítica possivelmente contribua com o evento farmacológico, embora o efeito mionecrótico *in vitro* não seja afetado, indicando uma dissociação entre estes efeitos.

ABSTRACT

Bothropic venom has several substances necessary to serpent survival, among them, one of the most widely studied are phospholipase A₂ enzymes, that hydrolyse *sn*-2 from membrane phospholipids, releasing lysophospholipids and fatty acids, which beyond playing a biological action in the lipid digestion process, also exhibit a wide variety of pharmacological effects.

The present work had as objective to characterize pharmacologically a new phospholipase A₂ denominated Bp-13 from the *Bothrops pauloensis* (endemic serpent to the Brazilian cerrado) venom, evaluating its action at neuromuscular junction, myotoxic effect and edematogenic activity.

Bp-13 was purified through chromatographic system, a reverse phase HPLC on a μ -Bondapak C18 column; it has a molecular mass of 14 035 Da, 2,43 nmol/min/mg (30-35 °C) catalytic activity Ca²⁺ dependent, however it was inhibited by Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺ and Sr²⁺.

Neuromuscular activity was evaluated in chick *biventer cervicis* (BC) preparations, *extensor digitorum longus* (EDL) and mouse phrenic nerve-diaphragm (PND), under indirect electrical stimulation during 120 minutes, at 37°C. Bp-13 (3,56 μ M) induced complete and irreversible neuromuscular block in mammalian preparations, which showed to be more sensitive to toxin action than bird preparations. In chick BC preparation, neuromuscular block was 28 ± 2 % after 120 minutes incubation with Bp-13 (7,12 μ M) and evoked contracture after exogenous ACh addiction was partially inhibited. Smaller concentrations (0,71 e 1,42 μ M) were tested in mouse PND preparation, inducing block of the contractile response in 29 ± 5 % and 55 ± 6 %, respectively. In some experiments, where Ca²⁺ was substituted for Sr²⁺ in Tyrode's solution, there was absence of the Bp-13 characteristic neuromuscular block (3,56 μ M); similar event was observed when the bath temperature was altered from 37 °C to 24 °C, with a block of $37,4 \pm 6$ % of the contractile response. Bp-13 (3,56 μ M) was able to inhibit contractile response to direct electrical stimulus in previously curarized mouse PND preparations.

Through electrophysiological study performed in mouse hemidiaphragm muscle preparation, membrane potentials at rest were evaluated (MP). Bp-13 (3,56 μ M) caused a progressive sarcolemma depolarization, reaching values from -80 ± 1 mV (control) until -37 ± 3 mV after 120 minutes in toxin incubation. In d-tubocurarine (10 μ M) pre-treated hemidiaphragm muscle preparations, a depolarization reduction was observed, induced by Bp-13 (-37 ± 3 mV to -58 ± 2 mV).

Myotoxicity was evaluated *in vitro* through morphological analysis of the mouse hemidiaphragm muscle and *in vivo* through determination of creatinkinase (CK) activity. Regarding morphological analysis, fibers which maintained intact sarcolemma with polygonal shape were considered normal, and fibers which presented hypercontraction of myofibrils, delta type lesion cells, edemaciated and vacuolized, were considered altered fibers. Lesioned fibers from *Bothrops pauloensis* (100 and 50 μ g/mL) venom incubated preparations were $14,4 \pm 3$ % and $8,7 \pm 3$ %, respectively; and for Bp-13 fraction (20 e 50 μ g/mL) they were $8,3 \pm 4$ % and $30,6 \pm 5$ %, respectively. When preparations were maintained in Tyrode's solution, where Ca^{2+} was substituted for Sr^{2+} , morphological alterations were $36,7 \pm 11$ %, that is similar to the observed values with Bp-13 in normal Tyrode's solution. The increase in creatinkinase release values after 30 minutes of Bp-13 injection revealed *in vivo* myotoxic effect, values that returned to normal after 6 hours. Bp-13 concentration of 10 μ g injected in rats via intraplantar induced paw edema formation after 15 minutes of toxin injection.

In conclusion, Bp-13 is a myotoxin that inhibits temperature and Ca^{2+} dependent neuromuscular response in mouse EDL and PND isolated preparations, suggesting that its catalytic activity possibly contributes to the pharmacological event, although *in vitro* myotoxic activity was unaffected by these treatments, indicating a dissociation between these effects.

1 . INTRODUÇÃO

Há poucos animais no mundo tão ricos em significados simbólicos quanto à serpente. Ofídio sagrado ou representação do mal, habitante dos pântanos, da lama, da turfa, rastejado nas terras profundas, príncipe dos meandros, silenciosa e sinuosa, ela surge dos confins mais obscuros de nosso inconsciente, cujos sonhos e fantasmas alimentam incessantemente, fazendo surgir, sucessivamente, angústias e desejos, atração ou repulsão.¹

¹ A Garganta da Serpente

1.1. As serpentes

No Brasil, foram descritas aproximadamente duzentas e cinquenta espécies de serpentes pertencentes a nove famílias, dentre elas só quatro gêneros são peçonhentos.

Família: Elapidae

Gênero: *Micrurus* (corais)

Família: Viperidae

Subfamília: Crotalinae

Gênero: *Bothrops* (jararacas)

Crotalus (cascavéis)

Lachesis (surucucus)

As serpentes da sub-família Crotalinae, possuem dentição tipo solenóglifa, caracterizada por presas situadas anteriormente no maxilar superior, grandes, amplamente móveis e providas de canal central por onde escorre o veneno. O orifício proximal do canal central comunica-se com o canal excretor da glândula de veneno e o orifício distal exterioriza-se a certa distância da extremidade da presa, o que garante o escoamento da peçonha mesmo se a ponta da mesma introduzir-se em uma estrutura como osso ou tendão. Assim, são capazes de introduzir grande parte de sua peçonha, sob pressão, tal qual uma seringa de injeção. As presas são móveis, permanecendo deitadas ao longo do maxilar superior, cobertas por uma bainha, podendo voltar-se para a frente, no momento do bote. Este fato, somado à agressividade destas serpentes, facilita a ocorrência dos acidentes. (Jorge e Ribeiro, 1990). A fosseta loreal, orifício bilateral situado entre as narinas e a boca, são detectores térmicos muito sensíveis, captando também as vibrações do ar, por

intermédio da membrana que reveste o septo entre suas duas câmaras (Silva Júnior, 1956).

1.2. Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em todo o território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias*). Os principais representantes do gênero *Bothrops* são as espécies: *B. atrox* – o ofídio mais encontrado na Amazônia, principalmente em beiras de rios e igarapés; *B. erythromelas* – abundante nas áreas litorâneas e úmidas da região Nordeste; *B. jararaca* – de grande capacidade adaptativa, ocupa e coloniza tanto áreas silvestres como agrícolas e periurbanas, sendo a espécie mais comum da região Sudeste; *B. jararacussu* – é a espécie que pode alcançar o maior comprimento (até 1,80 m) e que produz a maior quantidade de veneno dentre as serpentes do gênero. São predominantes nas regiões Sul e Sudeste; *B. moojeni* – principal espécie dos cerrados, capaz de se adaptar aos ambientes modificados, com comportamento agressivo e porte avantajado; e *B. alternatus* – vive em campos e outras áreas abertas, da região Centro-Oeste à Sul. (Guia de vigilância epidemiológica, 2005)

Os eventos fisiopatológicos produzidos pelo veneno botrópico, tem como característica a presença de efeitos locais como edema, hemorragia e necrose; sistemicamente pode tornar o sangue incoagulável, promover hipotensão, ou, em acidentes graves, causar a morte por choque ou por insuficiência renal aguda (Vital Brazil, 1982; Ribeiro e Jorge, 1990), diferindo dos venenos de serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Crotalus*, predominantemente neurotóxicos.

A ação proteolítica ou mionecrótica decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno. Essa ação está relacionada com a quantidade de veneno inoculado, podendo haver liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares. Os efeitos proteolíticos proporcionam a formação e/ou liberação

de aminas e peptídeos vasoativos, tais como bradicinina, histamina e serotonina, que causam lesão nos vasos capilares, fenômeno que se traduz através do aparecimento de hematúria, epistaxis e hemorragias viscerais.

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

A ação coagulante é resultado das proteínas e peptídeos biologicamente ativos que interagem com componentes do sistema hemostático, afetando o processo de coagulação, células endoteliais e plaquetas (Markland, 1998). A formação de trombos é quase instantânea na proximidade da área de inoculação, chegando até a bloquear a difusão do veneno por via sangüínea, embora exista ainda a difusão linfática e a formação de microtrombos de fibrina, especialmente em capilares pulmonares. O consumo de fibrinogênio pode produzir coagulação intravascular disseminada com o aparecimento de hemorragias difusas. Todos estes eventos concorrem para o quadro geral de intoxicação da vítima do acidente botrópico.

1.3. Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (E.C. 3.1.1.4) são enzimas que hidrolisam a ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (Arni e Ward, 1996; Kini *et al.*, 2003). Estas enzimas, amplamente distribuídas na natureza, são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (Dennis, 1994). As fosfolipases intracelulares estão freqüentemente associadas a membranas e

envolvidas com o metabolismo de fosfolipídios e outras funções celulares (Mukheerjee *et al.*, 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exudados inflamatórios e nos venenos de serpentes e de artrópodes.

A tabela 1 mostra as fosfolipases A₂, classificadas em 10 grupos (I-X), baseados na sua estrutura primária e no modelo de pontes de dissulfeto. (Balsinde *et al.*, 1999 Six *et al.*, 2000;). As fosfolipases A₂ presentes nos veneno de serpentes pertencem aos grupos I e II. Os venenos botrópicos contêm fosfolipases do grupo IIA, possuem sete pontes dissulfeto, massa molecular entre 13 e 15 kDa e precisam do cofator Ca²⁺ para exibir sua atividade catalítica, que está relacionada com o aminoácido histidina (His) na posição 48.

Grupo	Recurso	Localização	MM (kDa)	Requerimento de Ca^{2+}	Pontes dissulfeto	Aminoácido catalítico
I A	Cobras e serpentes.	Secreção	13-15	mM	7	Histidina
B	Pâncreas mamífero	Secreção	13-15	mM	7	Histidina
II A	Serpentes, viperideos, fluido sinovial de humano, plaquetas	Secreção	13-15	mM	7	Histidina
B	Veneno de víbora	Secreção	13-15	mM	6	Histidina
C	Testículos de ratos/camundongos	Secreção	15	mM	8	Histidina
III	Abelhas/lagartos/escorpiões/humano	Secreção	16-18	mM	5	Histidina
IV A	Células Raw 264,7/rim de rato. Células humanas U937/plaquetas	Citosolica	85	<μM		Serina
B	Cérebro/pâncreas/pulmão/coração humano	Citosolica	100	<μM		Serina
C	Coração / músculo esquelético humano	Citosolica	65	-		Serina
V	Coração/pulmão de mamíferos. Macrófagos P388D1.	Secreção	14	mM	6	Histidina
VI	Macrófagos P338D1, Células CHO	Citosolica	80-85	-		Serina
VII A	Plasma humano	Secreção	45	-		Serina
B	Cérebro bovino	Citosolica	42	-		Serina
VIII	Cérebro bovino	Citosolica	29	-		Serina
IX	Caracol marino	Secreção	14	mM	6	Histidina
X	Leucócitos humanos	Secreção	14	mM	7	Histidina

Modificado de Six e Dennis, 2000; Balsinde *et al.*, 1999 e Winstead *et al.*, 2000

Tabela 1. Classificação das PLA₂

Mais especificamente as fosfolipases A_2 miotóxicas encontradas em venenos botrópicos podem ser subdivididas em dois grupos: D 49, cataliticamente ativas e K 49, com baixa ou nenhuma atividade catalítica, como mostrado na figura 1. Diversas fosfolipase A_2 miotóxicas têm demonstrado induzir efeitos hemorrágicos e mionecróticos na ausência de Ca^{2+} , indicando que a atividade enzimática não está envolvida nos danos observados (Gutiérrez *et al.*, 1986a, 1986b; Lomonte e Gutierrez, 1989; Gutierrez *et al.*, 1990; Butron *et al.*, 1993)

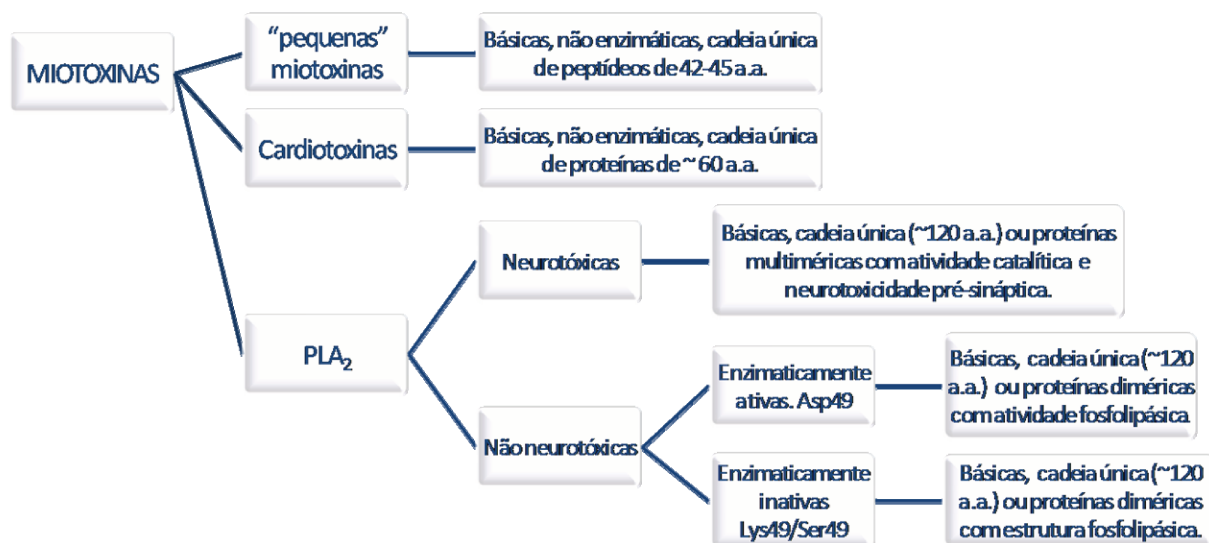


Figura 1. Classificação e características gerais das miotoxinas de venenos de serpentes (Lomonte *et al.*, 2003).

Durante os últimos anos houve um grande interesse em se estudar componentes do veneno que são responsáveis pela mionecrose, resultando no isolamento e caracterização estrutural e funcional de várias fosfolipases miotóxicas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Arni e Ward, 1996; Ownby, 1998; Ownby *et al.*, 1999; Gutiérrez e Lomonte, 1997; Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Prianti *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004 Cogo *et al.*, 2006).

A mionecrose que se estabelece após o envenenamento botrópico pode resultar da ação direta de miotoxinas sobre as fibras musculares (Figura 2) ou da ação indireta de metaloproteases hemorrágicas (Harris, 1984; Gutiérrez e Lomonte, 1995). A ação indireta, causada por hemorraginas que provocariam danos vasculares, levando à diminuição do sangue que supre as células musculares, induzindo isquemia e conseqüentemente morte celular e a ação direta decorrendo do efeito das fosfolipases A₂ miotóxicas sobre as membranas plasmáticas das células musculares (Rosenfeld, 1971).

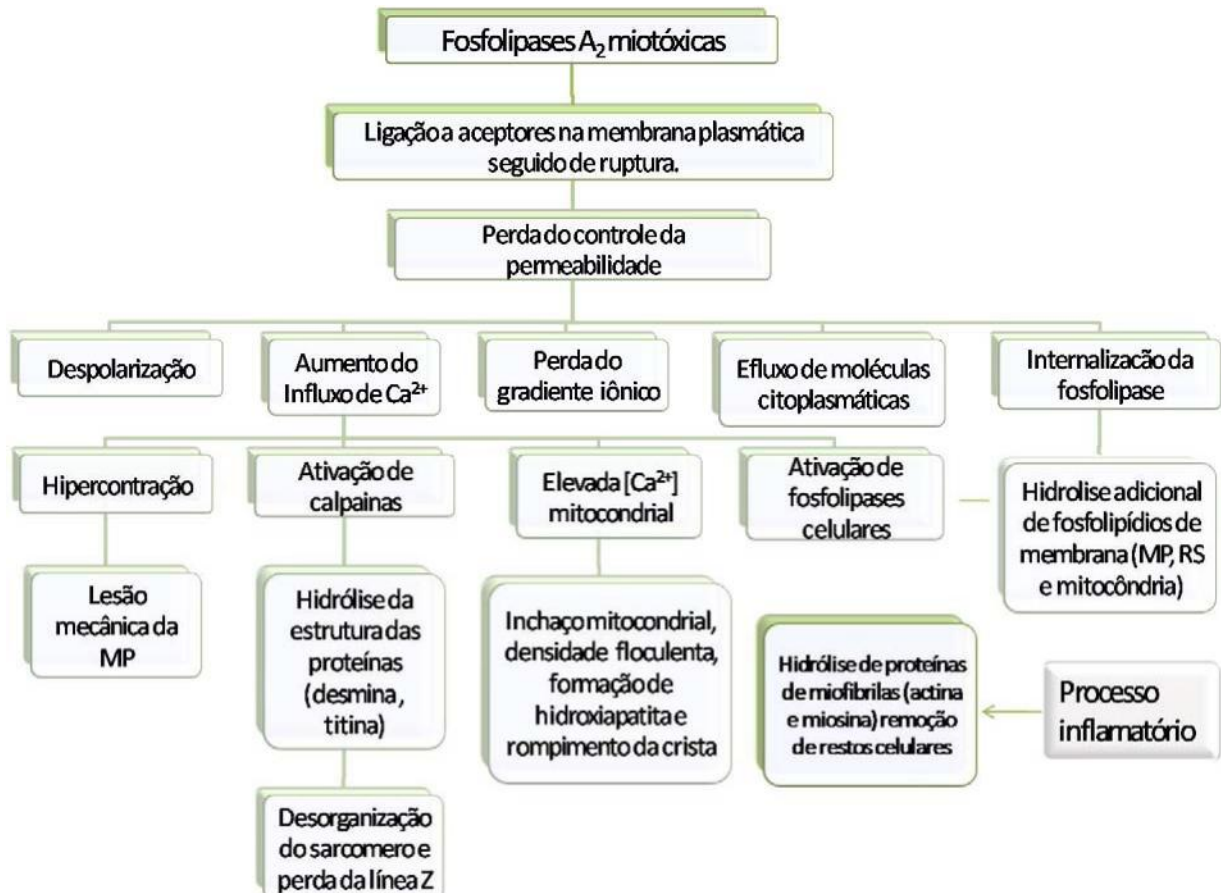


Figura 2. Seqüência hipotética dos eventos degenerativos em células musculares esqueléticas, induzidos pela ação de PLA₂ miotóxicas de veneno (Gutiérrez e Ownby, 2003).

A atividade fosfolipásica de venenos de diversas espécies botrópicas, como: *Bothrops jararacussu* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983); *Bothrops insularis* (Cogo *et al.*, 1993); *Bothrops pirajai* (Costa *et al.*, 1999); *Bothrops leucurus* (Prianti *et al.*, 2003); *B. pauloensis* (Borja-Oliveira, 2003) e *B. neuwiedi* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2007), demonstrou ser em parte a responsável pelos efeitos neuromusculares.

1.4. *Bothrops pauloensis*

Endêmica do Cerrado brasileiro, *Bothrops pauloensis* habita preferencialmente áreas secas e campos dos estados de Goiás, oeste de Minas Gerais, São Paulo, sul de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, norte de Paraná e áreas contíguas ao Paraguai (Figura 3).

Bothrops pauloensis (Figura 4) é uma serpente terrestre de tamanho médio atingindo 50 e 60 cm de comprimento; esta espécie é sexualmente dimórfica, as fêmeas atingem maior comprimento e peso que os machos.

Anteriormente denominada como *Bothrops neuwiedi pauloensis*, foi descrita pela primeira vez por Amaral (1925) e constituía uma das doze subespécies de *Bothrops neuwiedi*. Sete das espécies que pertenciam ao complexo *Bothrops neuwiedi* - *B. neuwiedi*, *B. diporus*, *B. lutzi*, *B. mattogrossensis*, *B. pauloensis*, *B. pubescens* e *Bothrops sp.*, pela análise dos caracteres morfológicos, foram classificadas como espécies plenas (Silva in Campbell e Lamar, 2004).

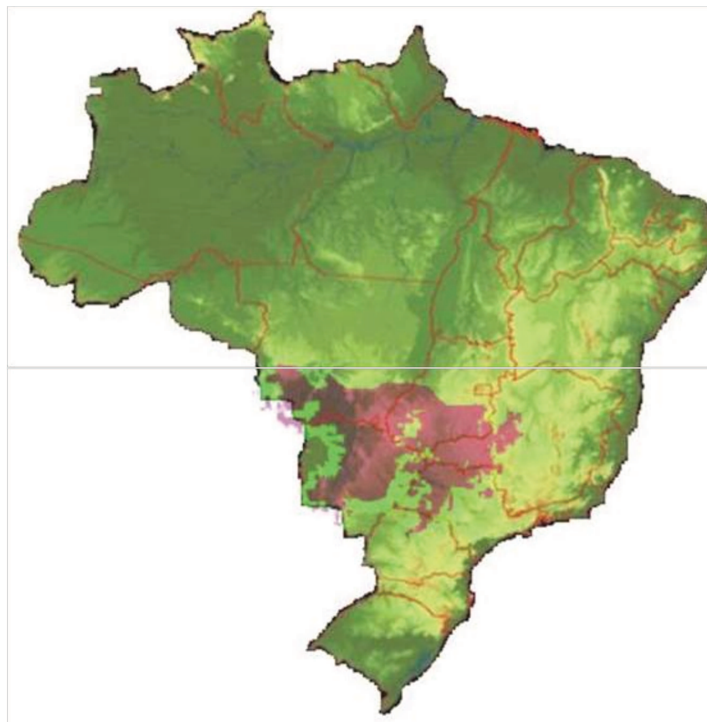


Figura 3. Distribuição geográfica da serpente *Bothrops pauloensis*¹.



Figura 4. *Bothrops pauloensis*².

¹ www.worldwildlife.org

² Fonte: Copyright by Cristiano Nogueira.

Rodrigues *et al.* (1998) observaram que a natureza e as propriedades biológicas dos componentes dos venenos são peculiares a cada espécie. Demonstraram que as diferenças na composição dos venenos da mesma espécie são devidas às variações geográficas, uma vez que as condições ambientais variam de uma região para outra. Utilizando um sistema cromatográfico (HPLC de fase reversa) isolaram três miotoxinas: BnSP-5a, BnSP-6a e BnSp-7, presentes no veneno de *Bothrops pauloensis*. A fração BnSP7, revelou uma alta homologia com a sequência amino terminal de fosfolipases miotóxicas Lys-49. A alquilação da toxina abole a ação miotóxica, mas não a atividade edematogênica.

Soares *et al.* (2000), determinaram a sequência de aminoácidos da BnSP-7. Esta fosfolipase homóloga exibe atividade bactericida, promove o bloqueio da contração muscular em preparações *biventer cervicis* de pintainho, induz miotoxicidade e formação de edema. Realizando modificações químicas nos resíduos His, Tyr e Lys observaram a inibição parcial ou total das atividades produzidas por essa toxina.

Borja-Oliveira *et al.* (2003) observaram que o veneno de *Bothrops pauloensis* induz bloqueio irreversível e dependente da temperatura na junção neuromuscular em preparações *biventer cervicis* de pintainho, inibindo parcialmente a contratura evocada por KCl, sugerindo uma ação miotóxica, embora a contratura evocada pela ACh não foi afetada, o que evidencia uma ação pré-sináptica do veneno em baixas concentrações (1, 5 e 10 µg/ml) do veneno.

Durigon *et al.* (2003) corroboraram os achados de Borja-Oliveira *et al.* (2003), observando bloqueio neuromuscular irreversível dependente de temperatura e de Ca^{2+} em preparações nervo frênico diafragma de camundongo induzido pelo veneno de *Bothrops pauloensis*, sugerindo que a atividade catalítica poderia estar envolvida nesta ação farmacológica. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que o veneno foi capaz de despolarizar a membrana plasmática em repouso, além de aumentar a amplitude e frequência de MEPP, demonstrando uma ação primária em sítios pré-sinápticos, no terminal nervo motor.

Continuando com as pesquisas, Rodrigues *et al.* (2004) isolaram duas fosfolipases D 49 denominadas BnpTX-I e BnpTX-II, capazes de induzir citotoxicidade *in vitro*, miotoxicidade e formação de edema. Além disso, a fração BnpTX-I causou neurotoxicidade *in vitro* em camundongos e atividade bactericida em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Modificações químicas inibiram a atividade catalítica, mas os efeitos tóxicos e farmacológicos foram parcialmente reduzidos, demonstrando assim, que o efeito neurotóxico induzido pelo veneno é devido à presença de fosfolipases A₂. Estes resultados corroboraram a hipótese de uma dissociação dos sítios catalíticos e farmacológicos, proposta por Kini *et al.* (2003).

Recentemente Borja-Oliveira *et al.* (2007) purificaram duas toxinas D 49 denominadas NeuTX-I e NeuTX-II que mostraram ter ação na junção neuromuscular. A toxina NeuTX-I não inibiu as contraturas evocadas por KCl e ACh; aumentou a amplitude e frequência da liberação espontânea do neurotransmissor (MEPPs) e não alterou o potencial de membrana em repouso, indicando a evidente ação pré-sináptica da NeuTX-I. Rodrigues *et al.* (2007) isolaram uma PLA₂ D49 ácida que apresentou atividade hemolítica, edematogênica e miotóxica.

A tabela 2 contém uma relação das fosfolipases A₂ isoladas do veneno de *Bothrops pauloensis*, bem como os efeitos farmacológicos estudados.

Toxina	PLA ₂	Bloqueio Neuro muscular	Miotoxi- cidade	Atividade Edemato- gênica	Citotoxi- cidade	Atividade Bacteri- cida	Anti- coagulant	Referência
Bp-12	-	NFD	+	+	nd	nd	nd	Randazzo <i>et al.</i> , 2008
Bp-PLA₂	+	Nd	+	+	nd	nd	nd	Rodrigues <i>et al.</i> , 2007
Neu TX-I	+	NFD	nd	nd	nd	nd	nd	Borja- Oliveira <i>et</i> <i>al.</i> , 2007
Neu TX-II	+	NFD	nd	nd	nd	nd	nd	Borja- Oliveira <i>et</i> <i>al.</i> , 2007
BnpTX-I	+	NFD	+	+	+	+	+	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
BnpTX-II	+	Nd	+	+	+	+	+	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
BnSP-7	-	BC	+	+	nd	+	-	Soares <i>et</i> <i>al.</i> , 2000
BnSP-6	-	Nd	+	+	nd	nd	-	Soares <i>et</i> <i>al.</i> , 2000

Nd: Não determinado; (+) presença de atividade; (-) ausência de atividade.

Tabela 2. Fosfolipases A₂ isoladas do veneno de *Bothrops pauloensis*

Os estudos acima citados revelam o interesse em purificar e caracterizar biologicamente os componentes dos venenos de serpentes, com o objetivo de identificar os responsáveis pelos efeitos do veneno sobre a fisiopatologia do envenenamento e contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação dessas toxinas. Neste sentido, o presente estudo propõe avaliar os efeitos de uma fração do veneno de *Bothrops pauloensis*, isolada e purificada, pelo método de HPLC de fase reversa, utilizando uma coluna μ -Bondapack C-18 (Apêndice 1). Esta fração que será denominada Bp-13 exibiu atividade fosfolipásica e uma única banda homogênea quando submetida à eletroforese SDS-PAGE, com massa molecular, determinada por espectrometria de massas (MALDI-Tof), foi de 14035.628 Da (Apêndice 2).

A análise da composição de aminoácidos da Bp-13 determinou a presença de Asp/9, Glu/5, Ser/4, Gly/13, Thr/7, Ala/6, Pro/11, Tyr/14, Val/4, Cys/14, Ile/3, Leu/11, Phe/3, Lys/12, His/2 and Arg/5; alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos e básicos (Lys – Arg – His) assim como 14 resíduos Cys (Apêndice 3), com a seguinte sequência N-terminal: DLWQFGKMILKENGKSPFPSYGTYGCGSLGRR..., que revelou um alto grau de homologia com fosfolipases A₂ miotóxicas D49 de outras toxinas botrópicas (Apêndice 4).

2. Objetivos

Avaliar os efeitos da Bp-13 proveniente da purificação do veneno total de *Bothrops pauloensis* através do estudo de sua:

- ⌚ Ação neurotóxica *in vitro* em preparações *biventer cervicis* de pintainho, *extensor digitorium longus* e nervo frênico diafragma de camundongo.
- ⌚ Atividade miotóxica através da análise histológica e determinação dos níveis plasmáticos de CK em camundongos.
- ⌚ Atividade edematogênica mediante a formação de edema de pata em ratos.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem SWISS, pesando entre 18 - 22 g; ratos da linhagem Wistar, pesando de 160 - 180 g; fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP; e pintainhos da linhagem HY LINE W36, pesando de 40 - 50 g (4 - 8 dias), fornecidos pela Granja Globo Aves Ltda. Os animais foram mantidos em gaiolas, no biotério do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP), recebendo água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo nº 1266-1 aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEEA - IB - UNICAMP).

3.2. Veneno

O veneno de *Bothrops pauloensis* foi adquirido do Serpentário de Proteínas Bioativas Ltda. (Fazenda Boa Esperança, Batatais/SP). O “pool” utilizado no presente trabalho é proveniente de um único processo cromatográfico em HPLC de fase reversa denominado Bp-13.

3.3. Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados foram de alto grau de pureza, obtidos da Sigma, Aldrich Chemicals, Merk e Bio Rad. Kit de creatinoquinase CK-NAC (Bioclin/Quibasa, Brasil) e Historesina (Leika NuBloch/Heidelberg, Alemanha).

3.4. Determinação da atividade fosfolipásica

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996), modificado por Ponce-Soto *et al.* (2002). O substrato utilizado foi o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico.

Foram utilizadas amostras com uma concentração de 1 mg/ml tanto do veneno total como da proteína purificada. 20 µL de amostras foram incubadas junto com 20 µL de substrato, 20 µL de água deionizada e 200 µL tampão de reação Tris-HCl 10 mM pH 8 contendo CaCl₂ 10mM e NaCl 100 mM, em um volume final de 260 µL por 20 minutos a 37°C. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e a atividade foi monitorada em absorbância a 425 nm com a liberação do cromóforo. Foram utilizadas placas para microtitulação de 96-well e o sistema utilizado para a leitura das placas foi VERSAMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA. USA.).

Uma unidade de atividade enzimática é definida como quantidade de enzima necessária para produzir 1nmol de cromóforo por minuto. A atividade específica é dado pela relação entre a unidade enzimática (em nmol/min) e o teor de proteína (em mg).

3.4.1. Efeito da temperatura na atividade fosfolipásica da Bp-13

O ensaio para observar o efeito da temperatura sobre a atividade fosfolipásica foi realizado segundo o método descrito no item 3.4. A temperatura variou de 5 -60 °C e foi mantida por 20 minutos e lida em seguida a 425 nm.

3.4.2. Efeito de íons divalentes na atividade fosfolipásica da Bp-13

A atividade fosfolipásica da Bp-13 foi determinada na presença de íons divalentes, como Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Sr²⁺ e Cd⁺², é determinada segundo o método descrito em 3.4.

3.5. Ensaios Farmacológicos

3.5.1. Preparação músculo *biventer cervicis* (BC) de pintainho.

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados via inalatória com halotano e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs, com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ e C₆H₁₂O₆ 11,65. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares na altura do tendão e nervo (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais de até 9 V de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição de KCl (13,4 mM) e ACh (110 µM) foram registradas em fisiógrafo (Gould RS 3400), por meio de transdutores isométricos (BG-10 g). Os registros das contraturas para KCl e ACh foram realizados na ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição da fração) e no final do experimento (após 120 min. de incubação com a fração). Após 15 min. de estabilização foram realizados os seguintes tratamentos: controle solução nutritiva Krebs e adição de Bp-13 em concentrações de 3,56 µM (50 µg/mL) e 7,12 µM (100 µg/mL).

3.5.2. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo.

Camundongos foram anestesiados por via inalatória com halotano, e posteriormente sacrificados por secção e sangria dos vasos cervicais. O músculo diafragmático foi removido cirurgicamente juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico, como descrito por Bülbring (1946); as preparações foram colocadas

em uma cuba contendo 5 mL de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte composição em mM; NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl₂ 1.88, MgCl₂ 0.49; NaH₂PO₄ 0.42; NaHCO₃ 25.0 e C₆H₁₂O₆ 11.65. A temperatura foi mantida a 37 °C e aerada constantemente com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% de CO₂). O músculo diafragma foi mantido por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina. A preparação, então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico (estimulador Grass S48; 3 V; 0,1 Hz; e 0,2 ms) ou diretamente através do músculo de preparações previamente curarizadas (d-Tc 10 µM) com pulsos supramaxiais (estimulador Grass S48; 70 V; 0,1 Hz e 2 ms). O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos, foi realizado através de transdutor isométrico (BG-10 GM) acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400). Após 15 min. de estabilização foram realizados os seguintes tratamentos: (1) controle solução nutritiva Tyrode, (2) Bp-13 em concentrações crescentes de 0,71 µM (10 µg/mL); 1,42 µM (20 µg/mL); 3,56 µM (50 µg/mL) e 7,12 µM (100 µg/mL), (3) Bp-13 e a substituição do Ca²⁺ (1,8 mM) pelo Sr²⁺ (4 mM) na composição da solução nutritiva, (4) Bp-13 e a mudança a temperatura de 37 °C para 24 °C, (5) Bp-13 em concentrações de 1,42 µM (20 µg/mL) e 3,56 µM (50 µg/mL) sob a ação muscular de preparações curarizadas.

3.5.3. Preparação *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongo

Os camundongos foram anestesiados por via peritoneal com hidrato de cloral a 10% (300 mg/Kg) e após atingir o nível cirúrgico, foi realizada uma incisão na face ântero-lateral da pata posterior, expondo os tendões dos músculos EDL e tibial, bem como este último músculo. Procedeu-se à secção dos tendões e à retirada do músculo tibial, com exposição total do músculo EDL. Este foi dissecado, desde sua inserção tendínea distal até a proximal.

Durante o procedimento, a preparação foi mantida umedecida com solução nutritiva de Tyrode. Retirada a preparação, o músculo EDL foi colocado em uma cuba contendo 3,5 mL de solução Tyrode e mantido sob aeração constante com carbogênio, a 37° C. O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos elétricos supramaximais, foi realizado por um transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM, acoplado a um fisiógrafo Gould universal Amplifier Model RS 3400 (Gould Inc., Cleveland, OHIO, USA).

O músculo foi submetido à tensão constante de 0,5 g/cm (por meio de um fio preso à porção tendinosa e ao transdutor isométrico) e à estimulação elétrica, através de pulsos gerados por estimulador S48F (Grass Instruments, Quincy, MASS, USA) Um eletrodo bipolar de platina foi colocado em torno da preparação que continha o tronco do nervo peroneal, suprimindo o músculo. A preparação foi submetida à estimulação elétrica indireta, com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, por um período de 20 minutos para estabilização.

Foram realizados os seguintes tratamentos (1) 3,56 μM (50 $\mu\text{g/mL}$) da toxina Bp-13 em preparações mantidas na solução nutritiva Tyrode e (2) 3,56 μM (50 $\mu\text{g/mL}$) da toxina em preparações mantidas em solução nutritiva Tyrode substituindo o Ca^{2+} por Sr^{2+} .

3.5.4. Estudo Eletrofisiológico

O registro do potencial de membrana (PM) foi observado em preparação hemidiafragma de camundongo. O hemidiafragma esquerdo com sua face torácica voltada para cima foi fixado horizontalmente, por meio de alfinetes, em cuba revestida de resina e silicone. A cuba foi preenchida com 2 mL de solução de Tyrode mantida à temperatura ambiente e aerada com carbogênio (mistura de 95% O_2 e 5% CO_2). Para o registro dos parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi

colocada na platina de microscópio estereoscópico (Wild M7 S - Switzerland) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Utilizou-se a técnica convencional de registro com microeletrodo (Fatt e Katz, 1951). Os microeletrodos de vidro, preparados com o auxílio do Vertical Pipette Puller (modelo 700 D-David Kopf Instruments, CA, USA), foram preenchidos com KCl 3 M, tendo uma resistência entre 10-25 M Ω . Os microeletrodos foram introduzidos intracelularmente sobre a camada superficial de fibras musculares, com o auxílio de micromanipulador Leitz, para a medida do PM. Os valores de PM foram obtidos através de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram feitos em um microcomputador (Microtec, São Paulo, SP) carregado com um software para aquisição de dados (AqDADOS, Lynx, São Paulo, SP). O computador munido de uma placa conversora A/D é capaz de digitalizar os biopotenciais.

- Registro do potencial de membrana

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-se 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 seis fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média aritmética e o erro padrão. O estudo dos efeitos induzidos pelas frações sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi feito nos tempos 0, 5, 30, 45, 60, 90, e 120 min. A concentração utilizada de Bp-13 foi de 3,56 μ M (50 μ g/mL), outra serie de experimentos foram realizados com preparações previamente incubadas com d-tubocurarina (10 μ M).

3.5.5. Análise Histológica Quantitativa

Após 120 minutos de incubação com *Bothrops pauloensis* (50 e 100 µg/mL); Bp-13 (20 e 50 µg/mL); Bp-13 (50 µg/mL) incubada em solução nutritiva Tyrode onde o Ca^{2+} foi substituído pelo Sr^{2+} ou solução nutritiva Tyrode (controle), as preparações NFD, foram fixadas em solução Bouin com ácido acético, por 24 horas. Após esse período as preparações foram lavadas com água e amônia, e desidratadas em álcool 70 %, 80% 90% e 100% e seguidamente a inclusão em Historesina Leika (Nubloch/Heidelberg, Alemanha). Posteriormente, foram confeccionados os blocos. Estes foram cortados em micrótomo (Leika RM 2035) e as secções (2 µm de espessura) foram montadas em lâminas e coradas com de 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; a captura das imagens foi feita através da utilização de um software (Image Pro Plus 6.0 Midia Cybernetics, Inc.) A análise foi feita por dois examinadores. Foi realizada a contagem do numero total de células presente em um corte, identificando o numero de células normais e lesadas. Foram consideradas células normais as que apresentaram se íntegras, com manutenção do formato poligonal e células lesadas as que apresentaram alterações como: vacúolos, hipercontração das miofibrilas, fibras edemaciadas e com perda de material celular. O grau de alteração foi expresso em porcentagem (% de alteração = (células lesadas x 100)/células totais).

3.5.6. Determinação dos níveis de CK *in vivo*

Camundongos de 18 a 22 g de peso foram inoculados com a fração Bp-13 em concentrações de 20 e 50 µg a nível intramuscular dissolvidos em 50 µL de PBS. Após 30 min, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas foi coletado sangue da veia caudal com auxílio de capilares heparinizados; logo após, o sangue foi centrifugado para a

obtenção do plasma. A atividade enzimática foi determinada utilizando o Kit comercial CK-NAC (Bioclin/Quibasa, Brasil), conforme orientações do fabricante. A atividade foi expressa em U/L. Uma unidade de CK corresponde a fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 37 °C.

3.5.7. Determinação da atividade inflamatória

Grupos de seis ratos (160 - 180 g) foram anestesiados superficialmente com halotano (via inalatória) e submetidos à injeção subcutânea na pata direita na região plantar de 0,1 mL de salina ou da Bp-13 em doses de 2,5; 5 e 10 µg/pata; dissolvida em solução salina. O volume da pata foi medido através de um hidropletismógrafo (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) imediatamente antes da injeção (basal) e em intervalos regulares de 15, 30, 60, 120 e 180 min após a injeção da Bp-13. 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.

3.6. Análise Estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos $\pm$ erro padrão da média. Foi realizada uma análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas.

Para a comparação das medidas ao longo do tempo e entre os grupos foi utilizada ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos. Para a comparação de dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

O coeficiente de correlação intraclases e respectivo intervalo de 95% de confiança foi utilizado para determinar a concordância entre observadores. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

4. Resultados

ESTUDO MIOGRÁFICO

4. 1. Preparação *biventer cervicis* (BC) de pintainho

A toxina denominada Bp-13 proveniente do veneno total de *Bothrops pauloensis* foi ensaiada em duas concentrações diferentes 3,56 e 7,12 μM incubadas com a preparação a 37 °C sob estimulação elétrica de campo. A resposta contrátil foi levemente inibida pela toxina, atingindo $21 \pm 6\%$ e $28 \pm 2\%$ de bloqueio da resposta contrátil após 120 min de incubação com 3,56 e 7,12 μM de Bp-13 respectivamente; a inibição da resposta muscular foi irreversível (Figura 5A). Os níveis de bloqueio foram significativamente diferentes do controle onde a resposta contrátil foi mantida em $96 \pm 2\%$, portanto a preparação BC de pintainho mostrou-se pouco sensível à ação da Bp-13.

Quando as preparações foram submetidas à adição exógena de ACh (110 μM) e KCl (20 mM), foi observado que: a concentração de 3,56 μM de Bp-13 não alterou significativamente a contratura evocada pela ACh ou KCl, porém a concentração de 7,12 μM de Bp-13 causou uma inibição parcial da contratura produzida em resposta ao KCl, porém, essa diferença não foi significativamente diferente do controle. Não obstante, a contratura evocada pela ACh foi inibida em $53 \pm 13\%$, sendo diferente do controle ($p < 0,05$). A figura 5B representa a porcentagem de contratura evocada por ACh e KCl, frente as duas concentrações utilizadas da Bp-13.

Na figura 6 são mostrados os registros miográficos dos experimentos controle e tratados com a Bp-13.

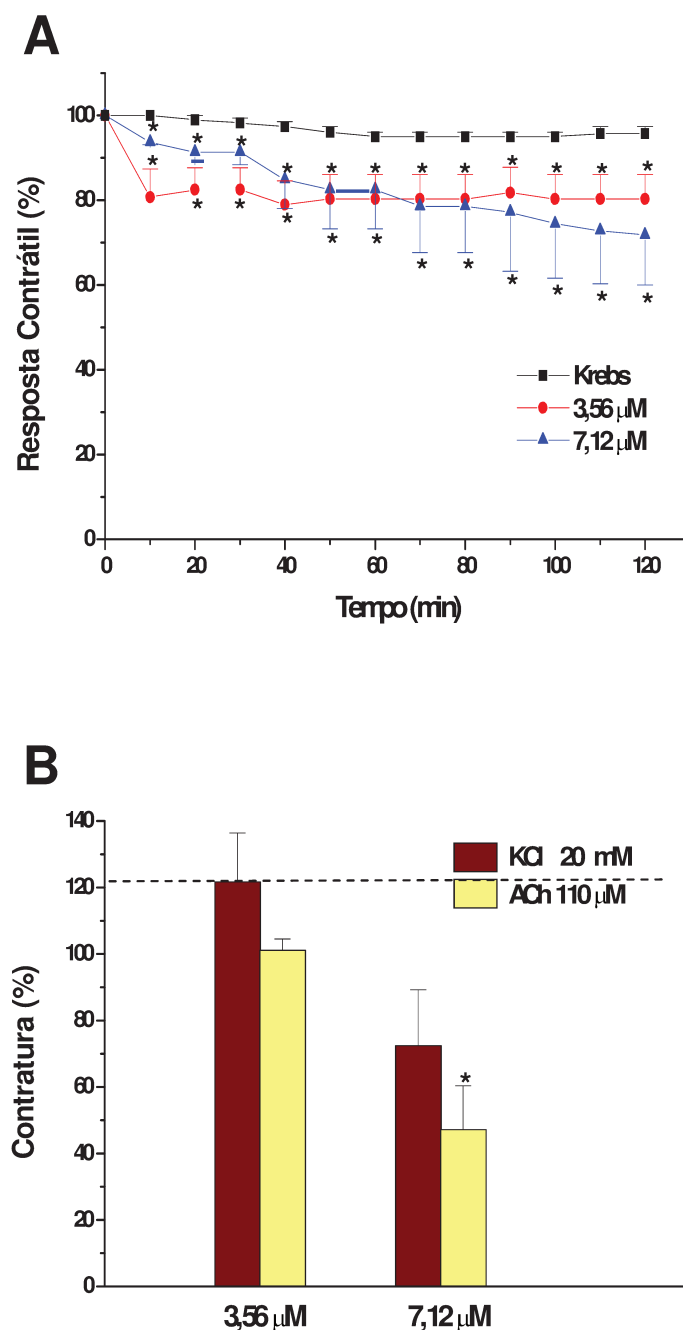


Figura 5. Efeito da Bp-13 em preparação BC de pintainho, sob estimulação elétrica de campo, a 37 °C. **(A)** Curva representativa da resposta contrátil. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão (n=3-6). **(B)** Porcentagem de contratura evocada por ACh (110 μ M) e KCl (20 mM) em presença de Bp-13. (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p<0,05$).

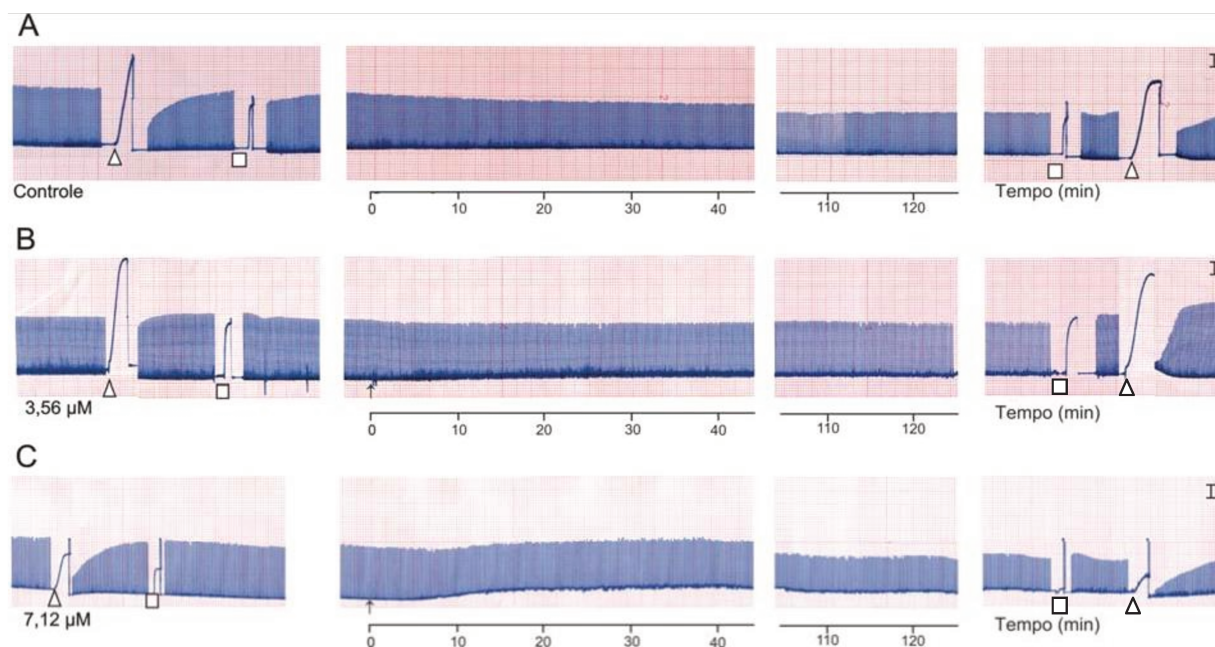


Figura 6. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações BC de pintainho, sob estimulação elétrica de campo. (A) Controle Krebs, (B) Bp-13 em concentração de 3,56 μM e (C) 7,12 μM . Note a alteração na linha de base. Adição exógena de ACh (□), e KCl (Δ). As setas (↑) representam o momento de adição da toxina. A barra vertical (I) indica 1 g.

4. 2. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo

4.2.1. Estimulação elétrica indireta

A preparação nervo frênico diafragma de camundongo mostrou-se mais sensível à ação neuromuscular da Bp-13 em comparação com a preparação *biventer cervicis* de pintainho.

Foram avaliadas diferentes concentrações de 0,71; 1,42; 3,56 e 7,12 μM a 37 °C sob estimulação elétrica indireta, conforme observado na figura 7.

O bloqueio neuromuscular mostrou-se dependente da concentração; os resultados mostram que as baixas concentrações de Bp-13 induziram bloqueio parcial da resposta contrátil após 120 min de incubação com a toxina, e que o grau de bloqueio observado foi de $29 \pm 5\%$ (n=3) e $55 \pm 6\%$ (n=3) para 0,71 e 1,42 μM respectivamente. Nos experimentos em que foram usadas altas concentrações (3,56 e 7,12 μM) de Bp-13 o tempo para produzir bloqueio de 50 % da resposta contrátil foi igual a 28 ± 3 (n=6) e 18 ± 1 (n=3) min respectivamente. Estas concentrações levaram ao bloqueio total e irreversível da resposta contrátil.

Na figura 8 são mostrados os registros miográficos das preparações tratadas com Bp-13. Repetidas lavagens nas preparações tratadas com a Bp-13 não foram capazes de reverter o bloqueio neuromuscular causado por essa toxina. Nos experimentos controle, o registro das contrações musculares permaneceu estável em $98,9 \pm 4,5\%$ após 120 min em solução Tyrode (n=4).

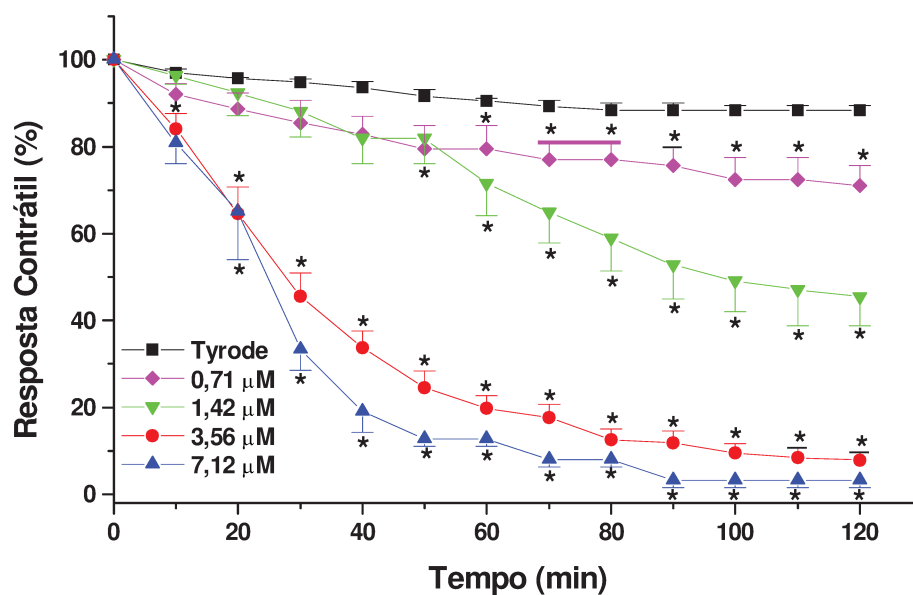


Figura 7. Curva da resposta contrátil da preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, após a adição de diferentes concentrações (μM) de Bp-13. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão ($n=3-6$). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p<0,05$).

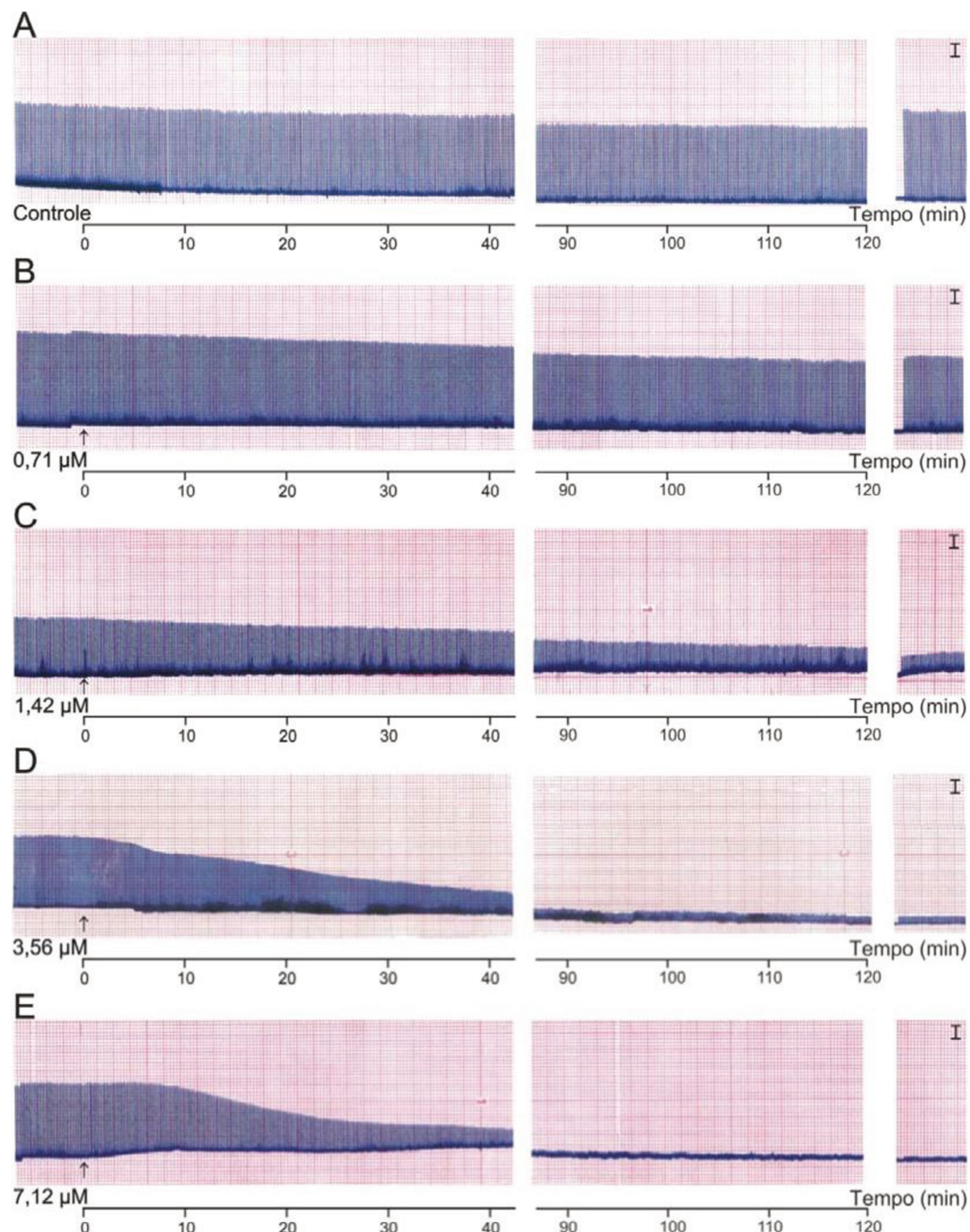


Figura 8. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo, sob estimulação elétrica indireta. (A) Controle Tyrode, (B) Bp-13 0,71 μ M, (C) 1,42 μ M, (D) 3,56 μ M e (E) 7,12 μ M. As setas ($\uparrow$) representam o momento de adição da toxina. A barra vertical (I) indica 1 g.

4.2.1.1. Substituição do Ca^{+2} e influência da temperatura

A atividade fosfolipásica da Bp-13 foi determinada na presença de alguns íons, como: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} e Cd^{2+} em uma concentração de 10 mM, na ausência e presença e de 1 mM de Ca^{2+} . A atividade catalítica da Bp-13 com 1 e 10 mM de Ca^{2+} também foi avaliada.

A Bp-13 apresentou atividade enzimática semelhante em presença de 1 e 10 mM de Ca^{2+} . No entanto, em presença dos íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} e Cd^{2+} (10mM) a atividade foi diminuída na presença de 1mM de Ca^{2+} . Na ausência de Ca^{2+} e na presença dos íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} e Cd^{2+} (10mM) a atividade fosfolipásica foi significativamente (*) diminuída mostrando que esses cátions não podem substituir o co-fator Ca^{2+} no desenvolvimento da atividade catalítica, como mostrado na figura 9.

Quando o Ca^{2+} (1,8 mM) foi substituído pelo Sr^{2+} (4 mM) na solução nutritiva Tyrode e as preparações NFD de camundongo incubadas com Bp-13 (3,56 μM), foi observada a inibição do bloqueio da resposta contrátil induzido pela toxina. Após 120 min de incubação a resposta contrátil foi de $83,7 \pm 14\%$, observando a ausência de bloqueio significativo, em relação ao controle, como mostrado na figura 9. O efeito bloqueador neuromuscular mostrou-se dependente da presença de Ca^{2+} .

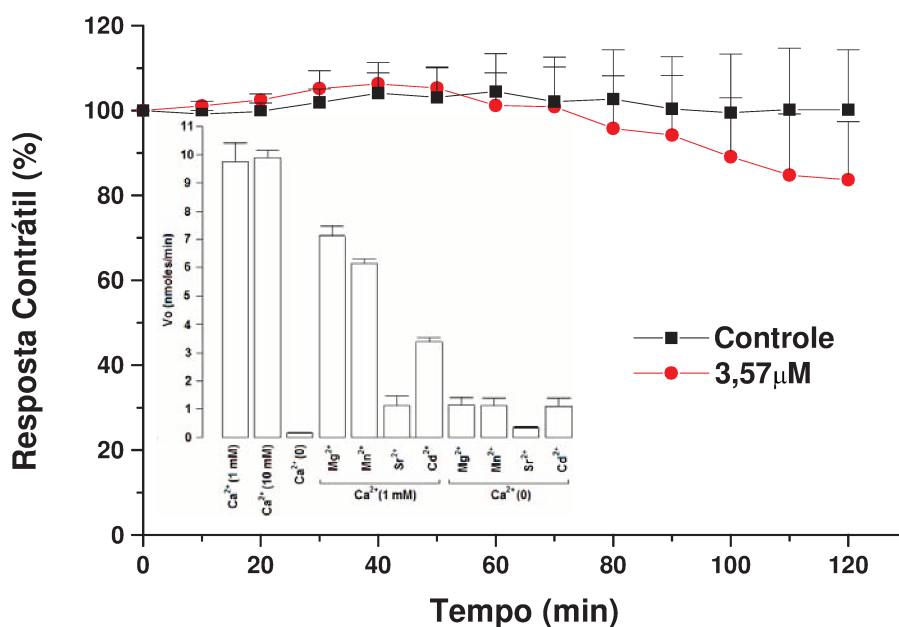


Figura 9. Curva da resposta contrátil da preparação NFD de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, após a adição de Bp-13 e a substituição do Ca^{2+} (1,8 mM) pelo Sr^{2+} (4 mM). Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão ($n=4-6$). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p<0,05$).

O efeito da temperatura sobre a atividade da catalítica da Bp-13, foi determinado, incubando a enzima em diferentes temperaturas (5 – 60 °C). O ótimo de atividade enzimática da fração Bp-13 foi registrado à temperaturas ao redor de 30 °C, conforme mostrado na figura 10.

A alteração da temperatura do banho 37 °C para 24 °C no banho, também inibiu parcialmente o bloqueio da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo, incubadas com a Bp-13. Após 120 min de incubação, o bloqueio da resposta contrátil foi de $37.4 \pm 6\%$, ao invés de 90% a 37 °C (fig. 10).

A fig. 11 mostra o registro miográfico dos experimentos realizados em condições alteradas, como a mudança da composição da solução nutritiva substituindo-se o Ca^{2+} (1,8 mM) pelo Sr^{2+} (4 mM), bem como a alteração da temperatura de 37 °C para 24 °C. Ambos os parâmetros interferiram sobre o efeito bloqueador da transmissão neuromuscular causado pela Bp-13 (3,56 μM), sugerindo que a Bp-13 se comporta do ponto de vista farmacológico, como uma típica PLA_2 D49, dependente de Ca^{2+} e de temperatura igual ou acima de 30 °C para exibir sua atividade catalítica.

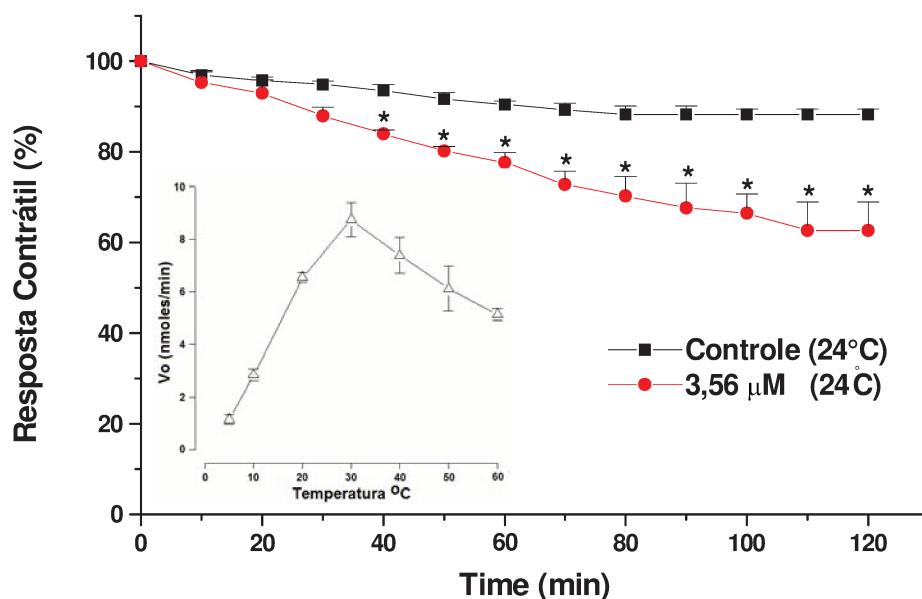


Figura 10. Curva da resposta contrátil da preparação NFD de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, após a adição da Bp-13. A temperatura do banho foi mantida a 24 °C. A figura inserida mostra a medida da atividade fosfolipásica da Bp-13 em diferentes temperaturas. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão ($n=4-6$). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p<0,05$).

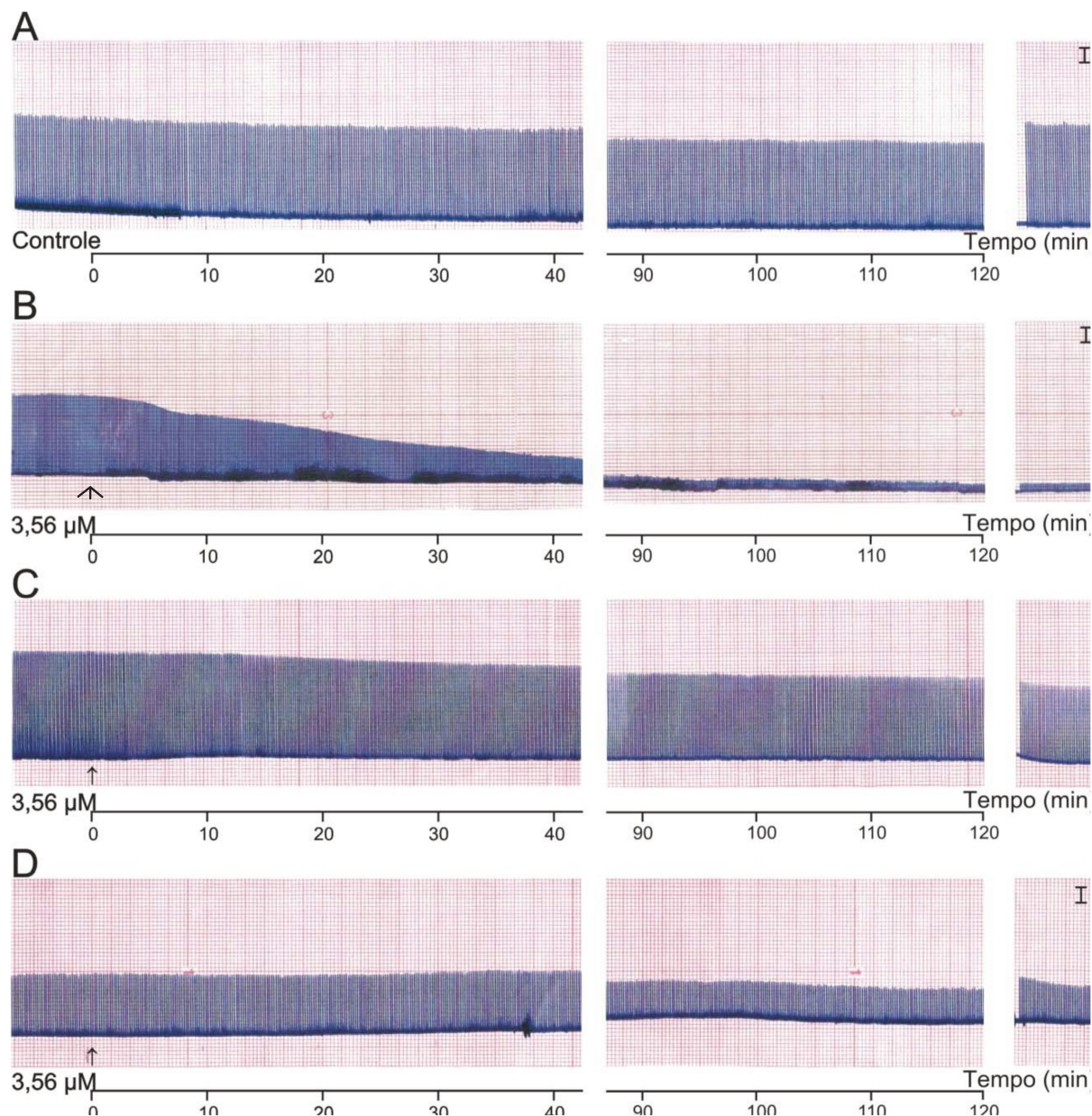


Figura 11. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo, sob estimulação elétrica indireta. (A) Controle Tyrode, (B) Bp-13 (3,56 μM) em condições normais; (C) Bp-13 (3,56 μM) incubado em Tyrode substituindo o Ca^{2+} pelo Sr^{2+} , (D) Bp-13 (3,56 μM) incubada a 24° C. As setas (↑) representam o momento de adição da toxina. A barra (I) indica 1 g.

4.2.2. Estimulação elétrica direta

As preparações NFD de camundongo previamente tratadas com d-Tubocurarina (10 μ M), foram submetidas à estimulação elétrica direta. A Bp-13 foi avaliada em concentrações de 1,42 e 3,56 μ M, induzindo bloqueio da força de contração muscular de forma semelhante à observada frente a estimulação elétrica indireta (Figura 12). Após 120 min de incubação com a Bp-13 (1,42 e 3,56 μ M), a resposta contrátil foi de $73 \pm 7\%$ e de $14 \pm 6\%$, respectivamente.

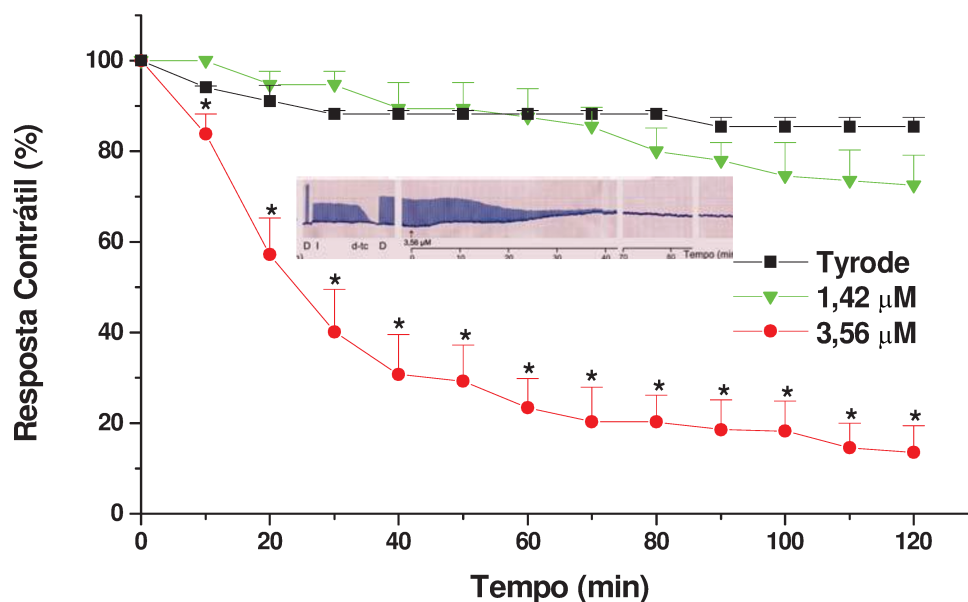


Figura 12. Representação gráfica do efeito da Bp-13 sobre a resposta contrátil da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica direta. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão ($n=3-6$). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p<0,05$). A figura inserida mostra o registro miográfico da resposta contrátil da preparação NFD de camundongo, incubada com 3,56 μ M de Bp-13. A seta ($\Downarrow$) indica o momento de adição da toxina.

4.3. Preparação *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongo

A preparação EDL de camundongo foi utilizada para observar a ação neuromuscular da Bp-13 em presença e ausência de Ca^{2+} . A concentração utilizada foi de 3,56 μM a 37° C sob estimulação elétrica indireta.

Como mostrado na figura 13, a resposta contrátil se manteve invariável ao longo de 60 min. Após a adição da Bp-13, observou-se que em presença de Ca^{2+} a resposta contrátil foi inibida, sendo praticamente abolida (90%) a partir dos 80 min de incubação com a toxina. Nos experimentos que foram realizados com a substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} , a resposta contrátil foi semelhante ao observado no controle por 180 min de observação.

A figura 14 mostra o registro miográfico dos experimentos realizados em preparação EDL.

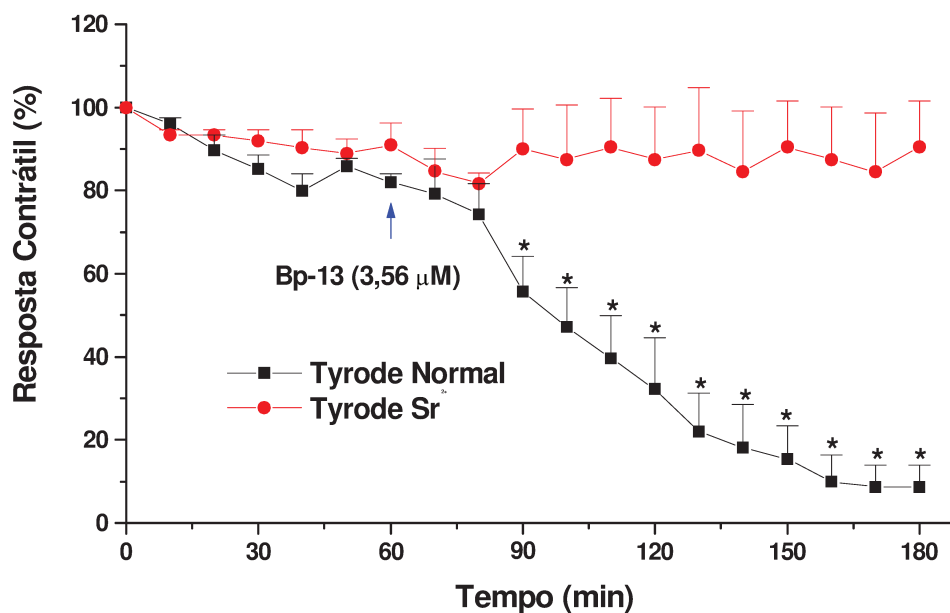


Figura 13. Representação gráfica do efeito da Bp-13 sobre a resposta contrátil em preparações EDL de camundongo, sob estimulação elétrica indireta. As preparações foram mantidas em diferentes soluções nutritivas (Tyrode com Ca^{2+} e Tyrode com o Ca^{2+} substituído pelo Sr^{2+}). Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão ($n=3-6$). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p < 0,05$).

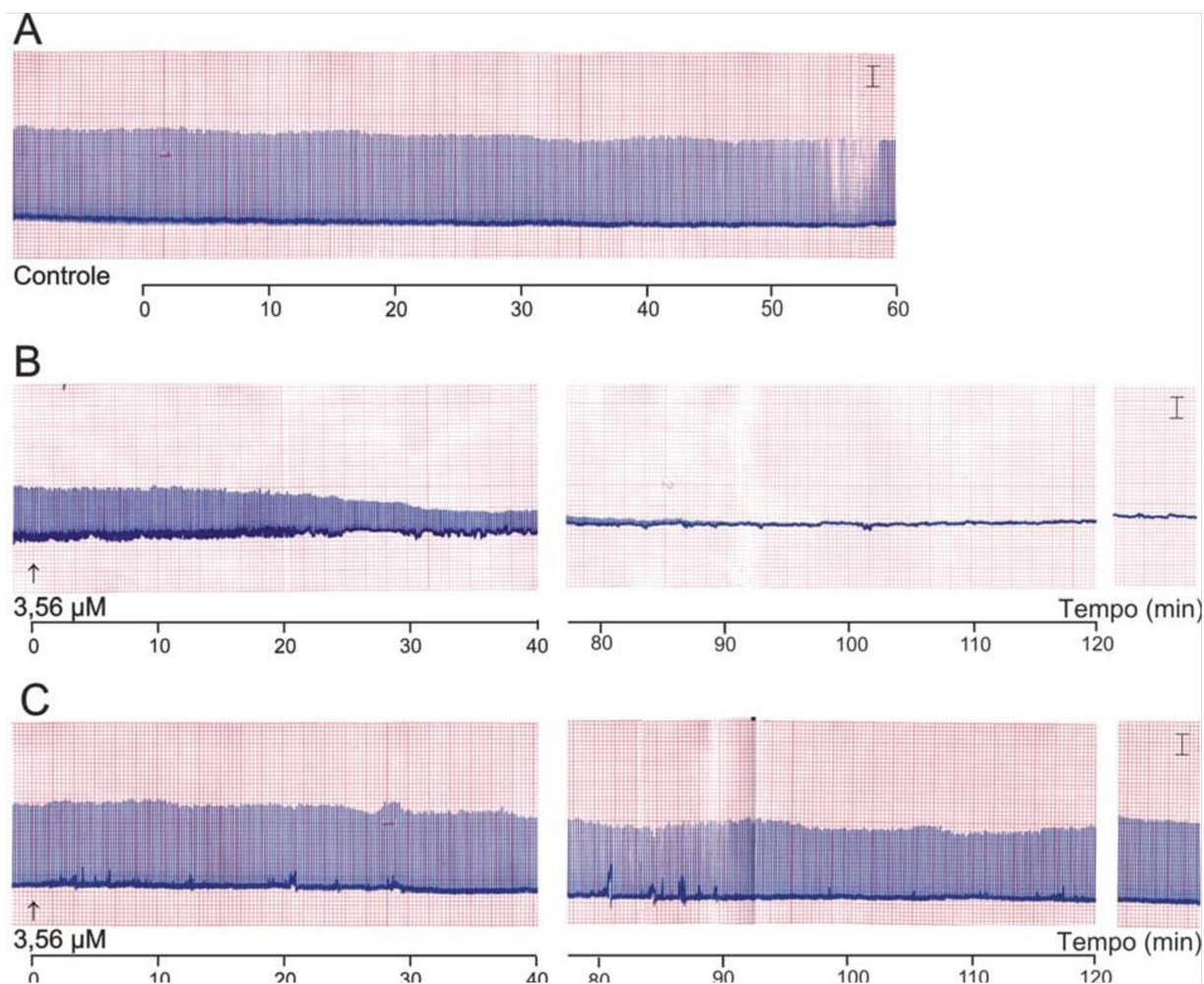


Figura 14. Registro miográfico da resposta contrátil em preparações EDL de camundongo, sob estimulação elétrica indireta. (A) Controle Tyrode, (B) Bp-13 (3,56 μM) em condições normais; (C) Bp-13 (3,56 μM) incubada em Tyrode substituindo-se o Ca^{2+} pelo Sr^{2+} . A seta (↑) representa o momento de adição da toxina. A barra vertical (I) indica 1 g.

ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

4.4. Potencial de Membrana (PM)

A medida do potencial de membrana em repouso foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min; em ausência de toxina os valores obtidos foram mantidos em -80 ± 1 (mV) após 120 min de experimento. Em presença de $3,56 \mu\text{M}$ de Bp-13, observou-se um aumento nos valores da medida do potencial de membrana, a partir de 15 min, atingindo valores de -37 ± 3 (mV) após 120 min de incubação com a toxina. Nos experimentos realizados com preparações previamente curarizadas (d-Tc $10 \mu\text{M}$), com os receptores nicotínicos bloqueados, observou-se uma proteção significativa contra a ação despolarizante da Bp-13 sobre a membrana plasmática; assim os valores obtidos aos 120 min foram de -58 ± 2 (mV). Houve diferença significativa entre os tratamentos com relação ao controle, bem como em relação aos tratamentos entre si, de acordo com a figura 15.

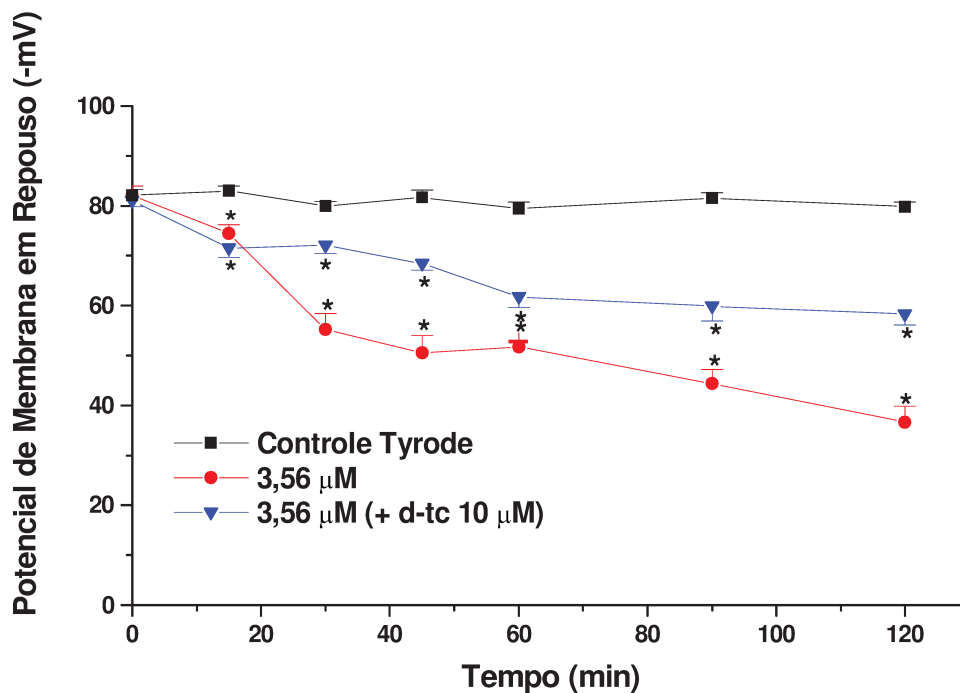


Figura 15. Potencial de membrana em repouso de preparações músculo diafragma de camundongo incubadas em solução Tyrode (controle), Bp-13 (3,56 μ M) e em preparações previamente curarizadas (d-Tuborurarina 10 μ M). Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão (n=3). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p < 0,05$).

MIOTOXICIDADE

4.5. Análise Histológica Quantitativa

A figura 16 mostra secções transversais de 2 μm de espessura de músculo diafragma de camundongo. As preparações que foram mantidas em solução nutritiva Tyrode durante 120 min com estimulação elétrica indireta, mostraram fibras musculares de aspecto normal com manutenção do formato poligonal e membrana plasmática íntegra.

As preparações que foram incubadas com 50 $\mu\text{g/ml}$ de veneno de *Bothrops pauloensis* apresentaram $8,7 \pm 3 \%$ de fibras alteradas que não foi diferentemente significativa do controle. Na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ o veneno causou $14,4 \pm 3 \%$ de fibras lesadas (Tabela 3).

A lesão muscular produzida pela fosfolipase Bp-13 na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ apresentou $8,3 \pm 4 \%$ de fibras lesadas. Em preparações tratadas com 50 $\mu\text{g/ml}$ de Bp-13 foi observado $30,6 \pm 5\%$ e $36,7 \pm 11\%$ de fibras lesadas, tanto nos experimentos realizados em presença quanto em ausência do Ca^{2+} , respectivamente. Vários estágios do processo mionecrótico foram observados, destacando-se hipercontração das miofibrilas, seguido de células edemaciadas e em alguns casos foram observados vacúolos.

Tratamento	% Alteração
Controle Tyrode	$1,8 \pm 0,9$
50 µg/ml de veneno total	$8,7 \pm 3,5$
100 µg/ml de veneno total	$14,4 \pm 3,3^*$
20 µg/ml de Bp-13 (1,42 µM)	$8,3 \pm 3,6$
50 µg/ml de Bp-13 (3,56 µM)	$30,6 \pm 5,1^*$
50 µg/ml de Bp-13 (3,56µM) [†]	$36,7 \pm 10,7^*$

*nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle.

[†]O experimento foi realizado em Tyrode com a substituição de Ca^{2+} pelo Sr^{2+} .

Tabela 3. Porcentagem de alteração morfológica

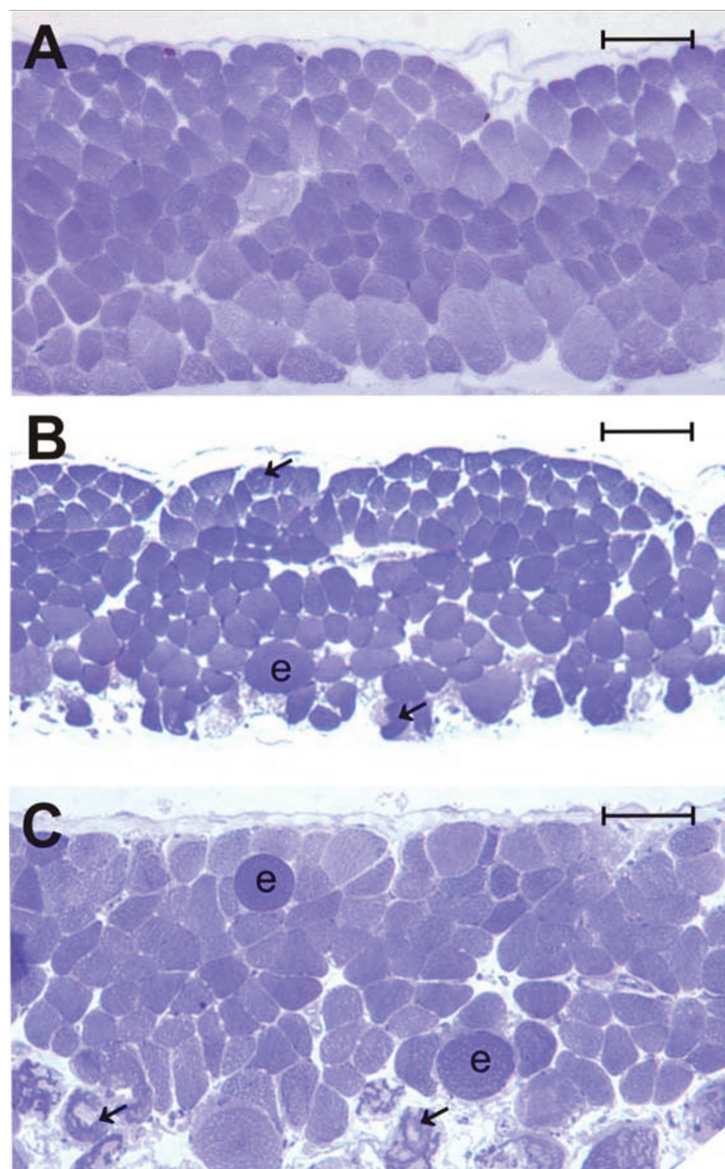


Figura 16. Fotomicrografias de cortes transversais (2 μm) de preparações NFD de camundongo após 120 min de estimulação elétrica indireta, as preparações foram mantidas em solução nutritiva Tyrode (A), ou tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ (B) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (C) de veneno total de *Bothrops pauloensis*. Alterações morfológicas, tais como, hipercontração de miofibrilas (⌢) e fibras edemaciadas (e), foram evidenciadas nas preparações tratadas. Barra 50 μm .

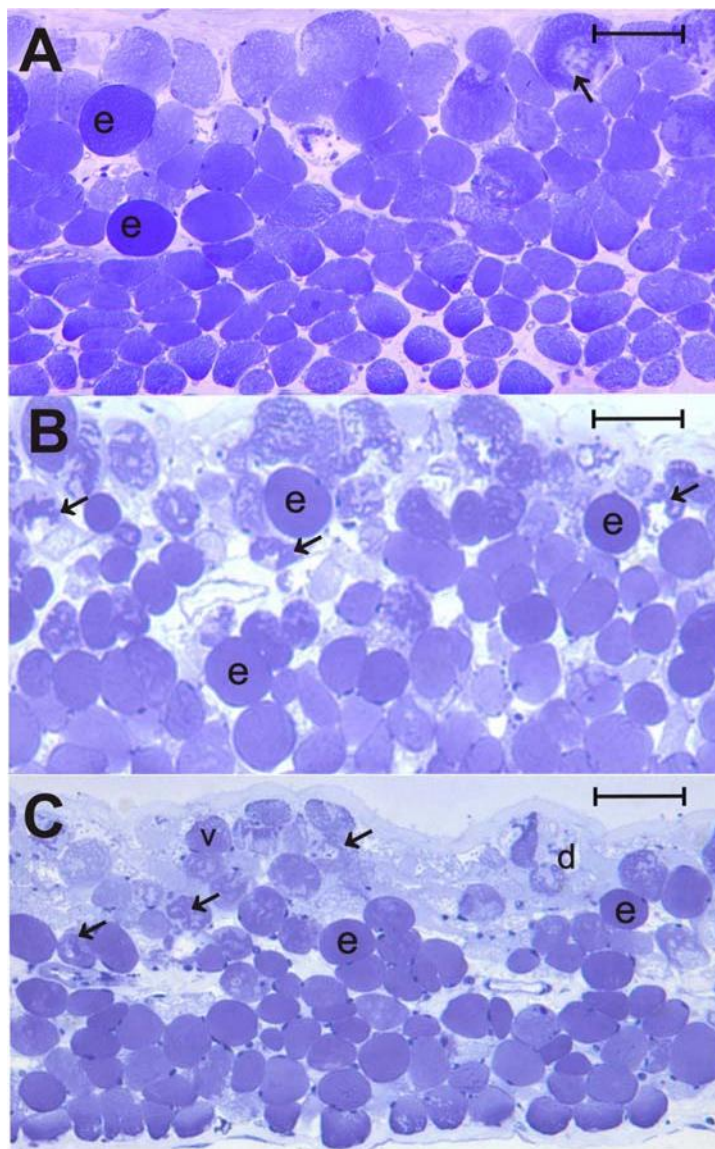


Figura 17. Fotomicrografias de cortes transversais (2 μm) de preparações NFD de camundongo após 120 min de estimulação elétrica indireta. As preparações foram mantidas em solução nutritiva Tyrode e incubadas com a fosfolipase A_2 ; (A) Bp-13 20 $\mu\text{g/mL}$; (B) Bp-13 50 $\mu\text{g/mL}$ e (C), Bp-13 50 $\mu\text{g/mL}$ mantida em solução Tyrode substituindo-se o Ca^{2+} pelo Sr^{2+} . Alterações morfológicas, tais como, hipercontração de miofibrilas (∇), fibras edemaciadas (e), vacúolos (v) e células com lesão tipo delta (d) foram evidenciadas nas preparações tratadas. Barra 50 μm .

4.6. Determinação dos níveis de CK plasmático *in vivo*

A atividade miotóxica “*in vivo*” da Bp-13 foi determinada dosando-se a liberação de creatinoquinase (CK) no plasma de camundongos, injetados no músculo gastrocnêmio, com 20 e 50 µg da Bp-13. A figura 18 mostra o aumento na liberação de creatinoquinase, quando comparada ao controle PBS.

Os níveis de CK foram significativamente aumentados, logo após a injeção da Bp-13. Aos 30 min, a liberação de CK atingiu valores de 948 ± 214 U/L e 1276 ± 229 U/L para 20 e 50 µg, respectivamente. Os níveis máximos correspondendo a 994 ± 167 U/L e 1440 ± 129 U/L foram atingidos após 1 hora da injeção intramuscular com 20 e 50 µg da toxina, respectivamente.

Os níveis de CK liberados no plasma para os experimentos controle foram de 69 ± 18 U/L.

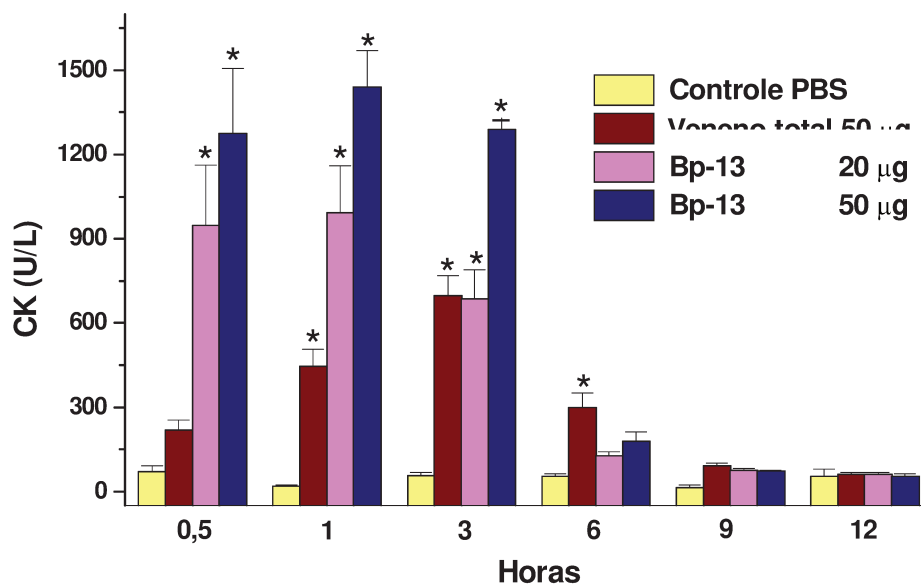


Figura 18. Níveis plasmáticos da liberação de creatinoquinase (CK), observados em camundongos inoculados com a Bp-13, ou com o veneno total injetado no músculo gastrocnêmio. Os resultados são expressos pela média dos experimentos $\pm$ erro padrão ($n=6$). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p<0,05$).

4.7. Atividade Edematogênica

A fosfolipase Bp-13 foi capaz de induzir a formação de edema de pata em ratos 15 min após a injeção da toxina, em doses de 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g/pata}$. A figura 19A mostra a formação de edema induzido pela toxina, $0,45 \pm 0,07 \text{ mL}$ (2,5 $\mu\text{g/pata}$); $0,47 \pm 0,04 \text{ mL}$ (5 $\mu\text{g/pata}$) e $0,45 \pm 0,06 \text{ mL}$ (10 $\mu\text{g/pata}$); aumento de volume no controle foi de $0,20 \pm 0,02$. Na figura 19B foram calculados os valores da área sob a curva (ASC) sendo 0,33 (salina); $0,41 \pm 0,07$ (2,5 $\mu\text{g/pata}$); $0,35 \pm 0,07$ (5 $\mu\text{g/pata}$) e $0,57 \pm 0,11 \mu\text{g/pata}$).

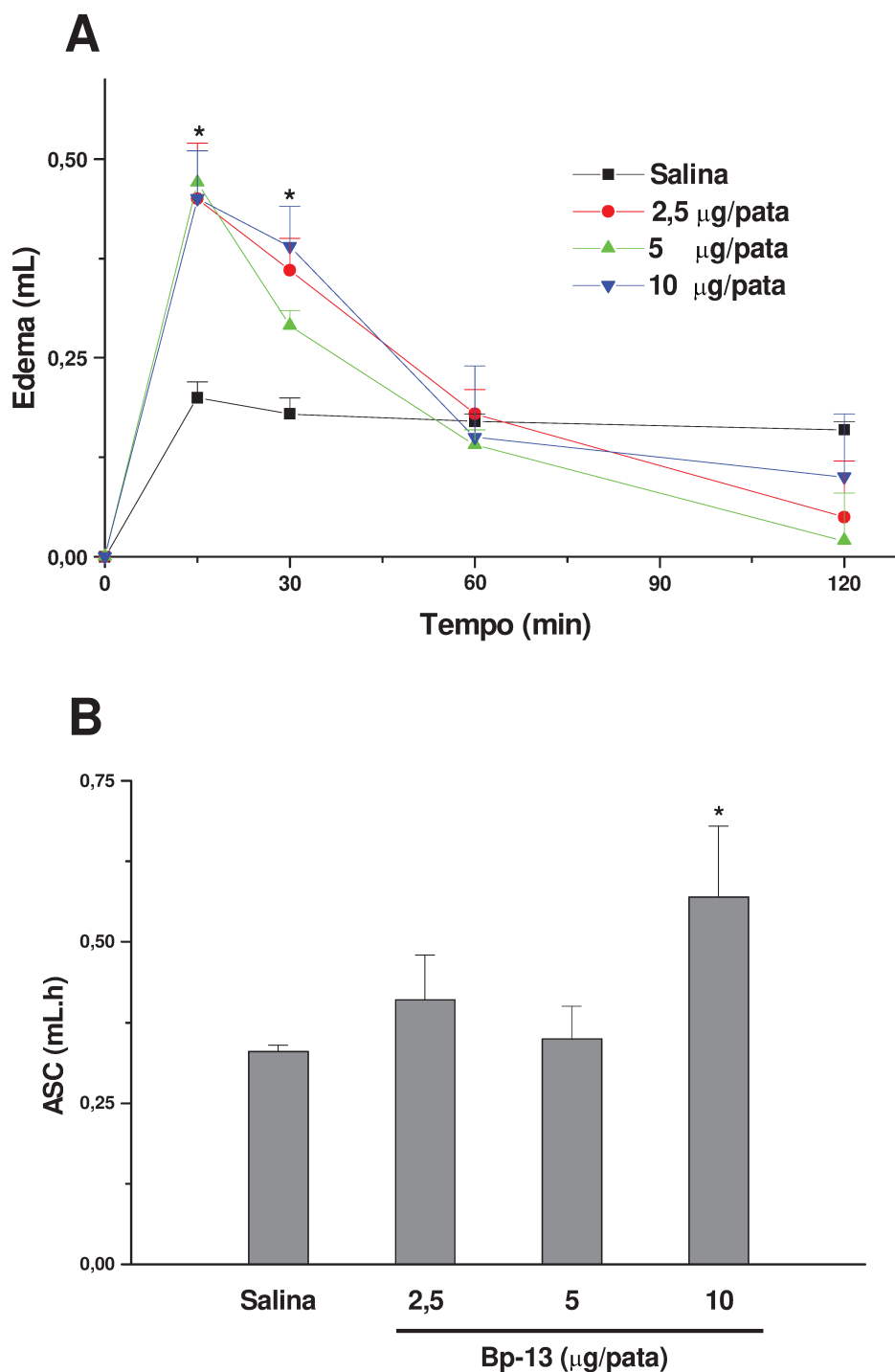


Figura 19. Representação gráfica da ação inflamatória induzida pela Bp-13 em ratos. **(A)** Curva da resposta inflamatória induzido pela Bp-13. **(B)** Cálculo da área sob a curva. Cada ponto representa a média dos experimentos $\pm$ erro padrão ($n=5$). (*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle ($p<0,05$).

5. Discussão

O veneno de *Bothrops pauloensis* possui ação neurotóxica *in vitro*, provavelmente devido à presença de diferentes toxinas que agem em sítios pré-sinápticos (Borja-Oliveira *et al.*, 2003; Durigon *et al.*, 2005); no sarcolema, aumentando os níveis plasmáticos da enzima CK, alterando a morfologia das fibras musculares; e ação edematogênica (Soares *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2007 e Randazzo-Moura *et al.*, 2008). Estes eventos farmacológicos foram atribuídos à presença de fosfolipases A₂ (BnpTX-I, BnpTX-II, NeuTX-I, NeuTX-II e Bp-PLA2) e Lys-49 (BnSP-6, BnSP-7 e Bp-12), que foram isoladas utilizando-se métodos cromatográficos, sem perda da atividade biológica, reproduzindo os efeitos observados pelo veneno total. Os trabalhos citados demonstraram a importância da separação de frações puras para, a fim de se isolar componentes responsáveis pelos efeitos induzidos pelo veneno total, para que se possa interpretar os resultados e estabelecer uma correlação adequada entre a estrutura e a função dessas proteínas.

A Bp-13 foi obtida a partir do veneno de *Bothrops pauloensis*, que foi submetido a um fracionamento em HPLC de fase reversa, apresentando 18 picos. A fração apresentou atividade fosfolipásica semelhante à do veneno total, com velocidade de reação de 2,17 nmol/min/mg para o veneno e de 2,43 nmol/min/mg para a Bp-13.

O efeito neuromuscular da Bp-13 avaliado em preparações de BC de pintainho, NFD e EDL de camundongo apresentou diferenças em razão da sensibilidade das preparações na ação da toxina. A ação da Taipoxina, por exemplo, é mais potente em preparações NFD de camundongo do que em preparações de BC de pintainho, que por sua vez, é mais sensível à ação da β -bungarotoxina e crotoxina (Lee e Ho, 1982). Estas diferenças podem ser atribuídas a diferenças na arquitetura muscular entre as espécies utilizadas, além das diferenças em composição e tipo de músculo. A preparação EDL é composta, principalmente, por fibras brancas de contração rápida e como consequência é de elevada capacidade glicolítica (Ellisman *et al.*, 1976; Takekura *et al.*, 1994). Por outro lado o diafragma é uma mistura fibras de contração rápida e lenta (60% fibras vermelhas, 20% brancas e 20 % intermediárias) com alta capacidade oxidativa (Padykula e Gauthier, 1970; Mc Ardle e Albuquerque, 1973). Além disso, tem sido relatado que as fibras musculares de contração rápida possuem maior

quantidade de canais de Na^+ na junção neuromuscular (Ruff, 1992) e na região extrajuncional do sarcolema (Milton e Behforouz, 1995) do que as fibras de contração lenta.

O veneno de *Bothrops pauloensis* demonstrou ser mais efetivo em induzir bloqueio neuromuscular em preparações isoladas BC de pintainho, em concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ (Borja-Oliveira *et al.*, 2003), uma vez que foram necessários 50 $\mu\text{g/mL}$ para induzir o bloqueio neuromuscular total em preparações NFD de camundongo (Durigon *et al.*, 2003). Da mesma forma, a Bp-13 não foi capaz de induzir bloqueio neuromuscular total em preparações BC de pintainho. O bloqueio da resposta contrátil foi observado com a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em preparações NFD de camundongo, não sendo possível, portanto, as observações dos efeitos da toxina na preparação BC de pintainho.

Em preparações BC de pintainho, a Bp-13 em elevadas concentrações induziu bloqueio parcial das contrações musculares, porém não afetou as contraturas evocadas pela adição de KCl, sugerindo que a toxina não teve efeito nenhum sobre o sarcolema; no entanto a contratura em resposta à ACh exógena foi reduzida significativamente por altas concentrações da Bp-13, esta observação pode sugerir uma ação preferencial na região subsináptica. Esses dados corroboram a observação de que, em preparações curarizadas NFD de camundongo, o grau de despolarização causado pela Bp-13 foi menor que na ausência de d-Tc. Soares *et al.* (2000) observou o bloqueio neuromuscular e das contraturas evocada pela adição de ACh e KCl, sugerindo que o efeito da BnSP-7 esteja relacionado com os receptores colinérgicos e a ação miotóxica respectivamente.

Em preparações NFD de camundongo, a Bp-13 induziu bloqueio neuromuscular irreversível, dependente de temperatura e de Ca^{2+} , indicando uma correlação entre a atividade catalítica e o efeito biológico. Observações semelhantes foram relatadas por Durigon *et al.* (2003), observando que as respostas à contratura de KCl e ACh mantiveram-se inalteradas quando a temperatura foi mantida entre 20 e 24 °C. A substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} na solução Tyrode demonstrou também impedir o bloqueio neuromuscular, sugerindo que o efeito bloqueador do veneno de *Bothrops pauloensis* poderia estar relacionado a um componente com atividade enzimática dependente da temperatura.

Estudos com outros venenos demonstraram a participação da atividade catalítica no bloqueio da transmissão neuromuscular, mediante observações feitas com mudança de temperatura, substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} e inibição da atividade fosfolipásica. Rodrigues-Simioni *et al.* (2004) observaram que em baixa temperatura (24 °C) o bloqueio neuromuscular induzido por 20 µg/mL de veneno de *Bothrops neuwiedi* foi impedido em preparação BC de pintainho. Cogo *et al.* (1998) observaram que a substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} reduziu o efeito farmacológico da F-IV de *Bothrops insularis*. Além disso, Rodrigues *et al.* (2004) demonstraram que a modificação induzida com BPB ou EDTA na toxina BnpTX-I do veneno de *Bothrops pauloensis* inibiu a atividade fosfolipásica, ao mesmo tempo que preveniu a atividade neuromuscular da toxina, reduzindo-a a 10 %. Estes achados sugerem uma correlação positiva entre a atividade enzimática e o efeito farmacológico estudado.

Na atividade catalítica das fosfolipases A_2 de baixo peso molecular estão envolvidos resíduos que participam da alça de ligação para íons Ca^{2+} (Tyr/28, Gly/30, Gly/32 e Asp/49), onde o Ca^{2+} tem dupla função: (1) fixar o grupamento do fosfolipídio e (2) estabilizar a carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição do substrato (Yang, 1994). A ausência de Ca^{2+} ou a alteração no arranjo estrutural na molécula da toxina, portanto, podem interferir nos efeitos farmacológicos exibidos por estas fosfolipases A_2 .

A avaliação do efeito da Bp-13 sobre a resposta contrátil ao estímulo elétrico direto em NFD de camundongo previamente curarizado, evidenciou o efeito miotóxico da toxina, inibindo a resposta contrátil. A despolarização persistente da fibra muscular observada mediante o estudo eletrofisiológico poderia explicar o efeito pós-sináptico da toxina. Gallacci *et al.* (2006) sugeriram que a despolarização da célula muscular é consequência da desestabilização da membrana da fibra muscular, podendo conduzir à paralisia do músculo. Rodrigues-Simioni *et al.* (1983) descreveu o efeito despolarizante do pool IV do veneno de *Bothrops jararacussu*, atribuindo este fenômeno à alteração no gradiente Na^+ e K^+ . A despolarização da membrana plasmática não é observada em toxinas que atuam pré-sinápticamente como observado por Borja-Oliveira *et al.* (2007).

O estudo miotóxico *in vitro* e *in vivo*, confirmou a ação miotóxica, característica de fosfolipases A₂ presentes nos venenos de serpentes botrópicas, e que podem ser as responsáveis pela mionecrose observada no envenenamento produzido por serpentes incluídas neste gênero (Soares *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2007 e Randazzo-Moura, 2008).

O termo “miotoxina” implica ação direta e específica da toxina no músculo esquelético, diferenciando-se de outros componentes tóxicos presentes no veneno ofídico, tal como hemorraginas, que podem destruir o músculo esquelético indiretamente através de sua ação em outros tecidos. Uma verdadeira miotoxina não afeta o terminal nervoso, células satélites, microvasculatura ou tecido conectivo (Fletcher *et al.*, 1997).

Do ponto de vista morfológico, a mionecrose induzida por fosfolipases A₂ acontece precocemente aos 5 min após a injeção da toxina (Johnson e Ownby, 1993) e é caracterizada pela presença de miofilamentos agrupados alternados com áreas claras de citoplasma. Após 1-3 horas são evidenciadas células no processo degenerativo, edema intersticial e infiltrado leucocitário (Mebs e Ownby, 1990)

As alterações morfológicas foram observadas, tanto em preparações NFD incubadas na presença de Ca²⁺, quanto aquelas incubadas na ausência, sugerindo que a atividade catalítica não deve estar envolvida neste evento farmacológico. Possivelmente a lesão celular seja consequência de interações da membrana plasmática com sítios da fosfolipase carregados positivamente (Lys, His e Arg) como reportado por Gutiérrez e Lomonte (1995).

Gutierrez *et al.* (1986, 1989) sugeriram que as miotoxinas agem na membrana sarcoplasmática, induzindo uma desorganização dos fosfolipídios, formando poros, que permitiriam a saída de macromoléculas, íons como o Ca²⁺, moléculas intracelulares como creatina e creatinoquinase.

A creatinoquinase (CK) é um marcador intracelular, liberado em resposta à lesão muscular, que é utilizado para determinar miotoxicidade *in vivo* ou *in vitro*. A fosfolipase A₂

Bp-13 apresentou um aumento significativo dos níveis de CK plasmático, atingindo valores máximos em 1 hora após a injeção da toxina.

A formação de edema é também uma característica típica do envenenamento por serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae (Rosenfeld, 1971). A inflamação é uma resposta protetora a qual possui um conjunto de estágios para recuperação e reconstituição da função normal do tecido lesado. A reação inflamatória é mediada endogenamente por substâncias ativas chamadas de mediadores químicos da inflamação. Entre eles estão eicosanóides, citocinas, quimiocinas, histamina e serotonina (Teixeira *et al.*, 2003). O edema de pata induzido em ratos em uma dose de 10 µg/pata atingiu o pico máximo após 15 min da injeção da Bp-13. O veneno de *Bothrops pauloensis* (25 µg/50µL) foi capaz de produzir a formação de edema (70%) após 1 hora da injeção da toxina (Rodrigues *et al.*, 2007).

Finalmente, Kini *et al.* (2003) propuseram que as fosfolipases A₂ induzem vários efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes da atividade enzimática. Assim, a ação das fosfolipases poderia ser determinada pela presença de um sítio específico (proteína/glicoproteína) presente na célula-alvo e por uma região específica complementar presente na molécula da fosfolipase (ou sítio farmacológico), o qual apresentaria afinidade pela molécula alvo. A ligação física das fosfolipases com a molécula alvo e, em alguns casos, associada à atividade hidrolítica sobre fosfolipídios de membrana, levaria aos efeitos farmacológicos de toxinas com preponderante atividade miotóxica.

Estes resultados em conjunto nos permitem sugerir que a atividade catalítica poderia contribuir para o efeito neuromuscular, embora a ação miotóxica não seja afetada pela ausência de Ca²⁺, indicando que estas atividades poderiam estar dissociadas ou, ainda, que diferentes e distintas regiões da molécula sejam as responsáveis pelos efeitos farmacológicos exibidos pelas fosfolipases.

6. Conclusão

Os diferentes estudos realizados neste trabalho nos permitiram concluir que a fosfolipase A₂ Bp-13:

1. Induziu bloqueio neuromuscular irreversível e dependente da temperatura e de Ca²⁺, sugerindo que a atividade catalítica pode estar envolvida neste evento farmacológico.
2. Produziu despolarização do sarcolema e em preparações previamente curarizadas o efeito despolarizante foi parcialmente inibido, sugerindo uma ação preferencial na região subsináptica.
3. Induziu mionecrose *in vitro* e miotoxicidade local *in vivo* efeitos característicos das miotoxinas botrópicas.
4. A substituição do Ca²⁺ pelo Sr²⁺ não inibiu o efeito miotóxico *in vitro*, mas impediu o bloqueio neuromuscular.

Portanto, estes resultados permitem sugerir que o efeito neuromuscular depende da atividade catalítica, mas o efeito miotóxico é independente da atividade enzimática indicando que diferentes sítios da molécula poderiam estar envolvidos nos eventos farmacológicos.

7. Referências bibliográficas

- Abreu VA, Dal Belo CA, Hernandez-Oliveira SS, Borja-Oliveira CR, Hyslop S, Furtado MdFD, *et al.* Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology 2007; 148: 142-49.
- 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(8):755-63.
- Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A₂-a structural review. Toxicon 1996; 34 (8): 827-41.
- Balsinde J, Balboa M A, Insel, P A, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol 1999; 39:175-89.
- Borja-Oliveira CR, Durigon AM, Vallin ACC, Toyama MH, Souccar C, Marangoni S, *et al.* The pharmacological effects of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) 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): 103-121.
- Borja-Oliveira CR, Soares AM, Zamunér SR, Hyslop S, Giglio JR, Prado-Franceschi, *et al.* Intraspecific variation in the neurotoxic and myotoxic activities of *Bothrops neuwiedi* venoms. J Venom Anim Toxins 2002; 8(1): 88-101.
- Borja-Oliveira CR. Ação Neurotóxica do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) em preparações neuromusculares isoladas – purificação, caracterização parcial e seqüência da porção amino-terminal de duas PLA₂ neurotóxicas pré sinápticas, neuwieditoxinas-I e II [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília (DF) 2005; 816 p.

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

Butrón E, Gutierrez JM, Thelestam M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo; myotoxin III) a basic phospholipase A₂ on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. *Toxicon* 1993; 31: 217-222.

Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of Latin América. *Cornell Univ. Press* Ithaca. 2004: 410-422.

Cho W e Kezdy F J. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Meth. Enzymol.* 1991; 197: 75-79.

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). *Biochemie* 2006; 88(12):1947-59.

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: 1237-47.

Cogo JC, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L. Efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops insularis* na preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo. *Mem. Inst. Butantan* 1990; 52: 78-86.

Cogo JC, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. The effects of *B. insularis* venom on isolated nerve muscle preparation. *Toxicon* 1990; 28: 605.

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

Dennis EA. Diversity of Groups Types, Regulation and Function of Phospholipases A₂. J Biol Chem 269: 13057-13060. Disintegrins: interactions with cells. Braz. J Med Biol Res 1994; 31: 853-62.

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: 22-33.

Durigon AM. Efeitos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre preparações neuromusculares de ave e mamífero: - Aspectos miográficos e eletrofisiológicos [Dissertação - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2003.

Ellisman MH, Rash JE, Staehelin LA, *et al.* Studies of excitable membranes. II. A comparison of specializations at neuromuscular junctions and non junctional sarcolemmas of mammalian fast and slow twitch muscle fibres. J Cell Biol 1976; 68 (3): 752-774.

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

Fletcher JE, Selistre de Araujo HS, *et al.* Molecular events in the myotoxic action of phospholipases. In: Kini RM. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure Function and Mechanism Wiley Chichester England; 1997. p. 455-497.

Gallacci M, Oliveira M, Dal Pai-Silva, M, Cavalcante WLG, Spencer P J. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. Exp Toxicol Pathol 2006; 57: 239-245.

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

Gutiérrez JM, Arce V, Brenes F, Chaves F. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of snake *Bothrops asper*. Exper Molec Pathol 1990; 52: 25-36.

Gutiérrez JM, Chaves F, Mata E, Cerdas L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Toxicon* 1986(a); 24: 223-231.

Gutiérrez JM, Lomonte B, Cerdas L. Isolation and parcial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* 1986(b); 24: 885-894.

Gutierrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. *Mem Inst Butatan* 1989; 51: 211-223.

Gutierrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon* 1995; 33: 1405-1424.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. In: Kini RM. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure Function and Mechanism* Wiley Chichester England 1997. p. 321–352.

Gutierrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003; 42: 915-931.

Harris JB. Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. *Prog Med Chem*. 1984; 21: 63-110.

Harvey AL, Barfaraz A, Thomson A, *et al*. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple “*in vitro*” preparations from rodent and chicks. *Toxicon* 1994; 32: 257-265.

Heluany NF, Homsí-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(10): 1203-10.

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

<http://www.gargantadaserpente.com/sagrada/index.shtml>

<http://www.wordwildlife.org>

Johnson EK, Ownby CL. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon* 1993; 31: 243-255

Jorge MT, Ribeiro LA. Acidentes por Serpentes Peçonhentas do Brasil. *Revista da Associação Médica Brasileira* 1990; 36(2): 66-77.

Kini RM. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 2003; 42: 827-840.

Lee CY, Ho CL. The pharmacology of phospholipase A₂ isolated from snake venoms with particular reference to their effects on neuromuscular transmission, In: (Yoshida H, Hagihara Y, Ebashi S) *Avances in pharmacology and therapeutics* 1982. Vol. 4. Oxford, Pergamon Press. P. 37-52.

Lobo-Araujo A, Donato JL, Leite GB, *et al.* Efeitos na junção neuromuscular do veneno de *Bothrops lanceolatus*. *Mem. Inst. Butantan* 1990; 52: 77.

Lomonte B, Gutiérrez JM. A new muscle damaging toxin myotoxin II from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1989; 27: 725-33.

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.

Mac Ardle JJ, Albuquerque EX. A study of the reinnervation of fast and slow mammalian muscles. *J Gen Physiol* 1973; 61: 1-23.

Markland F. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998; 36: 1749-1800.

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

Milton RL, Behforouz MA. Na⁺ channel density in extra junctional sarcolemma of fast and slow twitch mouse skeletal muscle fibers: functional implications and plasticity after fast motoneuron transplantation to a slow muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1995; 16: 430-39.

Mukherjee AB, Miele L, Pattabiraman N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. *Biochem Pharmacol* 1994; 5-48(1): 1-10.

Ownby CL. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. *J. Toxicol. Toxins Rev.* 1998; 17: 213–238.

Ownby CL, Selistre de Araujo HS, White SP, Fletcher JE. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon* 1999; 37(3): 411-45.

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

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: 131-136.

Prianti ACJr, Ribeiro W, Lopes-Martins RA, Lira-Da-Silva RM, Prado Franceschi J, Rodrigues-Simioni *et al.* Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon* 2003; 41(5): 595-03.

Randazzo-Moura P. Efeitos do manganês sobre a toxicidade da Bothropstoxina-I uma miotoxina do veneno de *Bothrops jararacussu* [Dissertação - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.

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*.

Ribeiro L, Jorge M. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpents *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. *Rev Inst. Med Trop* 1990; 32: 436-42.

Rodrigues RS, Izidoro LFM, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, *et al.* Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ From *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 2007; 27: 153-65.

Rodrigues VM, Marcussi S, Cambraia RS, de Araujo 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 VM, Soares AM, Mancin AC, Fontes MRM, Homs-Brandeburgo MI, Giclio JR. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comp Biochem Physiol* 1998; Part A 121: 215-22.

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, Cogo JC, Assakura MT, Mandelbaum FR. Muscular-blocking activity of *Bothrops moojeni* venom and its active fractions. *Mem Inst Butantan* 1990; 52: 77.

Rodrigues-Simioni L, Zamuner SR, Cogo JC, Borja-Oliveira CR, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling 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.

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

Ruff RL. Na current density at and away from end plates on rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers. *Am J Physiol.* 1992; 262: 229-34.

Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, *et al.* Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 1992; 30(1): 95-03.

Silva Júnior M. O Ofidismo no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro 1956. p.59-60.

Six DA, Dennis EA, The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes classification and acharacterization. *Biochim Biophys Acta* 1488 2000; 1-9.

Soares AM, Guerra-Sá R, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rdrigues 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 (2): 201-09.

Takekura H, Kasuga N, Yoshioka T. Differences in ultrastructural and metabolic profiles within the same type of fibres in various muscles of young and adult rats. *Acta Physiol Scand* 1994; 150 (3): 335-44.

Teixeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur E, Cury MY. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 2003; 42: 947-62.

Vital Brazil O. Peconhas. In: FARMACODINÂMICA. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6 ed. 1982. p.1044

Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 28-39

Yang CC. Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. *J Toxicol* 1994; 13 (2): 125-77.

8 . Anexo



CEE/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp**

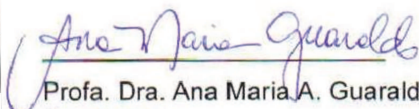
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1266-1, sobre "Purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de uma nova PLA₂ neurotóxica isolada do veneno total de *Bothrops pauloensis*: avaliação, estrutura e função", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Georgina Sucasaca Monzón, 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 – CEE/Unicamp em reunião de 25 de junho de 2007.

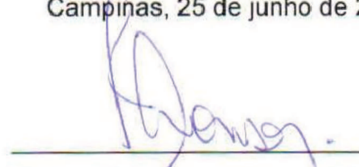
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1266-1, entitled "Purification and biochemical and pharmacological characterization of a novel PLA₂ neurotoxic isolated from whole venom *Bothrops pauloensis*: evaluation, structure and function", 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 June 25, 2007.

Campinas, 25 de junho de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo

Presidente

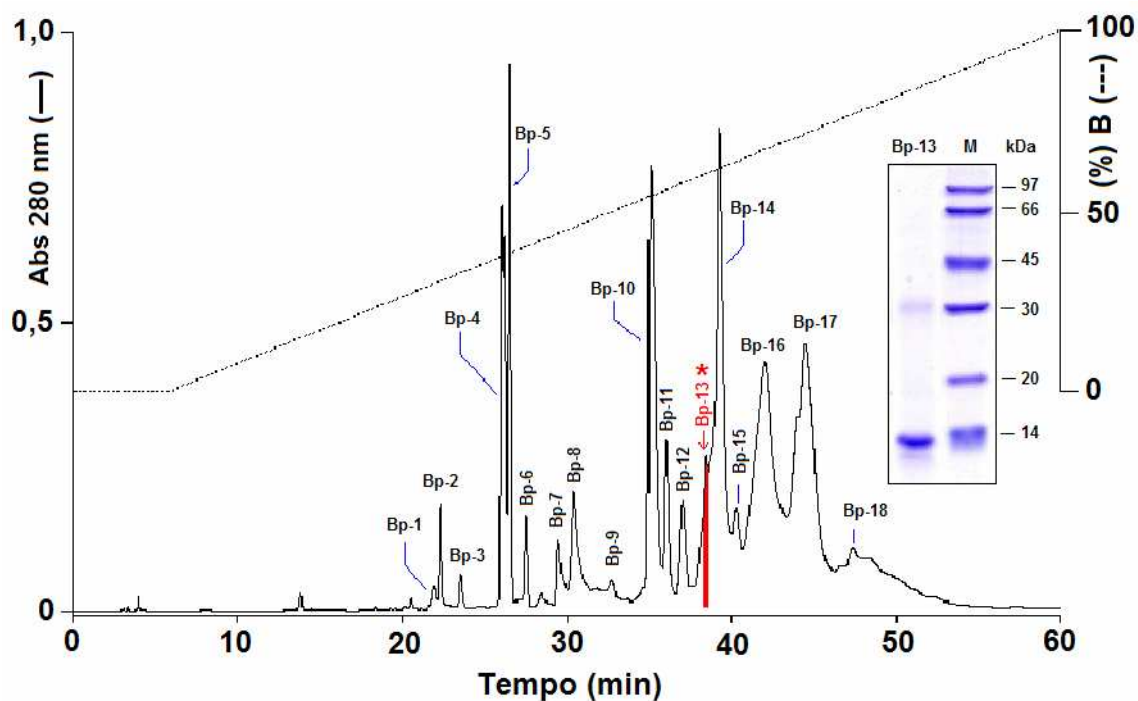


Fátima Alonso
Secretária Executiva

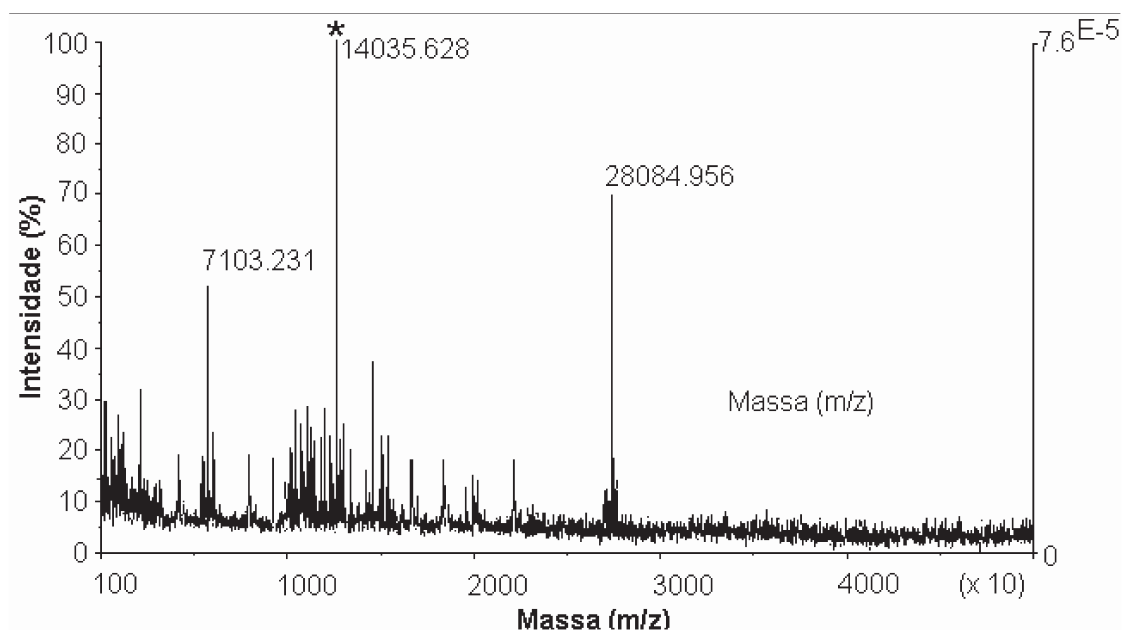
CEE/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/cee/index.htm>

9. APÊNDICE



Apêndice 1. Perfil cromatográfico obtido pelo fracionamento do veneno total da *Bothrops pauloensis* em uma coluna μ -Bondapak C 18 em um sistema de HPLC de fase. Bp-13 foi eluída no tempo de retenção de $38,2 \pm 0,2$ min e em uma concentração de $61,4 \pm 0,3\%$ de tampão B. Inserida a eletroforese em gel de poliacrilamida.



Apêndice 2. Determinação da massa molecular da Bp-13 da *Bothrops pauloensis* mediante espectrometria de massa, utilizando-se o software Voyager DE PRO Maldi-tof mass spectrometry.

Aminoácido	N.º de AA
Asp	9
Glu	5
Ser	4
Gly	13
His	2
Arg	5
Thr	7
Ala	6
Pro	11
Tyr	14
Val	4
Met	0
Cys	14
Ile	3
Leu	11
Phe	3
Lys	12
Total	123

Apêndice 3. Composição de Aminoácidos da Bp-13.