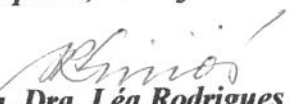


SARAGUACI HERNANDEZ DE OLIVEIRA E SILVA

**EFEITO FARMACOLÓGICO DE NOVOS COMPONENTES
DA CROTOXINA (*Crotalus durissus terrificus*)
E SUAS ISOFORMAS SOBRE A JUNÇÃO
NEUROMUSCULAR**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Pedagoga Saraguaci Hernandez de Oliveira e Silva.

Campinas, 23 de julho de 2001.


Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
- Orientadora -

UNICAMP – CAMPINAS/SP

2001



SARAGUACI HERNANDEZ DE OLIVEIRA E SILVA

Efeito farmacológico de novos componentes do complexo Crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*) e suas isoformas sobre a junção neuromuscular

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

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

UNICAMP/CAMPINAS-SP

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE	30
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	OL4e
V	EX
TOMBO BC/	54847
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00187220-4

BIBID 297426

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

OL4e

Oliveira e Silva, Saraguaci Hernandez de

Efeito farmacológico de novos componentes do complexo crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*) e suas isoformas sobre a junção neuromuscular / Saraguaci Hernandez de Oliveira e Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Léa Rodrigues-Simioni

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fosfolipase. 2. Crotoxina. 3. Junção neuromuscular. 4. Venenos. I. Léa Rodrigues-Simioni. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Profa. Dra. Julia Prado Franceschi

Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

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

Data: 23/07/2001

200325169

DEDICATÓRIA

*A Deus, pelo sopro de vida e por ter-me dado o rico presente, o dom da vida, por Sua
palavra,
Seu amor, Sua bondade, fidelidade e por muitas vezes, enxugar minhas lágrimas ,
pegar em minhas mãos e colocar-me em pé novamente,
encorajando-me a continuar.
Grata Pai, por tanto amor e cuidado.*

“Se Deus é por nós, quem será contra nós”.

AGRADECIMENTOS

*À Profa. Dra Léa Rodrigues Simioni, minha orientadora
por quem tenho grande admiração e gratidão,
por muitas vezes, mostrar-me que sou capaz e por um dia dizer-me:
“Tudo posso naquELE que me fortalece”.
Agradeço por confiar e por me dar esta chance para realizar este trabalho,
por não deixar morrer este sonho, tornando-o realidade,
por ser meu grande alicerce nesta construção, tanto espiritual como material,
por permitir-me sua grande amizade.
Sou grata a Deus por mais este presente.*

*Ao meu esposo Álvaro,
e a meus filhos Davidson, Nicholas, Susine e Brian, coluna desta construção,
grande razão deste sonho.
Obrigada por serem meus companheiros, nas horas felizes e também nas tristes.*

*Aos meus amigos Gildo, Yoko, Caroline,
por serem as paredes desta construção,
cada tijolinho representa amor, força, coragem, conhecimento,
principalmente espiritual. Obrigada pela dedicação, amizade, paciência.*

*Ao André, Chariston, Daniela, Daniel, Ludimila, Luis, Rosany, Toni, Valdemir o
meu muito obrigada, pelo carinho e amizade.*

*Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni e Prof. Dr. Marcos Toyama,
pela orientação bioquímica, pela paciência e oportunidade.*

*Ao Prof Dr. Marcos Dias Fontana e Prof Dr Stephen Hyslop,
meus agradecimentos pelo incentivo e sugestões
para a finalização deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. José Camilo Novello, Profa. Dra. Julia Prado Franceschi
Profa. Dra. Maria Inês Nogueira e Prof. Dr. Nadim Farah Heluany,
grata pela amizade e colaboração na correção desta tese.*

*A minha grande amiga e companheira Luzia Maria,
meu especial abraço, com muito amor e carinho.
Obrigada por ser amiga em todas as horas.*

A minha mãe, por ter-me gerado, obrigada mãe pela senhora existir.

*Aos meus sogros, os quais os tenho como meus pais, grata
pelo carinho, amor, paciência.*

*Aos meus irmãos,
principalmente as minhas irmãs Lucianir, Guacimara e Jussimara
deixo o exemplo de que é possível realizar o grande sonho,
de sermos aquilo que queremos ser.
Com a ajuda de Deus e de seus anjos na terra.*

*A todos os professores e funcionários do Departamento de Farmacologia,
da Faculdade de Ciências Médica,
do Departamento de Bioquímica
e a todas as pessoas que passaram e participaram desta construção de
conhecimentos , porque, acima de qualquer coisa,
quem passa leva algo,
mas deixa também muito.*

*É com grande carinho que me lembro de vocês e o registro aqui.
Teria sido impossível terminar este trabalho e concluir o curso sem vocês.*

À CAPES pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

1. *"O Senhor é o meu Pastor; nada me faltará*
2. *Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.*
3. *Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor de seu*
nome.
4. *Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,*
porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.
5. *Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a*
minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.
6. *Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da*
minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias."

(Salmo 23)

"Tudo posso naquEle que me fortalece."

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	<i>xxiii</i>
LISTA DE QUADROS	<i>xxvii</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
1. INTRODUÇÃO	34
1.1. Gênero <i>Crotalus</i>	34
1.2. Peçonha	36
1.2.1. Modo de ação da peçonha	37
1.2.2. Aspectos gerais da peçonha	40
1.2.3. Componentes do veneno <i>Crotalus durissus terrificus</i>	42
1.2.4. Aspectos gerais da fosfolipase A ₂	47
1.2.5. Fosfolipase A ₂ – Efeitos biológicos	54
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1. Animais	61
3.2. Veneno	61
3.3. Ensaio biológicos	61
3.3.1. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo	61
3.4. Ensaio bioquímicos	62
3.4.1. Cromatografia de exclusão molecular Sephadex G 75	62
3.4.2. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC	63



SUMÁRIO

3.4.3. Repurificação da crotoxina em HPLC de fase reversa	64
3.5. Análise estatística	64
4. RESULTADOS	67
4.1. Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G 75	67
4.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo	68
4.2.1. Efeito neuromuscular da crotoxina (Sephadex G 75)	68
4.3. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC	70
4.4. Efeito neuromuscular da crotoxina	
(picos cdtv III, crtx IV e cdtv V)	71
4.4.1. Crotoxina (crtx) pico IV	71
4.4.2. Pico cdtv III (novo componente do complexo crotoxínico)	71
4.4.3. Pico cdtv V (novo componente do complexo crotoxínico)	72
4.5. Repurificação da crotoxina em HPLC de fase reversa	76
4.6. Efeitos da crotapotina (F 7) e fosfolipase A ₂ (F 16 e F 17)	77
4.6.1. Efeito da crotapotina (F 7)	77
4.6.2. Fosfolipase (F 16) e (F 17)	77
4.6.3. Recombinação da crotapotina (F 7) e (F 16)	81
4.6.3.1. (1) crotapotina + (1) fosfolipase A ₂	81
4.6.3.2. (1) crotapotina + (2) fosfolipase A	81
4.6.3.3. (2) crotapotina + (1) fosfolipase A	81



SUMÁRIO

4.6.4. Recombinação da crotapotina (F 7) e (F 17)	85
5. DISCUSSÃO	90
6. CONCLUSÃO	96
7. SUMMARY	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografias

Fig. 01	Serpente solenóglifa ou solenoglifodonte	35
Fig. 02	Identificação do gênero crotálico (fosseta loreal)	36
Fig. 03	Aparelho peçonhífero da serpente solenóglifa	37

Figuras

Fig. 04	Local de hidrólise de diferentes fosfolipases em um fosfolípido	49
Fig. 05	Representação esquemática do mecanismo catalítico das fosfolipases A ₂	49
Fig. 06	Diagrama esquemático do modelo de interação da fosfolipase A ₂	57

Cromatografias

Fig. 07	Perfil de eluição do veneno total de cdt em cromatografia de exclusão molecular Sephadex G 75	67
Fig. 09	Cromatografia de exclusão molecular em HPLC (Protein Pack SW 300)	68
Fig. 13	Perfil repurificação da crotoxina em HPLC de fase reversa (μ Bondapak c 18)	76

Gráficos e miografias

Fig. 08	Efeito neuromuscular da crotoxina em preparação NFD de camundongo	69
Fig. 10	Representação gráfica do efeito da crtx IV, e seus componentes cdy III e cdy V, dose de 10 μg/ml e 20 μg/ml. Sobre a preparação NFD de camundongo (estímulo indireto)	73
Fig. 11	Registros da força de contração muscular em preparação NFD (crtx y IV,	



Fig. 11	Registros da força de contração muscular em preparação NFD (crtx y IV, cdy III e cdy V sob estimulação indireta nas doses de 10 µg/ml	74
Fig. 12	Registros da força de contração muscular em preparação NFD (crtx IV, cdy III e cdy V sob estimulação indireta nas doses de 20 µg/ml	75
Fig. 14	Efeito neuromuscular da crotopotina (F 7), em preparação NFD de camundongo	78
Fig. 15	Efeito neuromuscular da PLA ₂ (F16) em preparação NFD de camundongo	79
Fig. 16	Efeito neuromuscular da PLA ₂ (F17) em preparação NFD de camundongo	80
Fig. 17	Representação gráfica do efeito da recombinação F 7 + F 16, nas doses de 10 µg/ml e 20 µg/ml. Sobre preparação NFD de camundongo	82
Fig. 18	Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina F 7 + F16 nas doses de 10 µg/ml	83
Fig. 19	Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina F 7 + F16 nas doses de 20 µg/ml	84
Fig. 20	Representação gráfica do efeito da recombinação F 7 + F 17, nas doses de 10 µg/ml e 20 µg/ml. Sobre preparação NFD de camundongo	86
Fig. 21	Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina F 7 + F17 nas doses de 10 µg/ml	87
Fig. 22	Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina F 7 + F17 nas doses de 20 µg/ml	88



LISTA DE QUADROS

Quadros

Quadro 01	Classificação das enzimas fosfolipases	52
Quadro 02	Efeitos farmacológicos das enzimas PLA₂ isoladas do veneno total de serpentes	54



RESUMO

As espécies *Crotalus durissus*, popularmente conhecidas como cascaveis, são serpentes de grande importância médica na América do Sul, principalmente no Brasil. A peçonha dessa serpente tem sido objeto de estudos por mais de um século, como mostrado pelos estudos realizados por BRAZIL, 1903, SLOTTA & FRAENKEL CONRAT, 1938, VITAL BRAZIL, 1966 e muitos outros.

A peçonha crotálica isolada através de gel filtração do veneno bruto em coluna de Sephadex G 75, mostra a presença de quatro picos, (pico I) convulsina, (pico II) giroxina, (pico III) crotoxina e (pico IV) crotamina.

O pico III foi testado, mostrou seu característico bloqueio neuromuscular em preparação nervo-frênico diafragma de camundongo.

Na purificação do veneno bruto crotálico em HPLC de exclusão molecular, usando uma coluna Protein Pack SW 300, obteve-se além dos picos principais três novos componentes do complexo crotoxina picos: cdtv III; cdtv V e cdtv VI, sendo a crotoxina identificada como pico cdtv IV.

O uso desta cromatografia determinou a dissociação dos efeitos facilitadores e bloqueadores neuromusculares característicos da crotoxina. Assim, o pico cdtv III e cdtv V exibiram praticamente somente o efeito facilitador da crotoxina (pico cdtv IV) nos 120 min de observação.

A repurificação da crotoxina em HPLC de fase reversa em coluna μ -Bondapak c 18, resultou em duas isoformas de crotapotina (F 5 e F 7) e três de fosfolipase A₂ (F15, F16 e F17). Foram escolhidas as isoformas F7 (crotapotina) e



as F16 e F17 (PLA₂).as quais foram recombinaadas em três diferentes proporções: 1:1; 1:2 e 2:1.

Ao associarmos a crotapotina (F7) com a PLA₂ (F16), obtivemos o efeito "chaperone" descrito na literatura ou seja, a inibição da resposta contrátil, o efeito bloqueador irreversível.

O mesmo não ocorreu ao recombinaarmos crotapotina (F7) com PLA₂ (F17), o qual não determinou qualquer alteração na resposta contrátil, isto é, mostrou-se destituída de atividade biológica.

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Crotalus*

As espécies de serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente como cascaveis encontram-se distribuídas em todo o Brasil destacando-se dentre estas: *durissus terrificus*, *durissus cascavella*, *durissus ruruima*, *durissus marajoensis*, *durissus cuminaensis*, *durissus dryinas* (CAMPBELL *et al.*, 1989, SANTORO *et al.*, 1999). Responsáveis por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil sendo que, em algumas regiões podem chegar a 30% dos acidentes ofídicos, por exemplo, na cidade de Botucatu.

Do ponto de vista epidemiológico, as *Bothrops* são responsáveis, pela maioria dos acidentes ofídicos (90%) ocorridos no país. O acidente crotálico, contudo, apresenta o maior índice de letalidade devido à frequência com que evolui para insuficiência renal aguda ou insuficiência respiratória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). As serpentes pertencentes ao gênero *crotalus* medem aproximadamente 1,80 m e se alimentam principalmente de roedores (JANZEN *et al.*,1991).

A espécie *Crotalus durissus terrificus* e as subespécies próximas são as únicas cacavéis da América Tropical, podendo ser encontradas em terras baixas e secas, e se distribuem desde o Sul do México, todo território brasileiro até o Paraguai, com interrupções zoogeográficas no Panamá, ao Norte do Brasil.

O gênero *Crotalus* caracteriza-se por pertencer à família *Viperidae* que inclui as serpentes que possuem o mais complexo aparelho peçonhífero, através



do qual inoculam seu veneno. Possuem presas móveis na região frontal da boca e, por isso, são classificadas como solenóglifa (Fig.1).

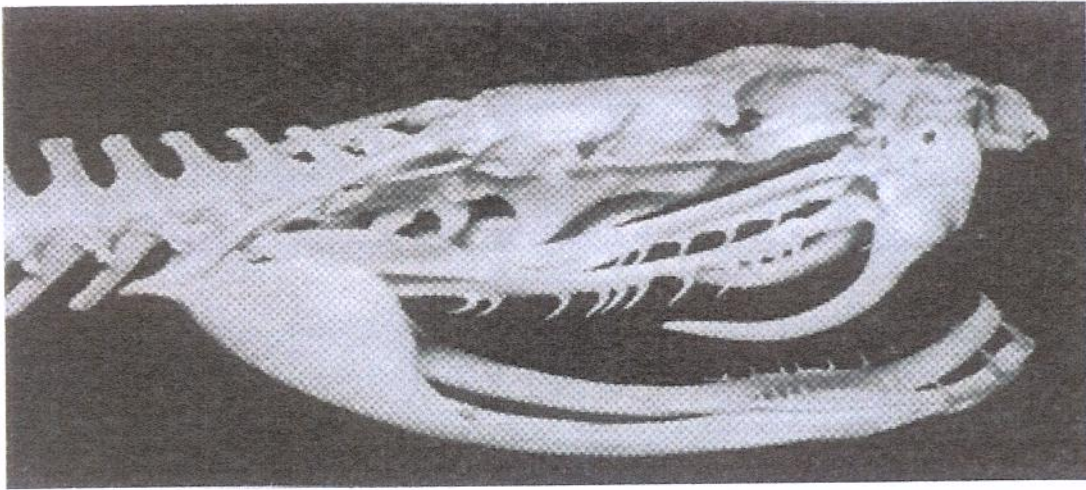


Figura 1 Serpente solenóglifa ou solenoglifodonte. O dente inoculador é móvel e localiza-se na mandíbula na região anterior da cavidade bucal

Identifica-se a serpente pertencente ao gênero *Crotalus* através da cauda que é composta por vários anéis córneos, formados cada qual ao final de uma ecdise, engastados entre si e que ao ser agitada emite um som como de um 'chocalho'. A provável função biológica de um 'chocalho' seria de alertar ou amedrontar possíveis inimigos naturais.

Também é identificada por ser um tanatofidio que possui fosseta loreal, um orifício situado entre os olhos e a narina, funcionando como uma espécie de 'radar', sendo um órgão sensorial termorreceptor, extremamente sensível, tão delicado e agudo que, em noites escuras, onde nem a serpente enxerga, ela é capaz de detectar a aproximação de um animal de sangue quente (com temperatura em torno de 36 a 37° C) a uma distância de dois metros (Fig. 2).

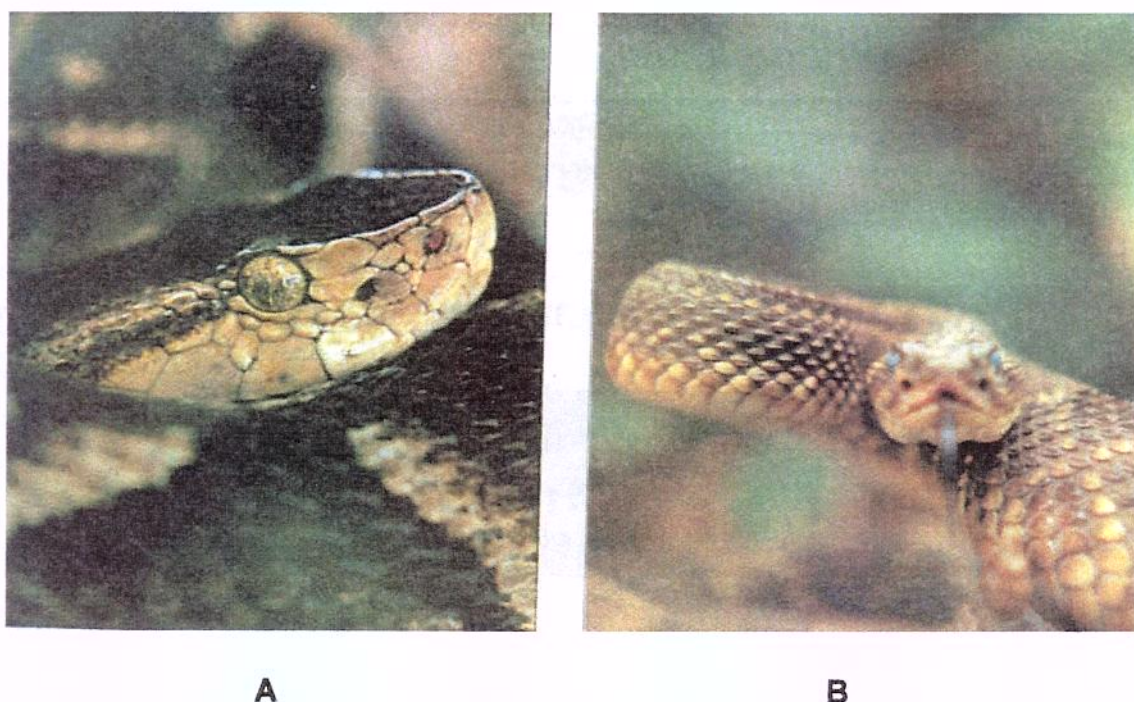


Figura 2 (A) Vista lateral da fosseta loreal. Fosseta loreal: orifício situado entre o olho e a narina. (B) Vista frontal da fosseta loreal.

1.2 PEÇONHA

A peçonha é produzida e mantida em uma glândula (par), situada na base da cabeça, o que, em algumas serpentes, pode lhes acentuar o aspecto triangular. Desta glândula sai um canal até a base frontal da presa, que é oca e permite a transferência de peçonha à vítima.

Existem músculos que rodeiam a glândula e que, no momento da picada, se contraem, fazendo com que a peçonha seja injetada na vítima (Fig.3) .

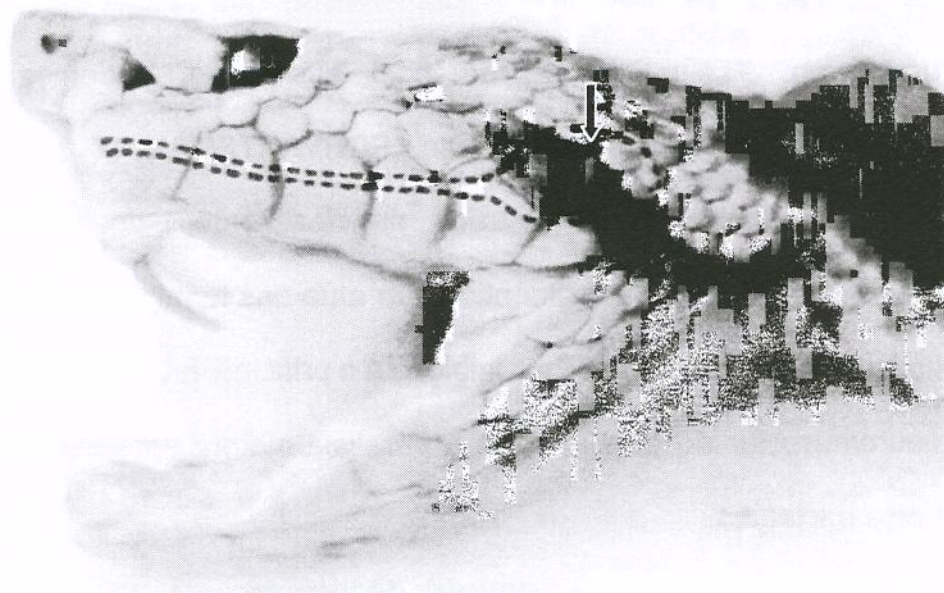


Figura 3 Esquema do aparelho peçonhífero de uma solenóglifa.
↓ glândula de peçonha

1.2.1 Modo de ação da peçonha

O tipo de ação da peçonha, em geral, é o mesmo dentro de um mesmo gênero, mas podem ocorrer variações ontogenéticas, sazonais e regionais:

Ontogênicas: em muitas serpentes ocorre uma variação entre a peçonha produzida pelo filhote e a do adulto;

Sazonais: em alguns animais a época do ano pode interferir na peçonha;

Regionais: podem ocorrer variações em termos de composição dos constituintes da peçonha, entre serpentes do mesmo gênero, mas geograficamente distantes.

A peçonha *Crotalus durissus terrificus* atua de diferentes formas em nosso organismo. Assim, de acordo com sua ação, podemos classificá-la em neurotóxica, miotóxica e coagulante. (SCHVARTSMAN, 1992).

Neurotoxicidade: produzida principalmente pela fração crotoxina, uma neurotoxina de ação pré-sináptica que atua nas terminações nervosas, inibindo a liberação de acetilcolina. Esta inibição é o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular do qual decorre a paralisia motora apresentada pelos animais e pelos pacientes.

As manifestações clínicas decorrentes da atividade neurotóxica da peçonha, geralmente se tornam visíveis nas primeiras seis horas, quando se evidencia a ptose palpebral uni ou bilateral e flacidez da musculatura da face, caracterizando um fácies miastênico que foi denominado 'fácies neurotóxicos' quando descrito por ROSENFELD, 1971. Há oftalmoplegia, podendo existir dificuldade na acomodação, alteração do diâmetro pupilar (midríase) com referência de visão turva, até cegueira e diplopia. Queixas menos frequentes aparecem como dificuldades na deglutição, alterações do olfato e do paladar, assim como paralisia velopalatina. Há relatos raros de ocorrência de paralisia da musculatura intercostal e/ou diafragmática (VITAL BRAZIL, 1966).

Miotóxica: produz lesões de fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) com liberação de enzimas e mioglobina para o soro e que são, posteriormente excretadas pela urina.

As manifestações decorrentes da atividade miotóxica provocam dores musculares generalizadas (mialgias), de aparecimento precoce e mais intensa, nos casos mais graves. A fibra muscular esquelética lesada libera quantidades variáveis de mioglobina para o sangue, que é excretada pela urina (mioglobinúria), conferindo-lhe uma cor avermelhada ou de tonalidade mais escura até marrom. A mioglobinúria constitui a manifestação clínica mais evidente da necrose da musculatura esquelética (rabdomiólise), (AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERING, 1982).

Coagulante: decorre de atividade de enzimas do tipo trombina- like que converte o fibrinogênio solúvel diretamente em fibrina (coágulo mole), de proteases (metaloproteases, serinoproteases) que atuam em pontos específicos da cascata da coagulação. O consumo de fibrinogênio promovido pela enzima tipo trombina, presente na peçonha, pode levar à incoagulabilidade sangüínea. Geralmente, não há redução do número de plaquetas (RAW *et al.*, 1986; ALEXANDER *et al.*, 1988).

A busca do conhecimento da estrutura química de toxinas de serpentes e suas propriedades farmacológicas tem sido longamente explorada cientificamente, consideradas valiosas ferramentas para elucidação dos complexos biológicos, principalmente em nível molecular, de fenômenos fisiológicos, farmacológicos e fisiopatológicos (TU, 1977; KARLSSON, 1979).



1.2.2 Aspectos gerais da peçonha

O veneno seco das serpentes é constituído por 90% de proteínas e cerca de 10% de componentes não protéicos.

A maior parte da porção protéica é constituída por enzimas de natureza hidrolítica, enquanto que os constituintes não protéicos são compostos inorgânicos e orgânicos (TU, 1977). Os constituintes inorgânicos são compostos por cátions e ânions, íons metálicos ou não. Muitos destes íons são extremamente importantes para a atividade de diversas enzimas como a acetilcolinesterase, que é dependente de zinco, magnésio e cálcio. A porção orgânica é composta por aminoácidos livres (SASAKI, 1960, SHIPOLINI, *et al.*, 1965). Também foram encontrados nucleotídeos de purina, carboidratos que estão na forma de glicoproteínas e açúcares livres, lipídios e aminas biogênicas, as quais são responsáveis pela dor, produzida pela mordida de serpentes, principalmente das pertencentes às famílias Viperidae. (LIN & LEE, 1971; BIEBER *et al.*, 1975).

As enzimas presentes no veneno total das serpentes podem ser divididas em seis classes principais:

Oxiredutases: o veneno total de serpentes possui basicamente dois tipos de enzimas: L-amino ácido oxidase e a lactato desidrogenase. A primeira converte o aminoácido livre em α -cetoácido (MEISTER, 1966; MEBS, 1970) enquanto que a segunda, é responsável pela catálise da reação de conversão do lactato a ácido pirúvico (MCLEAN, *et al.*, 1971).

Fosfatases: as fosfatases, presentes no veneno total de serpentes, quebram as ligações fosfomonoéster e fosfodiéster, sendo que as mais conhecidas são as fosfodiesterases (LASCKOWSKI, 1971).

Glicosidasas: um exemplo de glicosidase é a hialuronidase, uma enzima que catalisa a reação de hidrólise do ácido hialurônico, que, por sua vez, é um muco polissacarídeo que pode ser encontrado na pele, nos tecidos conectivos e nos tendões. Provavelmente, esta enzima teria o papel de facilitar a difusão das toxinas do veneno para dentro do tecido das vítimas (MAYER *et al.*, 1960).

Proteases: o veneno possui várias proteases, quase todas dependentes de co-fatores como íons metálicos (cálcio e magnésio), podendo ser agrupadas em duas grandes subclasses: endopeptidase e exopeptidases (IWANAGA *et al.*, 1976).

Lipases: o veneno possui várias lipases, sendo que as mais estudadas e caracterizadas são as fosfolipases A₂ (PLA₂), pela sua importância biológica e farmacológica e pelas suas propriedades químicas, (TU, 1977). As PLA₂, além de catalisar as reações de hidrólise de fosfolipídeos, são causadoras de efeitos farmacológicos importantes que podem ser independentes da quebra de lipídios, tais como: neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxidade, cardiotoxidade, atividade anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica, hemorrágica e edematológica (ARNI & WARD, 1995).

Além das enzimas, o veneno de serpentes pode possuir neurotoxinas, que é um outro grupo de proteínas que também estão presentes nos venenos.



1.2.3 Componentes do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

O veneno de *Crotalus* tem sido investigado, tanto biológica como farmacologicamente; desde 1938, foram isoladas do veneno total as frações denominadas: giroxina, convulxina, crotamina, crotoxina, sendo a crotoxina objeto de nossa pesquisa (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938).

Giroxina: é farmacologicamente pouco conhecida, produz uma síndrome convulsiva, em condições experimentais, em camundongos. Seu isolamento foi descrito por BARRIO (1961).

Convulxina: é responsável por convulsões, distúrbios respiratórios e circulatórios; é uma toxina de alta massa molecular, que se comporta como uma proteína homogênea. (PRADO-FRANCESCHI, 1970).

Crotamina: é uma neurotoxina polipeptídica de baixo peso molecular de carácter básico identificada pela primeira vez, por GONÇALVES & VIEIRA, em 1950; é encontrada no veneno de serpente da espécie em *Crotalus durissus terrificus*, de certas regiões do Brasil, Argentina e Bolívia. É uma proteína de ponto isoelétrico igual a 10,3, massa molecular de 4,8 kDa e com três pontes de sulfeto (GONÇALVES, 1956). Apresenta um pequeno número de resíduos de aminoácidos comparados com outras neurotoxinas (RYDEN *et.al.*, 1973, YANG, 1974). É uma molécula resistente ao calor, suportando uma temperatura de 70°C por 18 horas sem perder sua propriedade tóxica; quando é injetada intraperitonealmente em ratos causa depressão respiratória, lacrimejamento, paralisia espástica das patas posteriores, convulsão e morte.

Recentemente, MACIN *et.al.*, (1997), mostrou que a crotamina em baixas concentrações é capaz de induzir um efeito anestésico cujo mecanismo de ação é desconhecido, existe uma presença de isoformas detectadas por cromatografia convencional (SMITH AND SCHMIDT, 1990).

Duas variedades regionais de serpentes podem ser identificadas nesta espécie (*durissus terrificus*); uma que exhibe veneno de coloração amarelo e outra de coloração branca. Esta diferença se deve à presença no veneno de L-amino oxidase e de NAD-hidrolase (BARRIO & VITAL BRAZIL, 1951, TU, 1977,1982, BERCOVICCI *et al.*, 1987) determinando diferenças na sua composição bioquímica.

Crotoxina: a crotoxina é a responsável pela alta toxicidade do veneno crotálico atua nas terminações nervosas; bloqueando a transmissão neuromuscular (BRAZIL, 1966), sendo portanto responsável pela paralisia respiratória e dos músculos esqueléticos, em condições experimentais.

A crotoxina, cristalizada e isolada por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938; HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; BREITHAUPT, 1976, a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, mostrou ser um complexo resultante da interação de duas subunidades que formam uma proteína heterodímera. A subunidade ácida (CA) crotapotina, com massa molecular de 9 kDa, é formada por três cadeias polipeptídicas ligadas por três pontes de dissulfeto. O componente básico (CB) é uma proteína fosfolipase A₂ (PLA₂) que possui massa molecular de 14,5 kDa, sendo responsável tanto pela atividade enzimática, como pela toxicidade induzida pelo complexo (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971).



Por outro lado, o componente ácido, a crotapotina tem sido descrito como sendo destituído de atividade enzimática ou farmacológica (HABERMAN & BREITHAUPT, 1978; BON *et al.*, 1979; VERHEIJ *et al.* 1981; GOPALAKRISHNARONE *et al.*, 1984). Porém, estudos mais recentes sugerem que a crotapotina administrada *in vivo* (através de injeção subplantar, intraperitoneal ou por via oral) pode apresentar propriedades antiinflamatórias. Esta atividade não é devida à liberação de corticosteróides endógenos ou pela inibição da atividade das ciclo-oxigenase. Os dados obtidos por LANDUCCI *et al.* 1995a, sugerem que a crotapotina poderia estar interagindo com as PLA₂ extracelulares, geradas durante o processo inflamatório, levando a redução da atividade hidrolítica destas últimas.

A crotapotina é denominada proteína "chaperone", pois teria a função de impedir as ligações inespecíficas da PLA₂ na membrana celular, facilitando, desta forma, a manifestação de seus efeitos tóxicos (BOUCHIER *et al.*, 1991).

Os efeitos farmacológicos, observados pela ação das PLA₂ não são necessariamente geradas pela quebra de fosfolipídeos e da ruptura das membranas biológicas. As fosfolipases A₂ parecem apresentar mais de um sítio catalítico característico; um sítio (s) farmacológico (s) distinto (s) do catalítico (YANG, 1994).

A crotoxina, do ponto de vista farmacológico e fisiológico possui dois tipos de ações, uma pré-sináptica (BRAZIL & EXCELL, 1971) e uma pós- sináptica (HAWGOOD, 1979; BON *et al.*, 1979).

A crotoxina apresenta várias isoformas que são consequência, muitas vezes, da alteração de um único aminoácido. (FAURE & BON, 1988). Esta multiplicidade e a diversidade dessas isoformas de crotoxina parecem ser o resultado de modificação pós-traducional que ocorre sob uma única forma precursora, levando a formação de isoformas de crotapotina. (BOUCHIER *et.al.*,1991). Expressão de diferentes RNAs mensageiros, levando à formação de isoformas de PLA₂.(FAURE *et al.*, 1994).

De acordo com alguns modelos, o efeito farmacológico das PLA₂ poderia ser desencadeado pela presença de sítios catalíticos e farmacológicos presentes dentro da molécula. O sítio farmacológico da enzima teria alta ou baixa afinidade por determinado sítio alvo, presente na membrana celular.

A presença do sítio específico distinguiria uma célula alvo de uma célula não alvo, isso determinaria a união da enzima com sua célula alvo (presença do sítio ativo com alta especificidade) e a não união da célula alvo (ausência do sítio e baixa especificidade, ocorrendo apenas quando há um excesso de enzima), (KINI, 1997).

São descritos dois modelos para explicar a interação da crotoxina com a membrana pré-sináptica. O modelo da Dissociação e do Complexo Ternário Transiente. O primeiro modelo diz que, quando a crotoxina se aproxima do seu receptor na membrana celular, a crotapotina se dissocia da PLA₂ deixando-a livre para se ligar ao receptor. No segundo modelo, a crotoxina primeiramente se une ao receptor da membrana e só então ocorre a dissociação de seus componentes,

com liberação da crotapotina, enquanto a PLA₂ permanece ligada ao receptor (DELOT & BON, 1993).

Portanto, como já nos referimos acima, a crotapotina é considerada farmacologicamente inativa, quando se encontra isolada do complexo da crotoxina, e a sua função básica conhecida é a de facilitar a união da PLA₂ aos sítios específicos presentes nas membranas biológicas, propiciando uma melhor forma de interação da PLA₂ com os sítios específicos envolvidos em suas atividades fisiológica e farmacológica (BON, *et.al.*, 1979). Estes sítios específicos são de natureza protéica ou glicoprotéica e estariam localizados na superfície da membrana plasmática das células alvos (KINI, 1997).

A crotoxina, considerada então como uma substância neurotóxica atua em dois níveis:

Inibição da condução axônica: afetando fortemente o fluxo normal dos íons de Na⁺ e K⁺ ao longo da ação.

Inibidora da transmissão sináptica: sabe-se então que inibe a neurotransmissão principalmente por interferir com a liberação da ACh na junção neuromuscular. Embora também exiba alguma ação pós sináptica, o efeito da crotoxina, em nível pós-sináptico, ocorre por meio do bloqueio da resposta da acetilcolina, através da estabilização do receptor de acetilcolina para um estado conformativo inativo (BRAZIL & EXCELL, 1972, BON *et al.*, 1979).

Seu efeito primário pré-sináptico causa uma modificação trifásica na liberação do neurotransmissor nas terminações nervosas. Primeiro, ocorre depressão na liberação de transmissores neuromusculares, combinando com o

bloqueio linear da transmissão. (CHANG & LEE, 1977, CHANG & SU, 1982, HAWGOOD *et al*, 1988).

1.2.4 Aspectos Gerais da Fosfolipase A₂ (PLA₂)

A degradação dos fosfoglicerídios é realizada por fosfolipases (PLA), que são enzimas esterolíticas que hidrolizam glicerofosfolípidios, podendo ser encontradas em plantas, bactérias e tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares) (VAN-DER-BOSCH, 1980). Entretanto, as mais conhecidas e estudadas do ponto de vista bioquímico e biológico, são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos, nos venenos de serpente e na hidrólise da fosfatidilcolina (WITTCOFF, 1951).

Estudos subseqüentes mostraram que as PLA₂ são abundantemente encontradas em venenos de várias serpentes e nas glândulas exócrinas, onde estas enzimas têm papel importante na digestão de lipídios. (WITTCOFF, 1951; DENNIS, 1983; HARRIS, *et al.*, 1990).

As PLA são classificadas, baseando-se no sítio de hidrólise, em fosfolipase A₁, A₂, B, C e D. Estas enzimas são classificadas de acordo com a sua função, regulação, localização, mecanismo e sequência de aminoácidos, estrutura e papel dos íons divalentes (DENNIS, 1994).

Estas enzimas possuem várias pontes de sulfeto e são extremamente estáveis ao tratamento com calor e ácidos, apresentando homologia seqüencial entre si e especialmente na região do sítio catalítico (CHANG *et al.*, 1977).

As fosfolipase A₂ (PLA₂), também conhecidas por fosfatidil-acil-hidrolases (EC 3.1.1.4), são enzimas lipolíticas que agem especificamente na catálise de hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 de fosfoglicerídeos (fig. 4). Esta reação é dependente de cálcio e libera quantidades eqüimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, que são considerados substratos igualmente adequados para os processos hidrolíticos catalisados pelas demais fosfolipases (HANAHAHAN, 1971, SLOTBOOM *et al.*, 1982, MUKHERJEE *et al.*, 1994)

As PLA₂ têm papel fundamental no metabolismo de lipídios e estão intimamente relacionadas com a liberação de ácidos araquidônicos que é um precursor comum de uma série de lipídios bioativos tais como as prostaglandinas, leucotríns e (coletivamente denominados de eicosanóides) tromboxanos. Existem também evidências de que estas enzimas poderiam atuar nas respostas imunológicas, inflamatórias, proliferação celular, vasoconstrição e broncoconstrição (KINI, 1997).

As PLA₂ são capazes de hidrolisar vários tipos de fosfolipídios tais como: fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol e plasmalogeno.

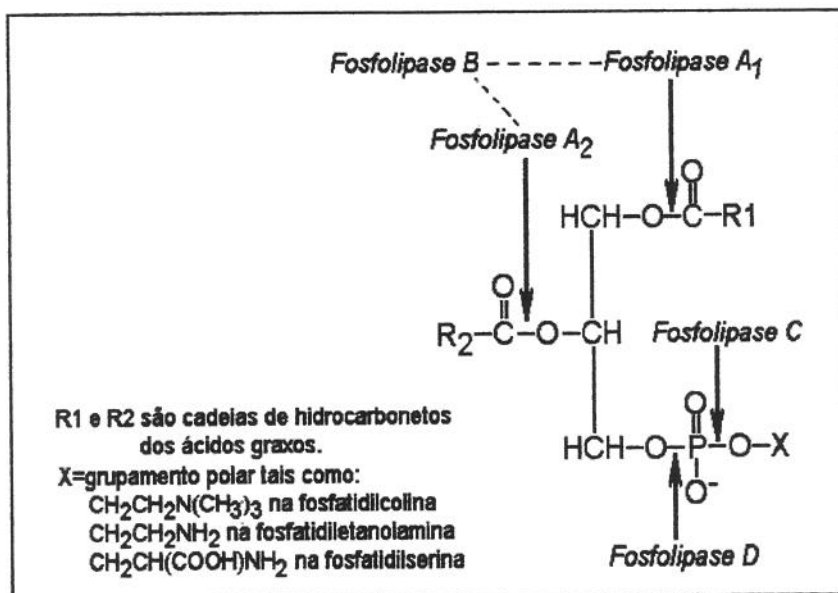


Figura 4 Local de hidrólise de diferentes fosfolipases em um fosfolípido (WAITE, 1987).

A₁- Presentes nos tecidos de mamíferos.

A₂- Foram as primeiras a serem reconhecidas, sua descoberta foi baseada na observação da ação do suco pancreático e do veneno da serpente na hidrólise de fosfatidilcolina (WITTCOFF, 1951).

C - Encontradas em lisossomos hepáticos e na α -toxina dos clostrídios e outros bacilos.

D - Encontrada principalmente em tecidos vegetais.

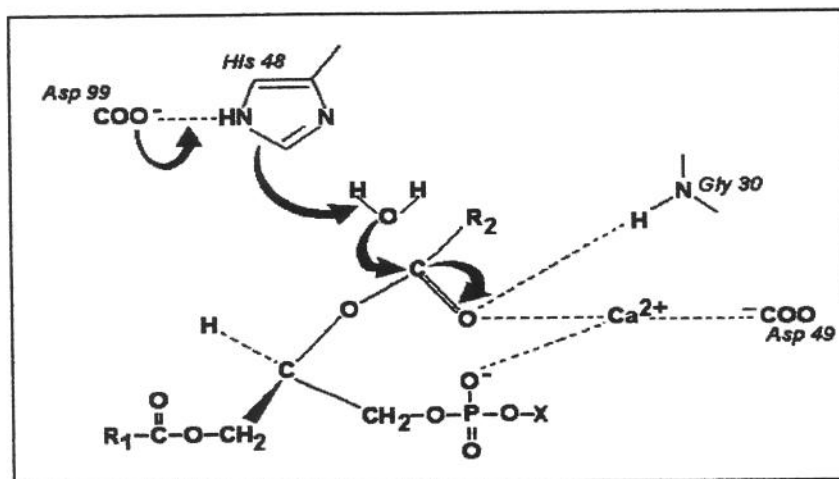


Figura 5 Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA₂ (VERHEIJ *et al.*, 1980).

Em 1980, foi proposto um mecanismo de catálise das PLA₂ baseado na comparação estrutural com as serino proteases, conforme figura cinco (VERHEIJ *et al.*, 1980). No modelo de ação das PLA₂, a atividade catalítica compreende os resíduos de His 48, Asp 99, e uma molécula de água.

O íon cálcio, que é um elemento importante na catálise, está ligado com oxigênio da Try28, Gly30, Gly32 e pelo oxigênio da cadeia lateral do Asp49. No mecanismo proposto, o cálcio teria uma função dupla que seria a fixação do grupamento fosfato do fosfolípideos e a estabilização da carga negativa sobre o oxigênio carboxil da ligação éster na posição sn-2. A Amida NH da Gly30 também foi sugerida como um fator importante na estabilização do estado de transição (VERHEIJ *et al.*, 1980).

As PLA₂ não dependentes de Ca²⁺ são de forma geral ativadas e estabilizadas pela presença de ATP. Basicamente, o ATP modula a polimerização destas PLA₂ o que as tornaria cataliticamente ativas e estáveis (DENNIS, 1994).

As PLA₂ podem ser classificadas em vários grupos (KINI, 1997). Esta classificação baseia-se na presença de pontes de sulfeto, tamanho, dependência ou não de cálcio (Quadro 1).

As PLA₂ do grupo I, compreendem e as PLA_{2(s)} pancreas de mamíferos e a dos venenos ofídicos pertencentes às famílias *Elapidae* e *Hydrophidae*. Estas enzimas contém cerca de 115-120 resíduos de aminoácidos e sete pontes de dissulfeto.

O Grupo II compreende as PLA_{2(s)} dos venenos de *Crotalidae* e *Viperidae*, fluido sinovial humano e plaquetas.

Estas enzimas possuem cerca de 120-125 resíduos de aminoácidos e sete pontes de dissulfeto. Fazem parte deste grupo as enzimas PLA₂ miotóxicas Asp 49 (D49) e Lys49 (K 49), que possuem atividade enzimática baixa ou residual.

As PLA₂ (s) do Grupo III compreendem as provenientes de venenos de vespas e abelhas, diferentemente das outras classes de PLA₂ (s) que são glicoproteínas, contém 130 a 135 resíduos de aminoácidos, sua homologia com as outras PLA₂ (s) é muito baixa. Estas PLA₂ (s) são encontradas em exudatos inflamatórios tais como plaquetas, mastócitos e quando estimuladas, são liberadas através do processo de exocitose (CLARCK *et al.*, 1990, TAKAYAMA *et al.*, 1991).

As PLA₂ (s) do Grupo IV, do ponto de vista estrutural, podem ser consideradas as mais recentes dentro das PLA₂ (s). Estas PLA₂ (s) tem duas cadeias polipeptídicas: uma longa com 77 resíduos de aminoácidos e uma curta com 42, ligados por pontes dissulfeto intercadeias. Estas enzimas mostram dependência de cálcio para sua atividade (MCLINTOSH, 1995).

Apesar da alta homologia entre as PLA₂ (s) do grupo I e II, existem diferenças significantes quanto a ativação dessas enzimas. Assim, as do grupo I são sintetizadas como pró-enzimas e manifestam sua atividade de forma limitada e somente através da clivagem proteolítica, expressam sua atividade total.

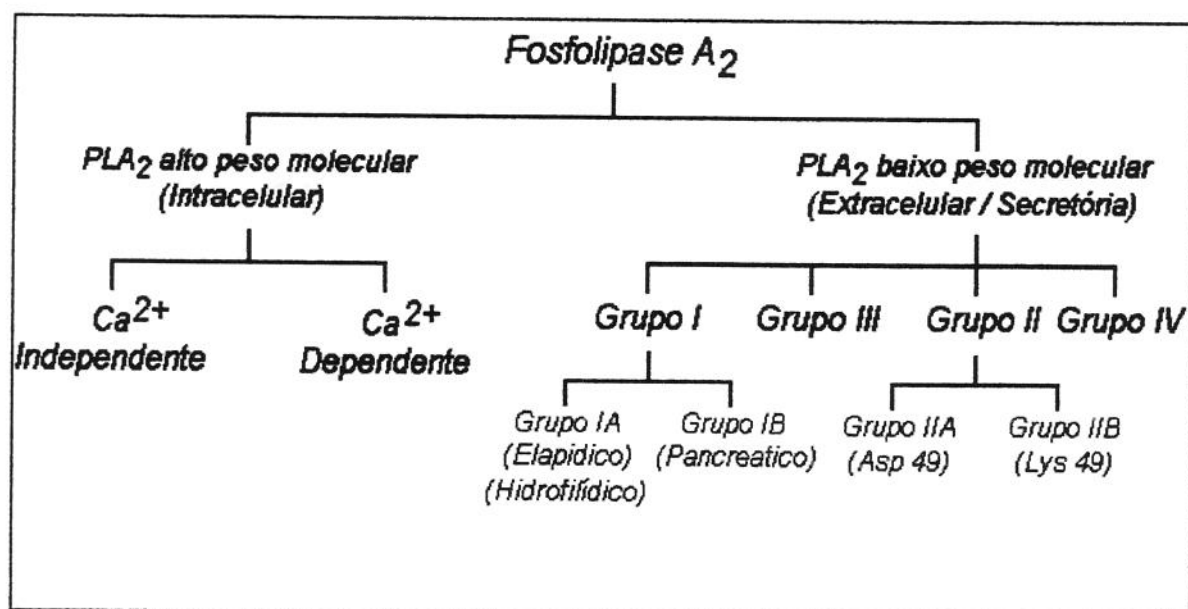
As do grupo II não existem como pró-enzimas, expressam sua atividade enzimática total a partir de estímulo capaz de desencadear sua ativação (MURAKAMI *et al.*, 1995).

De acordo com DENNIS, 1994, as PLA₂ (s) pertencentes aos grupos I, II, e III, são as menores e as mais simples, contudo todas são de baixo peso

molecular que hidrolisam os fosfolípidos através de mecanismos simples. Isto é identificado através do inibidor MG-14 (MCLINTOSH *et al.*, 1995; YUAN *et al.*, 1990; JAIN *et al.*, 1991 e BAYBURT *et al.*, 1993).

Nos grupos I, II e III, os resíduos envolvidos no mecanismo catalítico ocupam especialmente as mesmas posições, ocorrendo uma sobreposição destes três resíduos nas três classes (SCOTT *et al.*, 1990).

Quadro 1 Classificação das enzimas PLA_{2(s)}. (KINI, 1997)



As PLA_{2(s)} de venenos e de pâncreas de mamíferos passaram a ser denominadas de PLA_{2(s)} secretadas (sPLA_{2s}) porque, a partir de 1934, observou-se a existência de Pla₂ em outros tecidos de mamíferos, além do pâncreas. Estas PLA_{2(s)} foram identificadas como PLA_{2(s)} intracelulares as quais, na maioria das vezes, estão associadas com as membranas plasmáticas ou membranas de organelas citoplasmáticas (VAN DER BOSCH, 1980). Mais tarde, a maioria destas

PLA_{2(s)} intracelulares foram caracterizadas como enzimas de alto peso molecular (GLASER *et al.*, 1993)

Estas PLA_{2(s)}, atualmente conhecidas como citosólicas (cPLA₂), diferem das extracelulares (sPLA₂) não só pelo peso molecular, como também pelos sítios de ação, pelo requerimento de Ca⁺⁺ (atividade máxima em doses micromolares de Ca⁺⁺) e pela especificidade por fosfoglicerídeos que possuem o ácido araquidônico em sua posição sn-2 (GLASER *et al.*, 1993). Algumas cPLA_{2(s)} mostraram-se independentes de Ca⁺⁺, mas também específicas para o ácido araquidônico na posição sn-2 dos fosfoglicerídeos (HAZEN *et al.*, 1990).

Desde a década de 80, uma outra PLA₂ extracelular vem sendo identificada em doenças inflamatórias humanas, incluindo a artrite reumatóide (PRUZANSKI, *et al.*, 1985), psoríase (FORSTER *et al.*, 1985), choque séptico causado por bactérias gram-negativas (VADAS *et al.*, 1986), pancreatite aguda (FORMELA *et al.*, 1995) e outros. Esta PLA₂ foi denominada PLA₂ secretada não pancreática e incluída no grupo I devido às suas propriedades bioquímicas. O gene desta enzima já foi descrito (SCILHAMER *et al.*, 1989) e sua forma recombinante desenvolvida (KRAMER *et al.*, 1989). Tem sido demonstrado que a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) induzem a expressão desta forma da sPLA₂. Vários elementos como plaquetas (KRAMER *et al.*, 1989), leucócitos (MARSHALL & ROSHAK, 1993) e condrócitos (LYONS-GIORDANO *et al.*, 1989) foram identificados como fontes desta enzima. Além disso, um quinto grupo está sendo proposto para incluir as cPLA₂ que não requerem Ca⁺⁺ para sua atividade.

As PLA₂ (s) podem também ser classificadas em PLA₂ monoméricas e multiméricas; as monoméricas são homodímeros formados pela associação de duas unidades PLA₂ e as multiméricas são heterodímeros, onde uma das subunidades é uma PLA₂ e a outra um elemento peptídico.

1.2.5 Fosfolipase A₂ (PLA₂) - Efeitos biológicos

Quadro 2 Efeitos farmacológicos das enzimas PLA₂ isoladas do veneno total de serpentes (KINI, 1997)

Neurotoxicidade
Neurotoxinas Pré-sinápticas
Neurotoxinas Pós-sinápticas
Miotoxicidade
Mionecrose Local
Miotoxicidade Sistêmica
Cardiotoxicidade
Efeito anticoagulante
Iniciador da agregação plaquetária
Inibidor da agregação plaquetária
Atividade Hemolítica
Hemorragia Interna
Atividade antihemorrágica
Atividade Convulsionante
Atividade Hipotensiva
Atividade Edematogênica
Lesão de órgãos e tecidos.

Nesses últimos anos, as pesquisas sobre PLA₂ têm sido impulsionadas principalmente pelo seu importante papel em várias atividades biológicas, como as apresentadas no quadro dois (Quadro 2).

As PLA₂ de serpentes exibem ampla variedade de efeitos farmacológicos, apesar de suas similaridades, na estrutura primária, secundária e terciária.



Isoformas de PLA₂ de um mesmo veneno também exibem diferentes efeitos farmacológicos. Dentro destes, como já citado as mais comuns seriam a neurotoxicidade, miotoxicidade e efeito anticoagulante. Mesmo com o avanço da compreensão estrutural, funcional e do sítio de ação destas PLA₂, muitos dos aspectos do mecanismo dos eventos farmacológicos ainda permanecem desconhecidos.

Muitas das PLA₂ do veneno de serpentes necessitam de proteínas associadas para expressão de sua atividade farmacológica; estes fatores podem estar ligados à proteína de forma covalente ou não covalente.

Como exemplo desta complexa inter-relação são as β -neurotoxinas, que são potentes neurotoxinas que bloqueiam a transmissão neuromuscular. Estas β -neurotoxinas podem ser encontradas em duas formas básicas: na forma monomérica ou na forma multimérica (BON, 1997).

As neurotoxinas multimericas, são feitas de duas, três ou cinco subunidades polipeptídica, estruturalmente são homólogas às PLA₂, contudo algumas destas enzimas podem não apresentar atividade enzimática. Estas subunidades estão associadas por interações não covalentes como no caso da crotoxina, formado pela associação de uma subunidade ácida (crotopotina) e uma básica (PLA₂). Outras neurotoxinas estão associadas por pontes de sulfeto de forma similar ao inibidor do tipo Kunitz (BON, 1997).

Os vários efeitos farmacológicos promovidos pelas fosfolipase A₂ podem ser explicados também pela presença de sítios-alvo específicos, que estão localizados na superfície das células ou do tecido-alvo (fig. 6).

Estes sítios alvo seriam reconhecidos por sítios farmacológicos localizados na superfície das PLA₂, que, de forma geral, são independentes, mas algumas vezes se sobrepõem com o catalítico (KINI & EVANS, 1989). De acordo com esta hipótese haveria necessidade de complementaridade entre os sítios farmacológicos e o sítio-alvo, em termos de complementaridade de cargas, interação hidrofóbica e interações de forças de Van der Waals.

De acordo com KINI & EVANS (1989), a natureza química deste sítio de ligação entre as PLA₂ e as células ou tecido-alvo poderia estar entre um lipídio ou uma proteína (glicoproteínas). Em razão da alta especificidade das interações, pode-se supor que as glicoproteínas podem estar diretamente relacionadas com o reconhecimento, contudo lipídios próximos ao sítio de ligação também podem contribuir para o aumento da especificidade.

Muitos dos receptores para estas PLA₂ já foram identificados e caracterizados tanto a nível estrutural como funcional. Entre os mais bem caracterizados e conhecidos está a proteína do canal de potássio (KINI, 1997).

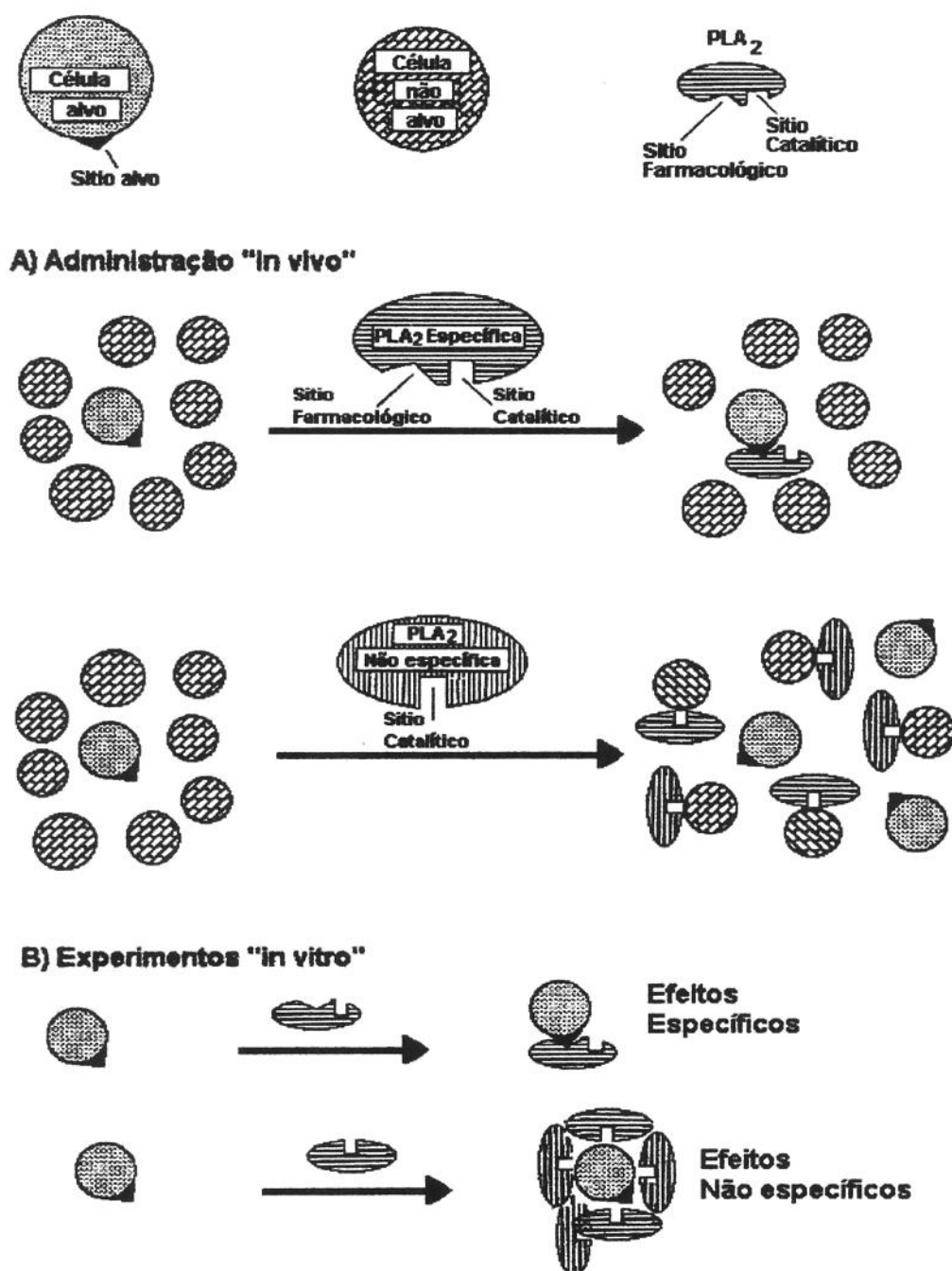


Figura 6. Diagrama esquemático do modelo de interação das PLA₂ com as células alvos e desencadeamento da atividade farmacológica. A base deste modelo está na capacidade de certas PLA₂ interagirem especificamente com determinadas células, via "sítios alvos". As PLA₂ não específicas podem interagir de forma aleatória com todos tipos celulares inclusive com as "células alvos". De acordo com este modelo os efeitos farmacológicos produzidos pela interação de PLA₂ não específicas é menos efetiva e potente do que numa interação específica (KINI, 1997).

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

- Isolar e caracterizar bioquimicamente as diferentes isoformas da crotoxina e avaliar suas atividades neurotóxicas sobre a junção neuromuscular em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo.
- Avaliar os efeitos neurotóxicos das isoformas de crotopotina e PLA₂ quando recombinaadas em diferentes proporções (1:1, 1:2 e 2:1).



3. MATERIAIS E MÉTODOS



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Nos ensaios farmacológicos foram utilizados camundongos da linhagem SWISS (18-30g) obtidas do biotério central da UNICAMP.

3.2. Veneno

Veneno: As frações do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Marcos Toyama do Laboratório de Bioquímica/ I.B – UNICAMP, do Prof. Dr. Sérgio Marangoni

3.3. Ensaios Biológicos

3.3.1 Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo

Para estes experimentos foram utilizadas preparações nervo frênico diafragma de camundongo. A preparação foi removida cirurgicamente de animais anestesiados com hidrato de cloral (3mg/ kg) e mortos por secção sangria dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragmático, juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico) foi cuidadosamente retirada como descrito por Bülbring, 1946 para ratos, e colocada em uma cuba contendo 5,0 ml de solução de Tyrode (com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCL 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9; C₆H₁₂O₆ 11,1), e, em seguida, presa, através dos músculos intercostais, por dois ganchos existentes na base da cuba. A

temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (95% O₂ e 5% de CO₂).

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos elétricos foi realizada através de transdutor isométrico load bell BG 10GM, acoplado a um fisiógrafo Gold Universal Amplifier Model RS 3400.

O músculo foi submetido à tensão constante de 5g/cm por meio de um fio preso à porção tendinosa ligado ao transdutor isométrico sendo a estimulação indireta, com pulsos supramaximais, gerados por estimuladores S48F (Grass Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 HZ de frequência, durante de 20 minutos para estabilização. Ao término do período de incubação foram injetadas as amostras obtidas do fracionamento. Para cada experimento foram utilizados um mínimo de animais n=3.

3.4 Ensaios Bioquímicos

A purificação assim como os ensaios bioquímicos (electroforeses) foram realizados no Laboratório de Bioquímica/ I.B – UNICAMP, do Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Purificação do Veneno total de *Crotalus durissus terrificus*

3.4.1 Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G75

O veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (100mg) foi dissolvido em 2.0ml de tampão bicarbonato de amônio (0.1M, pH 7.8) até sua homogeneização.

O homogenato foi clarificado por centrifugação $\cong 10000$ rpms durante 2 minutos, o sobrenadante obtido, foi guardado para posterior aplicação na coluna cromatográfica e o "pellet" foi descartado.

O sobrenadante (veneno bruto) foi aplicado em um coluna de Sephadex G75 (1.6 x 100cm), previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio (0,1M. pH7.8). A eluição do material foi realizada usando-se o tampão Bicarbonato de Amônia 0,1M, pH 7.8, a um fluxo constante 12ml/hr. As amostras com 3ml por tubo foram coletadas em um coletor de frações Redi Frac da Amersham Pharmacia Biotech. A absorbância de cada fração foi lida em 280nm, num espectrofotômetro Shimadzu UV1201. As frações foram liofilizadas e guardadas a -20°C.

3.4.2. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

Cerca de 20mg do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* foram homogenizados em tampão bicarbonato de amônia 0,1M, pH 7.9. Esta solução de veneno foi então centrifugado a 10000 rpm por 2 minutos para clarificação da solução. O sobrenadante obtido foi então aplicado a coluna pre-empacotada de exclusão molecular em HPLC, Protein Pack SW 300 (0.78 x 30cm) (Waters). A coluna cromatográfica acoplada ao sistema HPLC-biocompatível, APPS LC 650E (Waters), foi previamente equilibrada com o tampão Bicarbonato de amônio, pH7.9, 0,1M, 60 minutos antes da corrida. A eluição do material foi feita a um fluxo constante 0.2ml/min e foi monitorado a uma absorbância de 280 nm. As frações

coletadas em um coletor de frações automático Foxy 200 foram liofilizadas e guardadas a -20°C.

3.4.3. Repurificação da crotoxina em HPLC de fase reversa

Tanto o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* quanto suas frações de crotoxina foram purificados em uma coluna HPLC de Fase Reversa preparativa. O sistema cromatográfico foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um "loop" de 2,0ml e uma coluna μ -microbondapak C-18 0,78 X 30 cm (preparativa), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A). Inicialmente a eluição das amostras foi realizada através de um gradiente linear com Acetonitrila 66% (Tampão B), que foi modificado para a otimização da purificação das frações. As frações foram monitoradas a 280 nm.

3.5 Análise Estatística

Foi utilizado o método ANOVA (Análise de Variança) para medidas repetidas, pois leva-se em consideração várias medidas realizadas na mesma preparação, durante o tempo.

Foi realizado o teste de comparações múltiplas de DUNNET entre o grupo controle e os demais para cada tempo (t0 a t120), para comparação entre os demais grupos foi utilizado o teste TUKEY.

Para comparar o tempo (min) de 50% de bloqueio entre os grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de KRUSKAL-WALLIS, devido ao pequeno tamanho dos grupos.

Foi considerado o nível de significância 5% ou seja, $p \leq 0,05$

Para visualizar os dados foi utilizado gráficos de linhas com a média, Ep (Erro Padrão) para cada grupo ao longo do tempo.

4. RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G75

A purificação do veneno crotálico em coluna Sephadex G 75, ou seja, usando-se técnica convencional, resultou em picos principais de eluição que foram identificados como: convulxina pico I, giroxina pico II, crotoxina pico III e crotamina pico IV. (Fig.7)

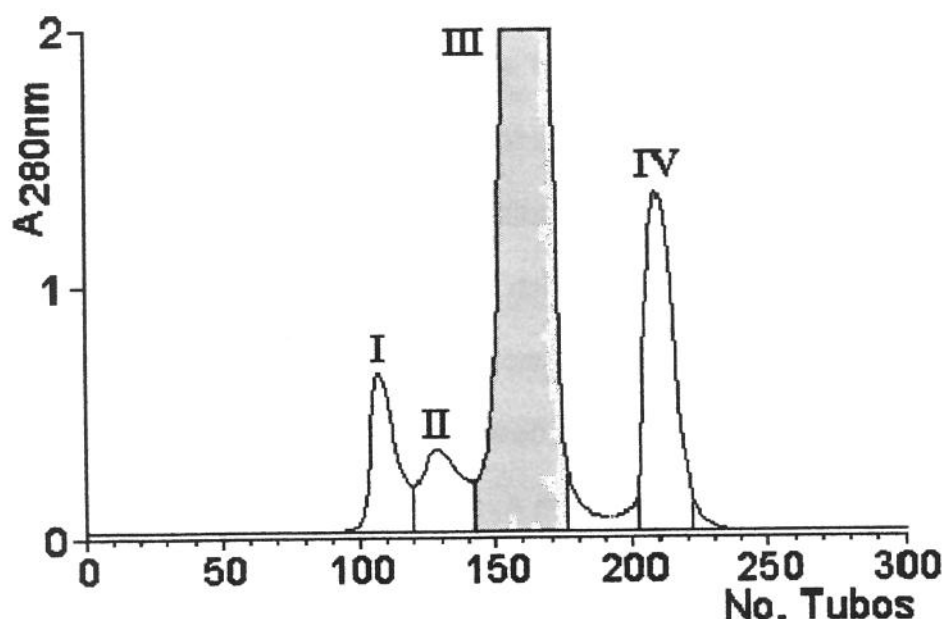


Figura 7 Perfil de eluição do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cromatografia de exclusão molecular, em Sephadex G-75 (1,6 x 100 cm). As colunas foram previamente equilibradas com tampão de eluição bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,8. A eluição do veneno total foi realizado com um fluxo constante de 12 ml/h e o monitoramento da corrida foi realizado à absorbância de 280 nm. As frações foram coletadas e liofilizadas e as amostras estocadas a -20 °C.

4.2 Preparação nervo-frênico-diafragma de camundongo (NFD)

4.2.1 Efeito neuromuscular da crotoxina (Sephadex G 75)

Inicialmente foi testada a crotoxina nativa, resultante da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G 75 (fig.7 pico III). Este pico quando ensaiado em preparação neuromuscular não exibiu o efeito facilitador inicial da neurotransmissão característico da crotoxina.

No entanto, como esperado, determinou o bloqueio neuromuscular irreversível e dependente da dose.

A figura oito mostra em A, a representação gráfica do efeito de duas doses de crotoxina (10 µg/ml n=8 e 20 µg/ml n=6). Em B e C estão ilustrados os registros miográficos do efeito da crotoxina correspondente às duas doses ensaiadas; o tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% foi de $65,38 \pm 5,5$ e $48,00 \pm 4,75$ min respectivamente.

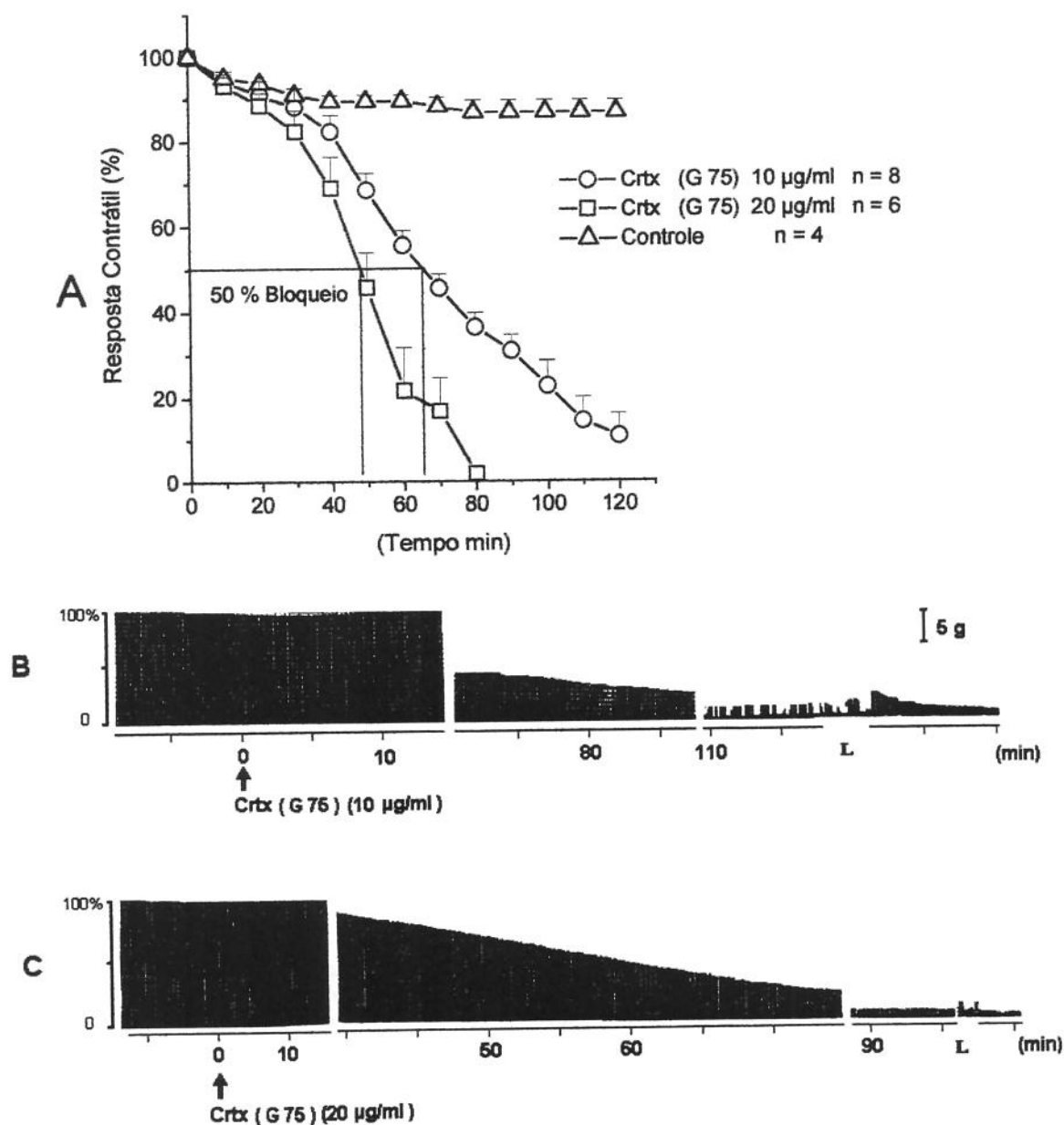


Figura 8 Efeito neuromuscular da crotoxina (Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo-estímulo indireto). Em A, representação gráfica do efeito da Crotoxina nas doses de 10 e 20 µg/ml. Porcentagem de 50% do bloqueio é dose-dependente. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro-padrão. Em B e C registros miográficos correspondentes às respectivas doses. $\uparrow$, adição da fração. L, lavagem.

4.3. Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

A purificação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em HPLC de exclusão molecular, mostra a presença de sete picos principais denominados convulxina (I), giroxina, (II) novo componente (cdty III), crotoxina (crtx IV), novo componente (cdty V), inter-cro (VI) e crotamina (VII). Os picos cdty III, e cdty V correspondem a dois novos picos que com o uso da técnica cromatográfica convencional, fazem parte do pico identificado como sendo crotoxina.

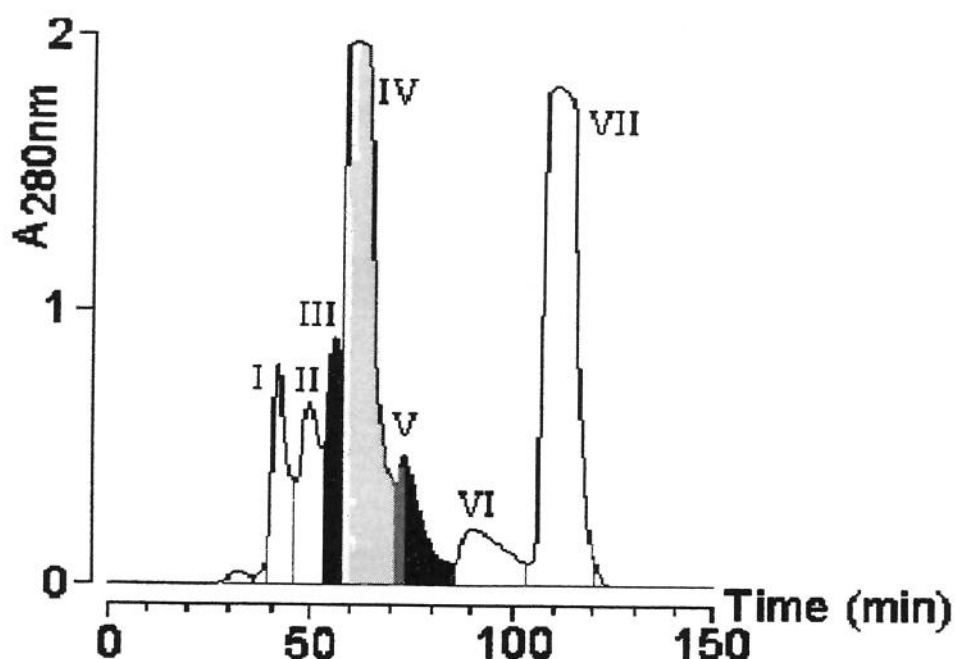


Figura 9 A cromatografia de exclusão molecular em HPLC, foi realizada, utilizando coluna Protein Pack SW 300 (0.78 x 30cm) (Waters). Foram aplicados 20 mg. de veneno total *Crotalus.durissus.terrificus*. A eluição do veneno total foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,1M. pH 7.8), a um fluxo constante 0,2 ml/min, monitorado a uma absorbância de 280 nm. Após a homogenização, o veneno foi clarificado e aplicado em coluna.

4.4 Efeito neuromuscular da crotoxina (pico cdy III, crotoxina (ctx) IV e cdy V). Cromatografia de exclusão molecular em HPLC (Proteinpak SW 300) em preparação nervo frênico diafragma de camundongo (NFD)

4.4.1 Crotoxina (pico ctx IV) Foram ensaiadas as doses de 10 e 20 µg/ml de crotoxina, proveniente do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, mostrado na figura 10 A e B.

A figura 10 A, na dose de 10µg/ml (n=3), apresentou uma discreta facilitação da transmissão neuromuscular, seguida de um bloqueio irreversível. O tempo para um bloqueio de 50% foi de $63,67 \pm 4,25$ min

A dose de 20 µg/ml (n=3) mostrada na figura 10 B, apresentou facilitação e um bloqueio irreversível na resposta da transmissão neuromuscular. O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% foi de $61,00 \pm 6,26$ min

O registro miográfico da resposta contrátil é mostrado nas figuras 11 B e 12 B, evidenciando o efeito facilitador e bloqueador.

4.4.2 Pico cdy III (novo componente do complexo crotoxinico)

As preparações realizadas com o pico cdy III, na dose de 10 µg/ml (n=4), apresentaram um aumento da amplitude de contração neuromuscular. Em relação ao grupo-controle não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$). (Fig.10 A)

Em 10 B, representação gráfica demonstrando o pico cdy III na dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ ($n=3$), evidenciando facilitação significativa ao longo dos 120 min. Após três lavagens (L), as preparações mantiveram o mesmo padrão de resposta contrátil.

As figuras 11 A e 12 A mostram o registro da resposta contrátil, com visível facilitação em 12 A.

Portanto usando-se a dose a dose de 20 $\mu\text{g/ml}$, foi possível dissociar com clareza o efeito facilitador do efeito bloqueador, característicos da crotoxina. Além disso, o efeito facilitador da neurotransmissão mostrou-se dependente da dose e persistente nos 180 min de observação.

4.4.3 Pico cdy V (novo componente do complexo crotoxínico)

Experimentos realizados com o pico cdy V, nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ ($n=3$) determinaram um aumento inicial da amplitude de contração muscular, seguido de leve redução e manutenção da amplitude de resposta após 120 min de observação. Em ambas as doses não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. (Fig. 10 A e 10 B)

Em 11 C e 12 C, registro miográfico, evidenciando o aumento da amplitude de contração muscular e leve redução da amplitude.



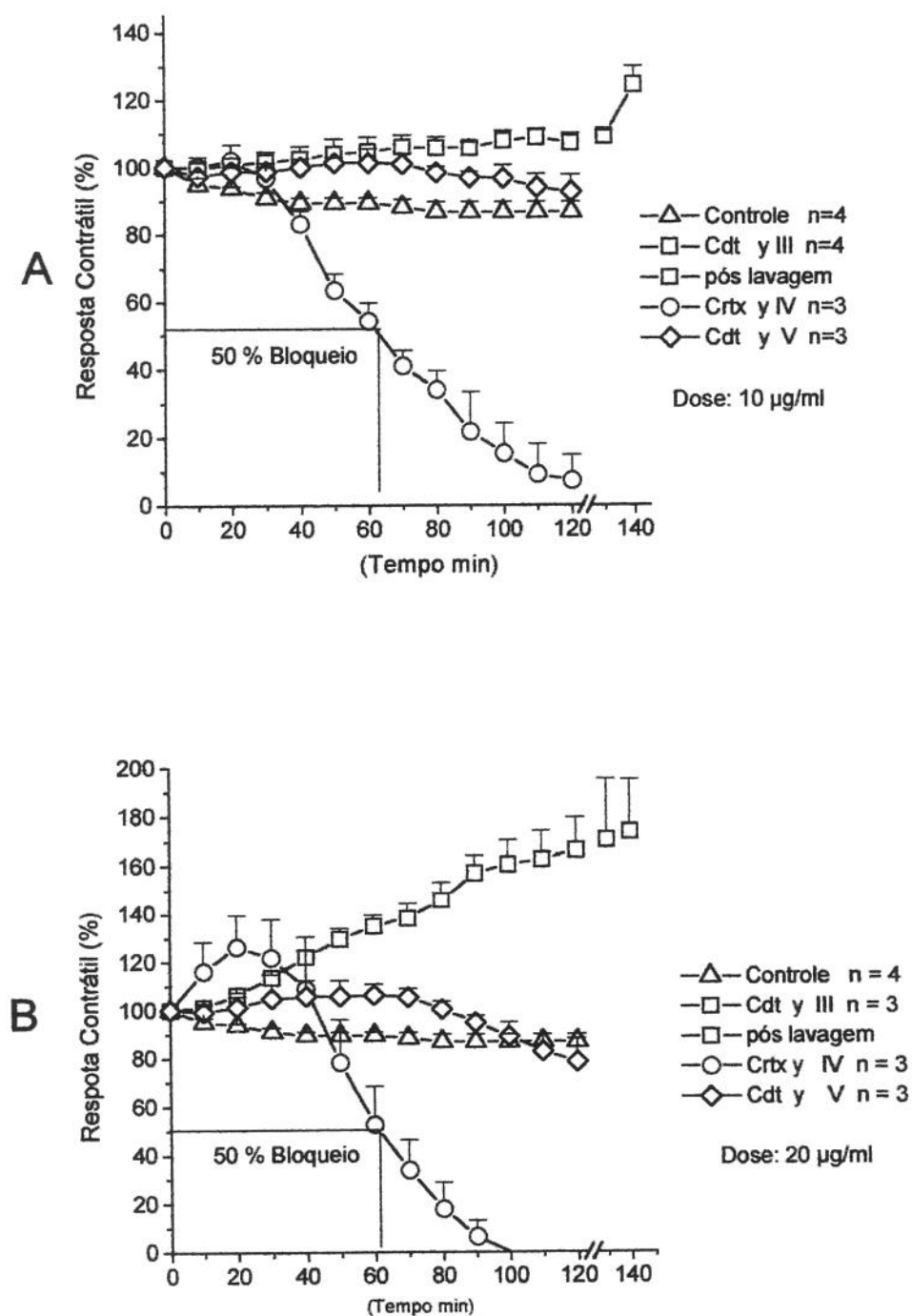


Figura 10 Representação gráfica do efeito da Crotoxina (crtx IV) e seus componentes cdt y III e cdt y V, na dose de 10 µg/ml (gráfico A) e 20 µg/ml (gráfico B) sobre a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (estímulo indireto). Porcentagem de 50% do bloqueio. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro padrão.

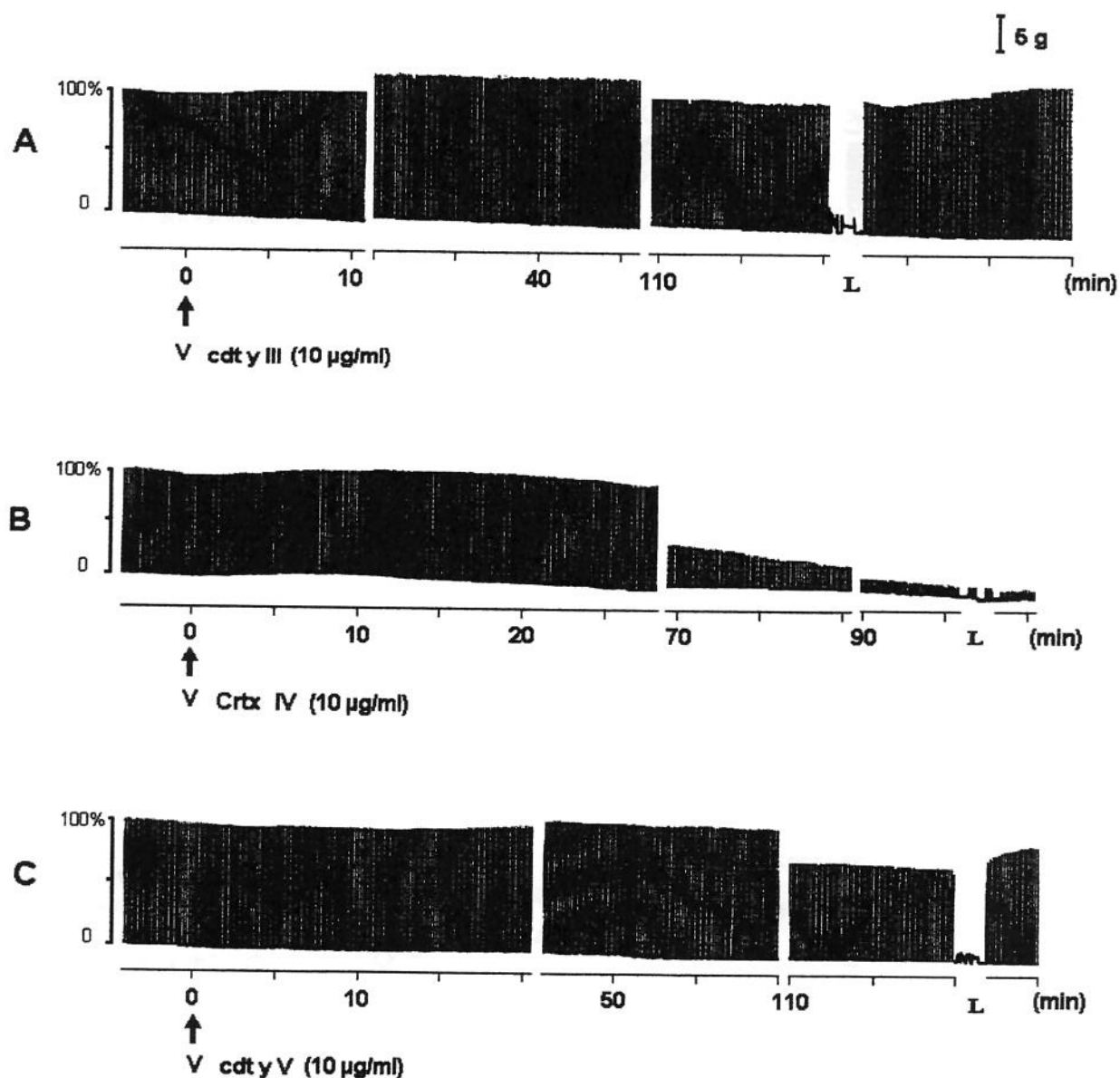


Figura 11 Registros da força de contração muscular em preparação NFD (estímulo indireto). Em A e C, ilustram os componentes da Crotoxina (cdty III e cdt y V), Em B, o efeito bloqueador da crotoxina (crtx IV), na dose de 10 µg/ml. ↑, adição da fração. L, lavagem.

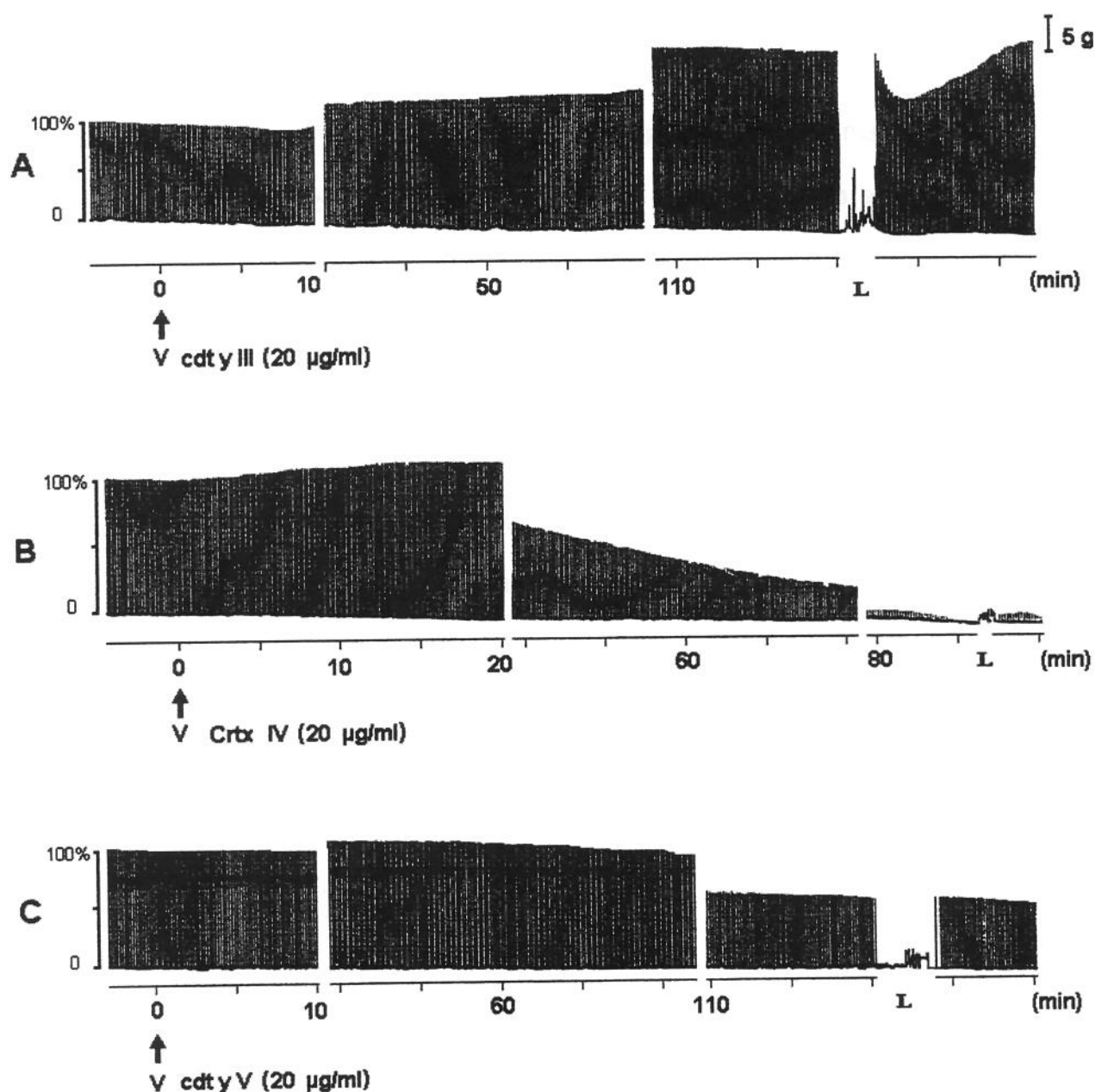


Figura 12 Registros da força de contração muscular em preparação NFD (estímulo indireto). Em A e C ilustram os componentes da Crotoxina (yIII e yV). Em B o efeito bloqueador da crotoxina (yIV), na dose de 20 µg/ml. ↑, adição da fração. L, lavagem.

4.5 Repurificação da crotoxina em HPLC de fase reversa

A crotoxina (IV) proveniente do veneno total *Crotalus durissus terrificus*, foi purificada em coluna de fase reversa e o seu perfil cromatográfico mostra a presença de duas isoformas da subunidade ácida (crotopotina) F5 e F7, tendo sido estudado somente a fração F 7, e três isoformas da subunidade básica (fosfolipase A₂ (PLA₂)) F15, F16 e F17. (Fig.13) foram estudadas somente as frações F16 e F 17. As frações F 5 e F 7 foram eluídas aos 28 e 31 min de corrida cromatográfica, enquanto que as frações F 15 e F 16 e F 17 foram eluídas aos 35, 36 e 37 min. Todas as isoformas obtidas foram testadas em sua atividade biológica através de miografia em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.

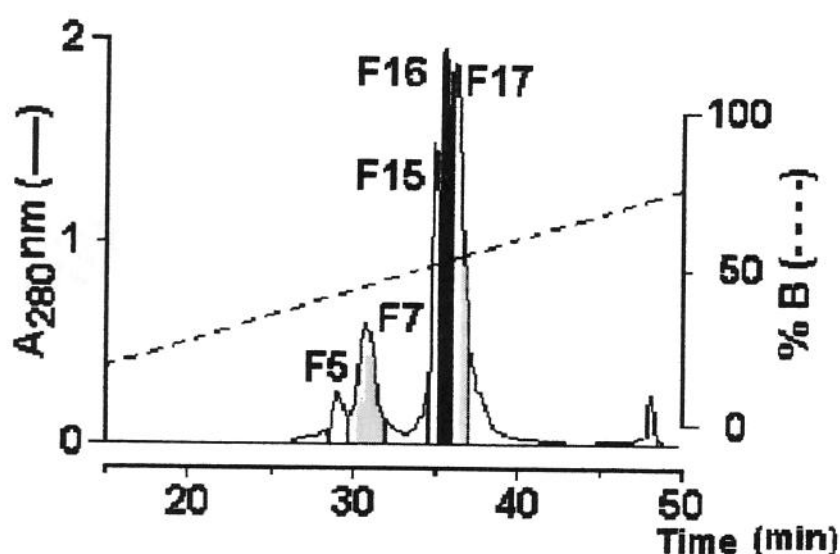


Figura 13 Perfil da repurificação de crotoxina proveniente do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* onde temos F5 e F7 (crotopotina) e F15, F16 e F17 (PLA₂). A coluna de fase reversa μ -Bondapak C 18 (3,9 X 300 mm), foi equilibrada com TFA 0,1% (Solvente A). Foram aplicados 2 mg. de crotoxina que foram previamente dissolvidas em 200 μ l de solvente, clarificados e aplicados à coluna. A eluição das amostras foi realizada, usando um gradiente linear de concentração de Acetonitrila 66%. (Solvente B).

4.6 Efeitos da crotapotina (F 7) e fosfolipase A₂ (PLA₂) (F 16 e F 17) – sobre a força de contração muscular em preparação NFD, resultante da cromatografia HPLC de fase reversa μ - Bondapack C 18

Como mencionado no item 4.3, a repurificação da crotoxina nativa em HPLC de fase reversa resultou em 2 isoformas de crotapotina e 3 de PLA₂. Destas isoformas isoladas foram estudadas a F 7 (crotapotina) e F 16 (PLA₂)

4.6.1 .Efeito da crotapotina (F7) A incubação de preparações NFD de camundongo com a crotapotina nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ (n=4) não determinou qualquer mudança na amplitude da resposta contrátil, ao longo dos 120 min do experimento, quando comparado com a preparação controle. (Fig 14 A, B e C)

4.6.2 Fosfolipase (PLA₂) F 16 e F 17 Com as preparações neuromusculares isoladas do músculo diafragma de camundongo, na presença das PLA₂ (F 16) e PLA₂ (F 17), nas doses de 10 $\mu\text{g/ml}$ (n=5) e 20 $\mu\text{g/ml}$ (n=4), também não mostraram qualquer alteração na amplitude da resposta contrátil, quando comparada ao grupo-controle. (Fig 15 A e 16 A). Após três lavagens (L), as preparações mantiveram o mesmo padrão de resposta contrátil. (Fig. 15 B e C, e 16 B e C)

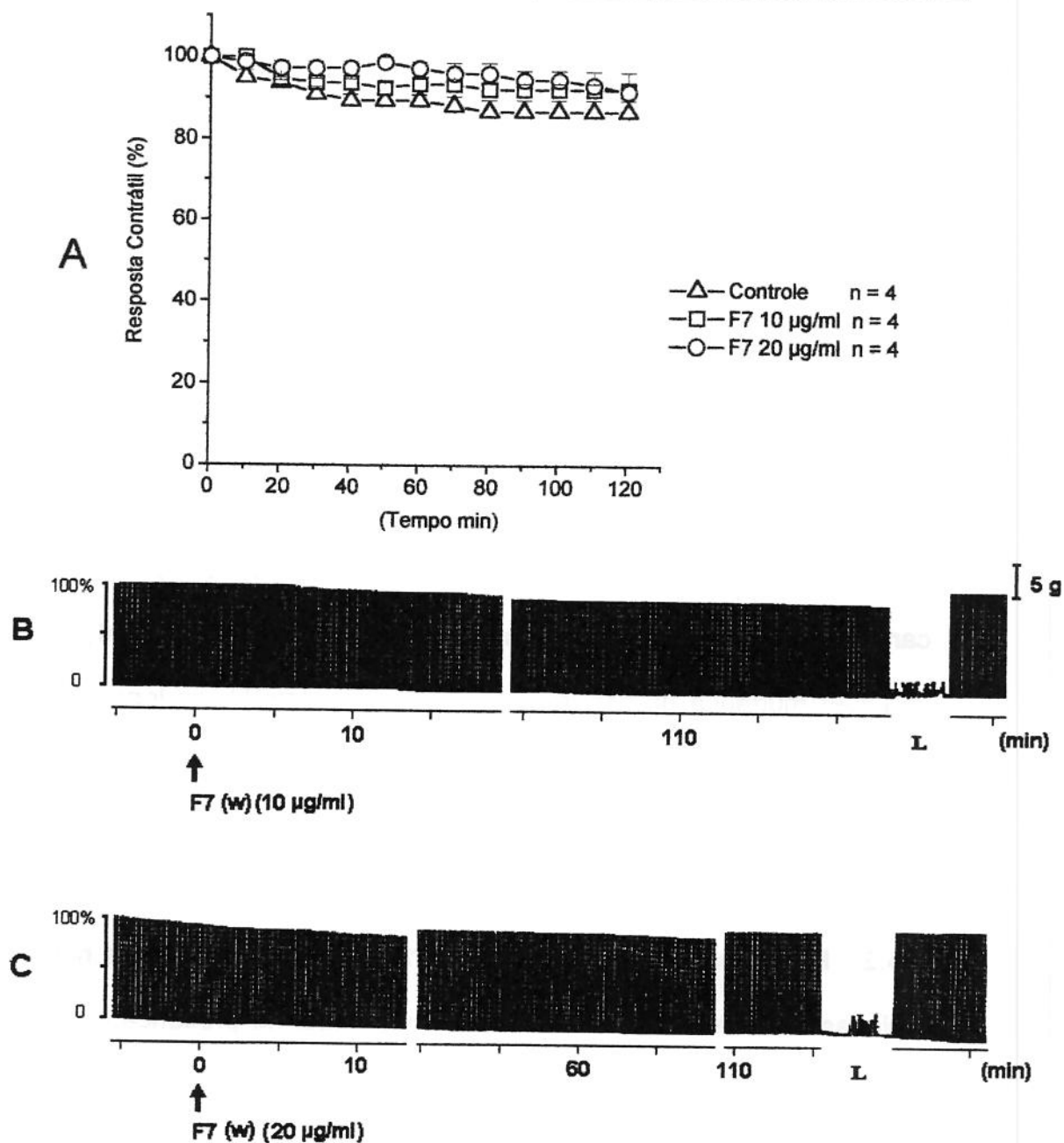


Figura 14 Efeito neuromuscular da crotapotina (F7) (Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo estímulo indireto). Em A, representação gráfica do efeito da Crotapotina (F7) nas doses de 10 e 20 µg/ml. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro-padrão. Em B e C registros miográficos correspondentes às respectivas doses. ↑, adição da fração. L, lavagem.

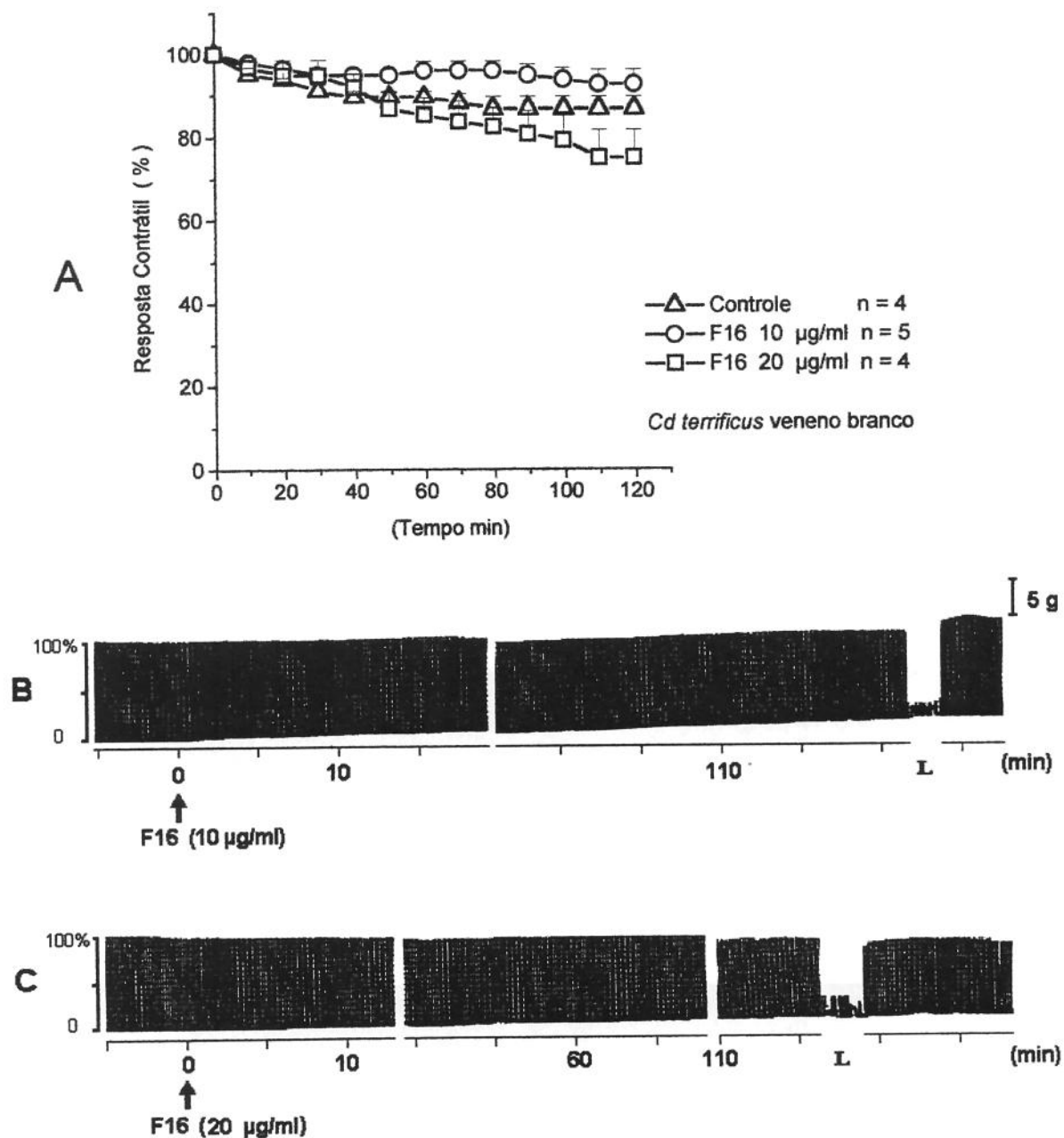


Figura 15 Efeito neuromuscular da PLA₂ (F16) (Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo estímulo indireto). Em A, representação gráfica do efeito da PLA₂ (F16) nas doses de 10 e 20 µg/ml. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro-padrão. Em B e C registros miográficos correspondentes às respectivas doses. ↑, adição da fração. L, lavagem.

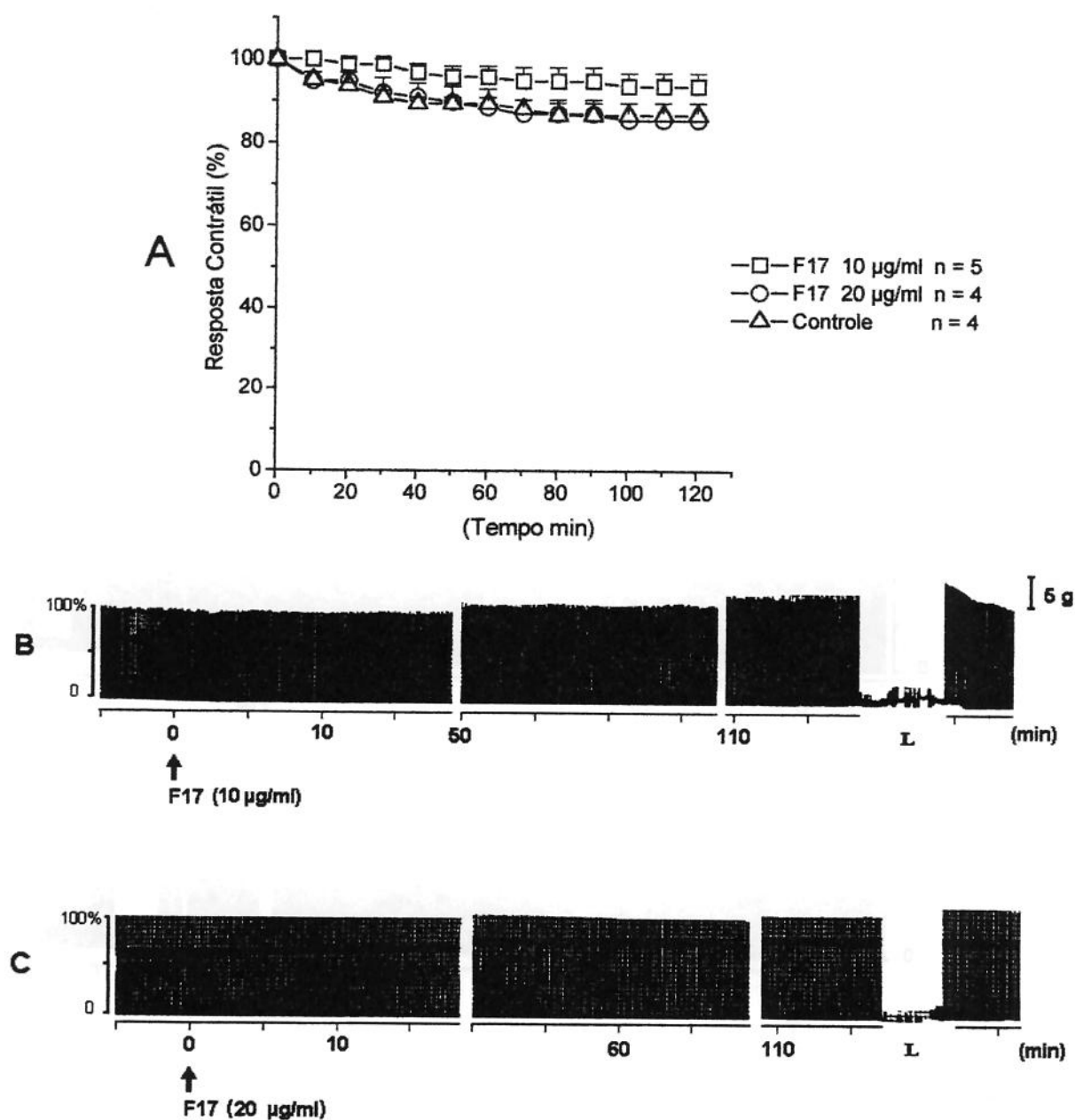


Figura 16 Efeito neuromuscular da PLA₂ (F17) (Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo-estímulo indireto). Em A, representação gráfica do efeito da PLA₂ (F17) nas doses de 10 e 20 µg/ml. Cada ponto representa a média de experimentos $\pm$ erro-padrão. Em B e C registros miográficos correspondentes às respectivas doses. ↑, adição da fração. L, lavagem.

4.6.3 Recombinação da crotapotina (F 7) + PLA₂ (F 16) nas proporções 1:1; 1:2 e 2:1 nas doses de 10 e 20 µg/ml

4.6.3.1 (1) F 7 + (1) F16 A adição de crotapotina + PLA₂ à preparação NFD de camundongo na proporção 1:1 na dose de 10 µg/ml (n=5) e na dose de 20 µg/ml (n=4) determinou um bloqueio neuromuscular irreversível ao final de 90 min de observação. O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% na dose de 10 µg/ml foi de $51,4 \pm 4,35$ min e para dose de 20 µg/ml foi de $53,55 \pm 6,09$. (Fig. 17 A e B).

As figuras 18 A e 19 A, mostram o registro miográfico da resposta contrátil, evidenciando o efeito bloqueador das respectivas doses.

4.6.3.2 (1) F 7 + (2) F16 Na proporção 1:2 na dose de 10 µg/ml (n=5) e 20 µg/ml (n=9), determinou um bloqueio neuromuscular irreversível ao final de 120 min observados O tempo necessário para se obter 50% na dose de 10 µg/ml foi de $84,80 \pm 7,5$ min e para dose de 20 µg/ml foi de $60,33 \pm 6,0$ min (Fig. 17 A e B). As figuras 18 B e 19 B ilustram perfil miográfico do efeito da resposta contrátil das respectivas doses.

4.6.3.3 (2) F 7 + (1) F 16 Nesta proporção, obtivemos diminuição da amplitude de contração muscular na dose de 10 µg/ml (n=5). (Fig.17 A e 18 C)

O mesmo não ocorreu com a dose de 20µg/ml (n=9), a qual determina 50% de bloqueio aos $70,17 \pm 8,5$ min e 80% de bloqueio aos 120 min. (Fig 17 B e 19 C)

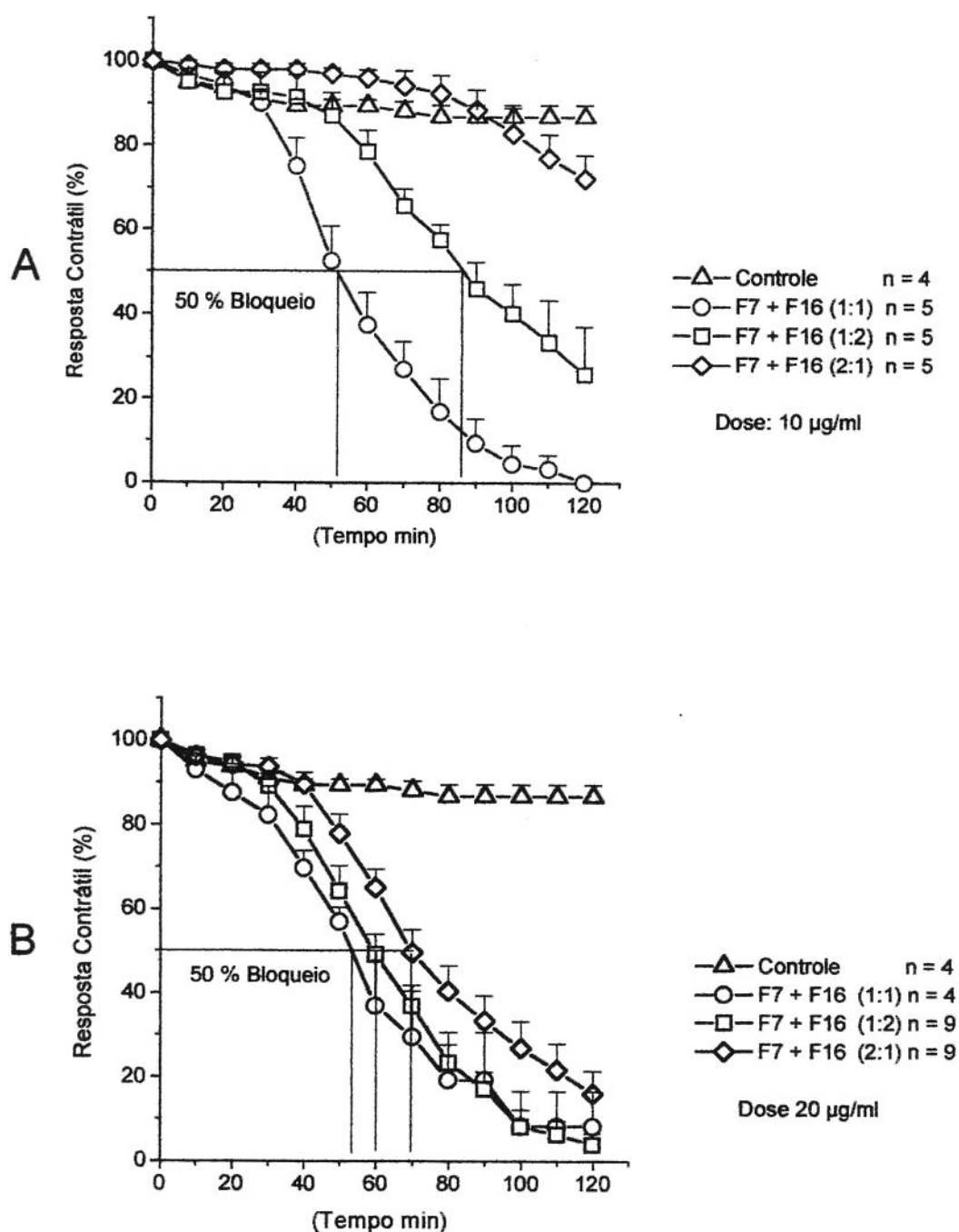


Figura 17 Representação gráfica do efeito da recombinação do complexo Crotoxina (Crotopotina F7 e PLA₂ F16), nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 nas doses de 10 µg/ml (gráfico 17 A) e 20 µg/ml (gráfico 17 B), sobre a preparação NFD sob estimulação indireta. Porcentagem de 50% do bloqueio. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro-padrão.

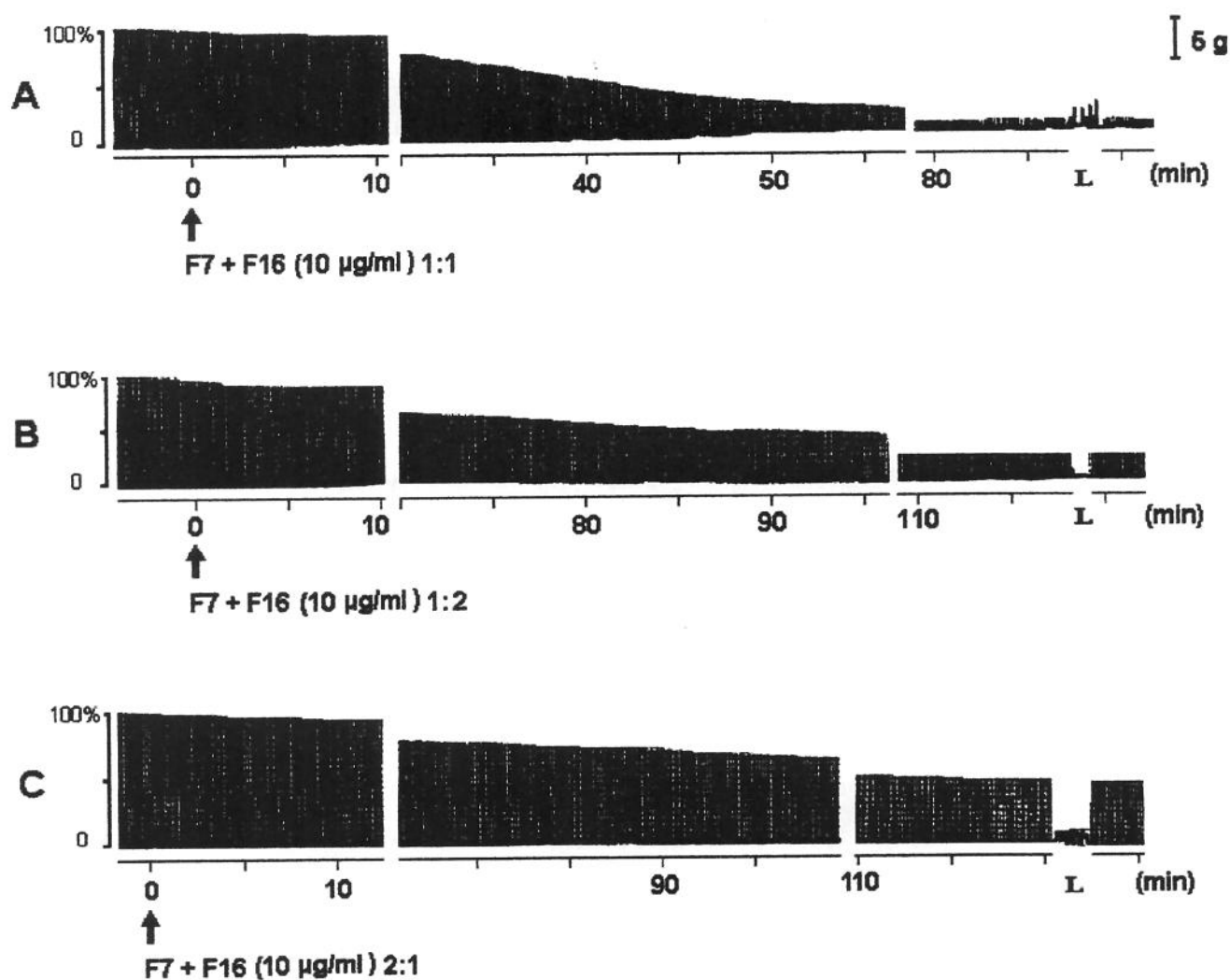


Figura 18 Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina (Crotopotina F7 e PLA₂ F16) (Preparação NFD. Estímulo indireto. Em A e B registros miográficos, demonstrando o bloqueio nas proporções de 1:1, 1:2 e C, a proporções de 2:1 (Dose de 10 µg/ml. ↑, adição da fração. L, lavagem.

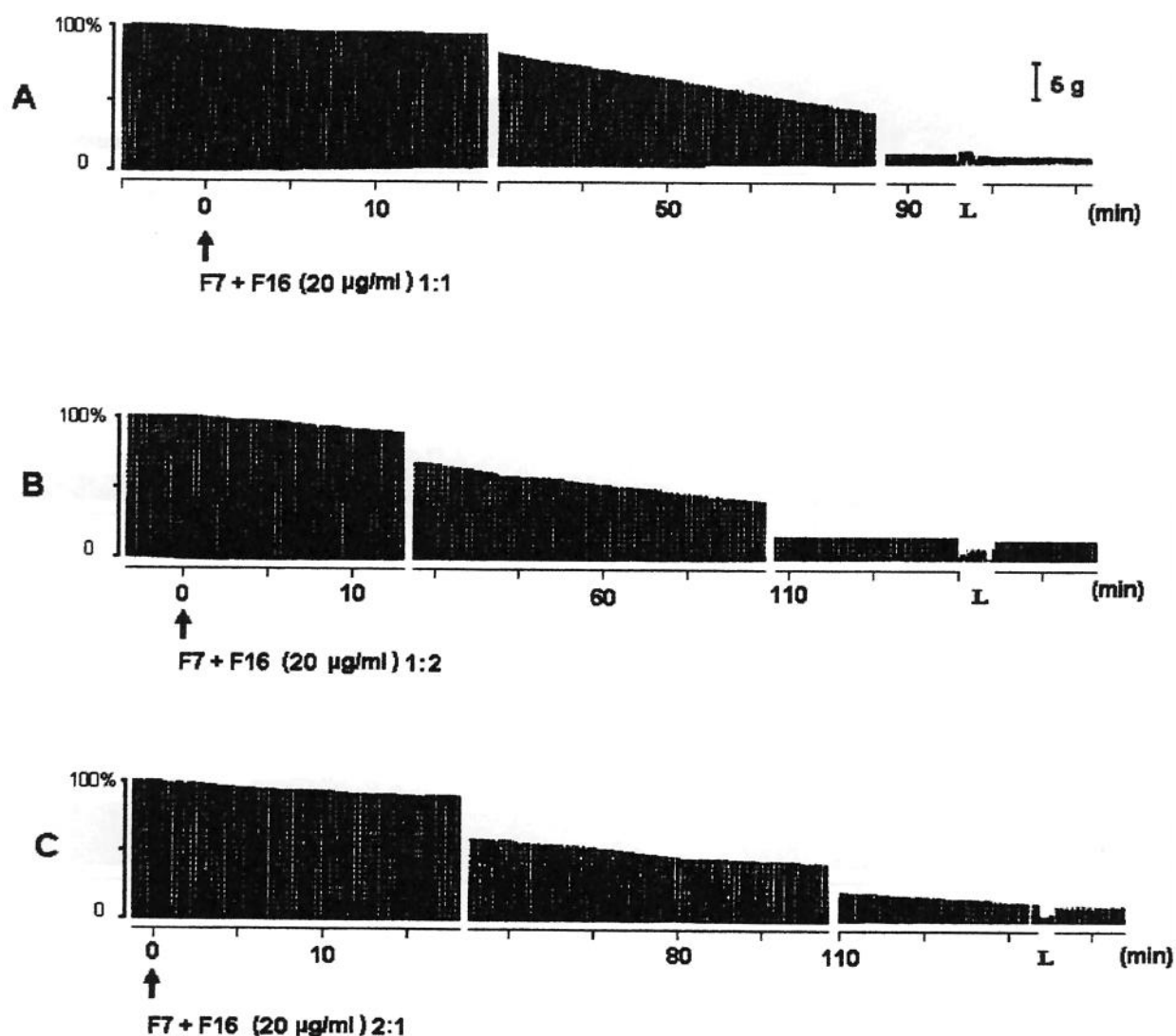


Figura 19 Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina (Crotapotina F7 e PLA₂ F16) (Preparação NFD. Estímulo indireto. Em A e B registros miográficos, demonstrando o bloqueio nas proporções de 1:1, 1:2 e C, a proporção de 2:1 (Dose de 20 µg/ml. ↑, adição da fração. L, lavagem.

4.6.4 Recombinação da Crotopotina (F 7) + PLA₂ (F 17) nas proporções 1:1; 1:2 e 2:1

Na recombinação das proporções 1:1; 1:2 e 2:1, nas doses de 10 µg/ml e 20 µg/ml (n=3), neste tipo de experimentos não foram determinadas mudanças significativas na amplitude da resposta contrátil, quando comparada com a preparação do grupo-controle. (Fig. 20 A e 21 A; B e C) e (Fig. 20 B e 22 A; B e C).

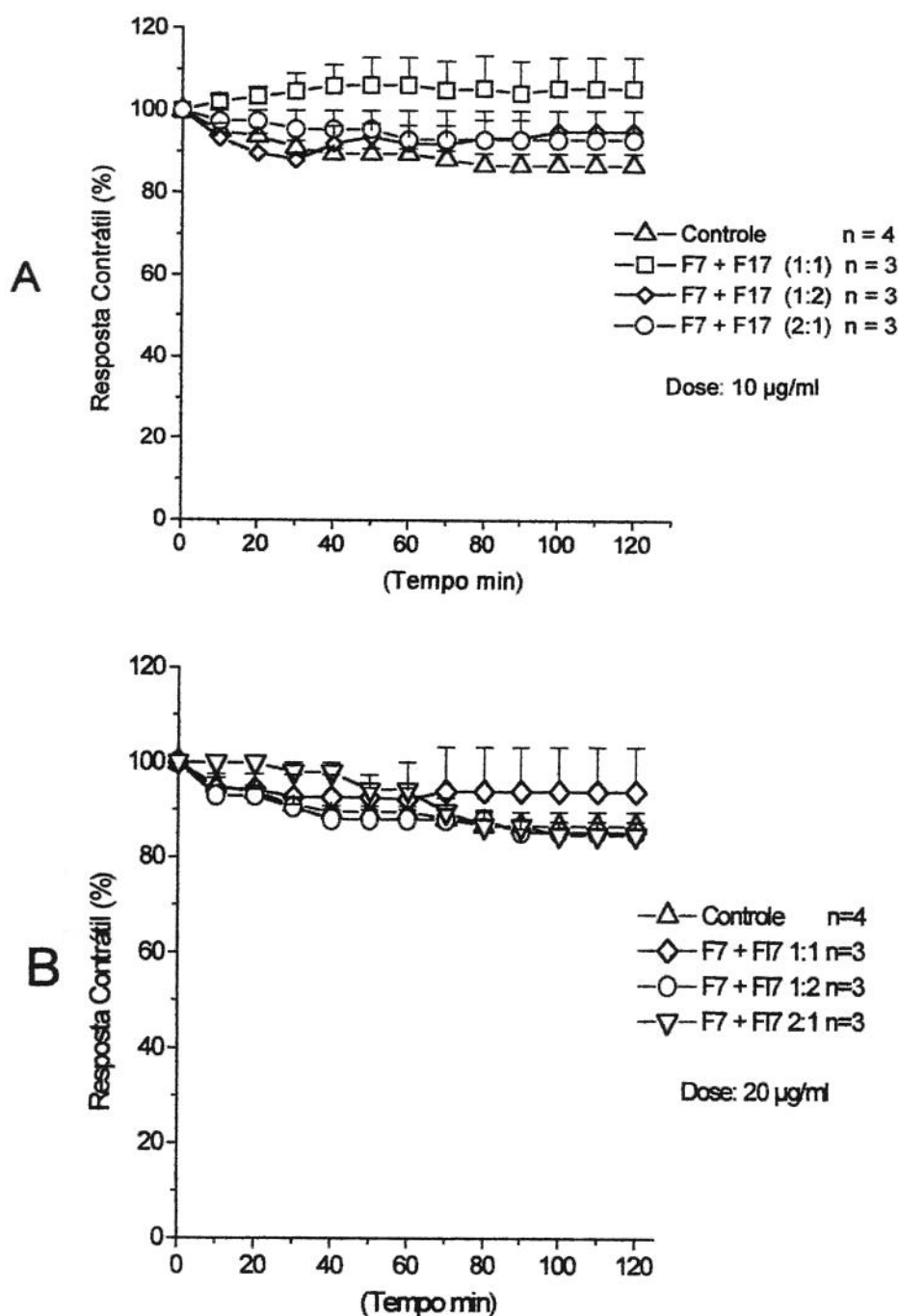


Figura 20 Representação gráfica do efeito da recombinação do complexo Crotoxina (Crotapotina F7 e PLA₂ F17), nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 nas doses de 10 µg/ml (gráfico A) e 20 µg/ml gráfico B, sobre a preparação NFD sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro-padrão.

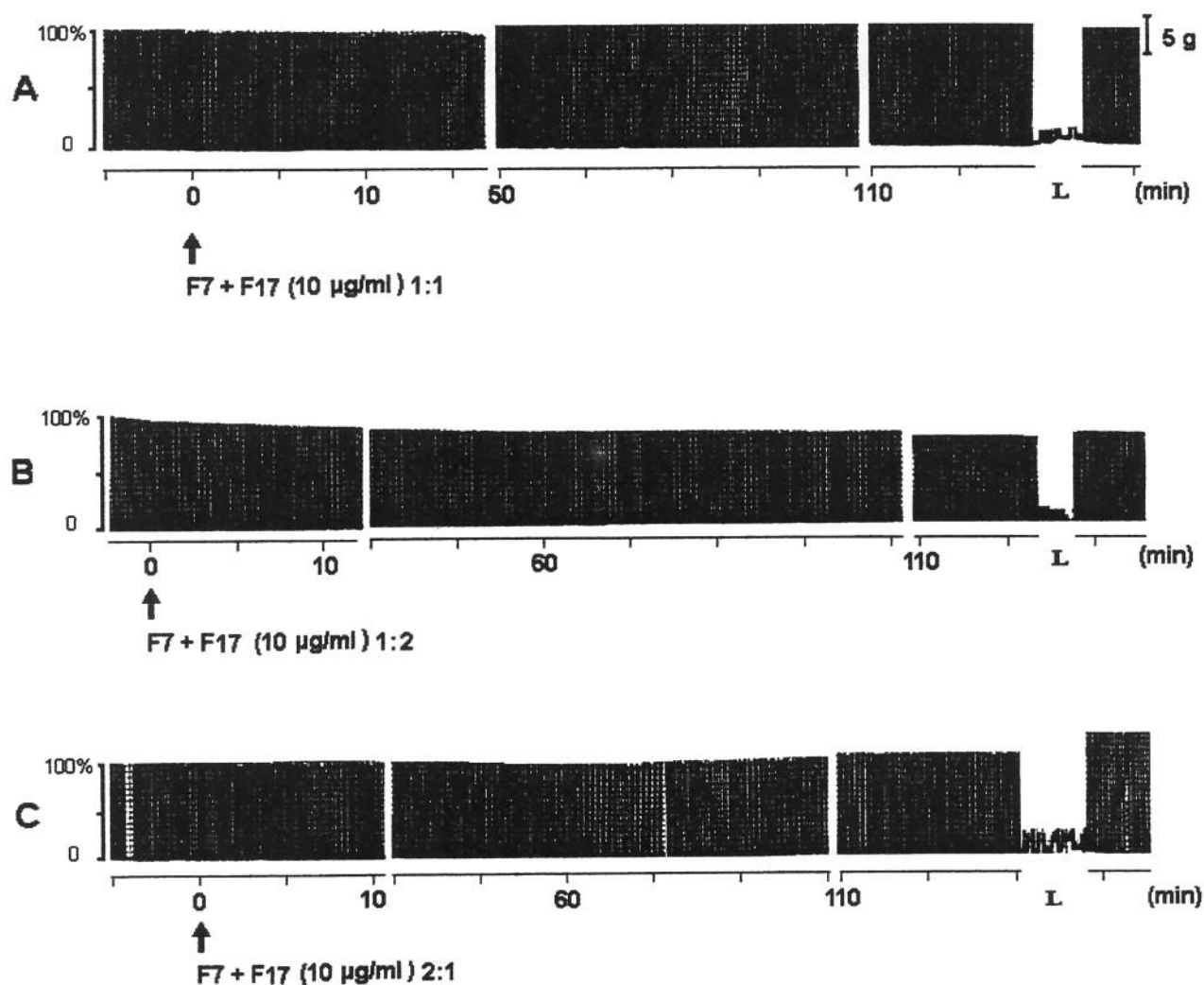


Figura 21 Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina (Crotapotina F7 e PLA₂ F17) (Preparação NFD. Estímulo indireto. Em A, B, e C registros miográficos, evidenciando-se as proporções 1:1, 1:2 e 2:1. Dose de 10 $\mu\text{g/ml}$. ↑, adição da fração. L, lavagem.

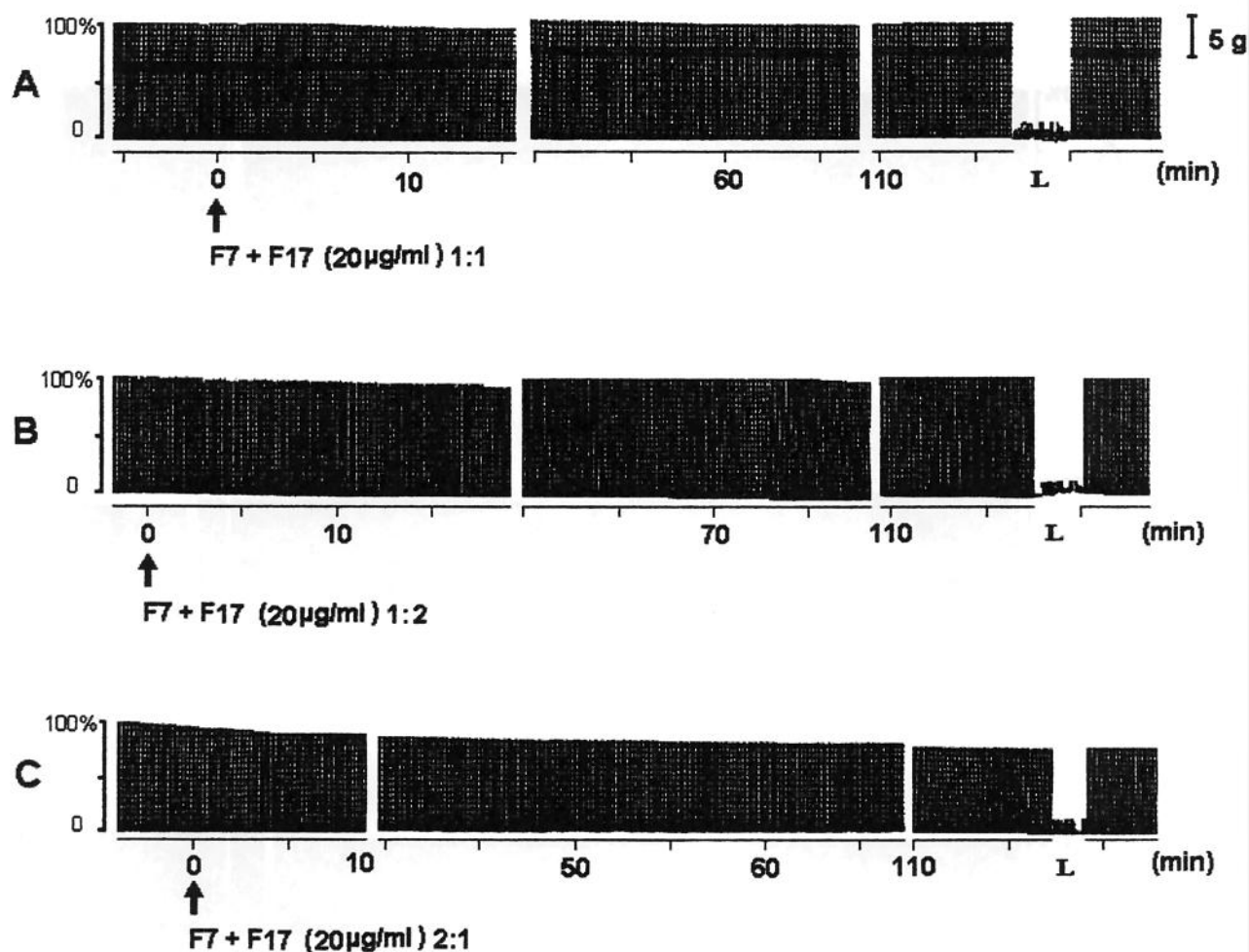


Figura 22 Efeito neuromuscular da recombinação do complexo crotoxina (Crotopotina F7 e PLA_2 F17) (Preparação NFD. Estímulo indireto. Em A, B, e C registros miográficos, evidenciando-se as proporções 1:1, 1:2 e 2:1. Dose de 20 $\mu\text{g/ml}$. $\uparrow$, adição da fração. L, lavagem.

5. DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

A purificação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (cdt) usando cromatografia convencional Sephadex G 75, no presente trabalho, confirmou a possibilidade de obter, além dos picos principais [(pico I) convulxina, (pico II) giroxina, (pico III) crotoxina e (pico IV) crotamina], estão três novos diferentes componentes, que fazem parte do complexo crotoxínico sendo: picos cdt_{III}, cdt_V e cdt_{VI}.

No entanto, a crotoxina isolada por gel filtração do veneno bruto em uma coluna Sephadex G 75, não mostrou seu característico efeito facilitador precedendo o bloqueio da neurotransmissão, como demonstrado por vários pesquisadores (LEE & HO 1982; CHANG, 1985; STRONG, 1987; RODRIGUES-SIMIONI & HAWGOOD, 1990). Este fato poderia ser justificado pela provável variação geográfica, e/ou pela quantidade de toxinas presentes no veneno, pois o teor de toxinas dependente de vários fatores como idade, sexo, alimentação e/ou habitat da serpente, além da diversidade quanto aos procedimentos de secagem e/ou estocagem do veneno. Assim, alguns autores têm demonstrado que, em geral, as serpentes recém-nascidas e/ou jovens da família Crotalidae possuem venenos mais ativos que os adultos (MINTON, 1967; FIERO *et al.*, 1972; REID & THEAKSTON, 1978; GUTIÉRREZ & CHAVES BOLAÑOS, 1980; MEIER & FREYVOGEL 1980).



Da nova metodologia usada na purificação do veneno total de *C.d.t.*, através da cromatografia de exclusão molecular em HPLC resultaram, além das frações já descritas (convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina), outras novas frações não descritas ainda na literatura sendo : cdy III, cdy V e cdy VI

A metodologia utilizada na purificação dos novos componentes, cdy III e cdy V, foi eficiente em dissociar a atividade facilitadora e bloqueadora da junção neuromuscular típica da crotoxina mostradas nas miografias. (Fig 10 A e B)

A crotoxina (cdy IV) caracterizada por esta nova metodologia mostrou o efeito facilitador seguido de um bloqueio irreversível, conforme descrito na literatura. De fato, é de se esperar que a ação pré- sináptica produza uma alteração trifásica na liberação evocada do transmissor (GOPALAKRISHNAKONE 1979; LEE & HO, 1982, CHANG 1985; STRONG, 1987; RODRIGUES-SIMIONI & HAWGOOD, 1990); sendo marcada por uma inibição inicial, atribuída à ligação da toxina ao sítio pré-sináptico específico, seguida por facilitação da liberação de ACh e progressiva depressão, até o bloqueio irreversível da transmissão. A crotoxina também bloqueia o aumento do efluxo de Na^+ de microvesículas excitáveis, causado pela carbamilcolina, em preparação de órgão elétrico de *Torpedo marmorata*, tendo portanto, ação pós-sináptica (BON *et al*; 1979). Já observada por VITAL BRAZIL (1966) em preparação isolada de diafragma cronicamente desnervado de rato.

A metodologia empregada neste trabalho na (re) purificação do complexo crotoxina, resultando em suas subunidades crotapotina e PLA_2 , difere da descrita anteriormente, tanto no emprego do tipo de colunas como nos procedimentos.



Esta metodologia não define o grau de purificação de isoformas e nem revela os novos componentes (cdy III, cdy V), que fazem parte do complexo crotoxinico, conforme encontrados neste trabalho.

A metodologia empregada na purificação de crotoxina, bem como nas das isoformas de suas subunidades (F5 e F7, crotapotina; F16 e F17, PLA₂) através de cromatografia em HPLC de fase reversa, usando uma coluna μ -Bondapack C 18, foi a mesma e empregada nos trabalhos de caracterização farmacológica por LANDUCCI *et al.*, 1995a, mostrando o grau de pureza dessas isoformas o que otimiza os procedimentos.

VALENTE *et al.*, 1998, utilizando o mesmo sistema cromatográfico porém utilizando um gradiente linear de acetonitrilo de 66%, evidenciaram as isoformas de PLA₂ denominadas F1; F2 e F3 e uma de crotapotina, do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*.

As técnicas empregadas por nós, neste trabalho, foram as mesmas descritas por VALENTE *et al.* (1998) e frações obtidas valendo-se da crotoxina, mostram a presença de isoformas de crotapotina (F5 e F7) e isoformas de fosfolipase PLA₂ (F15, F16 e F17), purificadas em uma coluna μ -Bondapack C 18 acoplado a um sistema de HPLC de fase reversa, com um gradiente linear de acetonitrilo 66%.

A ausência de atividade biológica exibida pelas isoformas ensaiadas, isoladamente a crotapotina (F7) e a PLA₂ (F16), confirma o que foi descrito na literatura para a crotoxina sobre a separação dos seus componentes e a

conseqüente perda de toxicidade sendo dez vezes menor que quando encontrados na forma associada (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938; CHANG & LEE, 1977; HAWGOOD & SANTANA DE SA, 1979).

A ação do efeito sinérgico do complexo crotoxina descrito segundo HAWGOOD & SMITH, 1977; .BON, 1982; FAURE & BON, 1987, KINI, 1997 foi evidenciada nas recombinações de crotapotina (F7) com fosfolipase A₂ (16). DÉLOT & BON (1993), descreveram dois modelos para o complexo crotoxina, a saber o da dissociação e do complexo ternário transiente. O primeiro modelo diz que quando a crotoxina se aproxima do seu receptor na membrana celular, a crotapotina se dissocia da PLA₂ deixando-a livre para se ligar ao receptor. No segundo modelo, a crotoxina primeiramente se une ao receptor da membrana e só então ocorre a dissociação de seus componentes, com a liberação da crotapotina, enquanto a PLA₂ permanece ligada ao receptor.

As recombinações nas proporções 1:1 e 1:2 nas doses de 10µg/ml de crotapotina (F7) com (F16), e nas doses de 20 µg/ml nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, mostram o efeito bloqueador irreversível descrito anteriormente (HAWGOOD & SMITH, 1977), sugerindo que as subunidades do complexo fosfolipase A₂ e crotapotina têm um sítio de ação pré- sináptico e podem interferir no acoplamento excitação-secreção no terminal nervo motor.

As associações realizadas neste trabalho entre a crotapotina (F7) e a PLA₂ (F16) associadas na proporção 1:1 mostraram que esta foi eficiente em recuperar o efeito bloqueador irreversível da resposta contrátil, reproduzindo o mesmo efeito

da crotoxina nativa, ao contrário da ausência de boqueio neuromuscular observada nos experimentos em que as isoformas foram ensaiadas isoladamente.

As PLA₂ são consideradas uma família de proteínas de peso molecular relativamente baixo, variando entre 12.000 e 15.000, tendo um número elevado de pontes dissulfeto e que apresentam considerável resistência aos detergentes, às variações de pH e às altas temperaturas. Além disso, apresentam razoável homologia entre si, em termos de sequência de aminoácidos, exceto a PLA₂ do veneno de abelha que se diferencia por ser uma glicoproteína (CHANG *et al.*, 1987).

Nossos estudos, realizados nas associações crotapotina (F7) e PLA₂ (F17), em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo, não alteraram o padrão de resposta contrátil nessas preparações neuromusculares em todas as proporções, 1:1, 1:2 e 2:1, sugerindo que não são todas as PLA₂ que formam o complexo crotox. Este fato pode estar ligado à ação da crotapotina, uma vez que o mecanismo desta continua a ser investigado, e como esta proteína é capaz de potenciar um efeito farmacológico ou modificar uma atividade biológica ainda não foi elucidado.

Isoformas de PLA₂ de um mesmo veneno também exibem diferentes efeitos farmacológicos, dentre estes, como já citados, seriam os neurotóxicos, miotóxicos e anticoagulante. (KINI, 1997)

Mesmo com o avanço da compreensão estrutural, funcional e do sítio de ação destas PLA₂, muitos dos aspectos do mecanismo dos eventos farmacológicos ainda permanecem desconhecidos.

6. CONCLUSÃO



6. CONCLUSÕES

Com base no exposto neste trabalho conclui-se que:

✓ 1º) A partir do veneno total de *C.d.terrificus*, através da cromatografia de uma coluna de exclusão molecular Protein pack SW 300 acoplada ao sistema de HPLC, foram revelados dois novos componentes do complexo crotoxina correspondente aos picos cdtv III e cdtv V. Destes o pico cdtv III se caracterizou pela ausência total de atividade bloqueadora neuromuscular e pelo persistente efeito facilitador da neurotransmissão.

✓ 2º) A metodologia utilizada na purificação dos novos componentes, foi eficiente em dissociar a atividade facilitadora daquela bloqueadora típica da crotoxina.

✓ 3º) A repurificação da crotoxina correspondente ao pico IV, obtida em uma coluna μ -Bondapack C 18 acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa, resolveu-se em duas isoformas de fosfolipase A_2 (F16 e F17) e uma de crotaipotina (F7). A associação de ambas ((1)crotaipotina e (1) fosfolipase A_2) restaurou a atividade bloqueadora neuromuscular do complexo crotoxina .

✓ 4º) A associação da crotaipotina (F7) com fosfolipase (F17), mostrou-se isenta de atividade boqueadora neuromuscular, sugerindo que não são todas as PLA_2 que formam o complexo crotoxínico.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

7. SUMMARY



7. SUMMARY

The species *Crotalus durissus*, popularly known as rattlesnakes, includes serpents of great medical importance in South America. The poison of that serpent has been object of studies for more than a century, as shown by the studies accomplished by BRAZIL, 1903, SLOTTA & FRAENKEL CONRAT, 1938 and VITAL BRAZIL, 1966 and so many others.

Through gel filtration of the crude poison in a column Sephadex G 75, shows the presence of four picks, (pick I) convulxin, (pick II) gyroxin, (pick III) crotoxin and (pick IV) crotoamine were obtained.

When the (pick III) crotoxin was tested, in the phrenic nerve-diaphragm preparation it showed the characteristic block neuromuscular effect.

When *Crotalus durissus terrificus* (cdty) was subjected to the molecular exclusion chromatography (protein pack SW 300) at isocratic conditions, besides the main picks three new components were obtained pick: III; V and VI. Crotoxin was there identified, as pick IV. Able of inducing initial facilitation followed by an irreversible block. Peak cdty III showed a facilitation effect that duers at least 120 min. The Pick V presented a light facilitation and a decrease of the contractile response during the course time of experiments



The use of this chromatography determined the dissociation of the facilitatory effects and blocking characteristic neuromuscular of the crotoxin.

% OF BLOCK EFFECT F7 + F16

1:1	1:2	2:1
100%	75%	25%

The block effect induced by these different mixtures was 100% (for 1:1); 75% (for 1:2) and 25% (for 2:1). In none of these situation the facilitatory effect was observed.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNI, R. K.; WARD, R. J.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R. - Crystallization and preliminary diffraction data of BthTX-I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon** 33:383-386, 1995.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. - Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon** 23:631-636, 1982.
- BARBARA, J., HAWGOOD J., W., SMITH. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapectin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. **Br. J. Pharmac.** 61: 597-606. 1977.
- BARRABIN, H., MARTIARENA, J.L., VIDAL, J.C., BARRIO, A., Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In Animal Plant and Microbial Toxins, P. Rosenberg (Ed). **Pergamon Press, Oxford**: 113-133, 1978.
- BARRIO, A.- Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Lat. Am.** 11: 224, 1961
- BARRIO, A. & VITAL-BRAZIL, O. - Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus* (Laur.) poisons. **Acta Physiol. Latinoamericana** 1:291-308, 1951.
- BERCOVICCI, D.; CHUDZINISKI, A. M.; DIAS, W. O.; ESTEVES, M. I.; HIRAICHI, E.; OISHI, N. Y.; PICARELLI, Z. P.; ROCHA, M. C.; UEDA, C. M. P. M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan** 49:69-78, 1987.
- BIEBER, A L., TU, A.T., - Studies of an acidic cardiotoxin isolated from the venom of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*). **Biochim. Biophys. Acta** 400: 178-188, 1975.



- BON, C.; CHANGEAUX, J-P.; JENG,T-W.; FRAENKEL-CONRAT, H. - Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.** **99**:471-481, 1979.
- BON, .C., - Synergism of the two subunits of crotoxin. **Toxicon** **20**:105-109, 1982.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. - Crotoxin, half-century of investigations of a PLA₂ neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamer.** **39**: 439-448, 1989.
- BON, C.; - Synergism of the two subunits of crotoxin. **Toxicon** **2**,105-109,1992.
- BON, C. Multicomponent Neurotoxic Phospholipases A₂. In:Venom Phospholipase A₂ Enzymes, Structure,Function and Metabolism, Kini, M.R. (edt)., cap11, pp 269 - 285. John Wiley & Sons - Chichester, New York, Weinheim, Brisbane,Singapore, Toronto, 1997
- BORGES, R. C. – Serpentes Peçonhentas Brasileiras – Schvartsman, S. (Ed) Sarvier, 1999.
- BOUCHIER, C.; BOULAIN, J.; BON,C.; and MENEZ, A.; - Analysis of cDNAs encoding two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rats snake venom: phospholipase A₂ - like precursor. **Biochem. Biophys. Acta.** **1088**: 401-408, 1991.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE - **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF, (no prelo), 1998.
- BRASIL. MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - **Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento**. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993.
- BRAZIL, V. - Contribuição ao estudo do veneno ophidico III. Tratamento das mordeduras de cobras. **Rev. Med. de São Paulo** **6**:265, 1903.
- BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA - Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. **Rev. Med. de São Paulo** **19**, **21** e **22**, 1909.

- BRAZIL, V. - *La défense contre l'ophidisme*. 2 ed., Pocaí & Weiss, São Paulo, 48. 1911.
- BREITHAUPT, H., OMORI-SATOH, T., LANG, J.- Isolation and characterization of three phospholipase A₂ from the crotoxin complex. **Biochem. biophys. Acta.** **403**: 355-369, 1975.
- BREITHAUPT, H. - Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A and its complex with crotapotin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.** **292**:271-278, 1976.
- BÜLBRING, E. - Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmac.** **1**:38-61, 1946.
- CAMPBELL, J.A, LAMAR, W.W. - The venons reptiles of Latin America. **Ithaca London**, 425, 1989.
- CANZINI, G., A, SEKI, C., VIDAL, J., C. - Dissociation of the crotoxin complex promoted by acetylcholine. **Acta Pharmacol. Latinoam** **35**: 165-180. 1985.
- CHANG, C.C., LEE, C. Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther** **144**: 241-257, 1963.
- CHANG, C. C., & LEE, J., D. - Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a pre-synaptic toxin acting like β -bungarotoxin. **Naunyn - Schmiedeberg's Arch Pharmacol** **296**: 159-168, 1977.
- CHANG, C. C. & TSENG, K. - Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.** **63**:551-559, 1978.
- CHANG, C. C.,& SU, M., J. - A study on the interaction of crotapotin with crotoxin phospholipase A₂, notexin and other presynaptic neurotoxins. **Br. J. Pharmacol.** **73** (2): 495-503, 1982.
- CHANG, C. C. - Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. **Proc. Natn. Sci. Council, R.O.C.** **B9**:126-142, 1985.
- CHANG, J., MUSSER, J., H., MCGREGOR, H. - Phospholipase A₂ function and pharmacological regulation. **Biochem. Pharmacol.** **36**: 2429-2436, 1987.

- CHO. W. AND KÉZDY. F.J.- Chromogenic substrate and assay of phospholipase A₂. in Method in Enzymology .**Academic Press 197**: 75-79,. 1991.
- CHOUMET, V., SALIOU, B., FIDELER, L., CHEN, Y-C, GUBENSEK, F., BON, C. AND DELOT, E. - Snake – venom phospholipase A₂ neurotoxins. Potencialization of a single-chain neurotoxin by the charperon subunit of a two-componet neurotoxin. **Eur. J. Biochem. 211**: 57 – 62, 1993.
- CLARCK, J.D., MILONA, N., KNOFF, J., L. –Purification os a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A₂ from the human monocytic cell line U937. **Proc Natl. Acad Sci USA 87**:7708-7712, 1990.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. - Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82**:924-929, 1988.
- DENNIS, E. A . - Regulation of eicosanoid production: role of phospholipase and inhibitors. **Bio Technology 5**: 1294-1300, 1987.
- DENNIS, E. A . – Diversity of groups types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J.Biol Chem 269 (18)**: 13057-13060. 1994.
- DELOT, E.& BON, C. – Model for the interaction of crotoxin, a Phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry 32**: 10708-10713, 1993.
- FAURE, G.& BON, C.- Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon 25**: 229-234. 1987.
- FAURE, G.& BON, C.- Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the south American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom. Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry 27**: 730-738, 1988.
- FAURE, G., GUILAUME, J.L., CAMOIN, L., SALIOU, B., BON, C. - Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry 30**: 8074-8083, 1991.

- FAURE, G., CHOUMET, V, BOUCHIER, C., CAMOIN, L., GUILLAUME, J-L., MONEGIER, B., VULLORGNE, M. AND BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.** **233**: 161 – 164, 1994.
- FIERO, M., K., SEIFERT, M., W., WEAVER, T., J., BONILLA, C., A. Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus v. viridis*) venoms. **Toxicon** **10**: 81-82, 1972.
- FORMELA, L., J., GALLOWAY, S., W & KINGSNORTH., A, N. – Inflammatory mediators in acute pancreatitis. **Br. J. Surg.** **82** (1): 6-13, 1995.
- FORSTER, S., ILDERTON, E., NORRIS, J., SUMMERLY, R. & YARDELEY, H. – Characterization and activity of phospholipase A2 in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with of psoriasis or eczema. **Br. J. Dermatol.** **112**: 135-147, 1985.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T. W.; HSIANG, H. - Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In: (EAKER, D. & WADSTROM, T., eds.) **Natural Toxins**. Oxford, Pergamon Press, 561-567. 1980.
- GLASER, K., B., MOBILIO, D., CHANG, J.,Y., & SENKO, N. – Phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. **Trend Pharmacol. Sci** **14**: (3): 92-98-1993.
- GONÇALVES, J.M., POLSON, A.- The electrophoretic analysis of snake venoms. **Arch. Biochem.** **13**: 253-259, 1947.
- GONÇALVES, J.M. & Vieira, L.G. Estudos sobre veneno de serpentes brasileiras-I. Análise eletroforetica. **Ann. Acad. Bras. Cien.** **22**: 141-149. 1950.
- GONÇALVES, J.M.- Purification and properties of crotoxin. In. **Venoms**. (Buckley, E.E. and Porges, N. Eds). Washington: Am. Assoc. Adv. Sci: **44**: 261 – 273, 1956.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. & HAWGOOD, B. J. – Morphological changes in murine nerve, neuromuscular junction and skeletal muscle induced by the crotoxin complex. **J. Physiol** **291**: 5-6, 1979.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. & HAWGOOD, B. J. - Morphological changes

- induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon** 22:791-804, 1984.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J.; and ELDER, H.Y.; Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon** 22: 85-98, 1984.
- GUTIÉRREZ, J., M., CHAVES, F., BOLANOS, R. – Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. **Ver. Biol. Trop.** 28:341, 1980.
- HABERMANN, E., & BREITHAUPT, H., - Mini-review. The crotoxin complex an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon** 16: 19-30, 1978.
- HANAHAN, D., J. Phospholipase. *The Enzymes*, 71-85, 1971.
- HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A.; MACDONELL, C. A. - Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins. In: (EAKER, D. & WADSTRÖM, T., eds.) **Natural Toxins**. Oxford, Pergamon Press, 569-578, 1980.
- HARRIS, J. B. & MACDONELL, C.A. - Phospholipase A₂ activity of notexin and its role in muscle damage. **Toxicon** 19:419-430, 1981.
- HARRIS, J. B. & CULLEN, M. J. - Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc. Rev.** 3:183-211, 1990.
- HAWGOOD, B., J., SANTANA-DE-SA, S. – Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience** 4: 293-303, 1979.
- HAWGOOD, B., J., SMITH, J., W. – The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotoxin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. **Br. J. Pharmacol.** 61:597-606, 1977.
- HAWGOOD, B., J., SMITH, I., C., STRONG, P., N. - Early induction by crotoxin of biphasic frequency giant miniature endplate potentials in frog muscle. **Br. J. Pharmacol.** 94: 765-772. 1988.

- HAWGOOD, B., J., SMITH, I., C. – The importance of phospholipase A₂ in the early in crotoxin of biphasic changes in endplate potential neuromuscular junction. **Toxicon** 27: 272-276, 1989.
- HENDON, R. A. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Biological role of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 68:1560-1563, 1971.
- HENDON, R. A, TU, A, T. – The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. **Biochim. Biophys. Acta** 578 (1): 243-252, 1979.
- IWANAGA, S. OHSHIMA, G. AND SUZEK, I. Proteinase from the venom of Agkistrodon Halys Blomhoffi. In: Lorand, L. (Ed). **Methods In Enzimology** Vol. XlVb. Academic press, 1976.
- IWANAGA, S. AND SUZUKI, T. - Enzymes in Snake Venom. In: Snake Venoms. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Lee, C.Y. vol. 52, cap. 4, pp 105. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.,1979
- JAIN, M., K., YU, B., Z., ROGERS, J., RANADIVE, G., N., BERG, O G. – Interfacial catalysis by phospholipase A₂ dissociation constants for calcium, substrate, products and competitive inhibitors. **Biochemistry** 30: 7306-7317. 1991.
- JANZEN D. H. – História Natural Costa Rica. P. 331-332,1991.
- KARLSSON, E., - Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): **Handbook of Experimental Pharmacology**, 159-212. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1979.
- KATTAH., L., S., SANTORO, M., M., DINIZ, C., R., DE LIMA, M., E. – Crotoxin, the major toxin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, inhibits ³H-choline uptake in guinea pig ileum. **Braz. J. Med Biol. Res.** 33: 1093-1097, 2000.
- KINI , R. M. & EVANS, H. J. - A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon** 27:613-635, 1989.
- KINI, R., M. – Venom phospholipase A₂ enzymes – Structure, Function and Mechanism. (Ed) R.Manjunatha Kini, 1997
- KRAMER, R., M., HESSION, C., JOHANSEN, B., HAYES, G., MACGRAY, P., CHOW, P.E., TIZARD, R. PEPINSKY, R., B. – Structure and properties of a human nonpancreatic phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.** 264: 57-68, 1989.
- KRIZAJ, I., FAURE, G., GUBENSEK, F., BON, C. – Re-examination of crotoxin-

- membrane interactions. **Toxicon** 34: 1003-1009. 1996.
- LANDUCCI, E. C. T.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A. C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. - Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon** 32: 217-226, 1995a.
- LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; DONATO, J., L., FARO, R., HYSLOP, S., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., CIRINO, G., NUCCI, G. - Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **British Journal of Pharmacology** 114,: 578-583. 1995b.
- LASKOWSKY, M. Venoms exonucleases. In boyer, P.D. (Ed) **Enzymes, Vol 4 New York London: Academic Press**, 1991.
- LEE, C. Y. & HO, C. L. - The pharmacology of phospholipases A₂ isolated from snake venoms with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In: (YOSHIDA, H., HAGIHARA, Y.; EBASHI, S, eds.) **Advances in Pharmacology and Therapeutics**. vol. 4. Oxford, Pergamon Press, .37-52.1982.
- LIN-SHIAU, S., Y., FU, W., M. - Antagonistic action of uranyl nitrate on presynaptic neurotoxins from snake venoms. **Neuropharmacology** 25: 95-101. 1986.
- LYONS-GIORDANO, B., DAVIS, G., L., GALBRATH, W., PRATTA, M., A, ARNER, E., C. - Interleukin-1 β stimulates phospholipase A₂ mRNA synthesis in rabbit articular chondrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 164-488, 1989.
- MACIN, A C; SOARES, A. M., GIGLIO, C.M., ADRIÃO-ESCARSO, S. H., VIEIRA, C. A, GIGLIO, J. R. The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipase A₂. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 42 (6): 1171-1177, 1997
- MCINTOSH, J.M.; GHOMASHCHI, F.; GELB, M.H.; DOOLEY, D.J.; STOEHR, S.J.; GIORDANI, A.B.; NAISBITT, S.R. Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. **J. Biol. Chem.** 270: 3518 - 3526, 1995

- MARLAS, G., BON, C., - Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. **Eur. J. Biochem** **125**:157-165. 1982.
- MARSHALL, L., A, ROSHAK, A – Co-existence of two biochemically distinct phospholipase A₂ activities in human platelet monocyte and neutrophil. **Biochem. Cell Biol.** **71**: 331-339, 1993.
- MAYER, F. K., LINKER, A. - Hialuronidasa. In: Bouer, P. D., LARDY, H., MYRBACK, K. (Ed) The enzymes. **Vol. 4 Academic Press**, 1960.
- McMAHAN, U.J.; SLATER, C.R. The influence of basal lamina on the accumulation of acetylcholine receptors at synaptic sites in regenerating muscles. **J.Cell Biol.**, **98**:1453-1473, 1984.
- MEBS, D., - A comparative study of enzyme activities in snake venoms . **Int. J. Biochem**:**1**: 335-342, 1970.
- MEBS , D. & SAMEJIMA, Y. - Isolation and characterization of myotoxic PLA₂ from crotalid venoms. **Toxicon** **24**:161-168, 1986.
- MEIER, J., 7 FREYVOGEL, T., A – Comparative studies on the venoms of the ferde-lance (*Bothrops atrox*) carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricollis*) snakes at different ages. **Toxicon** **18**:661, 1980.
- MEISTER, A, WELLNER, D., L-Amino acid oxidase. In flavins and flavoproteins, , E.C. Slater (ed). **Elsevier North –Holland, Amsterdam**: 226-241, 1965.
- MINTON, S., A – Observations on toxicity and antigenic make-up of venoms from juvenile snakes. In: **Animal Toxins** (RUSSEL, F., E., 7 SAUNDER, R., R., Eds), Oxford, Pergamon press, 211-222, 1967.
- MUKHERJEE, A, B., MIELE, L., PATTABIRAMAN, N. – Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochem. Pharmacol** **48**: 1-10, 1994.
- MURAKAMI, M., NAKATANI, Y., HARA, N., KUDO, I., IONE, K. – Role of phospholipase A₂ in mast cell activation and function. In: Phospholipase A₂ in Clinical inflammation: Molecular approaches to pathophysiology. (ed) By Glaser, K B & Vadas, P. (CRC Press, N.Y.), **5**: 93-124, 1995.
- MURATA, F., OGATA, T. The ultrastructure of neuromuscular junctions of Human red, white and intermediate striated muscle fibers. **Tohoku J. exp. Med**

- 99:289-301, 1969.
- PRADO-FRANCESCHI, J. AND BRAZIL, O. V.- Conculxina, uma nova neurotoxina de peçonha da *Crotalus durissus terrificus* , **Congresso Latamer. Cien. Fisiolo, Abstract, IX, Brazil**, 1969.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; TAVARES, D.A., HERTEL, R., & LOBO DE ARAUJO, A. E.; -Effects of convulxin a toxin from rattlesnake venom, on platelets and leukocyts of mesthetized rabbits. 1983.
- PRUZANSKI, W., VADAS, P., STEFANSKI, E., UROWITZ, M., B. – Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthrits and osteoarthritis: its possible role as proinflammatory enzyme. **J. Rheumatol.** 12: 211-220, 1985.
- RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. - Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 19:333-338, 1986.
- REID, H., A. & THEAKSTON, R., D., G. – Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snakes age. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 27: 1053, 1978.
- RODRIGUES-SIMIONI, L., HAWGOOD, B., J., SMITH, I., C. – Properties of the early phases of crotoxin poisoni neuromuscular junctions. **Toxicon** 28: 1479-1489. 1990.
- ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snakebites in South America. In: (BÜCHERL, W., BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V., eds.) **Venomous Animals and their venoms. Vol.2.** Academic Press, New York,. 345-395, 1971.
- RÜBSAMEN, K., BREITHAUPT, H. AND HEBERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. **Nauny Schmiedebergs Arch. Parmak.** 270: 247-288, 1971.
- RYDEN, L., GABEL, D. AND EAKER, D.- A model of tree-dimensional structure of snake venom neurotoxins based on chemical evidence. **int. J. Peptide Protein Res.** 5, 261, 1973
- SANTORO, M.L., SOUZA-SILVA, M.C., GONÇALVES, L.R.C., ALMEIDA- MEBS, D. & OWNBY, C. L. - Mytoxic components of snake venoms: their biochemical



- and biological activities. **Pharmac. Ther.** 48:223-236, 1990.
- SANTORO, M., L., SOUSA- E-SILVA, M., C., C., GONÇALVES, L., R., C., ALMEIDA-SANTOS, S., M., CARDOSO, D., F., LAPORTA-FERREIRA, I., L., SAIKI, M., PERES, C., A, SANO-MARTINS, I., S. – Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part 122**: 61-73, 1999.
- SANTOS, S.M., CARDOSO, D.F., LAPORTA-FERREIRA, I. A, SAIKI, C., PERES, C.A, SANO-MARTINS, I.,S. – Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C 122**: 61-73, 1999.
- SHIAU, S., Y., L., MIN-JON, L. – Suramin inhibits the toxic effects of presynaptic neurotoxins at the mouse motor nerve terminals. **European Journal of Pharmacology 382**: 75-80, 1999.
- SLOTBOOM, M., SIMIONESCU, N., SILBERT, J., E., PALADE, G., E. – phospholipids. Elsevier, Amsterdam. Hawthorne, J. N. and Ansell, G.B. (eds), 359-435, 1982.
- SLOTTA, K. H. & FRAENKEL-CONRAT. H. - Schlangengifte, III: Mitteilung Reiningung und Krystallization des klapperschlangengiffes. **Ber. Dtch. Chem. Ges.** 71:1076-1081, 1938.
- SMITH, L.A., SCHMIDT, J. - Cloning and nucleotide sequence of crotamine genes. **Toxicon 28(5)**: 575 – 585, 1990.
- STRONG, P. N. - Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: relationship between biochemical and electrophysiological approaches to the mechanism of toxin action. In: (DOWDALL, M. J. & HAWTHORNE, J. N., eds.) **The Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function**. Chichester, Ellis Horwood, .534-549. 1987.

- SU, M., J., CHANG, C., C. – Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A₂ activity (beta-bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). **Toxicon** 22: 631-640. 1984.
- TAKAYAMA, K., KUDO, I., KIM, D., K., NAGATA, K., NOZAWA, Y., IONE, K. – Purification and characterization of human platelet phospholipase A₂ which preferentially hydrolyses an arachidonoyl residue. **FEBS Lett.**, 282, 1991.
- TRIVEDI, S., KAISER, I., I., TANAKA, M., SIMPSON, L., L. – Pharmacologic experiments on the interaction between and the mammalian neuromuscular junction. **J. Pharmacol. Exp. Ther** 251: 490-496, 1989.
- TU, A. T. - **Venoms: chemistry and molecular biology**. New York, J. Wiley & Sons, 560, 1977.
- TU, A.T. – Chemistry of rattlesnake venoms in: **Rattlesnake venoms: their actions and treatment**. New York, Marcel Dekker, 1982.
- TU, A. T. & MORITA, M. - Attachment of rattlesnake venom myotoxin α to sarcoplasmic reticulum: peroxidase conjugated method. **Br. J. Exp. Pathol.** 64:633-637, 1983.
- TU, A.T.- Local tissue damaging (Hemorrhage and myonecrosis) toxins from rattlesnake and other pit viper venoms. **J. Toxicol-Toxin. Rev.** 2: 205 – 234. 1983
- VADAS P. & PRUZANSKI, W. – Biology Disease: Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. **Laboratory Investigation**, 55: 391-404. 1986.
- VALENTE, R.H., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., FERREIRA-DA-SILVA, L. MACEDO, D.V. - Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A₂ isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon** 36: 901-913, 1998.
- VAN DER BOSH, H. – Intracellular Phospholipase A . **Biochim. Biophys Acta** 604: 191-246, 1980.
- VARGAFTIG, B.B.; PRADO-FRANCESCHI, J., CHIGNARD, M.; LE FORT, J. & MARLAS, G., Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Eur. J.**

- Pharmacol** , **68**: 451, 1980.
- VERHEIJ , H., M., EGMOND, M., R., HAAS, G.H. – Chemical modification of the α -amino group in snake venom phospholipase A₂. A comparison of the interaction of pancreatic and venom phospholipase with lipid-water interfaces. **Biochemistry** **20**: 94-99, 1980.
- VERHEIJ , H., M., SLOTBOOM, A. J. & HASS DE, G. H. - Structure and function of phospholipase A₂. **Physiol. Biochem.Pharmacol**, **91**: 91-203, 1981.
- VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan** **33**:981-992, 1966.
- VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B.J. – Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol. (Lond)**. **212**:34 – 35-P, 1971.
- VITAL BRAZIL, O. - Venoms: their inhibitory action on neuromuscular transmission. **Int. Encycl. Pharmacol. Ther.** **14**:145-167, 1972.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M .D.; HELUANY, N. F. - Mode of action of crotoxin at the guinea-pig neuromuscular junction. **Toxicon** **17** (Suppl. n° 1):17, 1979.
- VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J.; LAURE, C. J. - Repetitive muscle responses induced by crotamine. **Toxicon** **17**:61-67, 1979.
- VITAL BRAZIL, O. - Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Med. Brasil.** **26**:212-218, 1980.
- VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: (CORBETT, C. E., ed.) **Farmacodinâmica**. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,. 1044-1074, 1982.
- WITTCOFF, H. The phosphatides. (Ed) **Reinhold Publising Corporation (New York)** 99, 1951.
- YANG, C. C. – Chemistry and evolution of toxins in snake venoms. **Toxicon** **12**, 1, 1974.
- YANG, C. C. – Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake venoms. **J. Toxicol**, **13** (2) :125-177, 1994.