

PATRÍCIA DOURADO COSTA

**AÇÃO DO VENENO TOTAL DE *Bothrops pirajai* E DE
SUAS FRAÇÕES MIOTÓXICAS PIRATOXINAS I e III
SOBRE A MUSCULATURA ESQUELÉTICA:
ESTUDOS *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Ciências na
área de Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Alice da Cruz-Höfling
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Léa Rodrigues-Simioni

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO	80/ 37743
PRIO.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/06/99
N.º CPD	

CM-00123805-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C823c

Costa, Patrícia Dourado

Ação do veneno total de *Bothrops pirajai* e de suas frações
miotóxicas piratoxinas I e III sobre a musculatura esquelética : estudos
"in vitro" / Patrícia Dourado Costa. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

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

1. Junção neuromuscular. 2. Cobra venenosa - Veneno - Efeito
fisiológico. 3. Músculos - Histopatologia 4. Microscopia eletrônica.
I. Maria Alice da Cruz-Höfling. II. Léa Rodrigues-Simioni. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof.^a. Dr.^a. Maria Alice da Cruz-Höfling

Membros:

1. Prof.^a. Dr.^a. Maria Alice da Cruz-Höfling

2. Prof. Dr. José Roberto Giglio

3. Prof. Dr. Humberto Santo-Neto

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

Data: 25/01/99

*Dedico este trabalho aos meus pais Vera Lúcia e
Fernando por toda dedicação, respeito e inesgotável amor*

Agradecimentos Especiais,

Aos meus irmãos Luciano, Fernandinho e Anna Andréa, que mesmo não entendendo a total complexidade deste trabalho, sempre souberam incentivar e apoiar a realização do mesmo.

Ao meu amor Marcus Alexandre pelo agradável companheirismo, imenso respeito, pela cumplicidade, pelo constante carinho e dedicação, pela infinita paciência e pelos dias e noites de intenso trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Alice da Cruz-Höfling por ter me recebido e acolhido com carinho e segurança. Pela orientação e inestimável dedicação que foram indispensáveis para a minha formação científica e pessoal. Muito obrigado por você ter acreditado em mim e ter me conduzido a prática da ciência.

À Profa. Léa Rodrigues-Simioni pela amizade, valiosa orientação e ensinamentos adquiridos durante esses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Luciano de Sousa Queiroz meus sinceros agradecimentos pelo seu precioso tempo dispensado na leitura e correção desta tese, os quais foram imprescindíveis no melhoramento da mesma.

Ao Prof. Stephen Hyslop pelas valiosas sugestões na revisão da tese e pelas traduções dos textos para o inglês.

Aos meus primeiros mestres Profa. Maria Astride S. Corrad e Prof. Sebastião R. Taboga por me iniciarem no mundo da pesquisa científica e pelo exemplo de profissionalismo acadêmico, respeito e humanidade.

Ao Prof. Dr. Marcos D. Fontana pela amizade e constante encorajamento, além do contagiante bom humor que foram essências para a minha formação e realização deste trabalho.

À Profa Drª Júlia Prado-Franceschi por ter me iniciado no campo da Farmacologia, pelos valiosos ensinamentos através dos preciosos "causos", pela agradável convivência e pela intensa vontade de viver que sempre me deram força para seguir em frente.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para melhoria do conteúdo e forma deste trabalho de tese.

Ao Prof. Hernandes Carvalho pela concessão do uso do fotomicroscópio.

Os meus sinceros agradecimentos à Profa Drª Sônia Bão da Universidade de Brasília pelos ensinamentos do processamento para microscopia eletrônica de transmissão.

Aos amigos da Farmaco Yoko, Stella, Carol, André e Toninho por sempre compartilharem seus conhecimentos com muita alegria e entusiasmo, pelo companheirismo e amizade tão gratificantes.

Aos amigos e "companheiros de luta" Luciana, Mônica, Júnior, Suzana, Gláucia e Celina pelos maravilhosos momentos vividos, pela amizade e pela grandiosa força nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão e amigo Sérgio L. Felisbino pelos inúmeros "socorros" nas fotografias e a amiga Patrícia Simone pelo constante apoio e incentivo em todos os passos deste trabalho.

À amiga Adrienne e à sua família por terem me recebido em sua casa com tanto carinho e alegria.

À minha irmã branca Fernanda B. Santos pela amizade incondicional, pelo imenso carinho, pelo essencial suporte emocional e constante presença em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos Patrícia Aline e Júlio cujas palavras são insuficientes para expressar todo o meu agradecimento, amor e amizade. Muito obrigado pela convivência e por tudo o que vocês fizeram por mim.

Aos amigos Gustavo H. da Silva e Gildo B. Leite pelo suporte técnico, interesse sempre notável e atenção constante dispensados em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho, e principalmente pela preciosa amizade. Minha especial gratidão.

Ao meu irmão Fernandinho pelo design da capa.

Aos secretários Gislaine, Rita, Solange e Wanderley da Farmacologia que com responsabilidade, atenção e paciência colaboraram no cumprimento de atividades imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Às secretárias e amigas Vaninha, Rita e Helena da Histologia pela constante participação, dedicação, apoio, paciência e carinho dedicados à mim. Muito Obrigado por tudo.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de Concentração em Farmacologia, da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP) por ter me recebido e possibilitado a execução deste trabalho.

Aos funcionários Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelos serviços prestados e alegre convívio.

Ao Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia/UNICAMP por possibilitar a execução de parte deste trabalho.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia-UNICAMP pelo apoio técnico e uso de seus equipamentos.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

E finalmente, à todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e para a minha formação pessoal e profissional.

Esta tese foi confeccionada de acordo com as novas instruções da CAPES, onde é incentivado a apresentação no formato de compilação de artigos para publicação.

Desta forma, o presente estudo consta de um trabalho aceito para publicação na revista inglesa TOXICON, um segundo trabalho a ser submetido em periódico a ser escolhido, e uma terceira parte que futuramente será escrita para publicação.

Além disso, no sentido de fornecer informações gerais, englobando os aspectos considerados nos diferentes artigos, esta tese apresenta uma introdução inclui os dados mais relevantes da literatura relacionados ao assunto, uma discussão geral, e conclusões que, também de forma geral, resumizam os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	
I- INTRODUÇÃO	1
1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES VENENOSAS	4
1.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	5
1.3 CARACTERÍSTICAS DAS SERPENTES VENENOSAS DO GÊNERO <i>Bothrops</i>	6
1.3.1 Ação coagulante	7
1.3.2 Ação hemorrágica	8
1.3.3 Ações edematogênica e inflamatória	9
1.3.4 Ação miotóxica	10
1.3.4.1 Peptídeos miotóxicos	11
1.3.4.2 Miotoxinas com atividades fosfolipásica A ₂ (PLA ₂) e neurotóxica (pré-sináptica)	12
1.3.4.3 Miotoxinas com e sem atividade PLA ₂ (PLA ₂ e PLA ₂ -"like")	12
1.3.4.4 Cardiotoxinas	14
1.4 PATOGÊNESE DA MIONECROSE INDUZIDA POR MIOTOXINAS PLA ₂ E PLA ₂ -"like"	15
1.5 CARACTERÍSTICAS DO VENENO DE <i>Bothrops pirajai</i>	19
II- OBJETIVOS	22
III- TRABALHOS PARA PUBLICAÇÃO	24
3.1 Effects of <i>Bothrops pirajai</i> venom on the mouse <i>extensor digitorum longus</i> (EDL) muscle preparation (no prelo)	26
3.2 Effects of myotoxin PrTX-III from <i>Bothrops pirajai</i> venom on the mouse <i>extensor digitorum longus</i> (EDL) muscle preparation (a ser submetido)	48
3.3 Resultados Adicionais	77
3.3.1 Análise ultraestrutural das lesões provocadas no músculo EDL de camundongos sob ação do veneno total da serpente <i>Bothrops pirajai</i>	78
3.3.2 Análise da atividade da fração miotóxica Piratoxina-I (PrTX-I) na preparação nervo-frênico diafragma de camundongos	91
IV- DISCUSSÃO GERAL	99

V-	CONCLUSÕES	107
VI-	ABSTRACT	109
VII-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
VIII-	APÊNDICE	131

Várias são as motivações que levam ao estudo de substâncias naturais podendo ser citadas, a caracterização dos seus princípios ativos e dos seus efeitos biológicos. Dentre estas, ocupam lugar de destaque os venenos ofídicos, uma vez que é freqüente o envenenamento acidental causado por picada de serpentes, nos países de clima tropical. No Brasil, os acidentes ofídicos representam problema de Saúde Pública, sendo o gênero *Bothrops* responsável por cerca de 90% dos casos. Dentre os efeitos sistêmicos e locais, destaca-se a mionecrose que se manifesta rapidamente, é de difícil controle e merece atenção especial nas estratégias de tratamento. A mionecrose é provocada por proteínas miotóxicas que atuam especificamente no sítio da picada. Frente à escassez de estudos quanto à ação biológica do veneno da serpente *Bothrops pirajai* ("jararacussu da Bahia") uma espécie rara e exclusiva do estado da Bahia e nordeste de Minas Gerais, o presente trabalho foi proposto com o objetivo de investigar as possíveis atividades miotóxica e neurotóxica do seu veneno total e de suas frações isoladas, Piratoxina-I (PrTX-I) e Piratoxina-III (PrTX-III). Para o estudo, foram utilizadas preparações neuromusculares, nervo frênico-diafragma (NFD) e *extensor longo dos dedos* (EDL) de camundongos. Os parâmetros utilizados foram a técnica miográfica, a determinação de creatinoquinase (CK), análise histológica e ultraestrutural. O veneno total e a fração PrTX-III nas doses de 10, 25 e 50 µg/ml causaram bloqueio dose-dependente da resposta contrátil do músculo EDL, alterações morfológicas e ultraestruturais com elevada liberação da enzima creatinoquinase (CK) na cuba. A miotoxina PrTX-I provocou bloqueio dose-dependente (doses de 5, 10 e 20 µg/ml) da resposta contrátil do músculo diafragma de camundongo e severa mionecrose constatada pela análise histológica do tecido. No entanto, esta fração não provocou alterações miográficas ou histológicas no músculo EDL. Essas diferenças quanto à sensibilidade foram provavelmente devidas às diferenças entre o EDL e o diafragma, que diferem quanto às quantidades de fibras de contração rápida e lenta. Nossos resultados sugerem que a miotoxina PrTX-I e a fração PrTX-III do veneno total de *B. pirajai* seriam os componentes responsáveis pela atividade miotóxica do veneno, muito embora haja evidência de que seus modos de ação podem ser distintos. Além disso, os resultados preliminares com a fração PrTX-III apontam para uma potente ação neurotóxica, fato observado também com o veneno total.

I-INTRODUÇÃO

As serpentes são répteis que se caracterizam, sobretudo, por serem desprovidos de membros, pálpebras móveis, ouvido externo, cavidade do ouvido médio, e tímpano. A mandíbula é composta de duas metades ligadas anteriormente por um ligamento frouxo, fato esse que, entre outros, permite a deglutição de presas muito grandes (HOGE & ROMANO-HOGE, 1972).

A classificação das serpentes na categoria de peçonhentas é baseada na presença de dentes inoculadores da peçonha na vítima. Existe uma relação direta entre o número de acidentes ofídicos e as características adaptativas da dentição para exercer o papel de agente inoculador. Baseado neste aspecto, serpentes com presas anteriores bem desenvolvidas, com grande mobilidade e que possuem no interior dessas presas um ducto excretor conectado à glândula produtora da peçonha, são aquelas consideradas peçonhentas, mais hábeis na sua capacidade de inocular o veneno na vítima, causando portanto maior número de acidentes. À este grupo denominado de **Solenóglifas**, pertencem as serpentes da família Viperidae. As **Proteróglifas** possuem os dentes inoculadores conectados à glândula de veneno e providos de sulcos por onde escoar o veneno, localizados na região anterior da boca, sendo portanto capazes de inocular o veneno na presa no ato da mordida; as **Opistóglifas** diferenciam-se das anteriores por possuírem estes tipos de dentes localizados posteriormente à boca; e as **Áglifas** por não possuírem dentes inoculadores de veneno (*cf.* VITAL BRAZIL, 1982).

As serpentes vivas mais primitivas são consideradas as Typhlopidae (Scolephidia, UNDERWOOD, 1967) e não mostram sinais de secreções biologicamente ativas na boca. Elas não possuem glândulas dentais e podem representar linhas evolucionárias onde essas glândulas foram perdidas (KOCHVA, 1987). Há hoje um consenso sobre a origem das serpentes, que

teriam nos lagartos ou em alguns ancestrais dos lagartos, os seus parentes primitivos (RIEPEL, 1979). Nesse sentido, as glândulas de veneno das serpentes situadas nas mandíbulas superiores seriam modificações das glândulas dos lagartos, que, nestes animais, estão presentes tanto nas mandíbulas inferiores como superiores. A princípio essas glândulas secretavam uma mistura de enzimas que, além da função digestiva, serviam para enfraquecer a presa, propiciando facilidades e segurança para o seu manuseio. Estas secreções enzimáticas modificaram-se posteriormente para substâncias com atividade tóxica. O veneno das serpentes, portanto, é produzido por um par de glândulas exócrinas especializadas, que são glândulas salivares modificadas, situadas na boca. É constituído de uma complexa mistura de moléculas de natureza química diversa e diferentes ações, tanto nas presas como no homem (JIMÉNEZ- PORRAS, 1970; TU, 1977). Dentre os componentes, aproximadamente 90% são proteínas, dotadas de atividades enzimáticas e/ou tóxicas, tais como, fosfolipases, fosfodiesterases, fosfatases, acetilcolinesterases e enzimas proteolíticas. Os 10% restantes são compostos não-proteicos como carboidratos, fosfolipídeos, aminas biogênicas, peptídios, nucleotídeos e íons (BIEBER, 1979; BJARNASON & FOX, 1994). Estes componentes têm como função primária imobilizar ou matar a presa, e em seguida digerí-la. O sucesso da captura e digestão da presa deve-se às atividades neurotóxica (pré/pós-sináptica), cardiotoxica, miotóxica, coagulante, anticoagulante, hemorrágica e, direta ou indiretamente, nefrotóxica ou hepatotóxica do veneno, além de ações de natureza sistêmica. Essas atividades, tanto em acidentes humanos como causadas experimentalmente, são devidas a efeitos aditivos ou sinérgicos, e também antagônicos das diferentes toxinas e enzimas presentes nos venenos, que atuam quer indiretamente através de liberação de substâncias

farmacologicamente ativas, quer diretamente através de ações nas membranas celulares (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989).

A busca conhecimento da estrutura química de toxinas de serpentes e suas propriedades farmacológicas tem sido largamente explorado desde a década de 60, e desde então tem despertado forte interesse científico. Toxinas ofídicas são valiosas ferramentas para elucidação dos complexos processos biológicos, principalmente em nível molecular, de fenômenos fisiológicos, farmacológicos e fisiopatológicos (KARLSSON, 1979; TU, 1977).

1.1 - CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES VENENOSAS

Em todo o mundo existem, aproximadamente, 2.300 espécies de serpentes, das quais cerca de 240 pertencem à Família Elapidae e 170 à Família Viperidae (KOCHVA, 1987). No Brasil, existem cerca de 250 espécies de serpentes que estão distribuídas em nove famílias. Destas, a Elapidae e a Viperidae englobam as 70 espécies de serpentes venenosas. O gênero *Micrurus* (cujas espécies são popularmente conhecidas como corais) é o único representante da família Elapidae no Brasil. Os representantes da família Viperidae, subfamília Crotalinae, pertencem aos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus) (cf. VITAL BRAZIL, 1982). Esses representantes são particularmente importantes do ponto de vista médico-epidemiológico para o continente americano, uma vez que essas serpentes são abundantes nas América do Norte, Central e do Sul, são Solenóglifas, possuem veneno com potente ação tóxica de longo espectro, características que as colocam no topo da lista como causadoras de acidentes ofídicos de importância médica.

1.2 - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

No Brasil, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993 os acidentes ofídicos notificados com informação do gênero da serpente indicaram que 90,5% foram por *Bothrops*; 7,7%, por *Crotalus*; 1,4% por *Lachesis* e 0,4% por *Micrurus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

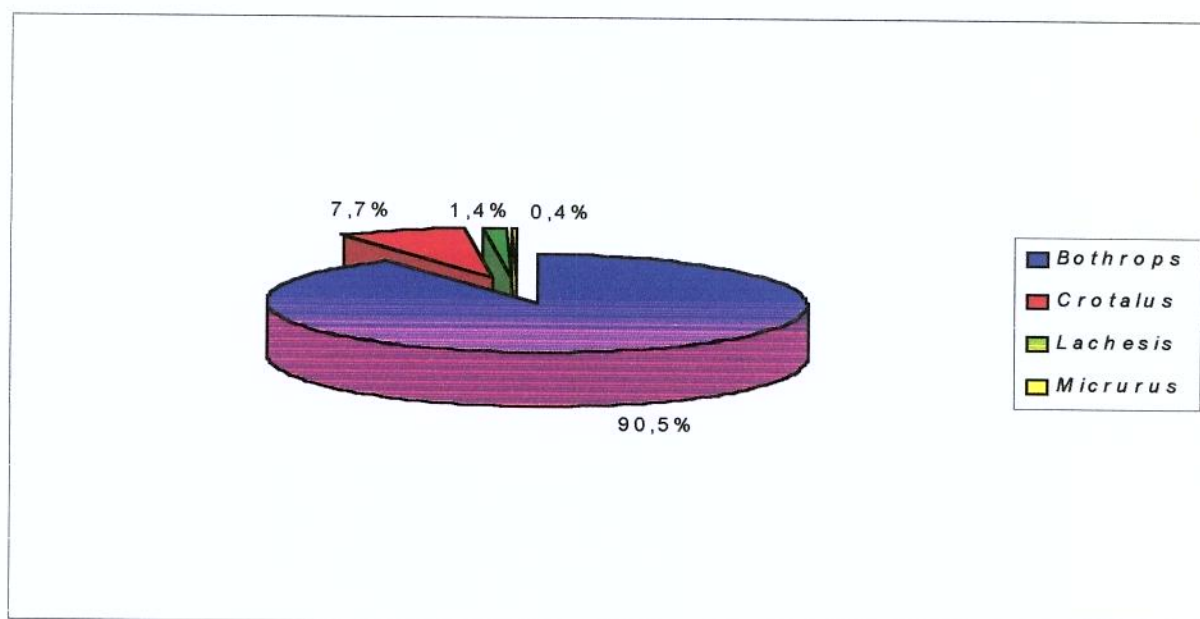


Fig. 1-Acidentes Ofídicos. Fonte: Ministério da Saúde 1997.

A mortalidade é maior nos acidentes crotálicos que nos botrópicos, em decorrência da menor letalidade do veneno botrópico. Entretanto, face à altíssima incidência dos acidentes por *Bothrops* em comparação àqueles por *Crotalus* (relação de 13:1), os primeiros têm maior importância do ponto de vista médico.

A frequência de acidentes causados pelos diferentes gêneros de serpentes é influenciada por vários fatores: (1) fatores ligados ao **ambiente** relacionados à região, clima (temperatura, pluviosidade, umidade), tipo de vegetação, devastação ambiental, fauna local, acúmulo do lixo, dentre outras;

(2) fatores ligados aos **aspectos humanos** ou **populacionais**, cabendo destacar tipo e locais das residências, atividade ocupacional (rural, acampamentos, milícias, etc), formas de lazer (caça, pesca, piqueniques), condições sócio-econômicas e culturais e ligadas à estas, a qualidade das informações relativas aos riscos e prevenção dos acidentes, a indumentária (tipos de roupas e calçados); (3) fatores ligados à **serpente**, que dizem respeito ao tipo de dentição, hábitos alimentares (roedores, pássaros, etc), distribuição geográfica (matas, florestas, litoral, regiões secas e úmidas) e características do seu "habitat" (aquáticas, arborícolas, subterrâneas, de superfície), mecanismos de defesa (bote, camuflagem, comportamento de fuga e/ou dissuasivo, guizo), períodos reprodutivos (maior atividade locomotora), capacidade de deslocamento (migração para regiões de estações favoráveis), entre outros (cf. RIBEIRO, 1991).

1.3 - CARACTERÍSTICAS DAS SERPENTES VENENOSAS DO GÊNERO *Bothrops*

O gênero *Bothrops* está distribuído no continente americano, do México à Argentina (HOGE & ROMANO-HOGE, 1972), e está representado por 32 espécies que se distribuem por todo o Brasil. Este gênero possui grande importância e interesse médico, científico e social pelo fato de ser responsável por 90% do total dos acidentes ofídicos notificados (KAISER & MICHL, 1971; ROSENFELD, 1971; AMARAL *et al.*, 1986, 1987; FERREIRA *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1991; BARRAVIERA & PEREIRA, 1994).

As serpentes pertencentes a esse gênero habitam, preferencialmente, os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas; paióis, celeiros, depósitos de ração, locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferias de

grandes cidades. Têm hábitos noturnos, e são consideradas as mais agressivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

Os estudos das peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* têm sido direcionados para a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos nos efeitos que as mesmas causam no local da picada, que incluem dor intensa, imediata; proeminente necrose tecidual, isto é, mionecrose; edema; distúrbios da coagulação e hemorragia. De acordo com a gravidade do acidente e as medidas de primeiros socorros adotadas, a mionecrose pode determinar perda de tecido ou amputação do membro afetado (ROSENFELD, 1971; VITAL BRAZIL, 1982; MEBS & OWNBY, 1990). Um dos principais efeitos locais provocados pelo envenenamento por serpentes deste gênero é a necrose muscular. A administração do soro anti-ofídico neutraliza com sucesso os efeitos sistêmicos da peçonha, no entanto, a neutralização dos efeitos locais é extremamente dificultada pela imediata atuação de toxinas com atividade proteolítica presentes no veneno.

As serpentes do gênero *Bothrops* possuem venenos com ações predominantemente **coagulante, hemorrágica, inflamatória, edematogênica, miotóxica** (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993), dentre outras.

1.3.1-Ação coagulante

Esta ação é conhecida por “ação coagulante do tipo trombina”, caracterizada pela transformação direta do fibrinogênio em fibrina, e envolve a ação de proteases que atuam em pontos específicos da cascata da coagulação. A maioria dos venenos têm capacidade de ativar o fator X e a protrombina resultando em consumo de fibrinogênio com incoagulabilidade sangüínea, restaurada horas após o tratamento adequado. Nos acidentes

botrópicos, quando ocorre a ativação do fator X, há também consumo de fatores V, VII e plaquetas, levando à coagulação intravascular disseminada, com formação e deposição de microtrombos na rede capilar (NAHAS, *et al.*, 1979), o que poderia contribuir para desencadear a insuficiência renal aguda (AMARAL *et al.*, 1986).

1.3.2-Ação hemorrágica

A hemorragia é um dos efeitos mais característicos induzidos por venenos crotálicos (para revisão ver OHSAKA, 1979 e OWNBY, 1982). Os venenos das serpentes da subfamília Crotalinae podem causar hemorragia local ou sistêmica em pulmões, cérebro e rins. O trabalho pioneiro feito por OHSAKA *et al.* (1973) sobre a natureza e o mecanismo de ação dos componentes hemorrágicos purificados do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (representante desta subfamília na Ásia, e estreitamente relacionada às *Bothrops*) levou à proposição de que essas toxinas induzem hemorragia por diapedese, isto é, através de abertura das junções interendoteliais nos capilares com conseqüente extravasamento sangüíneo. Por outro lado, OWNBY & GEREN (1987) e OWNBY *et al.* (1978) apresentaram evidência de várias toxinas hemorrágicas dos venenos de *Crotalus atrox* e *C. horridus*, que induzem hemorragia por rexe, isto é, pela ruptura da parede endotelial, permitindo a saída dos elementos figurados do sangue.

Como alguns componentes hemorrágicos, denominados hemorraginas, isolados dos venenos crotálicos, são proteases, é possível que essa atividade enzimática seja relevante para o processo de dano capilar. Várias toxinas hemorrágicas degradam o colágeno, inclusive o colágeno IV, que é um componente da lâmina basal que envolve as células endoteliais dos capilares (OHSAKA *et al.*, 1973; BARAMOVA *et al.*, 1989). Desta forma é possível

que as hemorraginas afetem a microcirculação, tendo como primeiro alvo a destruição da integridade da lâmina basal, levando ao extravasamento de sangue por diapedese ou rexe. O mecanismo exato desta ação permanece obscuro. Também, um efeito citotóxico direto sobre as células endoteliais não pode ser descartado. O desencadeamento do processo hemorrágico provavelmente é de natureza multifatorial.

Dentre as toxinas hemorrágicas isoladas e caracterizadas de alguns venenos botrópicos (MANDELBAUM *et al.*, 1976; 1984; 1988; MANDELBAUM & ASSAKURA, 1988; QUEIROZ *et al.*, 1985) todas são proteínas e têm o íon zinco, como co-fator essencial para a atividade hemorrágica (BJARNASON & TU, 1978; TU, 1982).

1.3.3-Ações edematogênica e inflamatória

Os envenenamentos botrópicos são também caracterizados pelo rápido desenvolvimento de edema e inflamação no local da picada ou da injeção do veneno. O fenômeno ocorre em minutos e perdura por 24 horas ou mais (ROSENFELD, 1971; BOLAÑOS, 1982; AMARAL *et al.*, 1987). Poucos estudos têm-se dedicado ao isolamento de fatores ou toxinas indutoras de edema. Este pode decorrer da ação tóxica no endotélio causada por hemorraginas, ou por toxinas que atuariam diretamente sobre as células endoteliais dos capilares e vênulas aumentando sua permeabilidade (OHSAKA, 1979; OWNBY, 1982). Além disso, fosfolipases induziriam a liberação de histamina pelos mastócitos e de ácido araquidônico dos fosfolípidos da membrana celular, que, por sua vez, desencadeariam a síntese de prostaglandinas. Esses vários fatores vasoativos sinergisticamente são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, levando ao edema pelo extravasamento de fluidos e infiltrado inflamatório de leucócitos (ROBBINS *et al.*, 1987).

1.3.4-Ação miotóxica

Como já mencionado, os efeitos locais causados por acidente ofídico, incluindo a necrose muscular, são seqüelas comuns causadas, muitas vezes, por mais do que um tipo de componente do veneno por ação sinérgica, razão pela qual as tentativas de prevenção desses efeitos são infrutíferas, mesmo porque, ocorrem de forma muito rápida logo após a picada por estes animais.

A pele e a musculatura esquelética são os primeiros tecidos afetados no acidente ofídico. Em muitos casos, o dano local pode levar a uma marcante diminuição funcional ou, até, amputação do membro afetado (ROSENFELD, 1971). Os processos miolíticos severos em geral vêm acompanhados por edema e hemorragia resultantes da ação combinada dos fatores contidos no veneno (HOMMA & TU, 1971; OWNBY, 1982; MEBS & OWNBY, 1990).

No caso dos venenos botrópicos a atividade miotóxica é acompanhada de forte atividade hemorrágica, mascarando o efeito específico atribuído à cada um dos componentes do veneno (MEBS & OWNBY, 1990).

As miotoxinas dos venenos das serpentes constituem um grupo heterogêneo de toxinas (MEBS & OWNBY, 1990), que atuam primariamente no tecido muscular causando mionecrose. Esta, é de difícil distinção da mionecrose secundária causada por exemplo, por isquemia do tecido por falência da microcirculação afetada pelas hemorraginas (QUEIROZ *et al.*, 1985), que direta ou indiretamente atuam nas células endoteliais. Por outro lado, existem venenos como o da *Bitis arietans* (MEBS & PANHOLZER, 1982) que não causam lesões nas células musculares, muito embora contenham algumas das mais ativas hemorraginas.

As miotoxinas dos venenos são componentes muito potentes. Quantidades de 1 micrograma freqüentemente causam notável dano nas fibras musculares esqueléticas quando injetadas experimentalmente em camundongos e ratos.

As miotoxinas podem ser classificadas em:

1.3.4.1-Peptídeos miotóxicos

Incluem polipeptídeos básicos de pequeno peso molecular, da ordem de 4.000 daltons, com 43 a 45 resíduos de aminoácidos, exibindo alto grau de homologia sequencial, ligados por três pontes dissulfeto, e ponto isoelétrico acima de 9 (FOX *et al.*, 1979), tais como a miotoxina *a* do veneno da *Crotalus viridis viridis* (OWNBY *et al.*, 1976; CAMERON & TU, 1977), o peptídeo *c* do veneno da *Crotalus viridis helleri* (MAEDA *et al.*, 1978), a crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (LAURE, 1975), miotoxina I e II do veneno de *Crotalus viridis concolor* (ENGLE *et al.*, 1983; BIEBER *et al.*, 1987), toxina III do veneno de *Crotalus horridus horridus* (MEBS *et al.*, 1983) e toxina CAM do veneno de *Crotalus adamanteus* (SAMEJIMA *et al.*, 1988). Estas miotoxinas não exibem atividade enzimática. A crotamina e a miotoxina *a* atuam nos canais de sódio, promovendo maior influxo desse íon nas células musculares, sem afetar a integridade do sarcolema. No entanto, alteram o equilíbrio hidroeletrolítico celular, com dilatação das cisternas do retículo sarcoplasmático e prejuízo da função da enzima Na^+K^+ -ATPase. Histologicamente, aparecem inúmeros vacúolos entre as miofibrilas, por conta do desequilíbrio funcional do retículo sarcoplasmático, no seu papel de manter a homeostasia iônica citossólica juntamente com as mitocôndrias.

Os efeitos desses venenos crotálicos são imediatos em camundongos, e manifestam-se por prostração, forte contratura das patas traseiras e morte devida à parada respiratória.

1.3.4.2-Miotoxinas com atividades fosfolipásica A_2 (PLA_2) e neurotóxica (pré-sináptica)

São toxinas potentes, com atividade fosfolipásica, e incluem a notexina do veneno de *Notechis scutatus scutatus* (HARRIS *et al.*, 1975), a crotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984), a taipoxina do veneno da *Oxyuranus scutellatus* (HARRIS & MALTIN, 1982) e a toxina mojave do veneno de *Crotalus scutulatus scutulatus* (CATE & BIEBER, 1978).

As alterações patológicas produzidas por essas miotoxinas nas células musculares caracterizam-se por hipercontração dos miofilamentos levando à agregação das miofibrilas, acompanhada por despolarização e necrose da célula. O mecanismo proposto para explicar essas alterações tem sido o de que haveria hidrólise dos fosfolipídeos da membrana devida à atividade enzimática, ruptura do sarcolema e perda da habilidade da célula em regular o fluxo de cálcio extracelular (HARRIS & MACDONELL, 1981; GUTIÉRREZ *et al.*, 1984), o que levaria às alterações patológicas observadas.

1.3.4.3-Miotoxinas com e sem atividade PLA_2 (PLA_2 e PLA_2 -"like")

São toxinas que causam danos musculares idênticos aos acima mencionados, porém não causam sintomas neurotóxicos. Provocam intensa mioglobínúria, com conseqüente falência renal, responsável pelo efeito letal em camundongos (FOHLMAN & EAKER, 1977). Dentre as proteínas dos venenos botrópicos com atividade miotóxica estão as fosfolipases A_2 (PLA_2) (E.C. 3.1.1.4.) e as PLA_2 -"like" (VAN DEENEN & HASS, 1963).

As PLA₂ compreendem uma família de hidrolases esterolíticas que catalizam a hidrólise de fosfoglicerídeos 3-sn na posição 2. Estas enzimas PLA₂ podem ser divididas em dois subgrupos: 1) as miotoxinas PLA₂-Asp49, que possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49 da cadeia de amino ácidos, o qual é o sítio de ligação do íon cálcio, e está relacionado com a elevada atividade enzimática e 2) as miotoxinas PLA₂-Lys49 ou PLA₂-“like”, que possuem um resíduo lisina na posição 49 e possuem baixa ou nenhuma atividade fosfolipolítica, embora estudos bioquímicos e imunológicos tenham indicado que elas são estruturalmente análogas às PLA₂ (KARLSSON, 1979; HOWARD & GUNDERSEN, 1980; DÍAZ *et al.*, 1991).

As fosfolipases dos venenos ofídicos estão usualmente distribuídas em dois grandes grupos destes animais. O **grupo I** inclui as famílias **Elapidae** e **Hidrophidae** e o **grupo II** inclui as **Crotalidae** e **Viperidae**. No veneno das serpentes do grupo II estão presentes:

- 1) As PLA₂-Asp49, que são catalicamente ativas e incluem a miotoxina I do veneno de *Bothrops asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984) e as miotoxinas dos venenos de *Naja nigricollis*, *Naja haje haje* e *Naja nivea* (MEBS, 1986).
- 2) As PLA₂-Lys49 inativas ou pouco ativas enzimaticamente (SELISTRE DE ARAÚJO *et al.*, 1996) e onde estão incluídas a bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1995), a miotoxina do veneno de *B. nummifer* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986; 1989), a miotoxina II (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989) e a IV (DÍAZ *et al.*, 1995) do veneno de *Bothrops asper*, a miotoxina I e II de *Bothrops moojeni* (LOMONTE *et al.*, 1990) e a miotoxina II de *Bothrops godmani* (DÍAZ *et al.*, 1992). Recentemente, uma nova miotoxina foi isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, a qual foi

denominada Piratoxina-I (PrTX-I) e caracterizada como sendo uma miotoxina do tipo PLA₂-Lys49, ou seja, com baixa atividade PLA₂ (PLA₂-“like”) (MANCUSO *et al.*, 1995).

1.3.4.4-Cardiotoxinas

São miotoxinas, também denominadas citotoxinas. São proteínas básicas de baixo peso molecular (6.000 a 7.000 daltons), desprovidas de atividade enzimática e possuem de 60 a 62 resíduos de amino ácidos interligados por 4 pontes de dissulfeto. Apresentam várias ações em diferentes tipos de células: causam hemólise e despolarização e contratura nas células musculares esqueléticas (HARVEY, 1985, 1990; LEE *et al.*, 1968; LIN SHIAU *et al.*, 1975; FLECHTER & LIZZO, 1987), com conseqüente mionecrose. Estas cardiotoxinas foram originariamente assim chamadas por sua ação *in vivo* sobre o coração, causando arritmias (CONDREA, 1974). Recentemente OWNBY *et al.* (1993), demonstraram a habilidade da cardiotoxina I do veneno de cobra (*Naja naja atra*) em causar necrose *in vivo* da musculatura esquelética, porém esta habilidade já havia sido relatada por DUCHEN *et al.* (1974) e COUTEAUX *et al.* (1988), com a cardiotoxina do veneno de *Naja mossambica mossambica*.

As cardiotoxinas alteram a função de canais de sódio, à semelhança da miotoxina α e crotamina. Porém, os efeitos morfológicos não se assemelham aos induzidos por essas toxinas, mas são similares aos produzidos pelas miotoxinas com e sem atividade PLA₂ (OWNBY *et al.*, 1993). As cardiotoxinas e as miotoxinas-PLA₂ e PLA₂-“like” causam imediata lise do sarcolema, seguida por hipercontração e necrose. São proteínas altamente básicas, com uma grande porção de superfície positivamente carregada. O sítio real de interação das cardiotoxinas com as membranas das células

musculares é obscuro, porém podem ser sugeridos: (a) sítios da membrana carregados negativamente, (b) sítios de ligação de cálcio e (c) proteínas integrais da membrana (HARVEY, 1990).

Os possíveis modos de ação para as cardiotoxinas incluem: (1) ação direta sobre a membrana plasmática provocando ruptura da mesma acompanhada por despolarização, (2) ação indireta através da ativação da fosfolipase C endógena do tecido, ou (3) uma combinação dos dois mecanismos; (4) uma possibilidade adicional para o mecanismo de ação seria através da inibição da Na^+K^+ -ATPase seguida por aumento da concentração osmótica de Na^+ e edema celular por influxo passivo de água para a célula (OWNBY *et al.*, 1993).

1.4 - PATOGÊNESE DA MIONECROSE INDUZIDA POR MIOTOXINAS PLA_2 E PLA_2 - "like"

O resultado da ação miotóxica é a mionecrose. Evidências histológicas, ultraestruturais e bioquímicas indicam que membrana plasmática da célula muscular é a primeira estrutura afetada por miotoxinas botrópicas (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). Esses autores estudaram o efeito de miotoxinas em células, lipossomos e músculo esquelético e sugerem um mecanismo de ação hipotético, onde as miotoxinas podem ligar-se a um sítio não identificado da membrana plasmática. Este sítio pode ser uma proteína, um domínio fosfolipídico carregado negativamente ou outro componente. Parece haver interação eletrostática entre sítios catiônicos das toxinas e grupos carregados negativamente na membrana. Após esta ligação inicial, as miotoxinas penetrariam a bicamada lipídica por uma interação hidrofóbica

mediada por uma região da molécula diferente do sítio catalítico. É possível que nesta região concentrem-se resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. Adicionalmente, a acilação poderia contribuir para a interação e penetração da toxina na membrana celular. Tal domínio tóxico hipotético poderia estar presente nas variantes enzimaticamente ativas e inativas. É muito provável que a presença de resíduos hidrofóbicos flanqueados por resíduos catiônicos, constitua um esboço molecular comum para a região citolítica nas miotoxinas. A penetração desta região no centro hidrofóbico da bicamada lipídica seria responsável pela desestabilização da membrana, com desregulação da permeabilidade a íons e macromoléculas. A penetração na membrana requer, provavelmente, uma membrana fluida, porque a miotoxina perde a ação citotóxica à 4°C. Um influxo de cálcio seria provavelmente a consequência mais relevante de distúrbios na membrana resultando em alterações no citoesqueleto, dano mitocondrial e ativação de proteases fosfolipases cálcio dependentes. A patogênese da lesão muscular por miotoxinas botrópicas não está elucidada, uma vez que são poucos os estudos com essas toxinas. Contudo, os resultados são semelhantes, sugerindo que todas têm mecanismo de ação análogo.

Além de ações primárias do veneno nas fibras musculares, a mionecrose pode ser induzida por ações secundárias ao colapso da microcirculação local (QUEIROZ *et al.*, 1985). O estudo da patogenia da mionecrose teve início com HOMMA & TU (1971) a partir de observações experimentais da ação de venenos de 37 espécies de serpentes. Esses autores relatam o aparecimento, após 24 hs da injeção intra-muscular (i.m.) dos venenos, de 3 tipos de mionecrose: (1) coagulativa, (2) miolítica, e (3) os dois tipos anteriores juntos, dependendo do tipo de veneno. Estudos em camundongos demonstraram que as células musculares afetadas por *miotoxina a* (OWNBY *et al.*, 1976) ou por miotoxina fosfolipásica do veneno

de *Bothrops asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984a), embora apresentem diferentes processos de patogênese das lesões mionecróticas, culminam no mesmo quadro patológico nos períodos tardios, que inclui despolarização, hipercontração, aumento da permeabilidade aos íons cálcio e necrose celular.

OWNBY *et al.* (1988) estudaram as diferentes etapas da mionecrose em experimentos realizados com venenos de *Crotalus viridis viridis*, *Naja naja naja* e *Crotalus atrox*. A mionecrose induzida por esses venenos pode ser dividida em 4 fases: fase inicial (15 min a 3h), fase intermediária (3h à 72h), fase tardia (72 à 96h) e fase final (após 96h). O início do processo caracteriza-se pelas chamadas lesões "delta", descritas por MOKRI & ENGEL (1975), usando microscopia de luz. São lesões das fibras em forma triangular originadas por lise focal da membrana plasmática. Além disso, o aparecimento de vacúolos claros; miofibrilas em diferentes graus de condensação, intercaladas com áreas claras irregulares, de aparência amorfa no citoplasma (semelhantes a regiões da fibra comidas por traças ou "moth-eaten" lesions); numa fase intermediária predominam pelo menos dois estágios patológicos caracterizados por miofibrilas condensadas, que assemelham-se às da fase inicial e por células com aparência amorfa; numa fase posterior, a presença de intenso infiltrado de células fagocíticas, e na fase final, áreas de células musculares pequenas em regeneração intercaladas com áreas de tecido fibrótico, foram os diferentes aspectos observados durante a patogênese da processo mionecrótico. As características essenciais da mionecrose são as mesmas para os três venenos, não sendo possível distinção entre eles baseado somente no aspecto morfológico. O tempo exato, após a injeção, no qual essas fases ocorrem varia dependendo do tipo e da dose do veneno injetado.

A mionecrose induzida por miotoxinas (com atividade PLA₂-Asp49 ou sem atividade PLA₂-Lys49) de venenos de serpentes (dentre as quais as botrópicas), parece iniciar-se por ligação interativa com a membrana e rompimento da bicamada lipídica da fibra muscular (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984 a; b; 1986; 1989; 1991; GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984). Um exemplo destas miotoxinas (Lys49) é a botropstoxina I (BthTx-I) do veneno de *B. jararacussu* (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988). A principal consequência da desorganização da membrana plasmática é a perda do controle da permeabilidade, que permitirá escape de moléculas como creatina, creatina quinase, desidrogenase láctica, e a entrada de íons cálcio.

A quantificação da liberação de enzimas sarcoplasmáticas de preparações isoladas de músculo esquelético é um método sensível para avaliar os efeitos miotóxicos dos venenos ofídicos, e danos causados por anóxia, “stress” celular ou agentes citotóxicos variados (SUAREZ-KURTZ & EASTWOOD, 1981; JONES *et al.*, 1983; MELO & SUAREZ-KURTZ, 1988; JACKSON *et al.*, 1991; MCARDLE *et al.*, 1991, 1992, 1994a, 1994b; MELO *et al.*, 1993, 1994; MCARDLE & JACKSON, 1994; PAGALA *et al.*, 1994).

Tais estudos têm sido efetuados em músculos isolados removidos com um mínimo de trauma, entre eles o EDL (músculo extensor longo dos dedos) de ratos e camundongos, e o SOL (soleus). Associado à determinação do nível sérico da enzima citoplasmática, creatino quinase (CQ) liberada devido à lesão da membrana celular, a análise das alterações morfológicas, contribuem para a medida da injúria muscular causada por ação de venenos ofídicos.

A literatura apresenta poucos trabalhos sobre a ação de venenos botrópicos quanto à atividade farmacológica sobre a junção neuromuscular, com exceção de estudos com frações obtidas dos venenos das *Bothrops moojeni*

(RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1990); *Bothrops lanceolatus* (LOBO-ARAÚJO *et al.*, 1990), veneno total de *Bothrops insularis* (COGO *et al.*, 1990a, 1990b, 1993) e de sua fração PLA₂ (COGO *et al.*, 1998).

1.5 - CARACTERÍSTICAS DO VENENO DE *Bothrops pirajai*

A espécie *Bothrops pirajai* (AMARAL, 1926) é exclusiva da região sul do estado da Bahia e nordeste de Minas Gerais (HOGE & ROMANO, 1978/79), e tem seu veneno pouco estudado.

A espécie *Bothrops pirajai* foi descrita por AMARAL (1926), como sendo uma espécie diferente das demais espécies brasileiras de *Bothrops*. Sua espécie mais afim é a *Bothrops jararacussu*, todavia, existem algumas diferenças fenotípicas entre estes animais AMARAL (1926).



Fig. 2 – *Bothrops pirajai*. Foto cedida pelo Dr. Ivan Sazima.

MANCUSO *et al.* (1995) foram os pioneiros no estudo bioquímico do veneno da *B. pirajai*. A Piratoxina-I (PrTX-I) é uma miotoxina isolada do mesmo e corresponde à 47,3% da quantidade total de proteínas presentes no veneno. O veneno apresentou pontos em comum com o da *B. jararacussu*, no que diz respeito às características fenotípicas e aos componentes do veneno. A botropstoxina-I (BthTX-I) do veneno de *B. jararacussu* e Piratoxina-I (PrTX-I) do veneno de *B. pirajai* exibem ausência de atividade fosfolipásica (testada em lecitina da gema de ovo), sendo ambas Lys49-PLA₂, e compartilham alta homologia na composição e sequência de aminoácidos, ocorrendo somente duas mutações ao longo da cadeia peptídica da PrTX-I em relação à BthTX-I. A PrTX-I, quando injetada no músculo esquelético, não causa hemorragia sugerindo que a lesão muscular ocorre devido à ação miolítica direta sobre a membrana celular (MANCUSO *et al.*, 1995).

O rompimento da membrana celular levaria ao influxo de cálcio para o citosol e provocaria uma sobrecarga deste íon às mitocôndrias, causando sua degeneração, associado ao fato de o excesso de cálcio citossólico levar à hipercontração dos miofilamentos e ativação de proteases e fosfolipases intracelulares cálcio-dependentes (WROGEMAN & PENA *et al.*, 1976), e finalmente à necrose celular. Este mecanismo têm sido proposto para outras miotoxinas de venenos botrópicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984b, 1991), e sugerido para outros agentes indutores de mionecrose (CRUZ-HÖFLING *et al.* 1997).

De acordo com MANCUSO *et al.* (1995), a mionecrose provocada pelo veneno bruto de *B. pirajai* associa-se a pronunciada reação inflamatória, principalmente representada por leucócitos polimorfonucleares.

Estudos de análise cristalográfica de proteínas homólogas Lys49-PLA₂ de espécies botrópicas, como a miotoxina II do veneno de *Bothrops asper* (ARNI *et al.*, 1995), e a miotoxina PrTX-I, de *B. pirajai* (CANDURI *et al.*, 1998) têm sido realizados. No caso da PrTX-I, os resultados preliminares revelaram a presença de duas moléculas na unidade assimétrica cristalográfica datoxina. O conhecimento das estruturas cristalográficas destas miotoxinas Lys49-PLA₂ pode contribuir para o esclarecimento da estrutura e localização dos sítios de ações correspondentes às atividades biológicas e catalíticas destas toxinas.

Outra fração isolada do veneno de *B. pirajai* corresponde à SIV-SP₃ (MANCUSO *et al.*, 1995) e representa 18,8% do peso total de proteínas do veneno. Esta mesma fração foi isolada pelo método de HPLC e demonstrou moderadas atividades fosfolipásica e anticoagulante e potente atividade miotóxica (TOYAMA *et al.*, 1998, *submetido*). Esta toxina foi denominada Piratoxina-III (PrTX-III).

II-OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi obter informações adicionais sobre a atividade biológica do veneno total de *Bothrops pirajai* em preparações isoladas de músculo *extensor longo dos dedos* (EDL) e identificar quais frações do veneno responsáveis pelas mesmas. Para esta finalidade, foram analisadas as frações Piratoxina-I (PrTX-I) e Piratoxina-III (PrTX-III). Na literatura são escassas as informações sobre os efeitos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos do veneno e frações de *B. pirajai*. A semelhança fenotípica da *B. pirajai* com a *B. jararacussu*, a homologia da composição de seus venenos e a distribuição geográfica de cada espécie poderiam estar relacionados com a atividade biológica destes venenos. Além disso, as informações obtidas sobre o veneno e suas frações poderão auxiliar na compreensão dos complexos fenômenos fisiopatológicos que ocorrem nos envenenamentos ofídicos, contribuindo para elucidação das relações entre a estrutura dos componentes e a função que exercem.

O modelo experimental escolhido para este estudo foram as preparações neuromusculares do diafragma e EDL de camundongos Swiss para o veneno total e PrTX-I, e a preparação EDL apenas para a PrTX-III. Os modelos *in vitro* são adequados à investigação científica por propiciarem boas condições para aferição das atividades fisiológicas, bioquímicas e morfológicas dos músculos. A combinação de diferentes métodos como a miografia, que avalia a resposta contrátil do músculo, a bioquímica, que avalia a integridade das fibras musculares, através da dosagem de enzimas intracelulares liberadas para o meio de incubação (p.ex.: creatinoquinasas) e a análise das alterações patológicas, tanto histológicas quanto ultraestruturais, permitirão consubstanciar os resultados obtidos e interpretá-los de forma mais crítica e objetiva.

III-TRABALHOS PARA PUBLICAÇÃO

**3.1- “Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation“
(no prelo)**

TOXICON

Editor-in-Chief: **Professor Alan Harvey**
Department of Physiology and Pharmacology
University of Strathclyde
27 Taylor Street
Glasgow
G4 0NR, UK

Tel: 0141-553 4155
Fax: 0141-552 8376
Email: toxicon@strath.ac.uk

November 19, 1998

Professor M.A. da Cruz-Hofling
Depto de Histologia e Embriologia
Instituto de Biologia
UNICAMP - CP 6109 CEP
13083-970 Campinas (SP)
BRAZIL

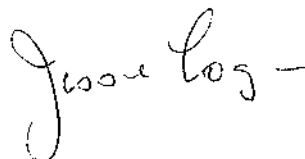
Dear Professor da Cruz Hofling

Manuscript number **98 137**

P.D. Costa, M.H. Toyama, S. Marangoni, L. Rodrigues-Simioni and M.A. da Cruz-Hofling
**EFFECTS OF BOTHROPS PIRAJAI VENOM ON THE MOUSE EXTENSOR DIGITORUM
LONGUS (EDL) MUSCLE PREPARATION**

I am pleased to tell you that your paper has been accepted for *Toxicon*. I have sent it to the publishers, and you should get proofs in due course.

Yours sincerely



Alan Harvey

**EFFECTS OF *BOTHROPS PIRAJAI* VENOM ON THE MOUSE
EXTENSOR DIGITORUM LONGUS (EDL) MUSCLE
PREPARATION**

Patrícia D. Costa¹, Marcos H. Toyama², Sérgio Marangoni², Léa Rodrigues-Simioni¹ and Maria Alice da Cruz-Höfling^{3**}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP),

²Department of Biochemistry and ³Department of Histology and Embryology, Institute of Biology,
UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Running title: *B. pirajai* venom and myonecrosis

****Address correspondence to: Dr. Maria Alice da Cruz-Höfling, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, UNICAMP – C. P. 6109.CEP 13083 -970 - Campinas (SP), Brasil.**

Tel: (55)-(19)-788 7801 Fax: (55)-(19)-289 3124

e-mail: höfling@obelix.unicamp.br

ABSTRACT

P.D. Costa, M.H. Toyama, S. Marangoni, L. Rodrigues-Simioni and M.A. da Cruz-Höfling. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation. *Toxicon* ● ●. ● ● ● ● ● ●, 19 ● ●. —The effects of *Bothrops pirajai* snake venom on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) preparation were examined using myographic, histopathological and biochemical approaches. *B. pirajai* venom (10, 25 or 50 µg/ml) dose dependently and irreversibly blocked the contractile response of indirectly stimulated EDL muscle. Histopathological analysis of EDL muscle incubated with venom showed dose-dependent damage with a loss of the normal tissue structure and the appearance of highly dark, edematous fibers together with myofibrils in various stages of condensation. At high doses of venom (50 µg/ml), loss of muscle cells was observed. In non-stimulated EDL, *B. pirajai* venom (10 µg/ml and 50 µg/ml) caused a time-dependent release of CK which was maximal after 120 min. These results suggest that component (s) presents in the *B. pirajai* venom have a direct myolytic action on the skeletal muscle.

INTRODUCTION

Most snakebites in Central and South America are inflicted by species of *Bothrops*. In Brazil, this genus is responsible for 90% of snakebites accidents (Rosenfeld, 1971). Envenomation by most *Bothrops* species produces a qualitatively similar pathophysiological picture characterized by: (1) immediate and prominent local tissue damage, including myonecrosis, hemorrhage and edema (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez *et al.*, 1982), (2) cardiovascular alterations, especially hemorrhage and hypovolemic shock (Rosenfeld, 1971; Amaral *et al.*, 1987), (3) coagulation disorders, most frequently defibrination (Rosenfeld, 1971; Bolanõs, 1982; Amaral *et al.*, 1987), and (4) renal alterations which may evolve into acute renal failure (Vargas-Baldares, 1978; Amaral *et al.*, 1985; Boer-Lima *et al.*, 1997). These symptoms reflect the additive or synergistic effects of different toxins and enzymes present in the venoms.

One of the main local effects observed following envenomation is myonecrosis, which frequently leads to permanent tissue loss, disability or amputation (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez and Lomonte, 1989).

Numerous studies have investigated the myotoxic and neuromuscular activities of the venoms and toxins of several *Bothrops* species including *B. jararacussu* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983), *B. moojeni* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1990; Franco-Andrade *et al.*, 1997), *B. alternatus* (Queiroz and Petta, 1984; Franco-Andrade *et al.*, 1997); *B. lanceolatus* (Lôbo-Araújo *et al.*, 1990); *B. insularis* (Cogo *et al.*, 1993, 1998) and *B. neuwiedi* (Zamunér, MSc thesis, State University of Campinas, 1997).

In contrast, little is known about the venom of *Bothrops pirajai* ("jararacussu da Bahia"), a species found in the State of Bahia, in northeastern Brazil (Amaral, 1926; Hoge and Hoge-Romano, 1978/79). Morphologically, this species is similar to *Bothrops*

jararacussu and its venom contains myotoxins (Mancuso *et al.*, 1995) similar to those in *B. jararacussu* venom (Cintra *et al.*, 1993). This report describes the myotoxic and neuromuscular activities of *B. pirajai* venom in the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation.

MATERIAL AND METHODS

Venom and animals

Desiccated *B. pirajai* snake venom was a kind gift from Dr. José Roberto Giglio (Faculdade de Medicina/USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil) and the Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil). Adult Swiss white mice of both sexes (25-30 g) were supplied by CEMIB-UNICAMP. The animals were housed with free access to food and water.

Methods

Myography

The *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation was carefully removed from mice anesthetized with chloral hydrate (3 mg/ml; Quimibrás, Campinas, SP, Brazil) and mounted horizontally under a tension of 0.5 g in a 3.5 ml organ bath containing Tyrode's solution (pH 7.4, 37°C) of the following composition (mM): NaCl 137, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.49, NaH₂PO₄ 0.42, NaHCO₃ 11.9 and glucose 11.1, aerated with 95% O₂ - 5% CO₂. A bipolar platinum ring electrode was placed around the muscle for indirect stimulation with a Grass S₄₈ stimulator (0.1 Hz, 0.2 ms, 9.0 mV). To record isometric muscle contractions and contractures, the muscle was connected to a force displacement transducer (BG-10 GM, model J-1217) coupled to a Gould RS 3400 physiograph. *B. pirajai* venom (10, 25 or 50 µg/ml) was added to the bath solution after allowing 10 min for the preparation to stabilize. The venom was in contact with the muscle for 120 min.

Creatine kinase (CK) release

EDL muscle was incubated in a tube containing 3.5 ml of Tyrode solution at 37°C and aerated with 95% O₂ - 5% CO₂. At 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min after the addition of venom (10 µg/ml or 50 µg/ml), samples of the bath solution (100 µl) were collected and

stored at 4°C until CK activity was determined using a commercial kit (Granutest® 2.5, Diagnostica Merck, Germany). The CK activity was expressed as units/litre (U/l).

Histopathological studies

EDL muscle was incubated with *B. pirajai* venom (10, 25 or 50 µg/ml) for 120 min. Following this incubation, fragments of the muscle were immediately fixed for 24 h in Bouin's fixative, after which they were washed three times with a solution of water and ammonia, dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70%, 95% and 100%) and embedded in Histo-resin JB-4 (LKB-Bromma, Sweden). Sections 2-3 µm thick were cut using a Leica RM 2035 microtome (Leica, Vienna, Austria) and stained with 0.5% Toluidine blue for examination by light microscopy. Photomicrographs were obtained using a Zenalumar Zeiss light microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Statistical analysis

The significance of any differences observed was determined using Student's t-test with a *P* value < 0.05 being considered significant. The results are expressed as the mean ± S.E.M. of the number of animals or experiments indicated.

RESULTS

Myography

B. pirajai venom caused dose-dependent contracture followed by blockade of the contractile response of EDL preparations under indirect electric stimulation (Fig. 1). A venom dose of 10 $\mu\text{g/ml}$, produced only a slight blockade (20%) and no contracture during 120 min incubation ($n=9$).

A venom dose of 50 $\mu\text{g/ml}$ produced 50% blockade in approximately 32.4 min ($n=3$), whereas a dose of 100 $\mu\text{g/ml}$ produced total blockade of the muscle twitch tension in all experiments ($n=3$) (Fig. 1).

(Position Fig. 1 here)

Histopathological analysis

No morphological changes were detected in EDL muscle fibers after a 120 min incubation with Tyrode solution (Fig. 2a, b). Cross sections of control muscle showed organized fascicles of muscle fibers with polygonal profiles permeated by strands of perimysium (Fig. 2a); the fiber striations were well defined in longitudinal sections (Fig. 2b). In contrast, EDL muscle incubated with *B. pirajai* venom showed a range of structural changes in the fibers, the intensity of which appeared to be dose-dependent. A venom dose of 10 $\mu\text{g/ml}$ produced heavily-stained round fibers, swollen cells and/or microvacuolated fibers as well as disorganization of the muscle fascicle (Fig. 2c). Longitudinal sections showed rarely both hypercontracting and myofibril-devoid areas along the same fiber (Fig. 2d). These alterations were more severe with 25 μg of venom/ml (Fig. 2e, f). Darkening of the fibers associated with both agglutination and disintegration of the myofibrils produced a lace-like appearance. The extent of myonecrosis varied among EDL fibers (Fig. 2e, d) and affects the fiber's diameter. At a venom concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, dispersion of the

fascicle fibers and potentiation of the necrosis was observed (Fig. 3a, b). This higher venom dose also reduced to nil the number of fibers resistant to necrosis seen with 25 µg/ml of venom (Fig. 3b).

(Position Figs. 2 and 3 here)

CK releasing in vitro

Incubation of EDL muscle with venom (10 µg/ml or 50 µg/ml) resulted in a time and dose-dependent release of CK which was maximal after 120 min. Compared to controls, CK content in the bath was remarkable even with the dose of 10 µg/ml (Fig. 4). A significance difference ($P < 0.05$) exists in CK releasing soon after 30 min incubation (Fig. 4), being the maximal peak achieved after 120 min (10 µg/ml = 3864.4 ± 153.2 U/liter/S.E.M.; 50 µg/ml = 4522.7 ± 166.2 U/liter/S.E.M.).

(Position Fig. 4 here)

DISCUSSION

B. pirajai venom produced dose-dependent contracture and blockade of the twitch-tension responses of EDL muscle under indirect electrical stimulation. Comparison of mouse EDL and phrenic nerve-diaphragm preparations (data not shown) showed that the former is four fold more sensitive to *B. pirajai* venom than the latter. EDL muscle contains mainly white, fast contracting twitch fibers with an elevated glycolytic capacity (Ellisman *et al.*, 1976; Takekura *et al.*, 1994), while the rat diaphragm is a mixed muscle with both fast and slow contracting twitch fibers (60% red, 20% white and 20% intermediate fibers) with a high oxidative capacity (Padykula and Gauthier, 1970; McArdle and Albuquerque, 1973). These differences reflect on the pattern of motor innervation and exert a direct role in the distinctive contractile, enzymatic and ultrastructural properties of each muscle fiber, as well as in their sensitivity to ACh (Vrborá, 1995). Fast-twitch (EDL) and slow-twitch (soleus) muscles have different sensitivities to some snake venoms and myotoxins as assessed by CK release and morphological changes (Melo and Ownby, 1996). In particular, the biochemical and physiological properties of EDL may enhance or favour the myotoxic action of snake venoms and toxins (Melo and Ownby, 1996).

The necrosis seen following snakebites is a highly complex phenomenon resulting from the action of specific factors and/or from the combination of secondary, non-specific reactions in the affected tissues (Fukami, 1978; Ownby *et al.*, 1982, 1990). For this reason, a combination of different approaches as CK measurements and morphological analysis are recommended for detecting and evaluating myotoxicity (Mebs and Ownby, 1990; Gutiérrez and Lomonte, 1995).

Bothrops pirajai venom caused widespread myonecrosis in EDL muscle and stimulated CK release, effects attributable to proteolytic and myotoxic components of the

venom which may or may not be associated with phospholipase A₂ activity. One such component is piratoxin-I (PrTX-I), a myotoxin lacking PLA₂ activity obtained from fraction SP₅; another fraction (SP₃) also has myotoxic, as well as anti-coagulant and PLA₂ activities (Mancuso *et al.*, 1995). In the EDL preparation, fraction SP₃ induces a myonecrosis similar to that of whole venom (unpublished observations) and to that described by Gutiérrez and Lomonte (1995) for the myotoxic PLA₂ isolated from *B. asper* venom. This toxin, like fraction SP₃ of *B. pirajai* venom, has no hemorrhagic activity. The former provokes muscular lesions by directly affecting the integrity of the sarcolemma through hydrophobic interactions with the phospholipids bilayer. Low doses of *B. pirajai* venom (10 µg/ml and 25 µg/ml) produced myofiber swelling and shrinking which was accompanied by dark or heavy staining by Toluidine blue, a cationic dye, indicating an exacerbation of anionic sites in the fiber (Fig. 2c, e). At these two doses a limited number of hypercontracted and aggregated myofibrils were perceived, compared to dose of 50 µg/ml which caused extensive swelling and/or shrinking (Fig. 3a, b). In parallel would modify the interactions of cell components provoking myofibrillar hypercontraction and agglutination supposedly by a coadjuvant effect of high levels of cytosolic Ca²⁺. A breakdown in Ca²⁺ homeostasis plays a major role in cell injury could provide a means for diminishing the contractile response of muscle incubated with venom *Bothrops jararacussu* and *Bothrops pirajai* are very similar morphologically (Amaral, 1926) and toxinologically in that each contains a myotoxin which lacks PLA₂ activity (Mancuso *et al.*, 1995; Toyama *et al.*, submitted). These myotoxins resembles each other in their amino acid composition and sequence. In addition, the neuromuscular blockade produced by *B. pirajai* venom, release of CK and myonecrotic pattern resemble those seen with *B. jararacussu* venom in the same muscle preparation used here (Oshima-Franco, MSc thesis, State University of Campinas, 1997).

In conclusion, *Bothrops pirajai* venom possesses potent myotoxic-acting constituent (s) which cause blockade of the contractile response, higher CK release and extensive structural damage to myofibrils. The determination of which fraction is responsible for such myotoxic effects is presently under study.

ACKNOWLEDGEMENTS

P. D. Costa was the recipient of a studentship (Master degree) from CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior). The authors thank Mr. Gildo Bernardo Leite and Mr. Gustavo H. da Silva for technical support, Dr. Stephen Hyslop for revising the English and two anonymous referees who provided useful advice and comments on the manuscript. This work was supported in part by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

REFERENCES

- Amaral, A. (1926) Novos gêneros e espécies de ophídios brasileiros (Contribuição III para o conhecimento dos ophídios do Brasil). *Arch. Museu Nac.*, 26, 120-121.
- Amaral, C.F.S., Da Silva, O.A., Godoy, P. and Miranda, D. (1985) Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon* **23**, 877-885.
- Amaral, C.F.S., Dourado, H.V., Kouyoumdjian, J.A., Cardoso, J.L., Campos, J.A., Azevedo-Marques, M. and Lopes, P.F.A. (1987) *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, p. 53, Brasília.
- Boer-Lima, P.A., Gontijo, J.A.R. and Cruz-Höfling, M.A. (1997) Histological and physiological alterations in the kidneys of rats induced by *Bothrops moojeni* venom. *Braz. J. Morphol. Sci.* **14**, 173.
- Bolños, R. (1982) *Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica*. San José, Editorial Universidad da Costa Rica, p. 136.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B. and Giglio, J.R. (1993) Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.* **12**, 57-64.
- Cogo, J.C., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Corrado, A.P. and Rodrigues-Simioni, L. (1993) Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* **31**, 1237-1247.

- Cogo J.C., Prado-Franceschi, J., Giglio, J.R., Corrado, A.P., Cruz-Höfling, M.A., Donato, J.L., Leite, G.B. and Rodrigues-Simioni, L. (1998) An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂. *Toxicon* (*in press*).
- Ellisman, M.H., Rash, J.E., Andrew Staehelin, L. and Porter, K.R. (1976) Studies of Excitable Membranes. II. A comparison of specializations at neuromuscular junctions and nonjunctional sarcolemmas of mammalian fast and slow twitch muscle fibers. *J. Cell Biol.* **68**, 752-774.
- Franco-Andrade, A.L., Leite, G.B., Rodrigues-Simioni, L., Prado-Franceschi, J. and Cruz-Höfling, M.A. (1997) Comparative study of *Bothrops moojeni* and *Bothrops alternatus* snake venoms in the phrenic nerve-diaphragm preparation. *Braz. J. Morphol. Sci.* **14**, 158.
- Fukami, M. (1978) Quantitative studies of local lesions in experimental snake envenomation. 1. Studies on composite lesions of muscular tissue caused by venoms of the habu (*Trimeresurus flavoviridis*), sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) and himehabu (*Trimeresurus okinavensis*). *Snake* **10**, 114.
- Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., Arroyo, O., Rojas, E., Lomonte, B. y Gené, J.A. (1982) Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente "terciopelo" (*Bothrops asper*). *Acta méd.Costarric.* **25**, 255-262.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan* **51**, 211-223.

- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* **33**, 1405-1424.
- Gutiérrez, J.M., Romero, M., Nuñez, J., Chaves, F., Borkow, G. and Ovadia, M. (1995) Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH₁, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Exp. molec.Path.* **62**, 28-41.
- Hoge, A. R. and Romano Hoge, S.A.R.W.L. (1978/79) Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan* **42/43**, 373-496.
- Lôbo-Araújo, A., Donato, J.L., Leite, G.B., Rodrigues-Simioni, L. and Prado-Franceschi, J. (1990 a) Efeitos na junção neuromuscular do veneno de *Bothrops lanceolatus*. *Mem. Inst. Butantan* **52**, 77.
- Mancuso, L.C., Correa, M.M., Vieira, C.A., Cunha, O.A.B., Lachat, J.J., Selistre de Araújo, H. S., Ownby, C.L. and Giglio, J.R. (1995) Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon* **33**, 615-626.
- McArdle, J.J. and Albuquerque, E.X. (1973) A study of the reinnervation of fast and slow mammalian muscles. *J. Gen. Physiol.* **61**, 1-23.

- Melo, P.A., Nascimento, M.C., Mors, W.B. and Suarez-Kurtz, G. (1994) Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon* **32**, 595-603.
- Melo, P.A. and Ownby, C.L. (1996) Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some venoms and myotoxins. *Toxicon* **34**, 653-669.
- Ownby, C.L., Gutiérrez, J.M., Colberg, T.R. and Odell, G.V. (1982) Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin α from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* **20**, 877-885.
- Ownby, C.L., Nikai, T., Imai, K. and Sugihara, H. (1990) Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* **28**, 837-846.
- Padykula, H.A. and Gauthier, G.F. (1970) The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white and intermediate skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* **46**, 27-41.
- Queiroz, L.S. and Petta, C.A. (1984) Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Inst. Med trop. São Paulo* **26**, 247-253.

- Rodrigues-Simioni, L., Borgese, N. and Ceccarelli, B. (1983) The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* **10**, 475-489.
- Rodrigues-Simioni, L., Cogo, J.C., Assakura, M.T. and Mandelbaum, F.R. (1990) Muscular-blocking activity of *Bothrops moojeni* venom and its active fractions. *Mem. Inst. Butantan* **52**, 77.
- Rosenfeld, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and Their Venoms*, ed. W. Bücherl and E. Bücherl, pp. 345-384. Academic Press, New York.
- Takekura, H., Kasuga, N. and Yoshioka, T.Y. (1994) Differences in ultrastructural and metabolic profiles within the same type of fibres in various muscles of young and adults rats. *Acta physiol. Scand.* **150**, 335-344.
- Toyama, M.H., Soares, A.M., Vieira, C.A., Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R. and Marangoni, S. (1998) The amino acid sequence of piratoxin-I (PrTX-I), a myotoxin from *Bothrops pirajaisnake* venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. *Journal Protein Chemistry* (in press).
- Vargas-Baldares, M. (1978) Renal lesion in snake bite in Costa Rica. In *Toxins: Animal, Plant and Microbial*, ed. P. Rosenberg, p. 497. Pergamon Press, Oxford.
- Vborá, G., Gordon, T. and Jones, R. (1995) Mammalian muscles and motor units. In: *Nerve-Muscle Interaction*, pp. 69-85. Chapman & Hall Press, London.

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. Effects of *B. pirajai* venom on indirectly stimulated mouse EDL muscle preparations.

A. Dose-dependent neuromuscular blockade of muscle twitches. Each point represents the mean $\pm$ S.M.E. of 3-9 experiments. (B), (C) and (D), isometric twitch-tension before and after the addition of 10, 25 and 50 μ g of venom (V/ml), respectively. W: washing of the preparation.

Fig. 2. Indirectly stimulated EDL muscle incubated with *B. pirajai* venom for 120 min.

Transversal (A) and longitudinal (B) sections of EDL muscle incubated with Tyrode solution for 120 min (control). Note the normal structure of the skeletal fibers. In C, the preparation was incubated with 10 μ g of venom/ml. Note disorganization of the muscle fascicles and the various stages (1-5) of necrosis, a few of which represent the later stages. Large dark cells are also conspicuously present (d). In D, different stages are seen in same fiber (F) while other regions maintain a normal striation and morphology (n). In E and F, an increased number of highly degenerated fibers is seen after incubation with 25 μ g of venom/ml; dark (d), shrunken (s) fibers and a lace-like (l) appearance resulting from the agglutination of myofibrils. Bar, 40 μ m.

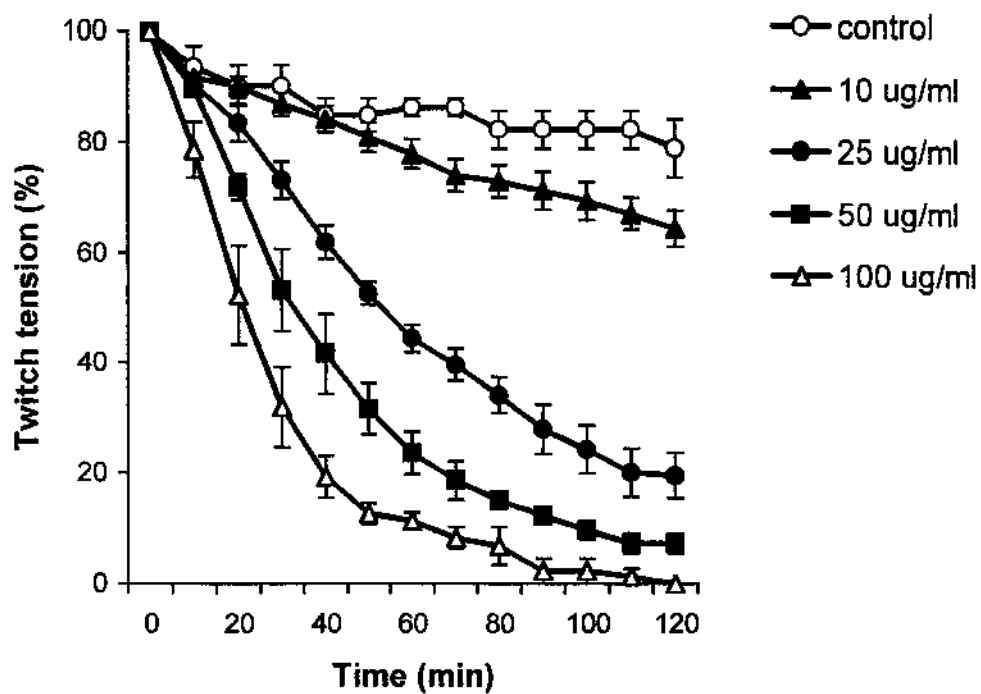
Fig. 3. EDL muscle incubated with 50 μ g of *B. pirajai* venom/ml for 120 min.

A-Transversal section showing muscle fiber with "delta lesions" (dl) and in an advanced stage of necrosis. Note the densely clumped myofibrils (dc), vacuolization (v) and darkened edematous cells. S = altered muscle spindle. Plate B, is a longitudinal section

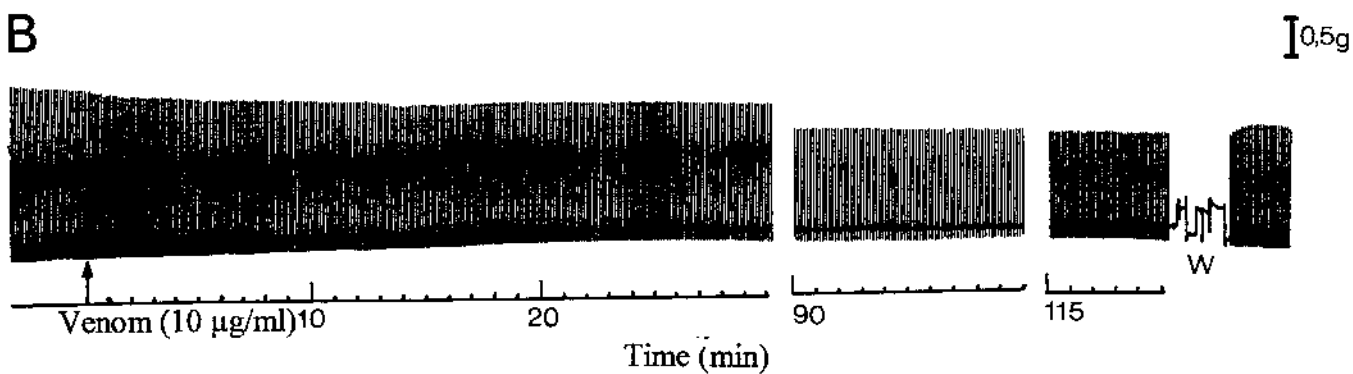
showing the general state of necrosis along a fiber. Note the retracted myofibrils separated by hyaline spaces (*). Bar, 40 μm .

Fig 4. CK release from EDL muscle incubated with *B. pirajai* venom. Each column represents the mean $\pm$ S.M.E. of 11 preparations. (* $P < 0.05$)

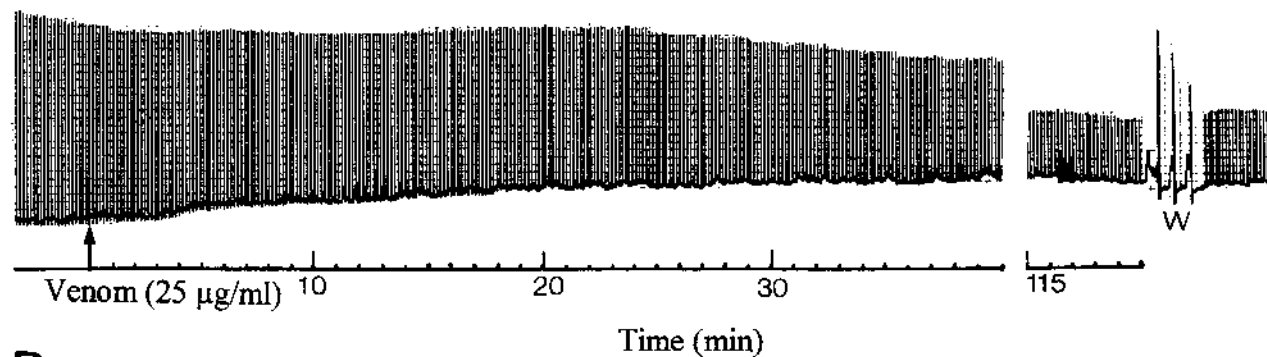
A



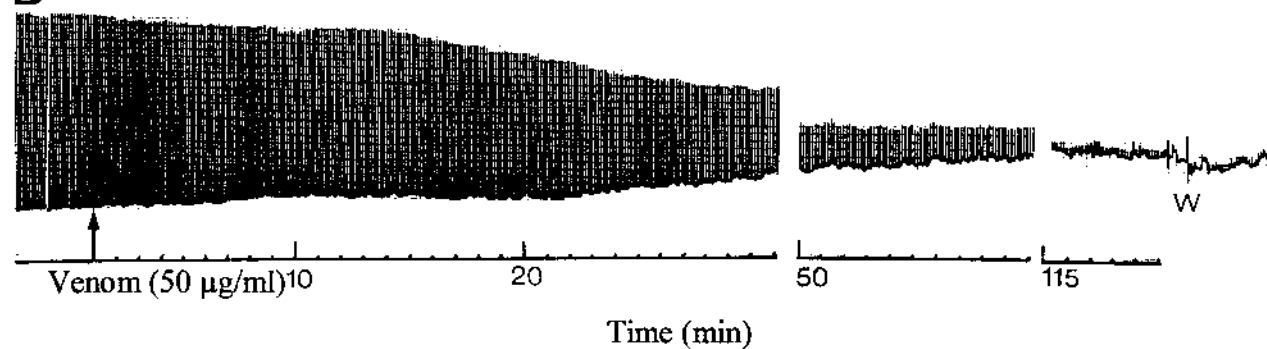
B

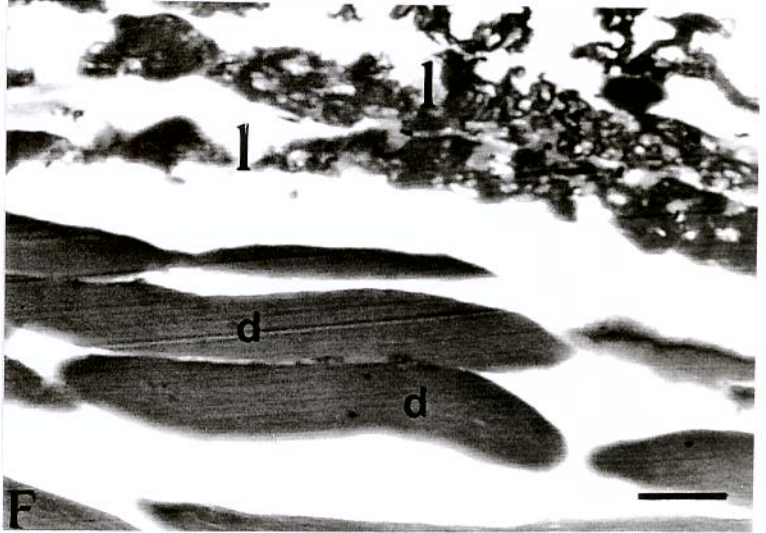
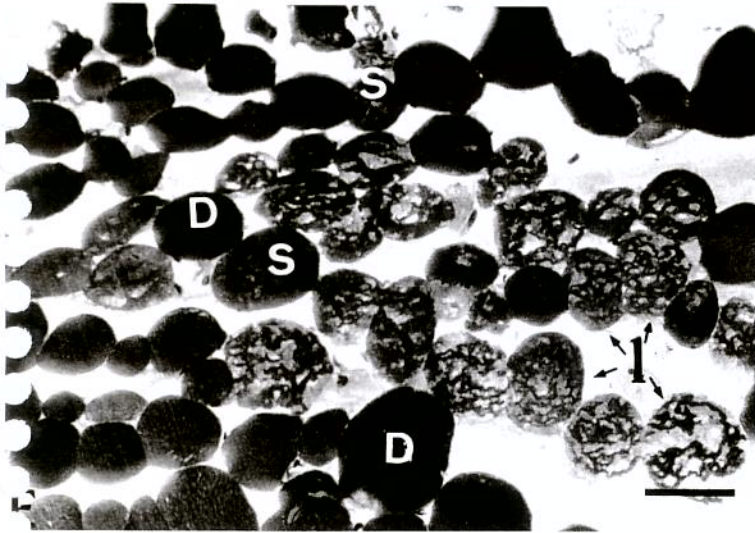
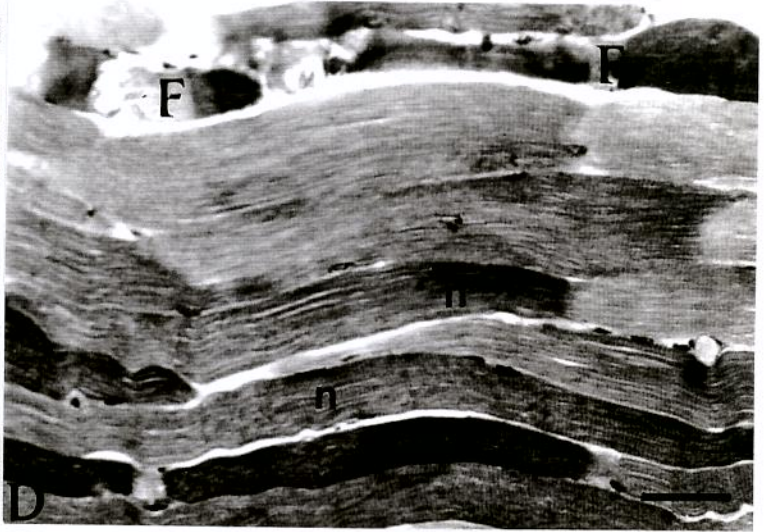
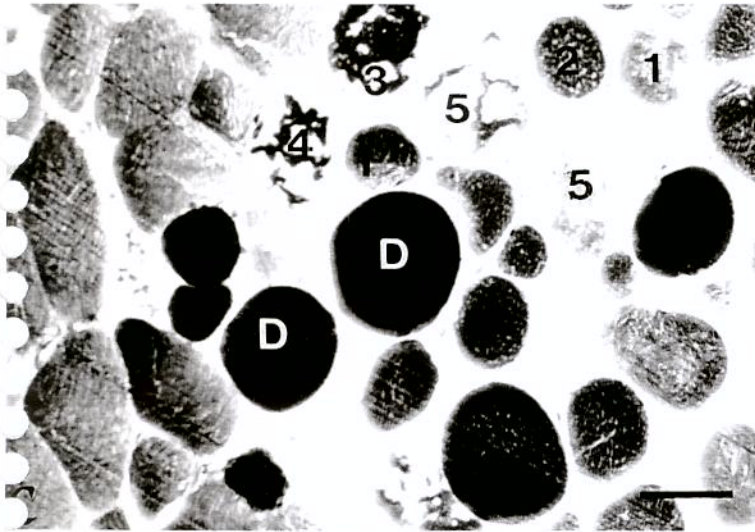
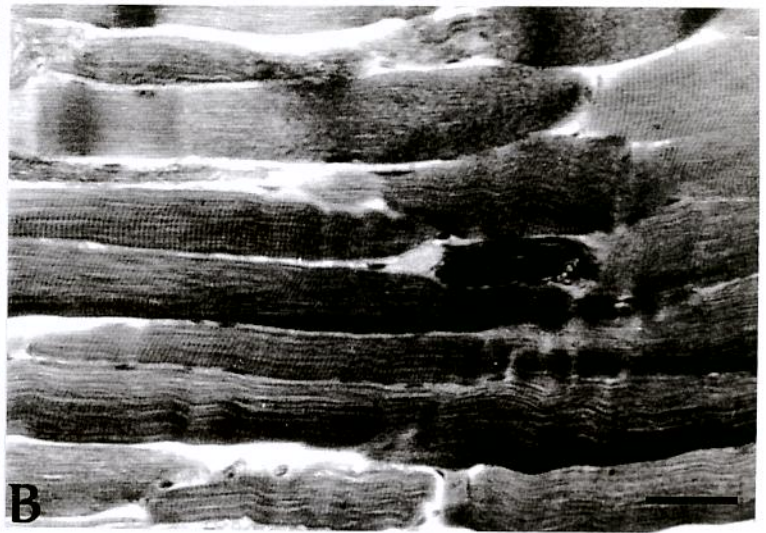
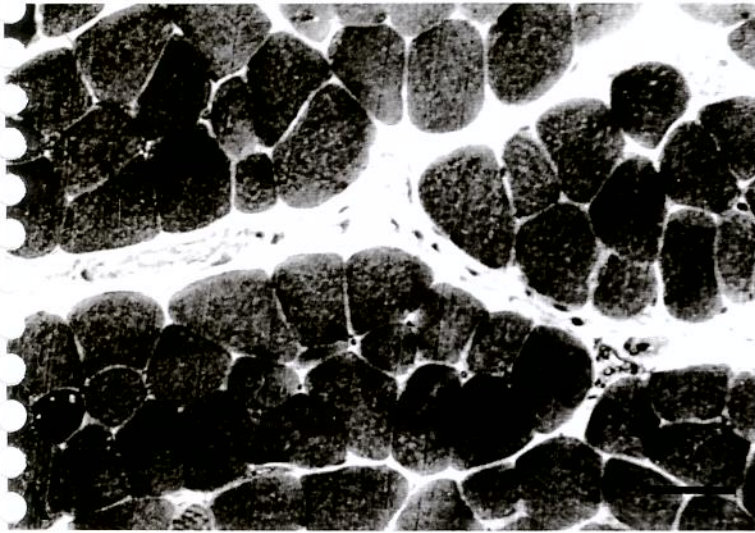


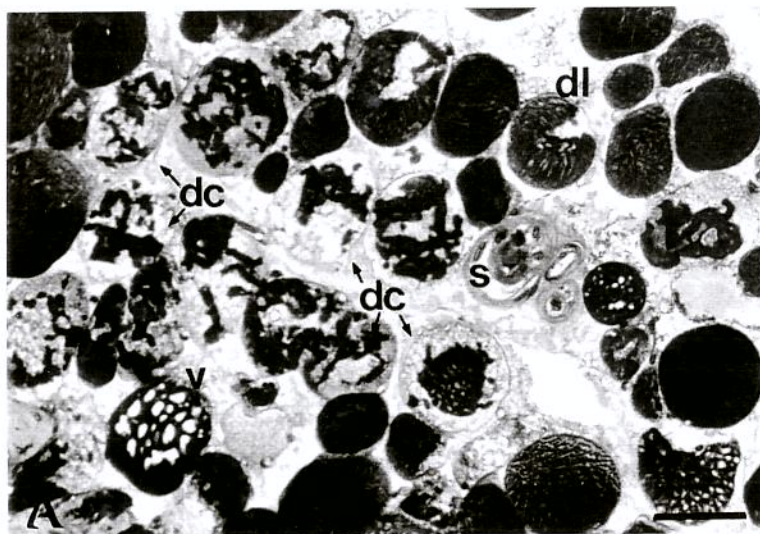
C

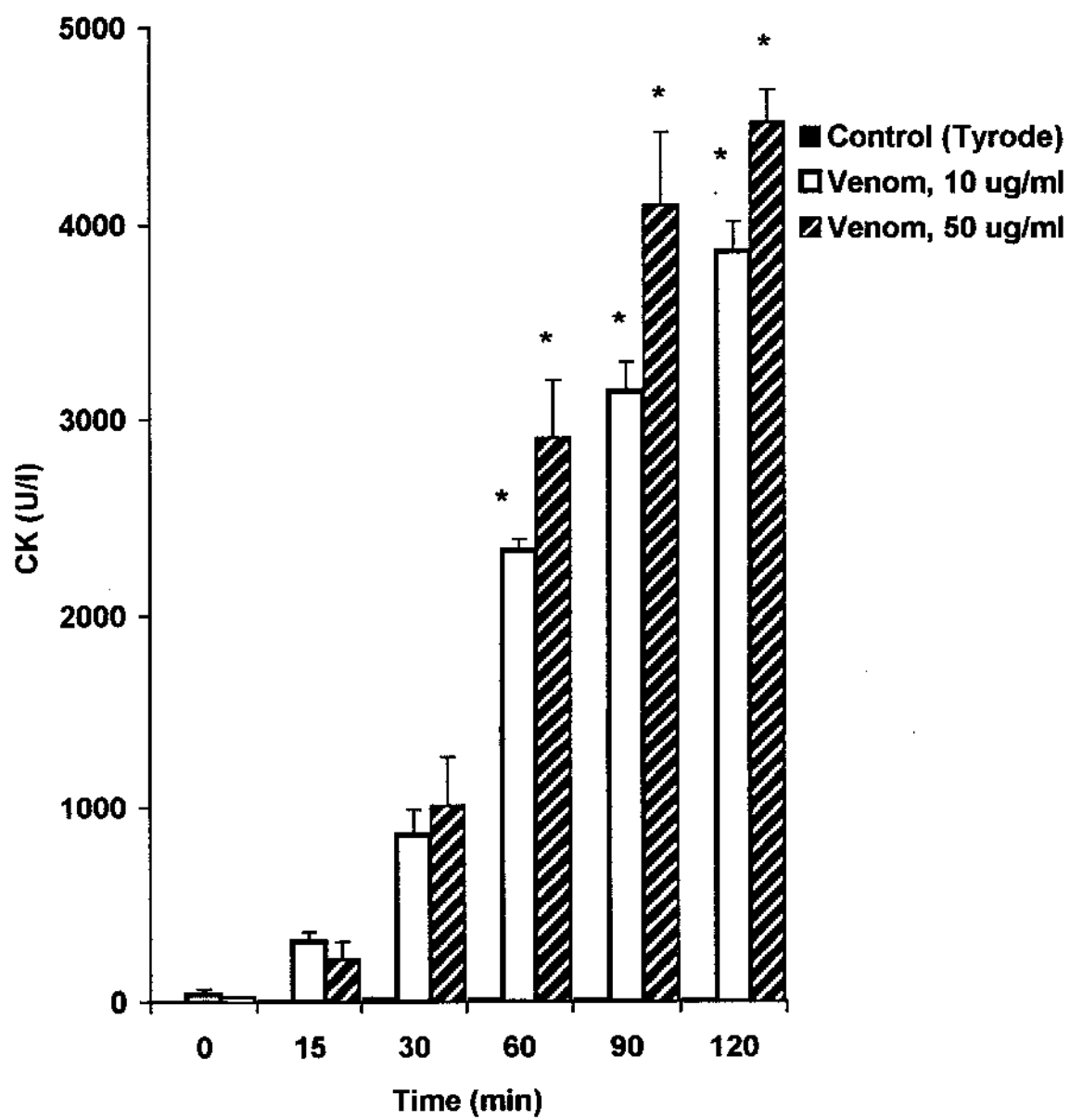


D









**3.2- “Effects of myotoxin PrTX-III from *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation“
(a ser submetido)**

INTRODUCTION

Toxins that induce degeneration in skeletal muscle fibers are thoroughly distributed in snake venoms (Mebs *et al.*, 1983). Myonecrosis is one of the main consequences of the envenomation by snakes of *Bothrops* genus (Rosenfeld, 1971). This myotoxic activity can be either due to ischemia caused by vascular damage, or by direct action on the muscle cell membranes, through damage-inducing proteins, e.g., -phospholipases PLA₂- and PLA₂-like myotoxins (Queiroz *et al.*, 1985; Gutiérrez and Lomonte, 1989). Some PLA₂ and PLA₂-like myotoxins of Bothropic venoms were already isolated, among which bothropstoxin I (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988) and II (Cintra *et al.*, 1993) of *B. jararacussu* venom; myotoxins I, II (Gutiérrez *et al.*, 1984a, Lomonte and Gutiérrez, 1989), III (Kaiser *et al.*, 1990), and IV (Díaz *et al.*, 1995) of *B. asper* venom, myotoxins of *B. nummifer* venom (Gutiérrez *et al.*, 1986; Brusés *et al.*, 1993), myotoxin of *B. insularis* venom (Selistre *et al.*, 1990) and its PLA₂-containing fraction (Cogo *et al.*, 1998), myotoxins I and II (Lomonte *et al.*, 1990), and MOO-1 (Moura *et al.*, 1991) of *B. moojeni* venom, the myotoxin of *B. atrox* venom (Lomonte *et al.*, 1990), myotoxin PRA-1 from *B. pradoi* venom (Moura *et al.*, 1991) and myotoxins I and II from *B. godmani* venom (Díaz *et al.*, 1992). These bothropic myotoxins have become useful tools for the study of muscle degeneration and may help clarify the interactions between nerve and muscle, since they may selectively disrupt motor terminals, muscle fibers or both.

Recently, a fraction SIV-SP₃ of *Bothrops pirajai* venom was isolated by Mancuso *et al.*, (1995) through molecular exclusion and cation ion exchange chromatography. The same fraction obtained by HPLC by Toyama *et al.*, 1998 (submitted) and named MP-III 4RPLA₂ has shown to be an Asp49-PLA₂ myotoxin, with moderate phospholipasic and

anticoagulant but potent myotoxic activities. The venom of *B. pirajai* causes extensive and dose-dependent myonecrosis when assayed *in vitro* (Costa *et al.*, 1998 *in press*). The physiologic and pathological effects of this toxin on EDL skeletal muscle preparation will be investigated in the present study. A brief description of the method of isolation of the fraction is also reported.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Desiccated *B. pirajai* snake crude venom was a kind gift from Prof. Dr. José Roberto Giglio (Faculdade de Medicina/USP, Ribeirão Preto-SP., Brazil) and CEPLAC, CEPEC (Ministry of Agriculture, Itabuna, Bahia, Brazil). Adult Swiss white mice of both sexes (25-30g) were supplied by CEMIB-UNICAMP (Campinas, Brazil). Animals had free access to food and water. All chemicals and reagents used in this work were of analytical grade.

Methods

Isolation of toxin MP-III 4R-PLA₂ (SIV-SP₃)

The purification of the toxin was made according to Mancuso *et al.*, 1995. The whole venom (100 mg) was dissolved in 2.0 ml of 0.1M (pH 7.9) ammonium bicarbonate buffer. The suspension was centrifuged at 10.000 rpm for 4 min and applied on a Sephadex G75 gel filtration column (1.8 cm x 120 cm) previously equilibrated with ammonium bicarbonate buffer. The chromatographic profile was monitored at 280 nm and 3 ml fraction were collected at 13 ml/hr flow rate. The active fraction from the first chromatographic procedure was dissolved in 0.05 M ammonium bicarbonate pH 7.8, centrifuged and applied on a SP-Sephadex C25 column (1.8 cm x 50 cm). The fractionation was made using a continuous convex concentration gradient from 0.05 M to 0.1 M of ammonium bicarbonate, pH 7.9. The elution of samples was monitored at 280 nm and the 3.0 ml fraction was collected at flow rate of 18 ml/hr.

The purification procedure of the isolated fraction obtained as described above was performed according to the method described by Toyama *et al.*, 1995. The active fraction

was dissolved with 750 μ l of 0.1 % (v / v) trifluoroacetic acid (Solvent A). The resulting solution was clarified by centrifugation and the supernatant was applied on top of a 0.78 cm x 30 cm μ -Bondapack C-18 column (Waters 991-PDA system). Elution of peaks were proceeded with a linear gradient from zero to 66.5 % (v / v) acetonitrile (Solvent B) in 0.1 % (v / v) trifluoroacetic acid, at a flow rate of 2.0 ml/min. Absorbances were monitored at 280 nm.

EDL preparation

The mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation was removed from animals anesthetized with chloral hydrate 3 mg/ml (Quimibrás, Campinas-SP., Brazil), mounted horizontally in a 3.5ml organ bath and maintained under a tension of 0.5g in Tyrode's solution (pH 7.4, 37°C) with the following composition (mM): NaCl 137; KCl 2.7; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 0.49; NaH₂PO₄ 0.42; NaHCO₃ 11.9 and glucose 11.1, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. A bipolar platinum ring electrode was placed around the muscle. Indirect stimulation was performed with a Grass S₄₈ stimulator (0.1 Hz, 0.2 ms, 9.0 mV). To record isometric muscle contractions and contractures, the muscle was connected to a force displacement transducer (BG – 10 GM model J-1217) coupled to a physiograph (Gould RS 3400). A single dose of 10, 25 or 50 μ g/ml of the fraction SP₃ of the *B. pirajai* snake venom, one at each time were added to the bath solution after 10 min of baseline recording, and remained during the 120 min of muscle incubation.

Creatine kinase release measurements

The EDL muscle was incubated in a tube containing 3.5ml Tyrode solution at 37°C and bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. At 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min after 10 and 50 μ g/ml fraction SP₃ of the *B. pirajai* snake venom addition, aliquots of the bath solution (100 μ l) were collected and stored at 4°C until their CK activity was determined

using a commercial kit (Granutest® 2.5) purchased from Diagnostica Merck, Germany. The CK activity was expressed by units/litre (U/l).

Histological and Ultrastructural studies

EDL muscle preparations were incubated with fraction SP₃ of the *B. pirajai* snake venom at the doses of 10, 25 or 50 µg/ml for 120 min at indirect electrical stimulation. Following incubation, fragments of the muscle were taken and processed according Costa *et al.*, *in press*. The examination of sections and photomicrographs were taken using a Axiophot Zeiss light microscope. For the ultrastructural analysis, the EDL muscle preparations (n=2) were incubated with fraction SP₃ of *Bothrops pirajai* snake venom at the dose of 50 µg/ml for 120 min. The tissue was immediately fixed in Karnovsky's fixative (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) for 12 hr, washed in phosphate buffer, pH 7.2, and postfixes in 1% buffered osmium tetroxide. Then, samples were dehydrated in ethanol and embedded in Spurr resin. Sections (1.5 µm thick) were double-stained with toluidine blue for selection of interesting areas, and ultrathin (silver to light gold) sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined on Leo- 906 electron microscope.

Statistical analysis

The significance of any differences observed was determined using Student's *t* – test with a *P* value < 0.05 being considered significant. The results are expressed as media ± Standard error ($\Sigma \pm$ S.E.)

RESULTS

Effects on Myography

The fraction SP₃ of a dose of 50 µg/ml (n=5) of *Bothrops pirajai* snake venom induced a blockade of the contractile response on indirect electrical stimulation after 120 min. (Fig. 2 A and C). With the dose of 25 µg/ml (n=4), a 50% blockade of the contractile response was observed at 60 min of experiments (fig. 2 A). No contracture was observed.

CK release by EDL muscle preparation

Incubation of EDL muscle preparation with 10 and 50 µg/ml of toxin SP₃ induced a dose-dependent liberation of CK. The dose of 10 µg/ml, did not cause variation in the amount of CK in the incubation bath at 15, 30, 60 and 90 min (Fig. 3). Incubation with 50 µg/ml dose causes a gradual CK liberation the maximal peak being achieved after 120 min, (18 476,57 U/liter/S.E.M.) (Fig. 4).

Myotoxic Effects

Light microscopy

Morphological changes of the muscle fibers were detected with the dose of 10 µg/ml after incubation with myotoxin SP₃ for 120 min. The myonecrotic lesions induced by this fraction consisted of delta lesions, agglutinated myofibrils forming masses intermingled with clear spaces and irregularly shaped fibers (Fig. 4A, B). Such changes affected the peripheral fibers most. A number of fibers looked normal. At a dose of 25 µg/ml there were larger number of affected fibers but the myonecrotic process was more advanced, as the intertwined threads of clumped myofibrils were thinner resembling a lace network (Fig. 4C, D). In addition to such type of myonecrotic fibers, there were others which were densely stained and with large numbers of micro-vacuoles. With the highest dose (50 µg/ml) the myonecrosis was more severe as large clear areas devoid of myofibrils

appeared in many fibers. Cross sections of such areas represented ghost profiles of the fibers (Fig. 4E, F). Darkened cells still showing striation and/or swollen at hypercontracted areas were also seen.

Electron microscopy

Venom's fraction-treated preparations

Incubated-muscles showed that the fraction SIV-SP₃ was able to induce remarkable changes in a number of muscle fibers, but was ineffective or poorly myotoxic to a few others, which remained normal in appearance. Figure 5 illustrates such distinct cell responses upon interaction with the toxin (50µg/ml) at the same incubation period of 120 min. The majority of muscle cells that were affected by the toxin were at about the same stage in the necrotic process. The ultrastructural changes were characterized by amorphous electron opaque masses, immersed in which more or less distinguishable myofilaments were detected depending on the section level of the fiber (Figs. 5B-5C). At this time some portions along the fiber were severely damaged (Figs. 6A, 6B). Those most affected were virtually empty cells showing here and there abnormal mitochondria (Fig. 6B), but the basal lamina was still visible. Sarcoplasmic reticulum disorganization and mitochondrial pleomorphism (abnormalities of cristae and matrix) ran parallel to sarcomere/myofilament damage (Fig. 5 A to 6B). Besides the myonecrotic effect, SIV-SP₃ fraction also proved able to provoke striking changes at the neuromuscular junctions affecting both pre- and subsynaptic sites. At 120 min incubation nerve endings were necrotic, being only recognizable through their location at the synaptic gutter (Figs. 7 A to 8B). Intramuscular myelinated nerve fibers also appeared necrotic with abnormalities both in the myelin sheath and axon.

DISCUSSION

The majority of myotoxins isolated from snake venoms are phospholipases A₂ (Harris *et al.*, 1980; Gutiérrez *et al.*, 1984 b). The fraction SIV-SP₃ isolated from *Bothrops pirajai* snake venom is also a basic phospholipase A₂ - Asp₄₉ myotoxin, with molecular weight of 13.000 daltons (Mancuso *et al.*, 1995; Toyama *et al.*, 1998 *submitted*). Despite its moderate phospholipasic activity, SIV-SP₃ fraction has shown highly potent myotoxic activity in mice gastrocnemius muscle (Toyama *et al.*, 1998 *submitted*). Kini and Evans (1989) analysing the amino acid sequences of some phospholipasic myotoxins concluded that a variety of myotoxins possesses cationic properties and hydrophobic domains, distinct from those of catalytic sites. Such characteristics are evident in myotoxins devoid of phospholipase activity but high myotoxic activity, such as bothropstoxin-I (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988) of *Bothrops jararacussu* venom and myotoxin I of *Bothrops asper* venom (Gutiérrez *et al.*, 1984a).

Besides the *in vivo* studies, *in vitro* models have also been utilized for reproducing and evaluating the biological phenomena that would happen with the muscle in venomous ophidic bites. In this work, we found that the fraction SP₃ of the venom of *Bothrops pirajai* presents a potent effect on the muscle fibers and neuromuscular junction. Our results demonstrate a dose-dependent blockade of twitch-tension responses under indirect electrical stimulation, which we repute to arise from neurotoxic and myotoxic effects of the toxin. Ultrastructural data shows that the sarcolemma of the muscle fibers and the axolemma of the nerve terminals were ruptured. A major task in determining the mechanism (s) by which toxins express their effects resides in the determination of the interaction site established between membrane receptors in the tissues and specific groups of the toxin molecule. In this interaction hydrophobic domains, radical charges and spatial

conformation of the molecule also may have important roles (Kini and Iwanaga, 1986 a, b; Dreyer, 1990; Strong, 1990).

The morphological changes caused by PLA₂- myotoxin (Asp 49) and PLA₂- "like" (Lys49) ones were characterized by rapid lysis of sarcolemma, hypercontractions and necrosis. Delta-lesions are consequent to focal lesions of the sarcolemma and progress to a Ω-shaped lesion (Mokri and Engel, 1975). They are observable after 15 min of the injection of the toxin (Gutiérrez *et al.*, 1984 a, b; 1991).

In the present work the SIV-SP₃ fraction (10, 25 and 50 µg/ml) produced dose-dependent numbers of damaged muscle cells. However, regardless the dose, a quite common state of necrosis was exhibited by the effect cells after 120 min incubation time, i. e., clumping of myofibrils. Cells that in cross section showed vacuolation were the same that presented closely-clumped myofibrils as observed in longitudinal sections. The morphological findings (light and electron microscopy) of the muscle exhibit the classical myonecrotic features being unspecific and independent of the agent. Sarcolemma lesions, extracellular Ca²⁺ entrance, hypercontraction of myofibrils and mitochondria intoxication were the common sequence of events leading to cell death.

Evaluation of the myotoxic activity of venoms and toxins, *in vivo* and *in vitro* has been performed through histological analysis associated to biochemical assays measuring muscle damage. We have demonstrated that fraction SP₃ incubated with EDL-preparation promoted dysfunction of the sarcolemma which lost its ability to maintain CK, the major protein of the M-line (a region where lateral connections are made between adjacent thick myofilaments) inside the cells. Creatine kinase catalyses the transfer of a phosphate group from phosphocreatine, a storage form of high-energy phosphate groups, to ADP, thus providing the supply of ATP necessary for muscle contraction. When sarcolemma loses its integrity, as is the case after SP₃ action, muscle cells were deprived from the contraction-

promoting fuel and permits to understand the rapid onset of local lesions at the snake bite site.

Using a dose of 50 µg/ml CK levels in the incubation bath rise dramatically to 13.000 U/l at 60 min and 20.000U/l at 120 min. The findings stress the myotoxic character of the fraction, and agree with literature on effects of other myotoxins (Gutiérrez *et al.*, 1986 a, b; Melo *et al.*, 1993).

In EDL, glycolytic muscle fibers outnumber oxidative ones, but the results do not permit the identification of which fibers were more sensitive to the toxin.

Our ultrastructural findings suggest that SP₃ from *B. pirajai* also has a potent pre-synaptic effect. As regards the neurotoxic activity, receptors located at the nerve endings would recognize the amino acid sequence of 80 - 110 PLA₂ residues (Kini and Iwanaga, 1986 a, b), promoting a selective inhibition of slow K⁺ channels which would be responsible for the facilitatory effect, and the influx of Ca²⁺ at the nerve terminals (Simpson *et al.*, 1993; Dreyer and Penner, 1987). A cascade of events triggered by Ca²⁺ influx produces hypercontraction, high concentration of cytosolic Ca²⁺, Ca²⁺-dependent endogenous PLA₂s activation, loss of cell homeostasy and necrosis (Wrogieman and Pena, 1976; Trump *et al.*, 1982; Petronsk *et al.*, 1982).

It has been proposed that myotoxicity from notexin, crotoxin and taipoxin arises from the capacity of the venom PLA₂ to hydrolyse phospholipids of cell membranes (Harris and MacDonnel, 1981; Hawgood, 1982; Gopalakrishnakone *et al.*, 1984; Harris and Maltin, 1982). These myotoxins are examples of PLA₂ myotoxins with presynaptic activity, and their effects are similar to the effects of SIV-SP₃ fraction from *B. pirajai*.

Our results permit suggest that the fraction SP₃ acts as a phospholipase A₂-myotoxin Asp49, with potent neurotoxic activity, the exact mechanism of which is still obscure.

ACKNOWLEDGEMENTS

P. D. Costa was the recipient of a studentship (Master degree) from CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior). The authors thank Mr. Gildo Bernardo Leite and Mr. Gustavo H. da Silva for technical support, Dr. Stephen Hyslop for revising the English. This work was supported in part by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

REFERENCES

- Brusés, J.L., Capaso, J., Katz, E. and Pilar, G. (1993) Specific *in vitro* biological activity of snake venom myotoxins. *J. Neurochem.* **60**, 1030-1042.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B. and Giglio, J.R. (1993) Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.* **12**, 57-64.
- Cogo, J. C., Prado-Franceschi, J., Giglio, J. R., Corrado, A. P., Cruz-Höfling, M. A. Donato, J. L. , Leite, G. B. and Rodrigues-Simioni, L. (1998). An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicon* **36**, 1323-1332.
- Costa, P.D., Toyama, M.H., Marangoni, S., Rodrigues-Simioni, L. and Cruz-Höfling. (1998) Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation. *Toxicon* (in press).
- Díaz, C., Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1992) Isolation and characterization of basic myotoxic PLA₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. *Archs. Biochem. Biophys.* **298**, 135-142.
- Díaz, C., Lomonte, B., Zamudio, F. and Gutiérrez, J.M. (1995) Purification and characterization of myotoxin IV a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. *Natural Toxins* **3**, 26-31.
- Dreyer, F. and Penner, R. (1987) The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of a mouse motor nerve terminal. *J. Physiol. (Lond.)* **386**, 455-463.

- Dreyer, F. Peptide toxins and potassium channels (1990) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.* **115**, 93-136.
- Gopalakrishanakone, P., Dempster, D.M., Hawgood, B.J. and Ekder, H.Y. (1984) Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon* **22**, 85-98.
- Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Mata, E., Cerdas, L. (1986 a) Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Toxicon* **24**, 223-231.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. and Cerdas, L. (1986 b) Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* **24**, 885-894.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan* **51**, 211-223.
- Gutiérrez, J.M., Nunez, J., Díaz, C., Cintra, A.C.O., Homsí-Brandeburgo, M.I. and Giglio, J.R. (1991) Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. molec. Path.* **55**: 217-229.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. and Odell, G.V. (1984a) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* **22**, 115-128.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L. and Odell, G.V. (1984b) Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.* **40**, 367-379.

- Harris, J. B., Johnson, M. A. and MacDonnel, C. A. (1980) Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins. In: *Natural Toxins*, eds. Eaker, D. and Wadstrom, T., pp. 569-578. Pergamon Press, Oxford.
- Harris, J. B. and MacDonnel, C. A. (1981) Phospholipase A₂ activity of notexin and its role in muscle damage. *Toxicon* **19**, 419-425.
- Harris, J. B. and Maltin, C. A. (1982) Myotoxic activity of crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin of the Australian taipan *Oxyuranus scutellatus*. *Br. J. Pharmacol.* **76**, 61-75.
- Hawgood, B. J. (1982) Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: *Rattlesnake Venoms. Their Actions and Treatment*, ed. Tu, A. T., p. 121. New York: Marcel Dekker.
- Homsí-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J.R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* **26**, 615-627.
- Kaiser, I.I., Gutiérrez, J.M., Plummer, D., Aird, S.D. and Odell, G.V. (1990) The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 319-325.
- Kini, R.M. & Evans, H.J. (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* **27**, 613-635.
- Kini, R. M. & Iwanaga, S. (1986 a) Structure-function relationships of phospholipases-I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* **24**, 527-541.

- Kini, R. M. & Iwanaga, S. (1986 b) Structure-function relationships of phospholipases-II; charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* **24**, 895-905.
- Lomonte, B. and Gutiérrez, J.M. (1989) A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* **27**, 725-733.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Furtado, M.F., Otero, R., Rosso, J.P., Vargas, O.; Carmona, E. and Rovira, M.E. (1990) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28**, 1137-1146.
- Mancuso, L.C., Correa, M.M., Vieira, C.A., Cunha, O.A.B., Lachat, J.J., Selistre De Araújo, H.S., Ownby, C.L. and Giglio, J.R. (1995) Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon* **33**, 615-626.
- Mebs, D., Ehrenfeld, M. and Samejima, Y. (1983) Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. *Toxicon* **21**, 393-404.
- Melo, P.A.; Honsi-Brandeburgo, M. I.; Giglio, J. R.; Suarez-Kurtz, G. (1993) Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon* **31**, 285-291.
- Mokri, B. and Engel, A.G. (1975) Duchenne dystrophy: Eletron microscopic finding pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane at the muscle fiber. *Neurology* **25**, 1111-1120.

- Moura, A.M., Desmond, H., Laing, G. and Theakston, R.D.G. (1991) Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon* **29**, 713-723.
- Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Mandelbaum, F.R. (1985) Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* **23**, 341-345.
- Rodrigues-Simioni, L., Borgese, N. and Ceccarelli, B. (1983) The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* **10**, 475-489.
- Rosenfeld, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and Their Venoms*, ed. W Bücherl and E. Bücherl, pp. 345-384. Academic Press, New York.
- Selistre, H.S., Queiroz, L.S., Cunha, O.A.B., De Souza, G.E.P. and Giglio, J.R. (1990) Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* **28**, 261-273.
- Simpson, L., Lautenslager, G. T., Kaisee, I. and Middlebrook, J. L. (1993) Identification of the site at which phospholipase A₂ neurotoxins localize to procedure their neuromuscular blocking effects. *Toxicon* **31**, 13-26.
- Strong, P. N. Potassium channel toxins (1990) *Pharmac. Ther.* **46**, 137-162.
- Toyama, M.H., Soares, A.M., Vieira, C.A., Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R. and Marangoni, S. (1998) The amino acid sequence of piratoxin-I (PrTX-I), a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. *J. Protein Chem.* **17**, 713-718.

- Toyama, M. H., Costa, P. D., Novello, J. C., Oliveira, B., Giglio, J. R., Cruz-Höfling, M. A. & Marangoni, S. (1998) Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity. *J. Protein Chem.* (submitted).
- Wrogieman, K. and Pena, S. D. J. (1976) Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell necrosis in muscle diseases. *Lancet i*, 672-673.

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1-Repurification of SIV-SP₃ fraction performed on analytical RP-HPLC. The repurification was made using a linear gradient of concentration of acetonitrile (Buffer B).

Fig. 2- Blockade of contractile response of the mouse EDL skeletal muscle preparations incubated with fraction SP₃ of *Bothrops pirajai* snake venom.

In A, dose-dependent blockade by toxin SP₃ of the EDL muscle twitches. Verticals bars represent the means $\pm$ S.E. of 3-5 experiments. B, C, and D correspond to isometric twitch tension recorded after indirect electrical stimulation of the EDL muscle preparation incubated in normal Tyrode (*) and in Tyrode with fraction SP₃ ($\uparrow$) with doses of 10, 25 and 50 μ g/ml, respectively. At W, the preparations were washed with Tyrode solution.

Fig. 3-Effect of myotoxin fraction SP₃ on the release of CK from EDL muscle preparation.

Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 3-4 experiments.

Fig. 4-Morphological alterations of indirectly stimulated EDL incubated with fraction SP₃ for 120 min.

A and B: dose 10 μ g/ml. Myonecrosis is mainly restricted to peripheral fibers (arrow), v: blood vessels. In C and D, some necrotic stages included hypercontracted fibers (e); diminute cells (arrowheads) and vacuolation (arrow). More necrosis was seen in the peripheral fibers. (*) delta lesions; d = densely contracted myofibrils, moth-eaten in appearance (m). E and F, 50

$\mu\text{g/ml}$ SP₃ myotoxin: observe that the majority of the cells presents advanced myonecrosis (arrowheads). A and C: Bar= 40 μm ; B, D, E and F: Bar= 10 μm .

Fig. 5- Electronmicrographs of skeletal muscle cells after incubation with 50 $\mu\text{g/ml}$ of SP₃ myotoxin

A - Damaged and normal-looking muscle fibers (top and bottom, respectively). Note the electron-density of the T-tubules (inset) (16.800 x).

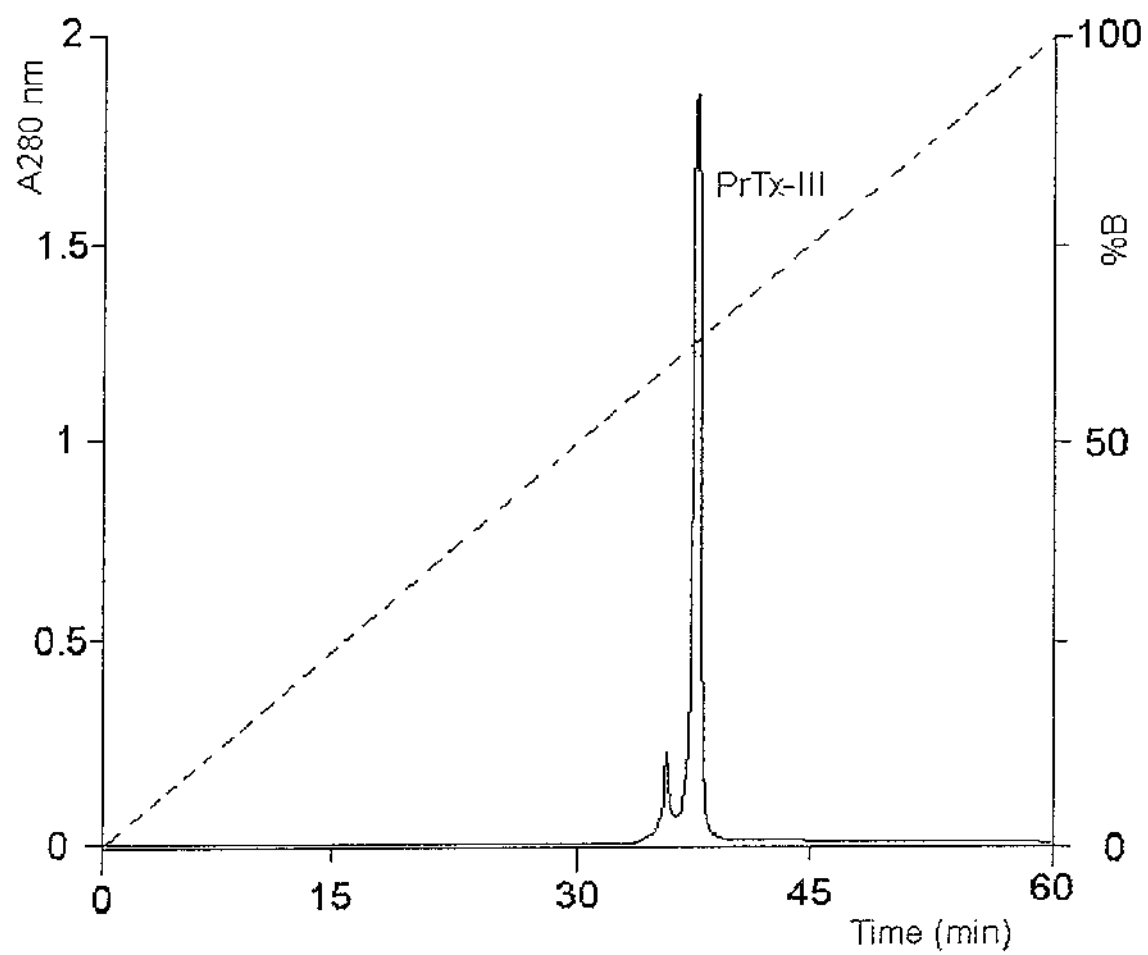
B - Necrotic fiber with a cluster of abnormal mitochondria (flocculent densities (f), swelling (s), ruptured or collapsed cristae) between hypercontracted sarcomeres and a loose area with abundant small vesicles (10.200 x).

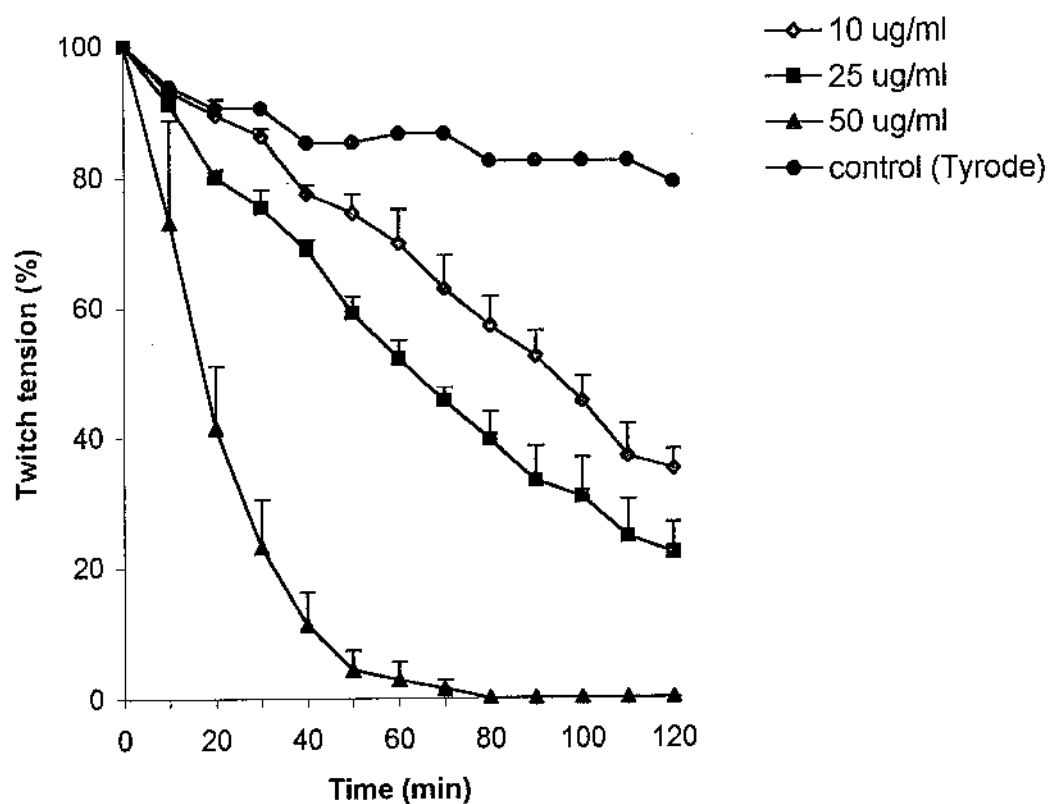
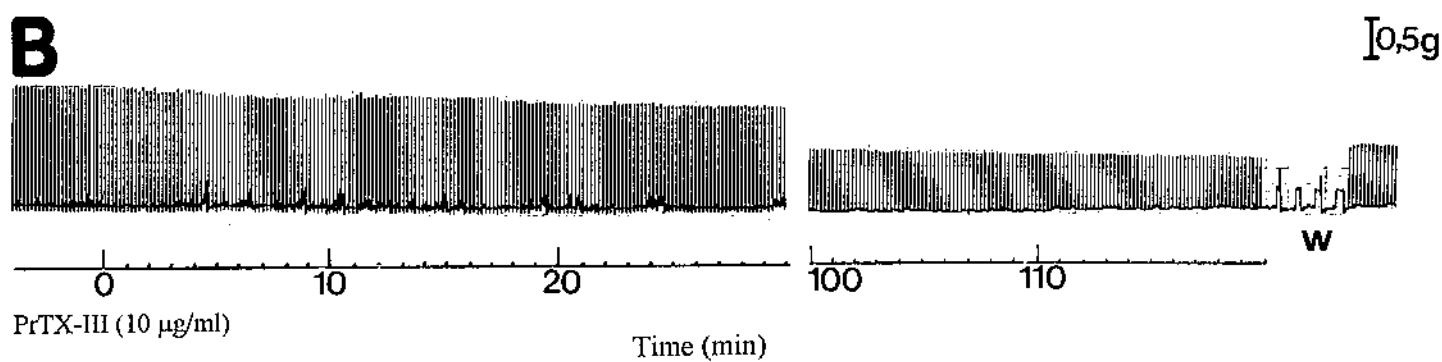
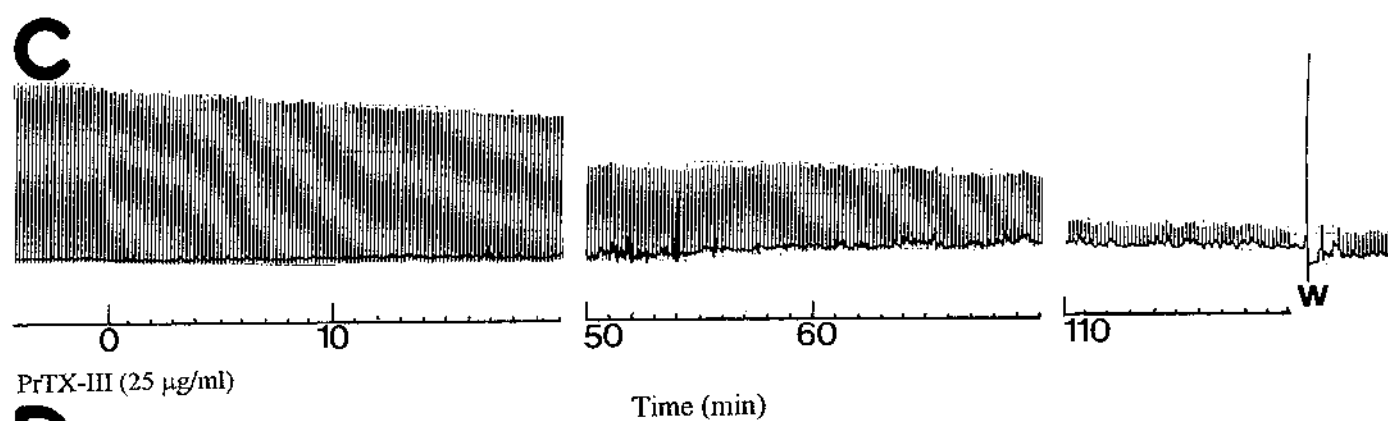
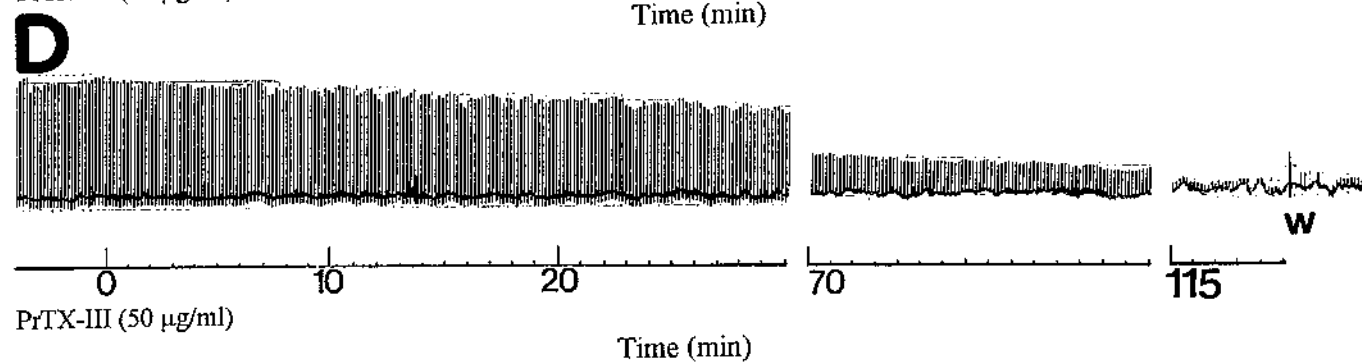
C - Detail of a muscle cell with myofilament clumping (17.000 x).

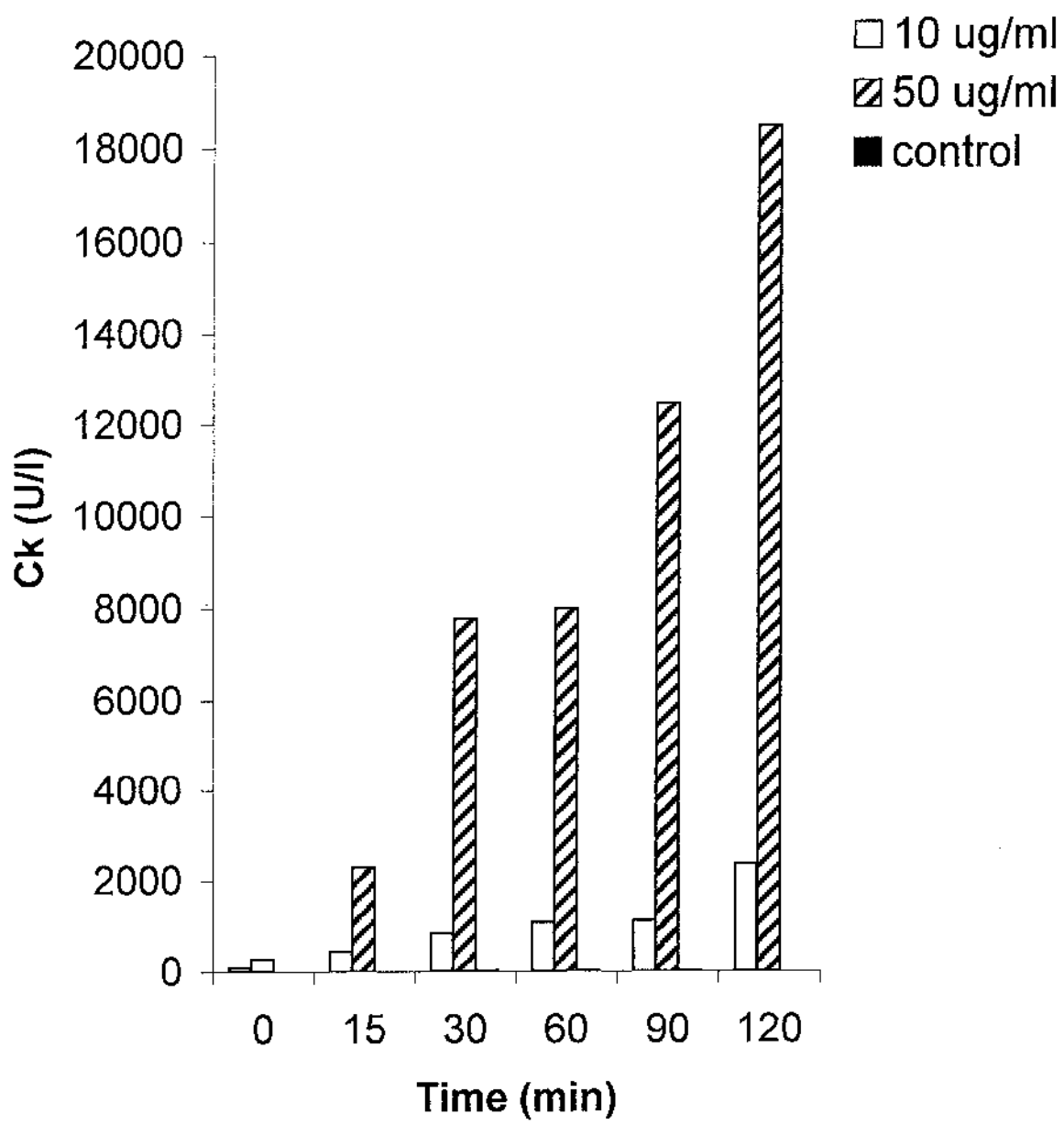
Fig. 6- A) Electronmicrograph showing a myonecrotic cell in advanced stage of damage; densely-clumped myofilaments (C) and clusters of degenerated mitochondria (M) and sarcoplasmic reticulum-derived membranes. Note that basal lamina (bl) appears intact but plasma membrane is interrupted (arrowheads) (7.000 x). In B: muscle cell depleted of organelles, except for damaged mitochondria. Segments of interrupted sarcolemma were seen (10.800 x).

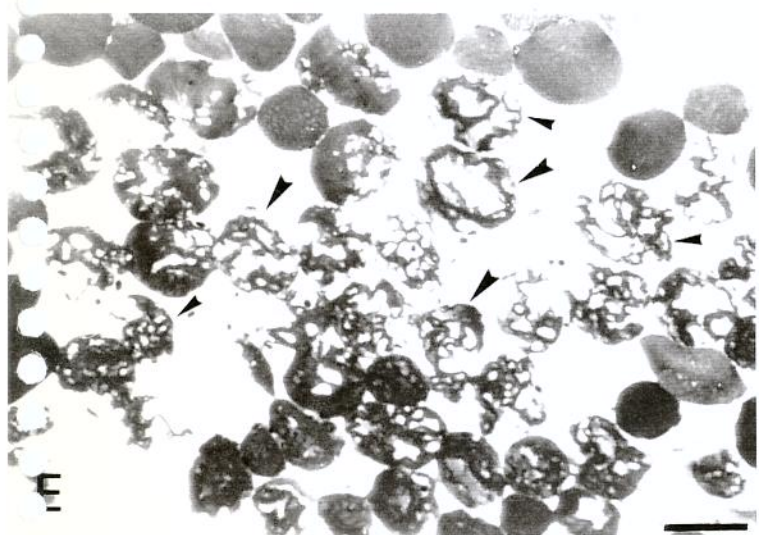
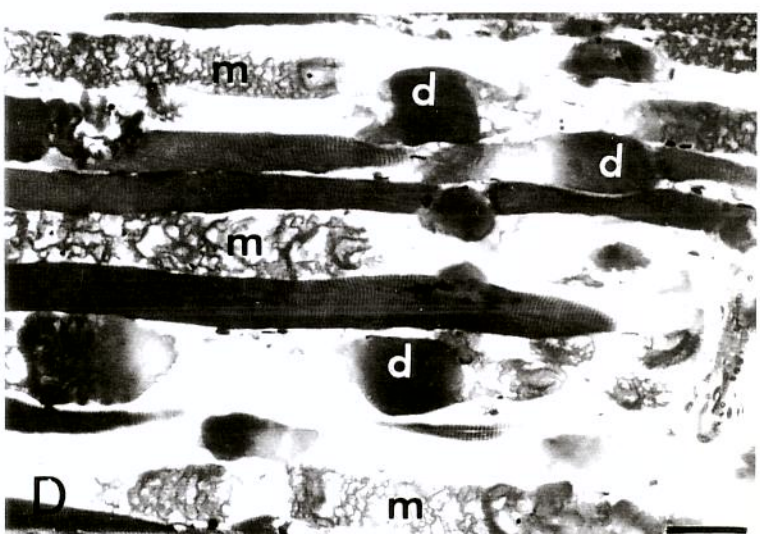
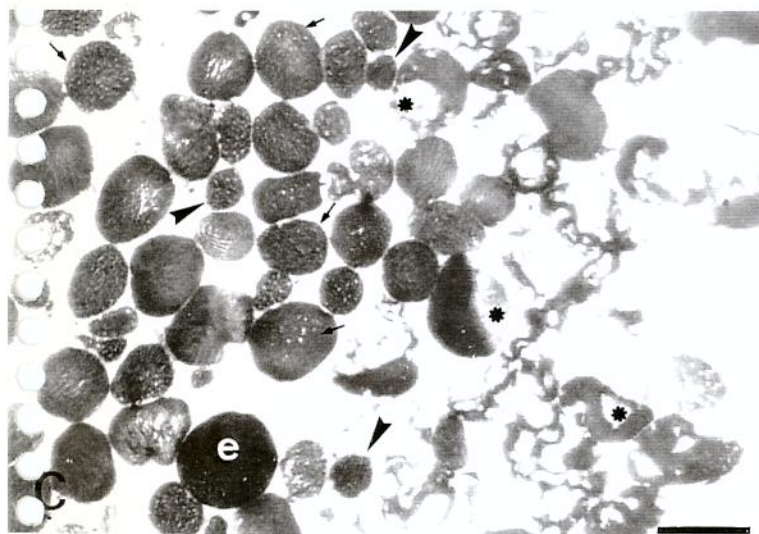
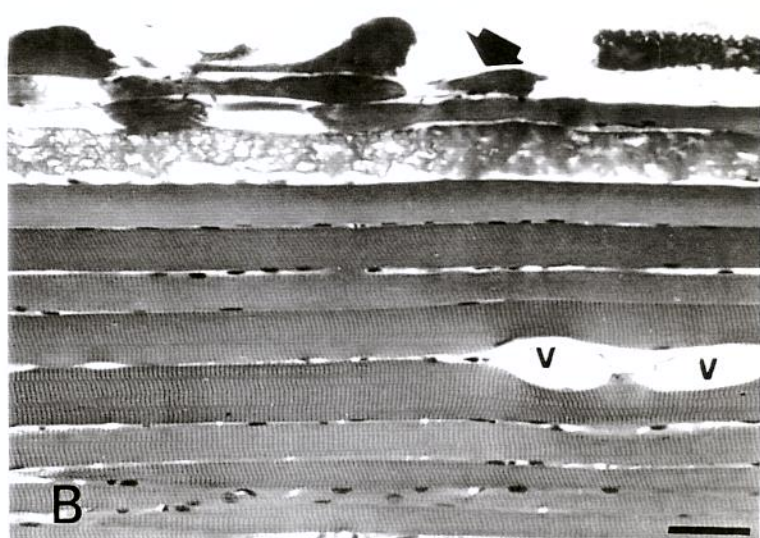
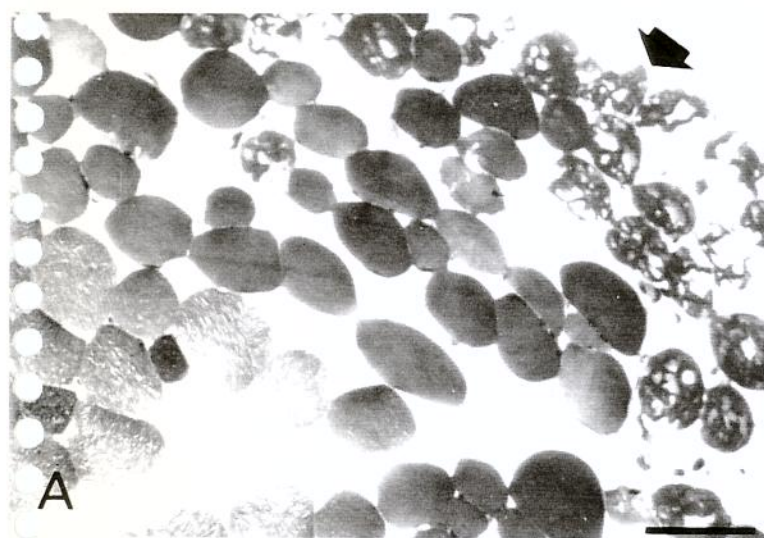
Fig. 7- A and B, electronmicrographs of two neuromuscular junctions (50 $\mu\text{g/ml}$ of SIV-SP₃ myotoxin) showing highly deteriorated nerve endings. Schwann cell (S) cytoplasmic tongues surround the darkened terminal. Junctional folds present, membranous whorls or have abnormal profiles. Mitochondria matrix of normal density (38.000 x and 28.000 x, respectively).

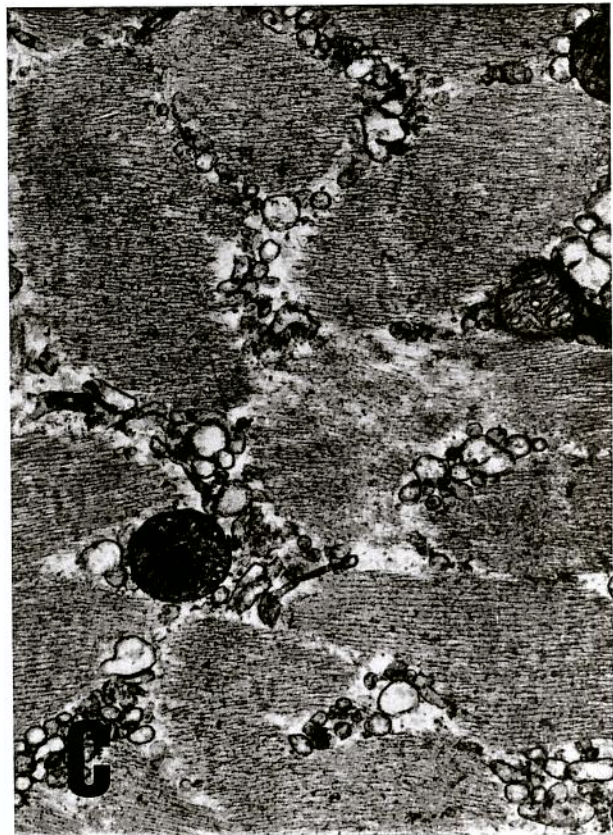
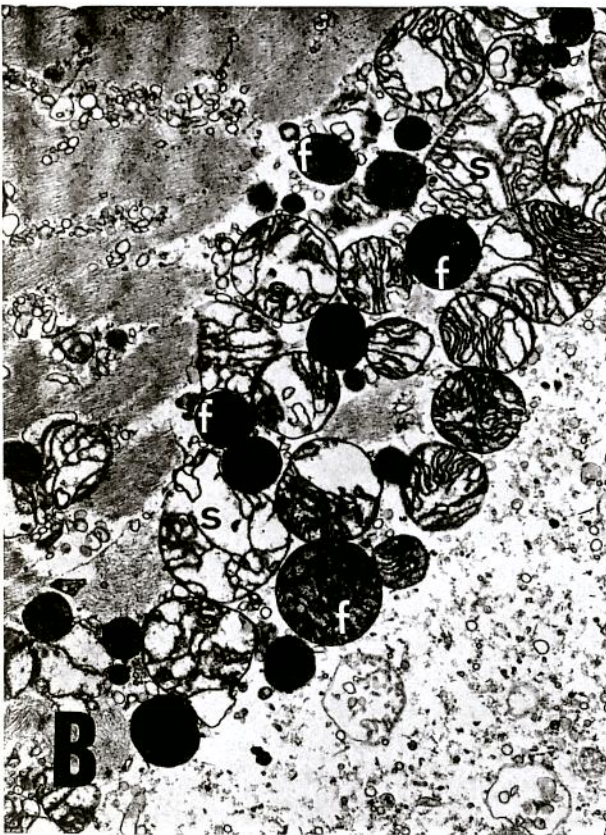
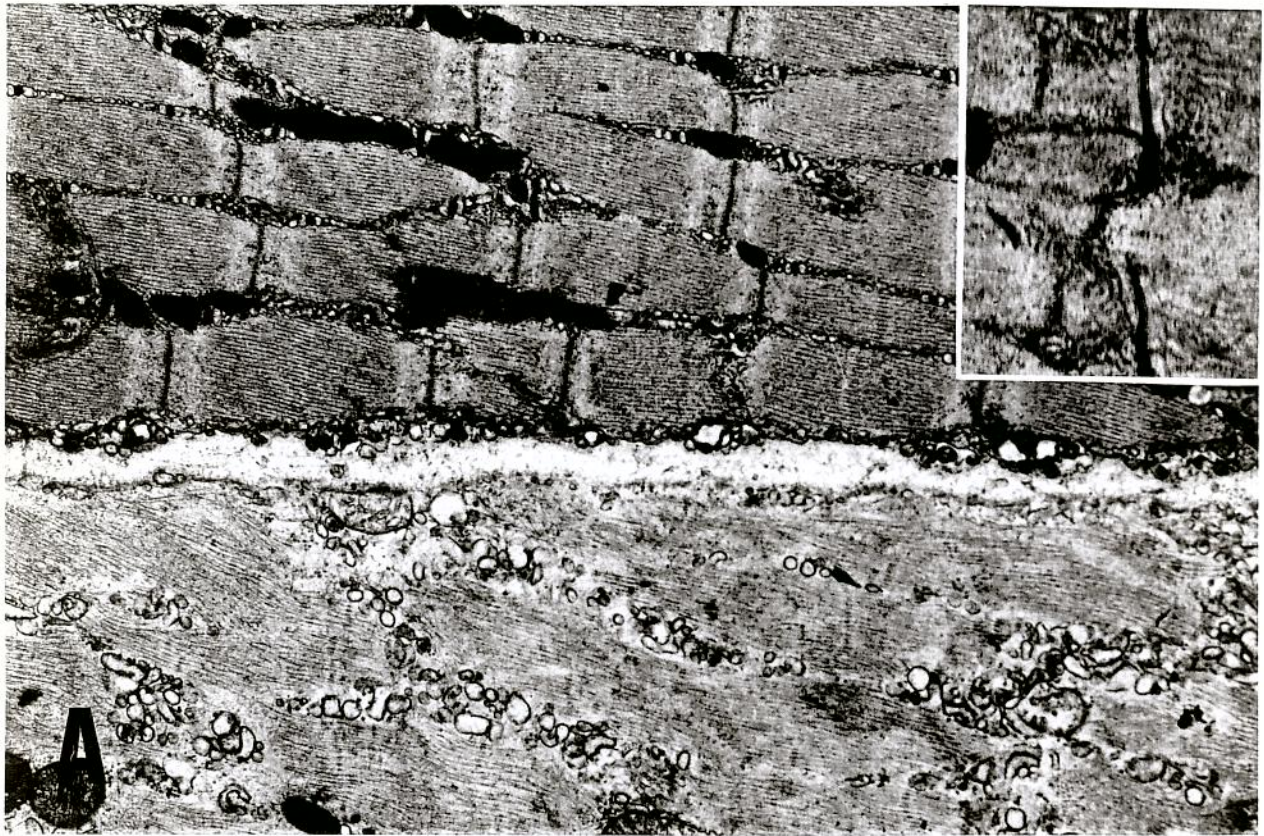
Fig. 8- Electronmicrographs of a denervated end-plate. A) The remnants of the nerve ending incompletely fill the synaptic gutter; B) detail of a heavily damaged terminal. A population of round membrane bound vesicles fills the synaptic cleft. S= Schwann cell; C) myelinated axons show disorganization of the myelin sheath and axoplasm (29.800 x, 30.000 x and 9.600 x, respectively).

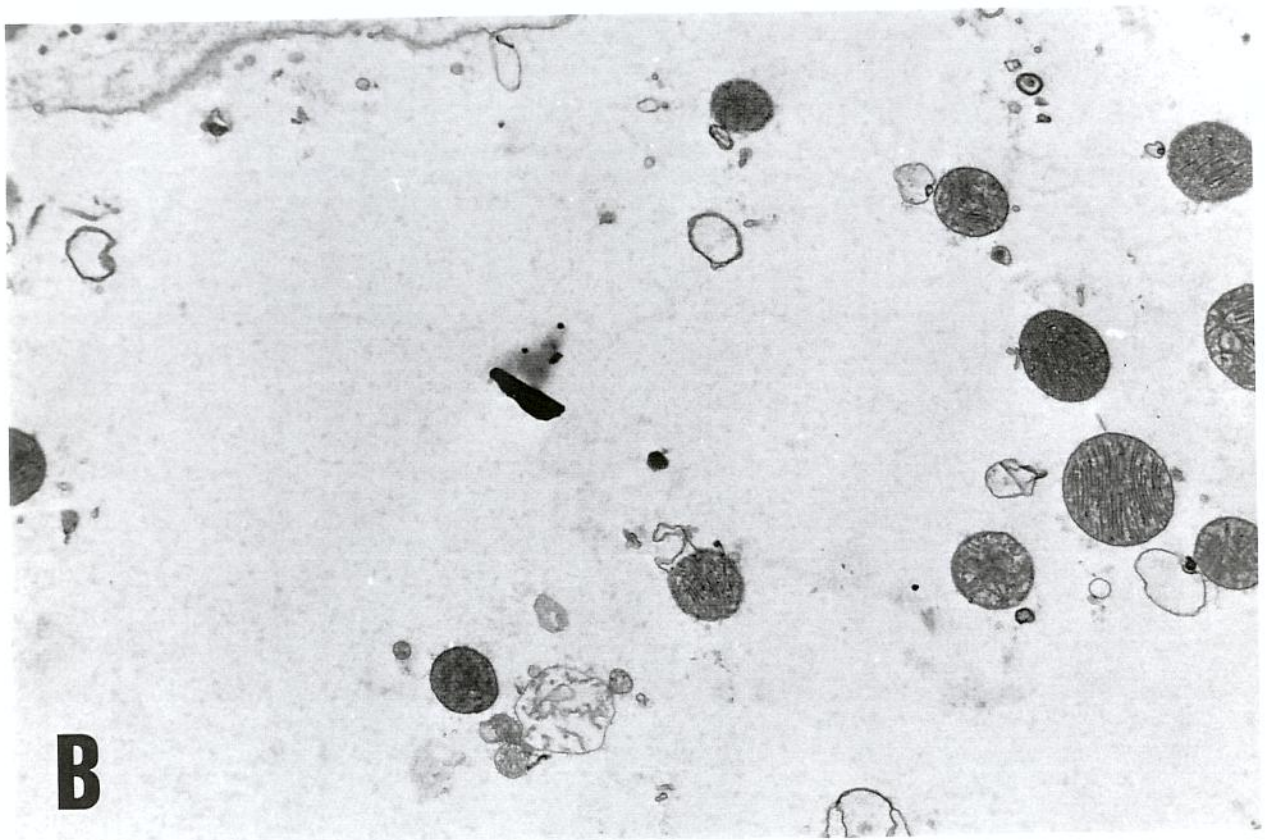
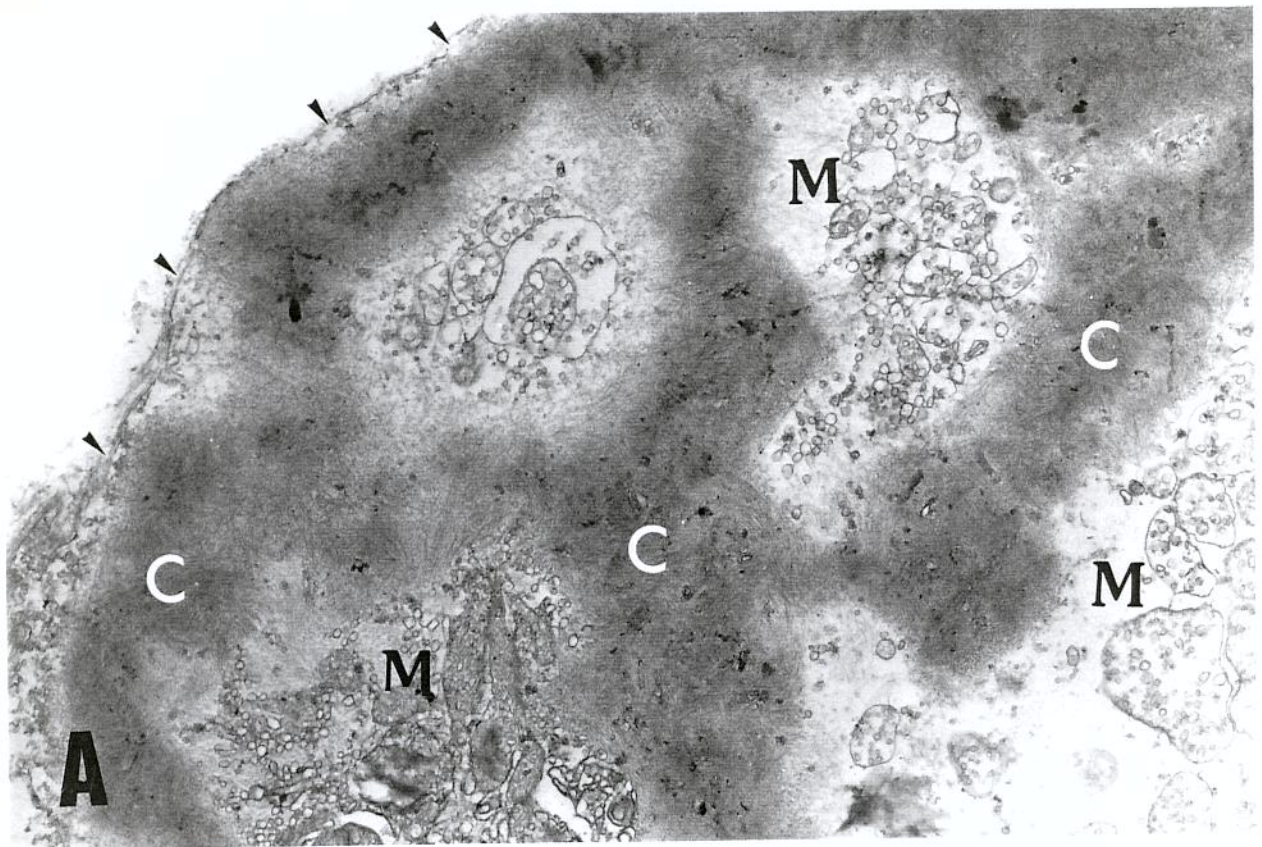


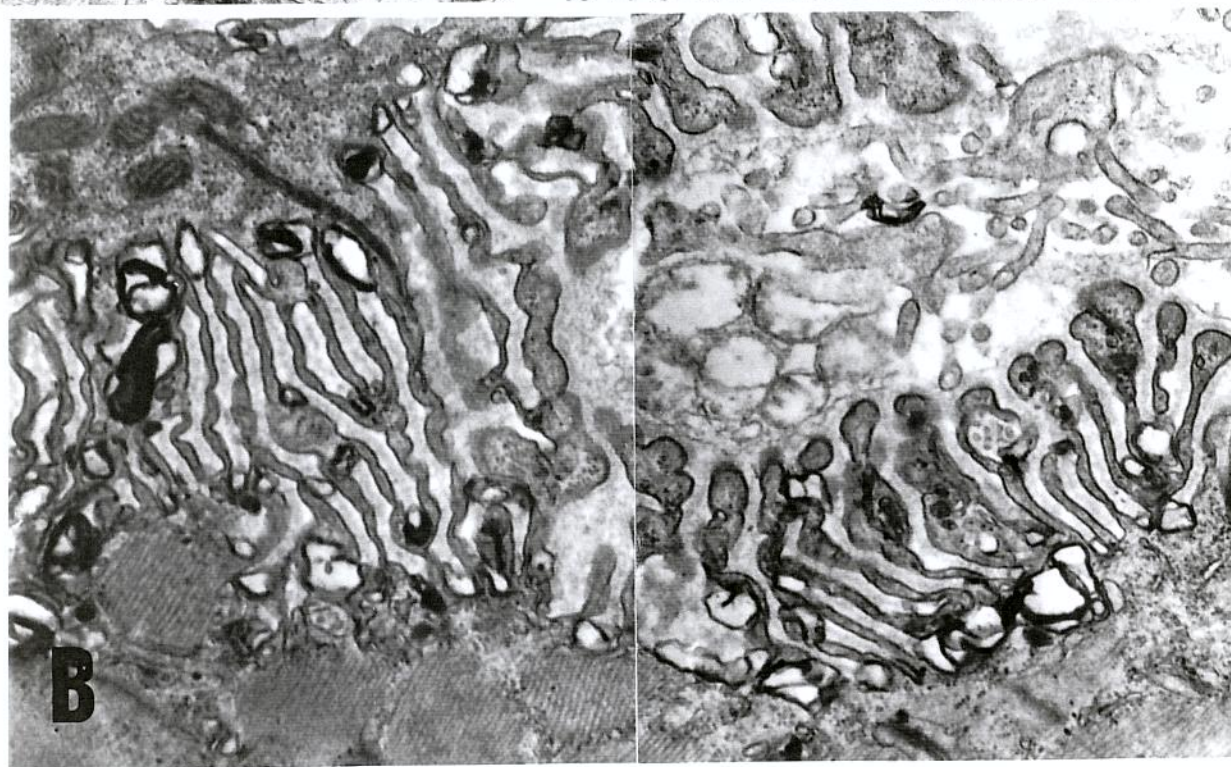
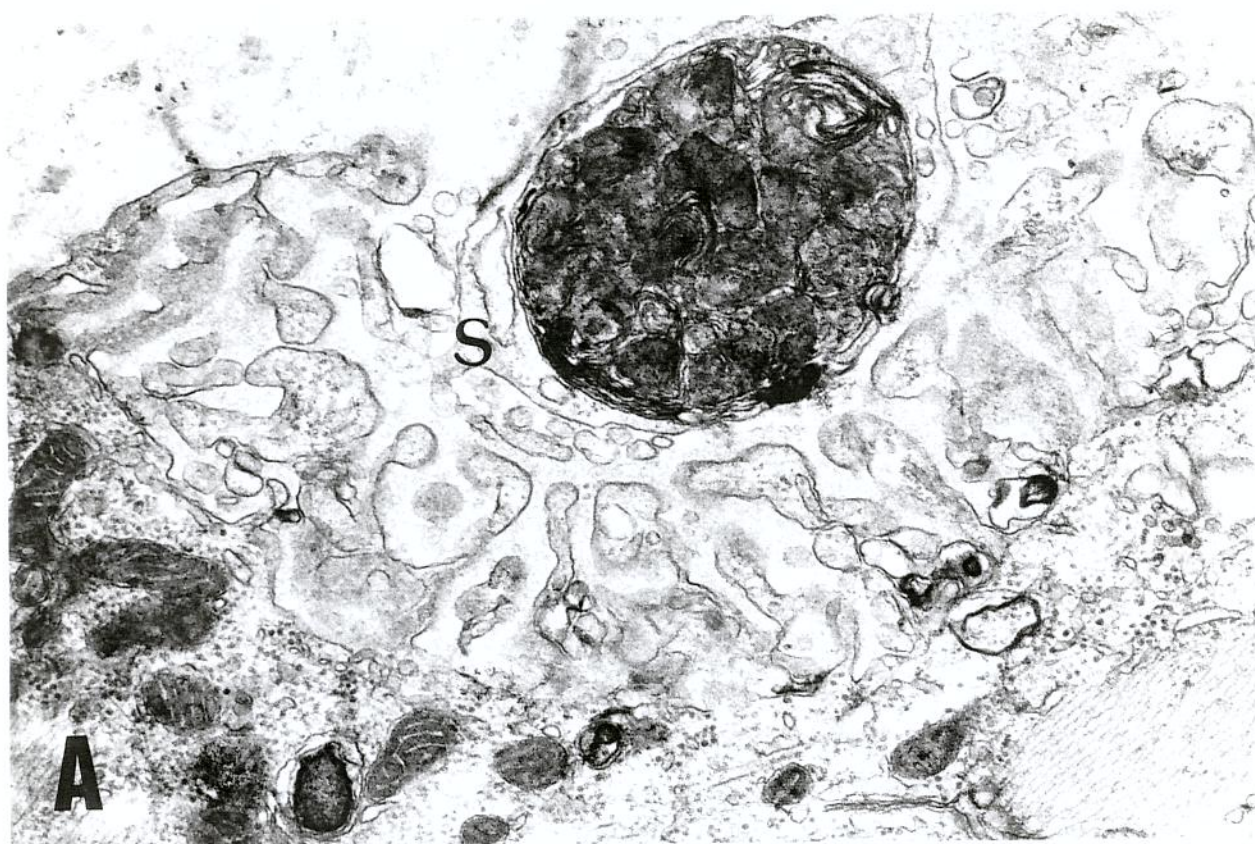
A**B****C****D**

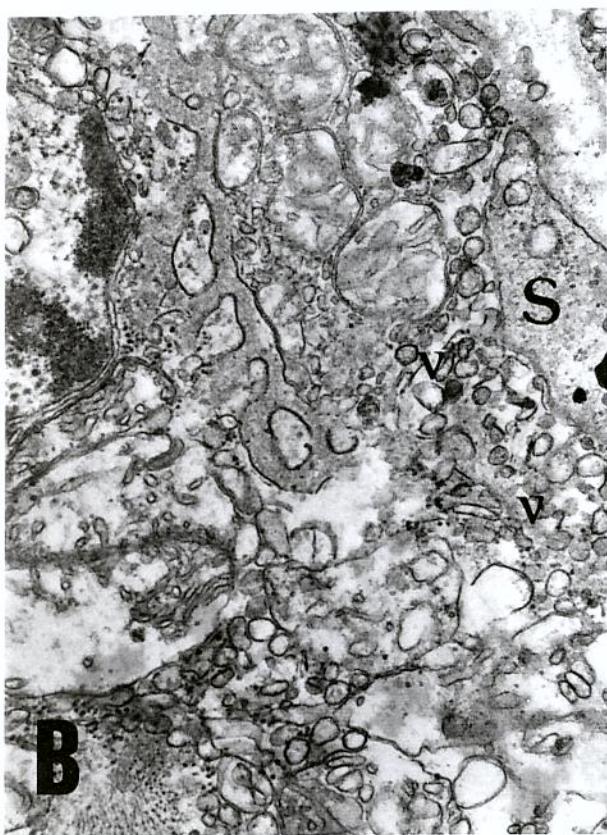
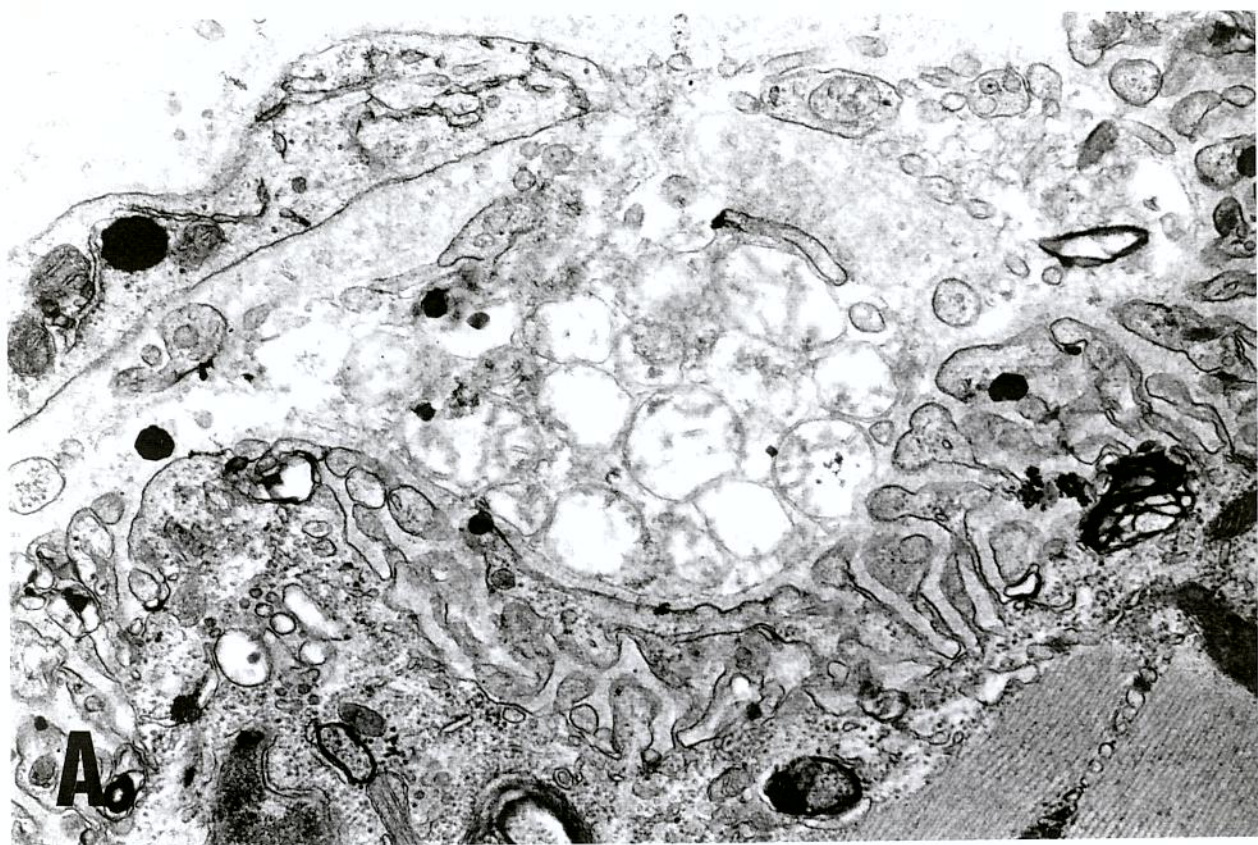












3.3- Resultados Adicionais

**3.3.1-Análise ultraestrutural das lesões provocadas no músculo
EDL de camundongos sob ação do veneno total da serpente
*Bothrops pirajai***

3.3.1-ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS LESÕES PROVOCADAS NO MÚSCULO EDL DE CAMUNDONGOS SOB AÇÃO DO VENENO TOTAL DA SERPENTE *Bothrops pirajai*

Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão serão posteriormente organizados em formato de artigo para publicação.

1-MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 - Animais e Veneno

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas (25-30g), provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Estes foram mantidos em gaiolas e tratados com água e ração *ad libitum*.

Foi utilizado o **veneno total da serpente *B. pirajai***, gentilmente cedido pelo Dr. José Roberto Giglio (Faculdade de Medicina/USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil).

1.2 - Solução Nutritiva

As preparações utilizadas foram incubadas com solução nutritiva de Tyrode, cuja composição em mM é: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1.

1.3 - PREPARAÇÃO *extensor longo dos dedos* (EDL) DE CAMUNDONGO

PROCEDIMENTO

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% com injeção intraperitoneal, e após a anestesia ter atingido nível cirúrgico, foi feita uma ampla incisão sobre a face ântero-lateral de uma das patas posteriores do animal e foram expostos os tendões dos músculos EDL e tibial. Procedeu-se à secção dos tendões e à retirada do músculo tibial, com exposição total do músculo EDL. Este foi dissecado, desde sua inserção tendínea distal até a proximal. Durante este procedimento, mantivemos a preparação umedecida com solução de Tyrode. Retirada a preparação, o músculo EDL foi montado em uma cuba contendo 3,5ml de Tyrode e mantido sob aeração constante com carbogênio a 37°C. Antes do início do experimento, a preparação foi lavada 3 vezes durante 10 min, e em seguida foi adicionada ao banho uma dose de 50 µg/ml de veneno total de *B. pirajai*. O músculo EDL permaneceu incubado durante 120 min.

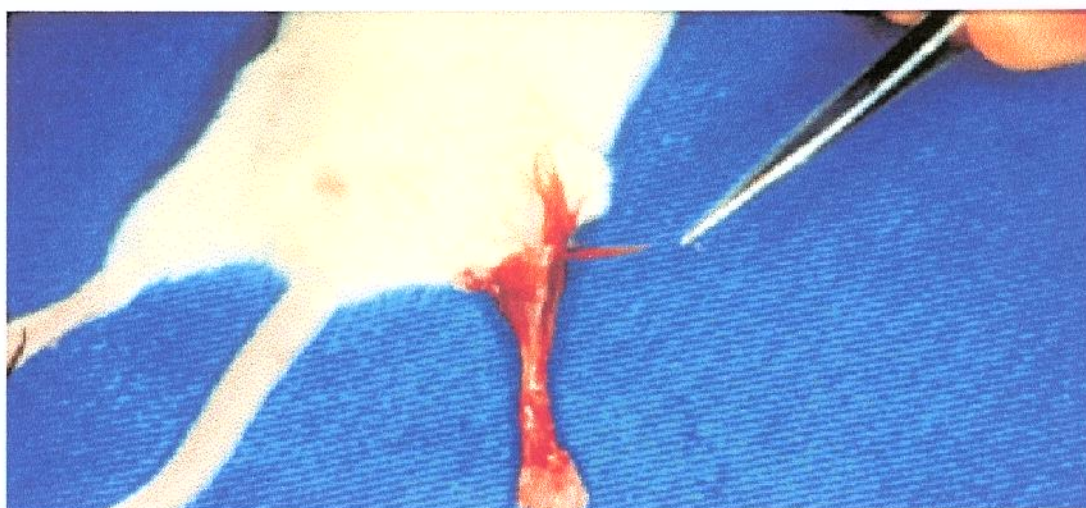


Fig. 1-Fotografia do músculo *extensor longo dos dedos* (EDL) de camundongo.

1.4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Terminado o experimento conforme descrito no **item 1.3**, o músculo EDL foi dividido em fragmentos de aproximadamente 1mm de espessura, que foram imersos até o dia seguinte em solução fixadora de Karnovsky composta por: glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. Após este período, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4, pós-fixados com solução de tetróxido de ósmio 1% com ferrocianeto de potássio 0,8% durante 40 minutos em temperatura ambiente, novamente lavados em tampão cacodilato e imersos em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% até o dia seguinte à 4°C. Foram novamente lavados com água destilada durante 10 minutos e desidratados em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, uma vez de 15 minutos cada e três vezes de 10 minutos em acetona 100%), embebidos em mistura acetona-resina spurr na proporção 2:1 durante 6 horas, mesma mistura na proporção 1:1 durante 12 horas, novamente na proporção 1:2 durante 3 horas e finalmente na resina pura durante 6 horas. A inclusão foi em resina spurr e a polimerização conduzida à 60°C por 48 horas.

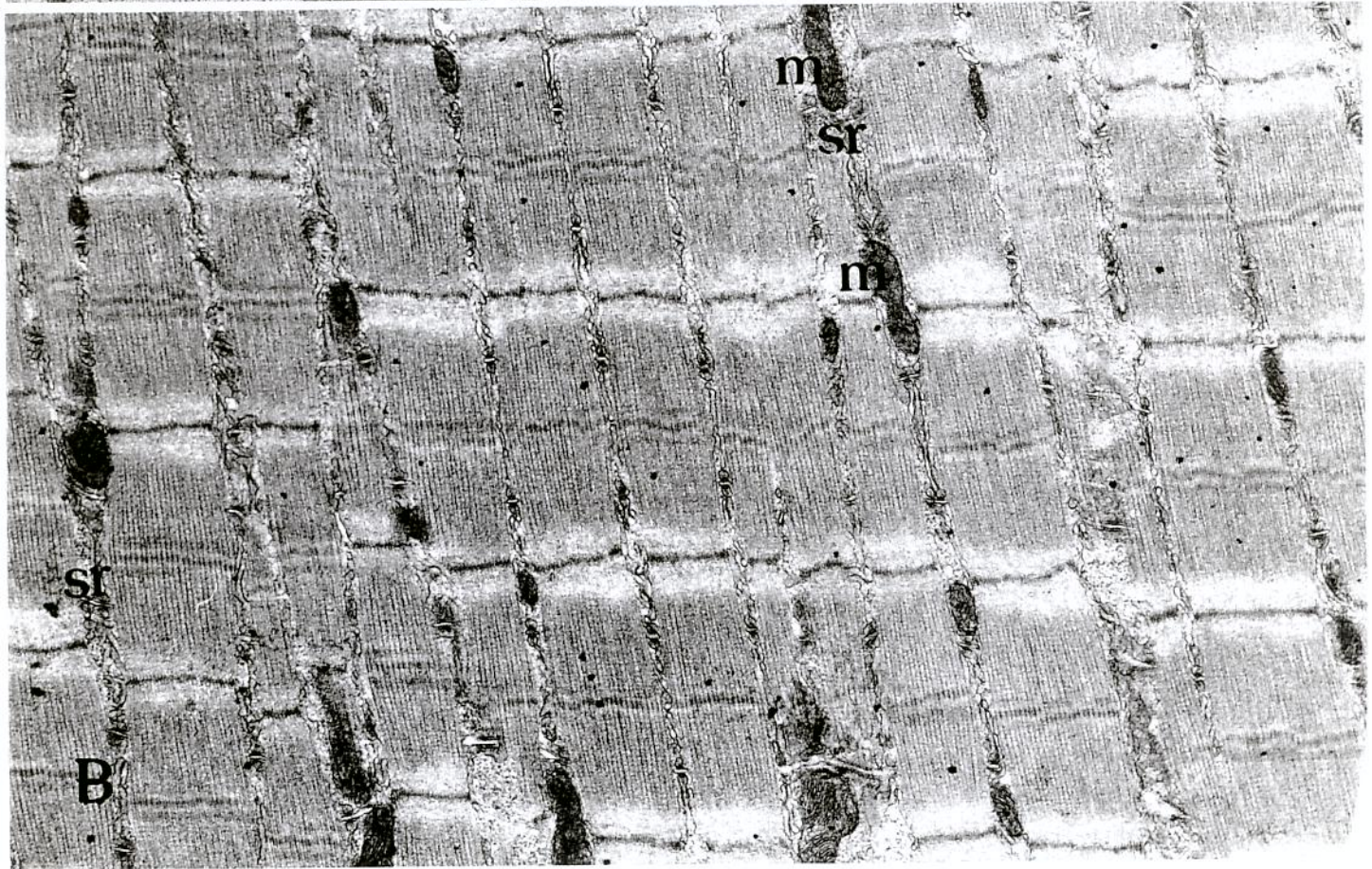
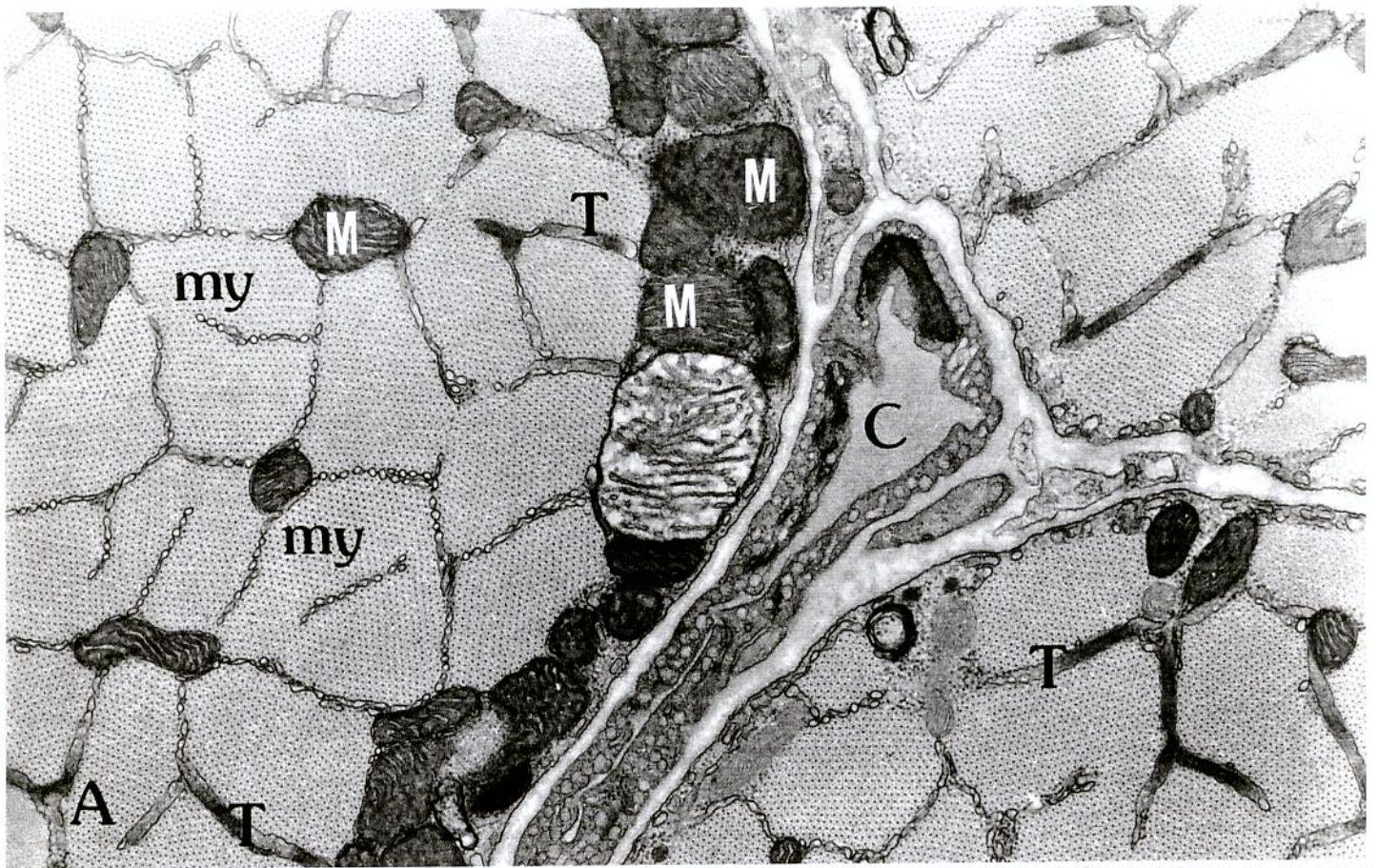
Cortes semi-finos de aproximadamente 1 µm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo Leica UCT, em navalhas de vidro e corados em solução de Azul de Toluidina 0,5%, com finalidade de definir a área de interesse.

Os cortes ultrafinos (60 – 70 nm de espessura) foram obtidos com navalha de diamante, coletados em telas de cobre (200 mesh) e contrastados com acetato de uranila à 2% durante 20 minutos e citrato de chumbo à 0,5% durante 5 minutos.

As observações e documentação fotográfica foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão Leo 906, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp.

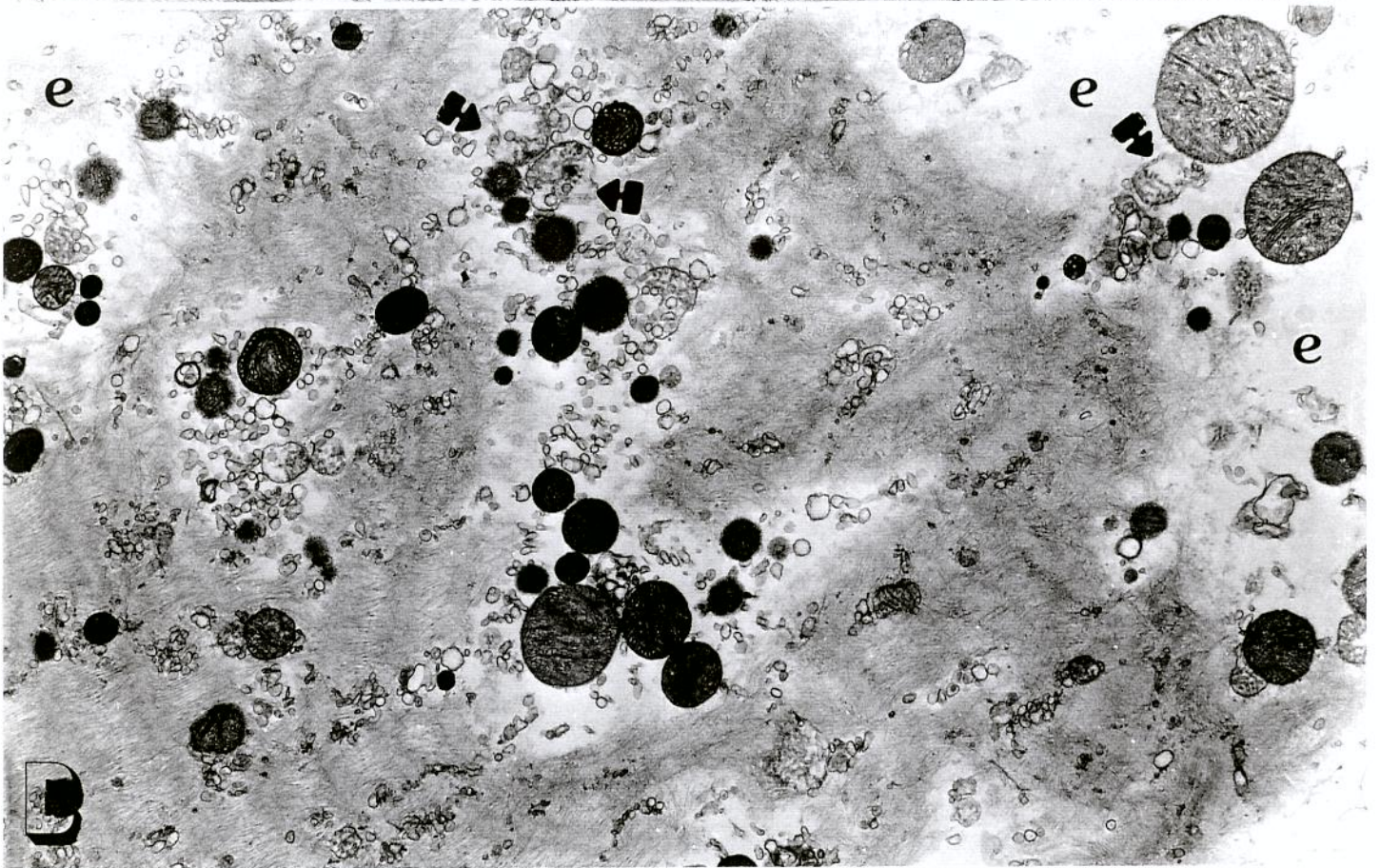
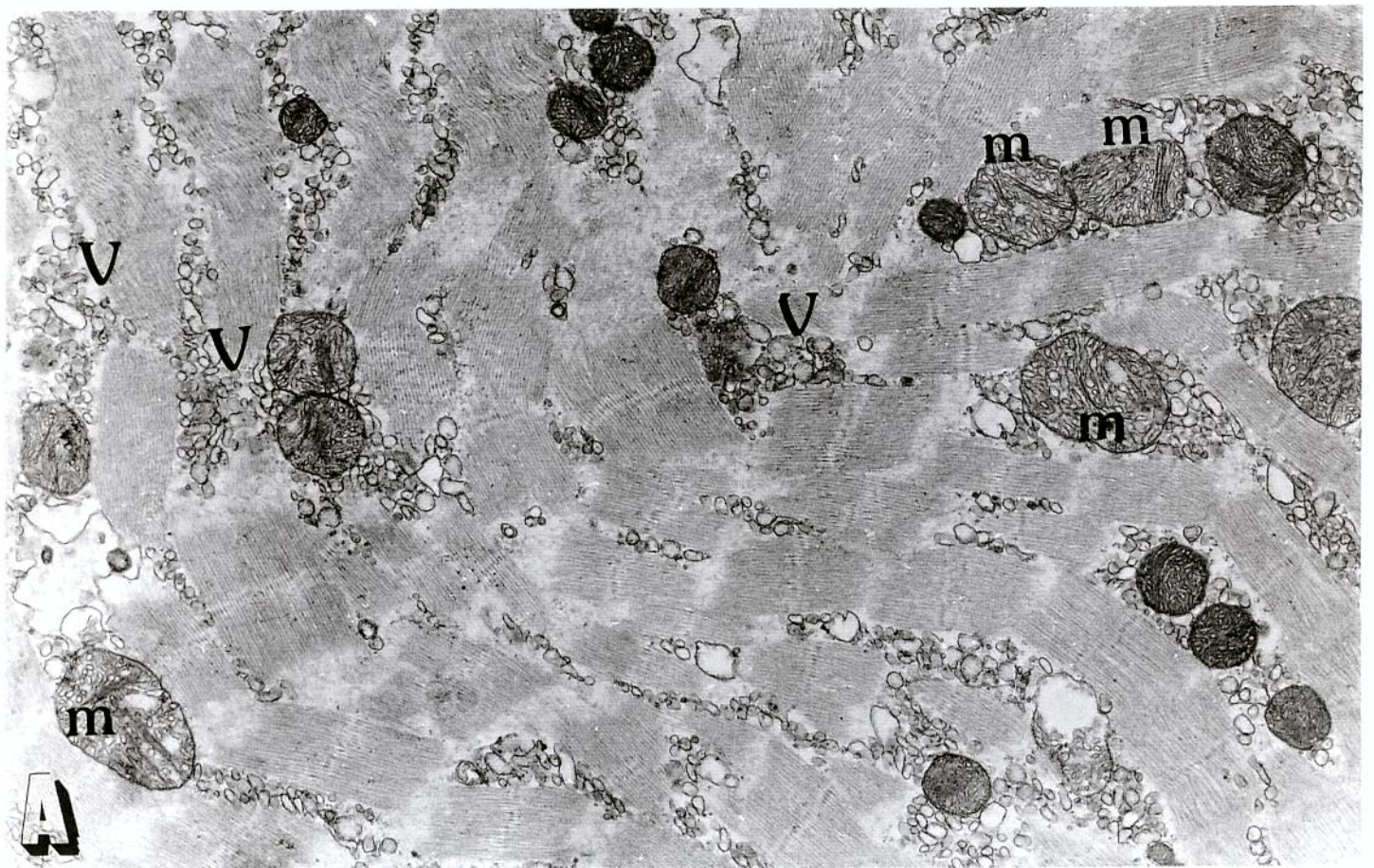
**FIGURA 1- ELETROMICROGRAFIA DE EDL CONTROLES: 120
MIN DE INCUBAÇÃO COM SOLUÇÃO DE TYRODE**

- A-** Secção transversal de miofibrilas das fibras musculares do músculo EDL (my) bem preservadas com mitocôndrias intactas (M) e perfil regular do retículo sarcoplasmático (rs) e do sistema T. C= secção de um capilar: numerosas vesículas pinocitóticas são evidentes (26.000x).
- B-** Organização normal dos sarcômeros, distribuição regular dos miofilamentos nas miofibrilas, cada qual limitada por vesículas do retículo sarcoplasmático (SR) e mitocôndrias (m). As tríades estão situadas próximo ao limite das bandas A e I (20.700x).



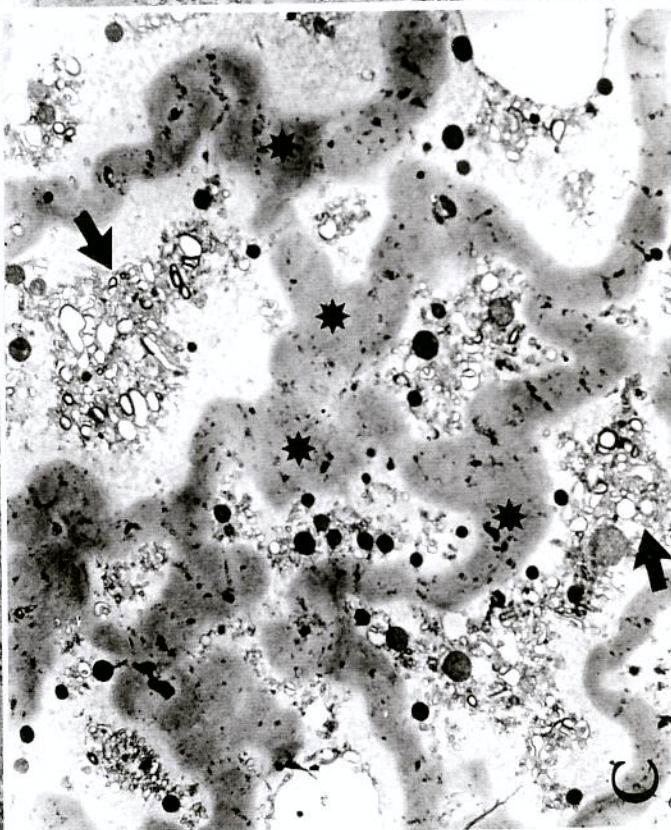
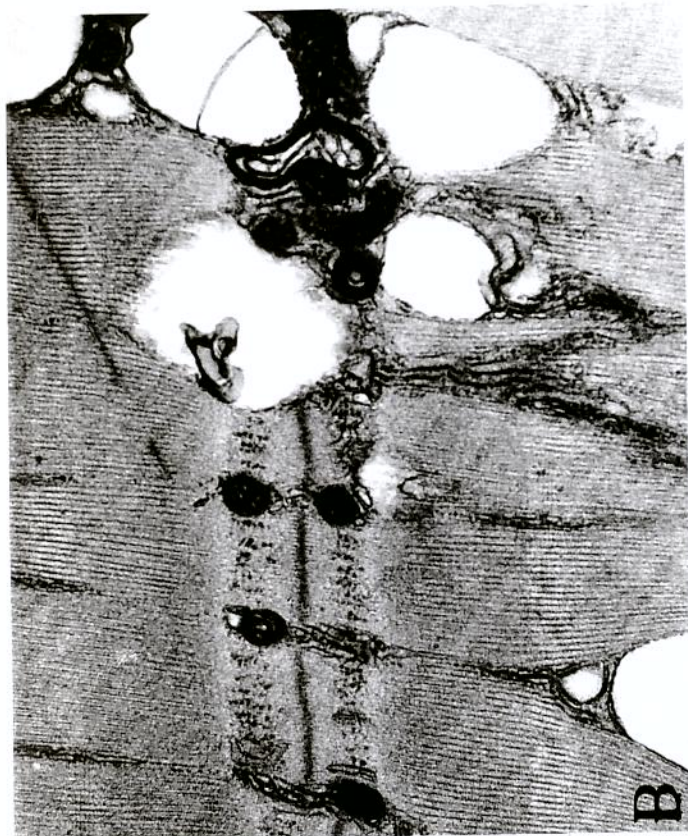
**FIGURA 2- ELETROMICROGRAFIAS DE MÚSCULO EDL
INCUBADA COM 50 µg/ml DE VENENO TOTAL DE *Bothrops*
pirajai - 120 MIN**

A e B - Micrografias de células musculares esqueléticas em estágios de necrose, mais e menos avançado, respectivamente. Em **A**, miofibrilas distorcidas destituídas do arranjo típico da organização do sarcômero, permitindo a visão do curso sinuoso dos miofilamentos; agrupamentos de vesículas (v) resultantes da desorganização do retículo sarcoplasmático; as tríades estão indistinguíveis. Mitocôndrias tumefeitas (m) com cristas anormais (15.600x). Em **B**, condensamento dos miofilamentos, dando lugar à áreas "vazias" (e) dentro da fibra. Mitocôndrias heterogêneas quanto ao tamanho, eletrondensidade e disposição das cristas, algumas estão rompidas(setas) (12.000x).



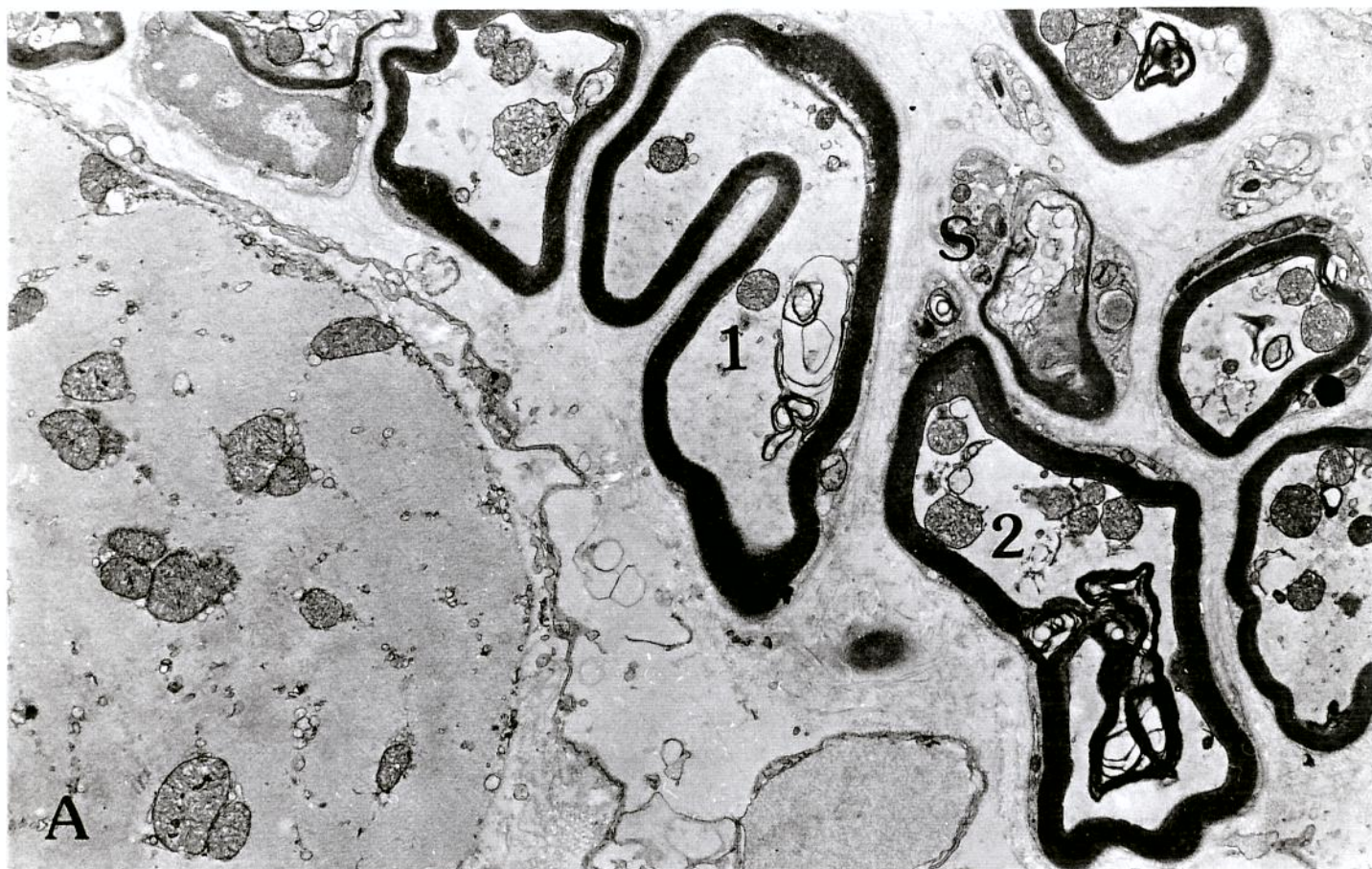
**FIGURA 3- DETALHES DE ALTERAÇÕES MUSCULARES
PROVOCADAS PELO VENENO TOTAL DE *Bothrops pirajai*
(50 µg/ml)**

Eletronmicrografias mostrando que após 120 min de contato com 50 µg/ml do veneno de *Bothrops pirajai*, diferentes células musculares do EDL respondem diferentemente à toxicidade do veneno. Em **A** e **B**, fibras resistentes ao veneno sendo afetadas as mitocôndrias. Túbulos T (setas) estão sem alterações, no entanto, o retículo sarcoplasmático apresenta variados graus de dilatação. Em **C** e **D**, fibras mais susceptíveis ao veneno mostrando marcantes alterações. Ruptura do sarcolema (cabeça de seta), alterações nas cristas e matriz das mitocôndrias, miofilamentos formando estruturas tortuosas (*), extensa área com restos de membrana provenientes do retículo sarcoplasmático e túbulos T (seta) (11.000, 30.000, 6.000 e 4.500x, respectivamente).



**FIGURA 4- ELETRONMICROGRAFIAS DE LESÕES DOS FEIXES
INTRAMUSCULARES DE NERVOS DO MÚSCULO EDL (50 µg/ml
DE VENENO TOTAL-120MIN)**

Em A, feixe intramuscular de axônios no EDL apresentando degeneração de muitas fibras nervosas, em algumas o axoplasma está retraído e as mitocôndrias estão anormais, e/ou as lamelas de mielina formam alças redundantes (axônios 1 e 2). As células de Schwann (S) também estão afetadas. À esquerda, uma célula muscular com o sarcolema descontínuo e mitocôndrias tumefeitas (9.300x). B- Um axônio pré-terminal em degeneração mostrando no axoplasma material com textura finamente granulosa, mitocôndrias com densidades floculentas (setas) e bainha de mielina aparentemente normal (ml). Observe a descontinuidade do perineuro (setas abertas). As células musculares parecem estar normais (9.300x).



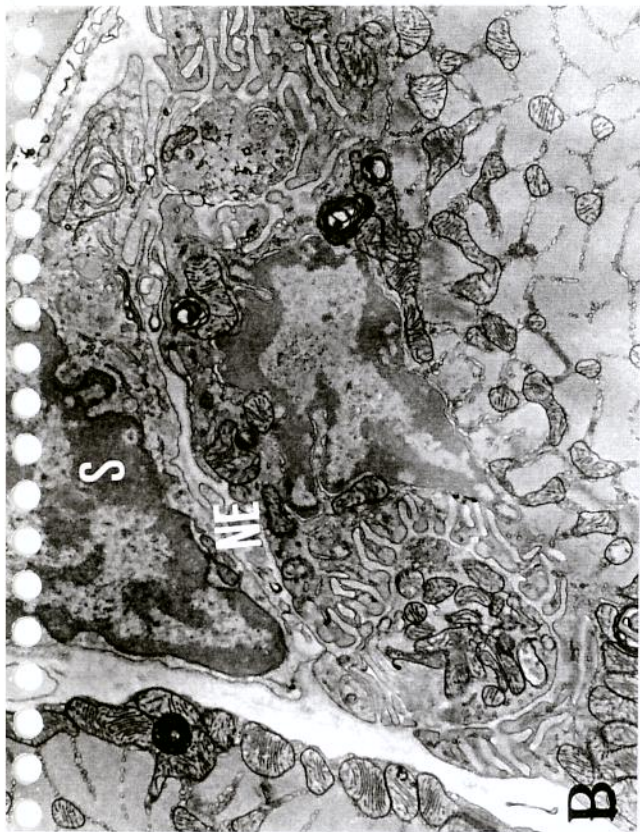
**FIGURA 5- ELETROMICROGRAFIA DE UMA JUNÇÃO
NEUROMUSCULAR DO MÚSCULO EDL - CONTROLE**

Secção transversal de 2 terminais nervosos normais. Observar a distribuição das vesículas sinápticas, mitocôndrias e dobras juncionais, todos normais e bem preservados (12.000x).



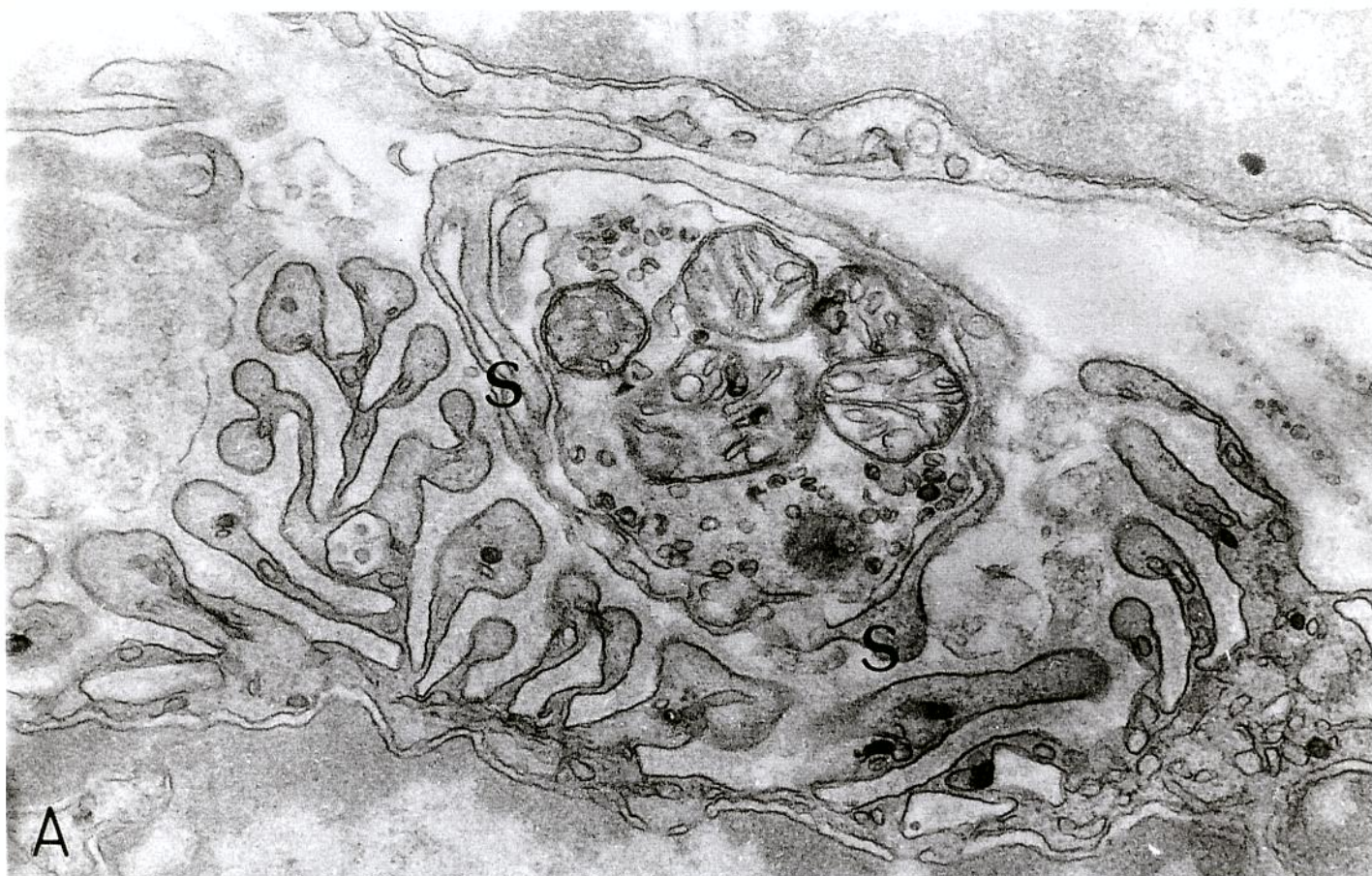
**FIGURA 6- ELETRONMICROGRAFIAS DE PLACAS TERMINAIS
DO MÚSCULO EDL INCUBADOS COM 50 μ g/ml -120 min**

A- Eletromicrografias de uma placa terminal desnervada (1, 2 e 3). Escassez de sarcoplasma abaixo das dobras juncionais. As vesículas sinápticas estão depletadas, mitocôndrias (m) estão anormais (9.600x). Em **B**, outra visão de uma junção neuromuscular incluindo célula de Schwann (S), dois terminais motores (TM) e componentes subsinápticos. Mitocôndrias "inchadas" ocupam todo o terminal (9.600x). Em **C**, um terminal nervoso apresentando anormalidades no número e distribuição das vesículas sinápticas e agrupamento mitocôndrias. O axolema está mal definido (cabeça de seta). Extensa fusão das dobras juncionais (*) (34.000x).



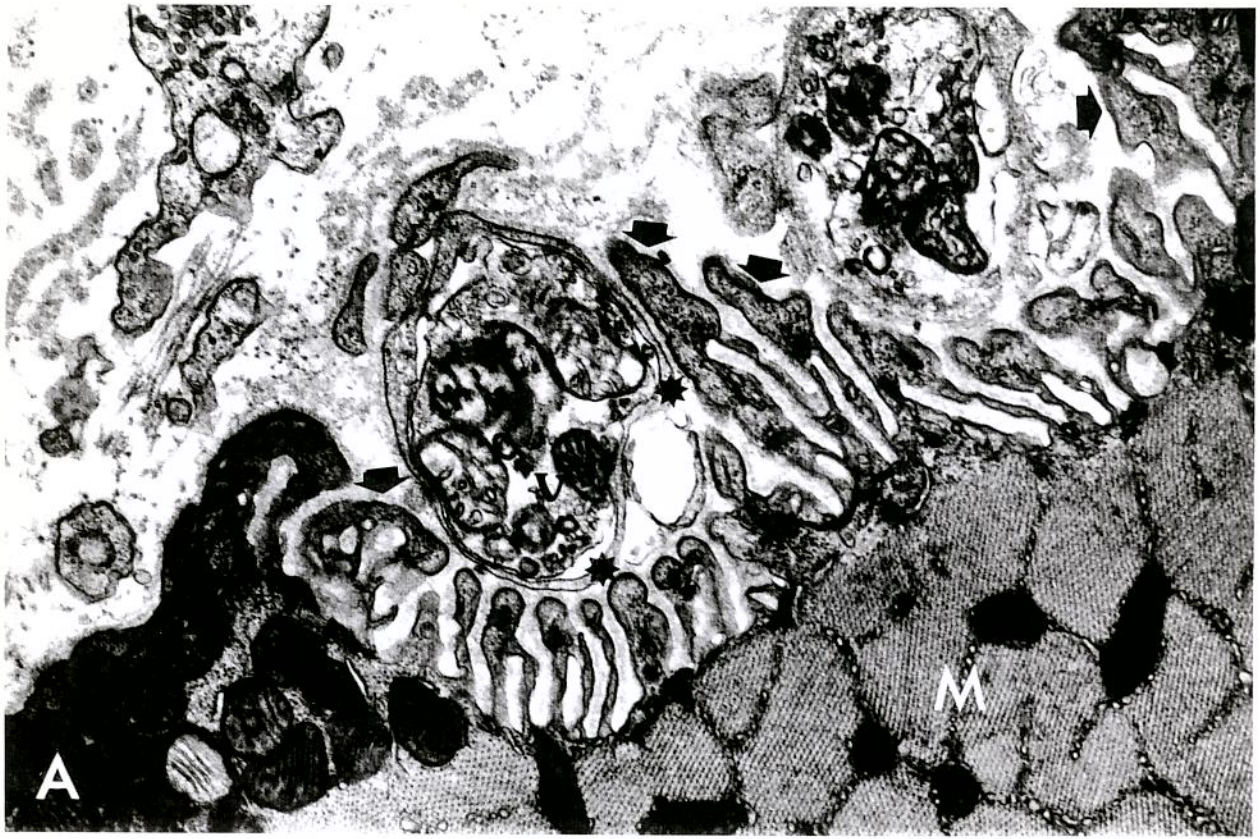
**FIGURA 7- DETALHES DA PLACA TERMINAL APÓS
INCUBAÇÃO COM 50 μ g/ml DO VENENO TOTAL DE *Bothrops
pirajai* DURANTE 120 MIN**

- A- Junção neuromuscular apresentando alterações morfológicas em todos os seus componentes. Observe que a célula de Schwann (S) está envolvendo o terminal nervoso (43.400x).
- B- Terminal nervoso destruído, com estruturas pós-sinápticas muito afetadas. Porções da célula de Schwann justapõem-se aos restos do terminal (26.700x).
- C- Ampliação de parte de uma junção neuromuscular focalizando a fusão de duas ou mais dobras juncionais (seta) (58.000x).



**FIGURA 8-ELETROMICROGRAFIAS DE PLACAS TERMINAIS
DEGENERADAS INCUBADAS COM 50 µg/ml DE VENENO
TOTAL DE *B. pirajai* - 120 MIN**

- A- Terminal nervoso necrótico apresentando algumas vesículas sinápticas agrupadas (v), as mitocôndrias estão tumefeitas. (*): célula de Schwann envolvendo o terminal e impedindo o contato com a região pós-sináptica. As dobras juncionais apresentam-se fundidas (seta). A célula muscular não mostra alterações nas miofibrilas (M) e mitocôndrias (24.000x).
- B- Visão de um terminal nervoso com axoplasma eletrolucente, algumas mitocôndrias tumefeitas estão presentes e axolema descontínuo. S: célula de Schwann. Na região subsináptica, as mitocôndrias estão muito edematosas (M), com alteração nas cristas e matriz. Núcleo da placa terminal (NP) (12.000x).



3.3.2-Análise da atividade da fração miotóxica Piratoxina-I na preparação nervo-frênico diafragma de camundongos

3.3.2- ANÁLISE DA ATIVIDADE DA FRAÇÃO MIOTÓXICA PIRATOXINA-I (PrTX-I) EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE CAMUNDONGO

A metodologia utilizada para o estudo das atividades neurotóxica e miotóxica desta toxina foi a mesma descrita em COSTA *et al.*, 1998 (*in press*), entretanto a PrTX-I não apresentou atividade na resposta contrátil da preparação do músculo *extensor longo dos dedos* (EDL), nem tampouco sinais de mionecrose. Estes resultados foram contrários aos verificados por MANCUSO *et al.*, 1995 quanto à atividade miotóxica *in vivo* desta fração quando injetada no músculo gastrocnêmio de camundongos, quer sob o aspectos histológico (mionecrose) como enzimático (liberação da enzima creatinoquinase medida no plasma dos animais).

Visto que existem variações entre as preparações neuromusculares quanto à composição dos tipos de fibras musculares e tipo de inervação, resolvemos verificar se esta miotoxina apresentaria ação na resposta contrátil da preparação nervo-frênico diafragma de camundongo, largamente utilizada no estudo dos efeitos dos venenos e suas toxinas na junção neuromuscular.

1 - MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 - Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas (25-30g), provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Estes foram mantidos em gaiolas e tratados com água e ração *ad libitum*.

1.2 - Toxina

A fração miotóxica PrTX-I foi purificada do veneno da serpente *Bothrops pirajai*, como descrito por TOYAMA *et al*, 1995.

1.3 - Solução Nutritiva

As preparações utilizadas foram incubadas com solução nutritiva de Tyrode, cuja composição em mM é: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1.

1.4 - Preparação Nervo Frênico-Diafragma (NFD)

Após anestesia com éter etílico, os camundongos foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragma, juntamente com seu nervo motor, nervo-frênico) foi cuidadosamente retirada (BÜLBRING, 1946), colocada em cuba contendo 5 ml da solução nutritiva de Tyrode. O músculo diafragma foi preso, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba, mantida à aeração constante com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂) a 37°C. O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos elétricos supramaximais, foi realizado através de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400.

O músculo foi submetido à tensão constante de 5 g/cm (por meio de um fio preso à porção tendinosa e ao transdutor isométrico) e à estimulação elétrica indireta através de pulsos supramaximais gerados por estimulador S48F (GRASS Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência.

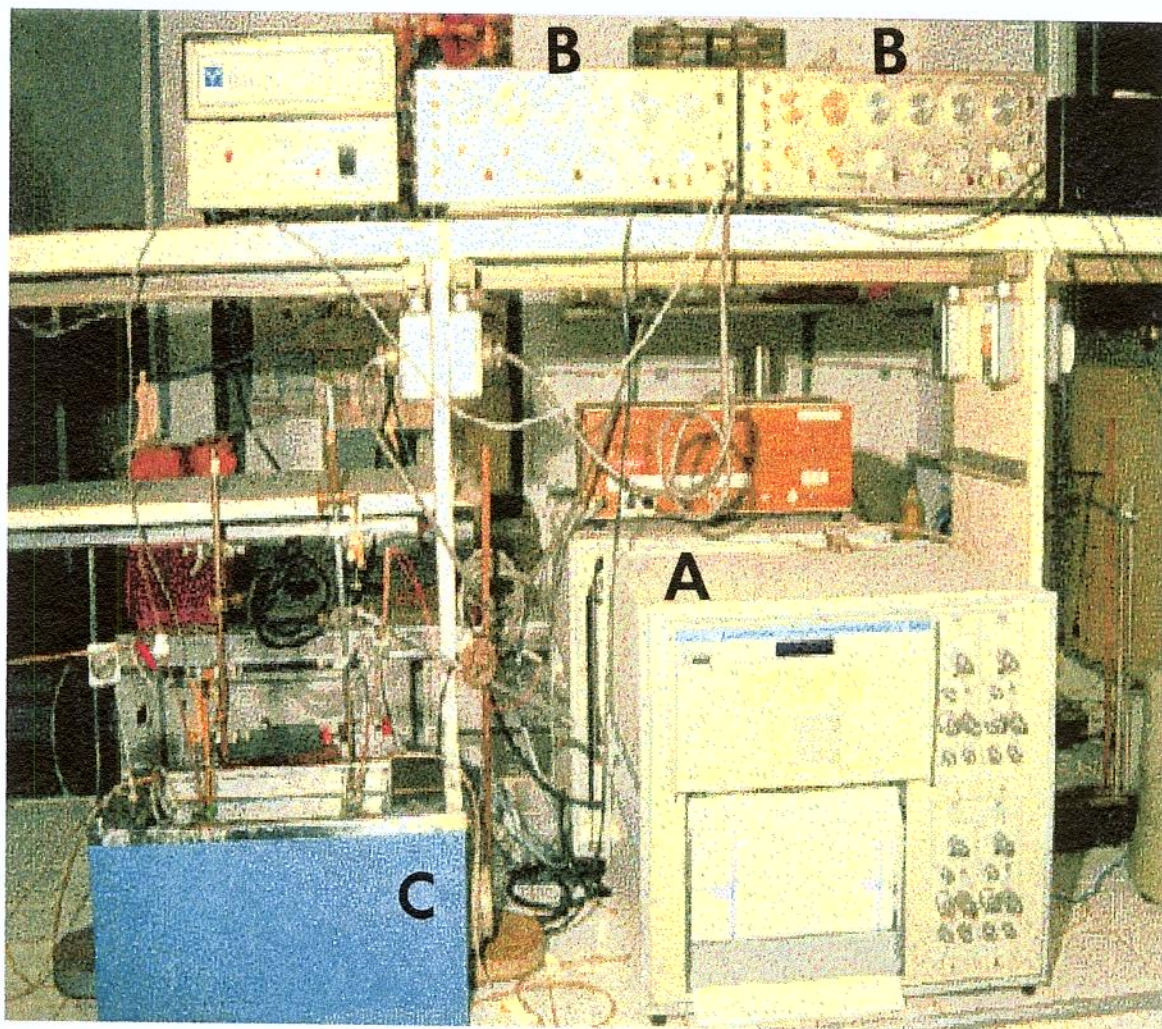


Fig 2- Ilustração dos equipamentos utilizados: A, fisiógrafo Gould RS 3400; B, estimuladores S48F (GRASS); C, banho-maria.

Antes do início do experimento, a preparação foi lavada por um período de 20 minutos, com intervalos de 10 minutos cada. Após este período, foi adicionada ao banho a fração PrTX-I nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. Cada experimento teve duração de 120 min ou até o bloqueio total da resposta muscular. Os experimentos controle foram incubados com solução de Tyrode.

1.5 - Microscopia Fotônica

Os músculos diafragma que foram incubados com a toxina conforme o **item 1.4** foram em seguida, fixados por imersão, em solução fixadora de Bouin durante 24h. Posteriormente, foram desidratados em soluções crescentes de etanol (etanol 70%, 95%, uma vez de 30 minutos cada e duas vezes de 30 minutos em etanol 100%), embebidos em mistura de etanol-historesina na proporção 1:1 durante duas horas, historesina pura durante a noite a 4°C, e incluídos com Historesina JB-4 (LKB-Bromma, Suécia). A polimerização foi em dissecador a vácuo durante 12 horas, a 4°C. Foram obtidas secções de 2-3µm de espessura, em micrótomo MT1 (Sorval) coletados em lâminas histológicas e coradas com azul de toluidina 0,5% para observação ao microscópio fotônico Axiophot Zeiss. Foram feitas fotomicrografias em cores com filme Ektra Plus-Multi Speed/Kodak.

2 - RESULTADOS

2.1- Estudo Miográfico

Foram ensaiadas doses de 5, 10 e 20 µg/ml, sendo que a primeira produziu um reduzido bloqueio da resposta contrátil (cerca de 25%) ao final de 120 min (n=3). Com a dose de 20 µg/ml (n=3) observou-se contratura seguida por bloqueio em todos os experimentos (Fig. 3D), sendo que o tempo para bloqueio de 50% foi de aproximadamente 25 min (Fig 3A).

2.2- Estudo Histopatológico

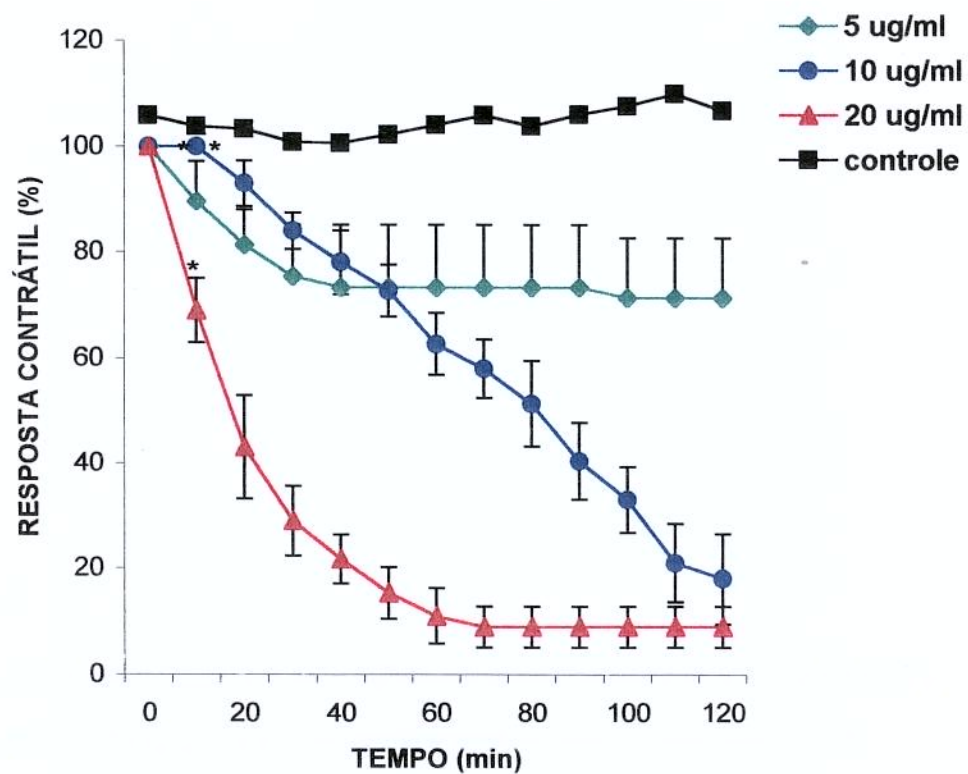
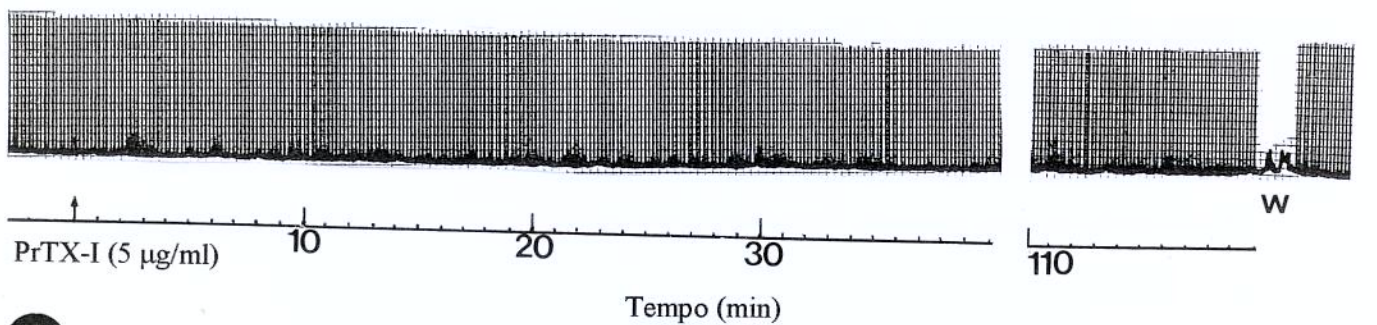
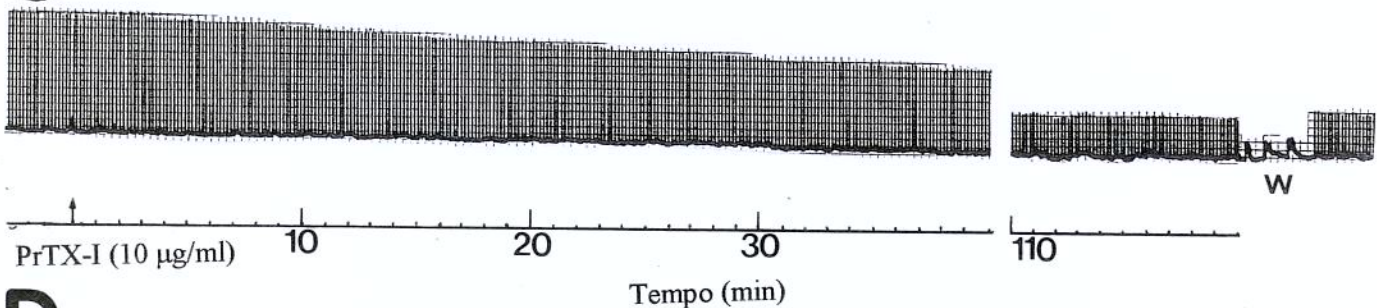
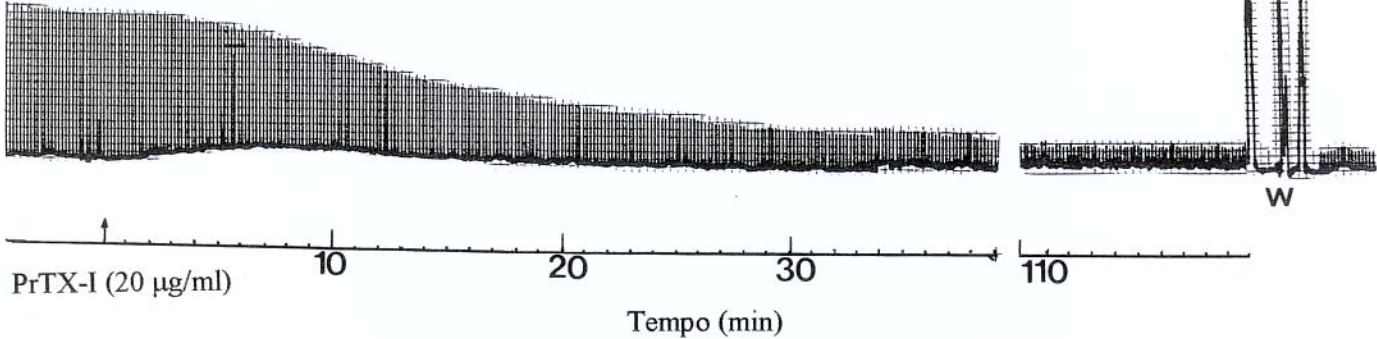
Em secção longitudinal o músculo diafragma incubado com solução nutritiva de Tyrode durante 120 min (controle) não mostrou alterações. A preparação incubada com 5 µg/ml da fração miotóxica PrTX-I revelou

mionecrose leve, sendo que a grande maioria das fibras musculares permaneceram intactas (Fig 4A). Já com as doses de 10 (Fig. 4B) e 20 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 4C) foi observada intensa mionecrose, com lesões do tipo "delta", regiões de hipercontração e condensação das miofibrilas alternando-se com espaços vazios no citoplasma, e regiões de lise com desorganização do material intracelular. Este tipo de mionecrose é classificado como tipo miolítico (OWNBY & COLBERG, 1988).

**FIGURA 3 - BLOQUEIO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DE
PREPARAÇÕES DE MÚSCULO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS
INCUBADOS COM A MIOTOXINA PrTx-I DO VENENO DE *B.***

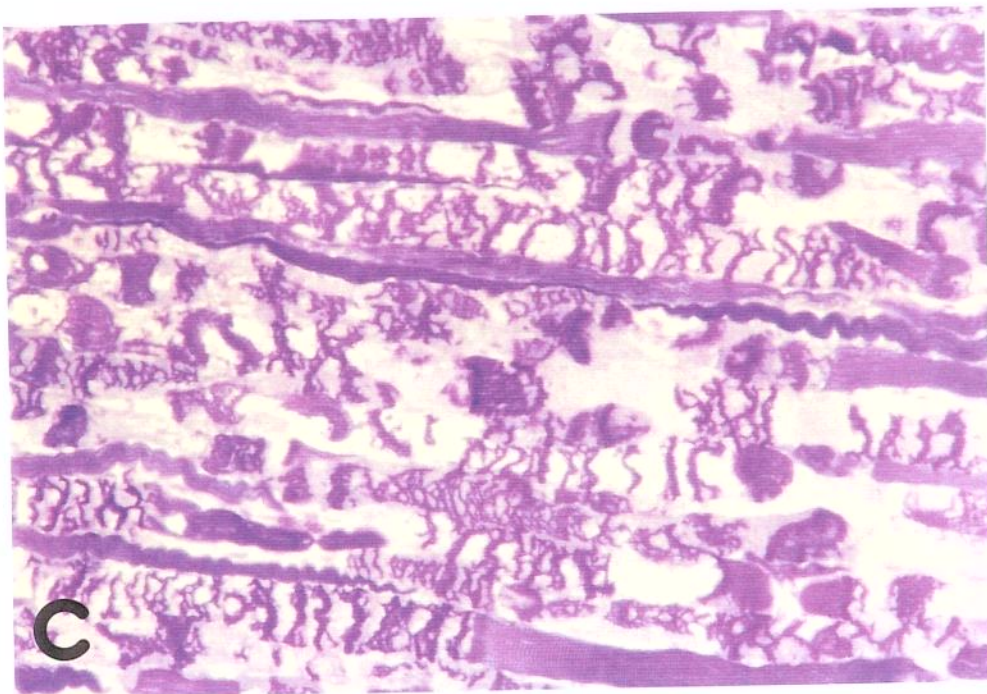
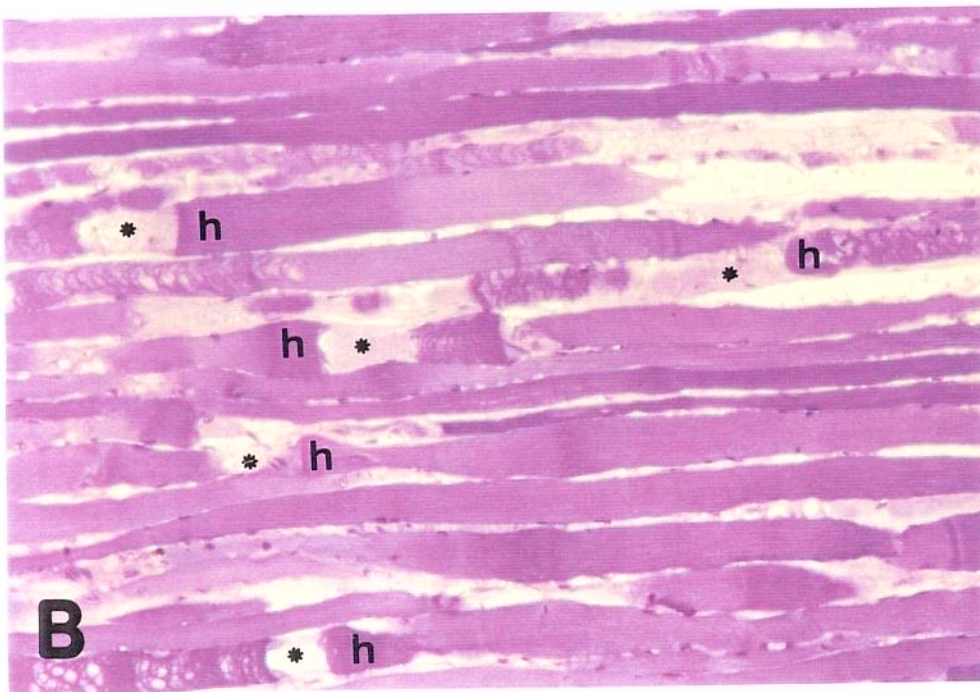
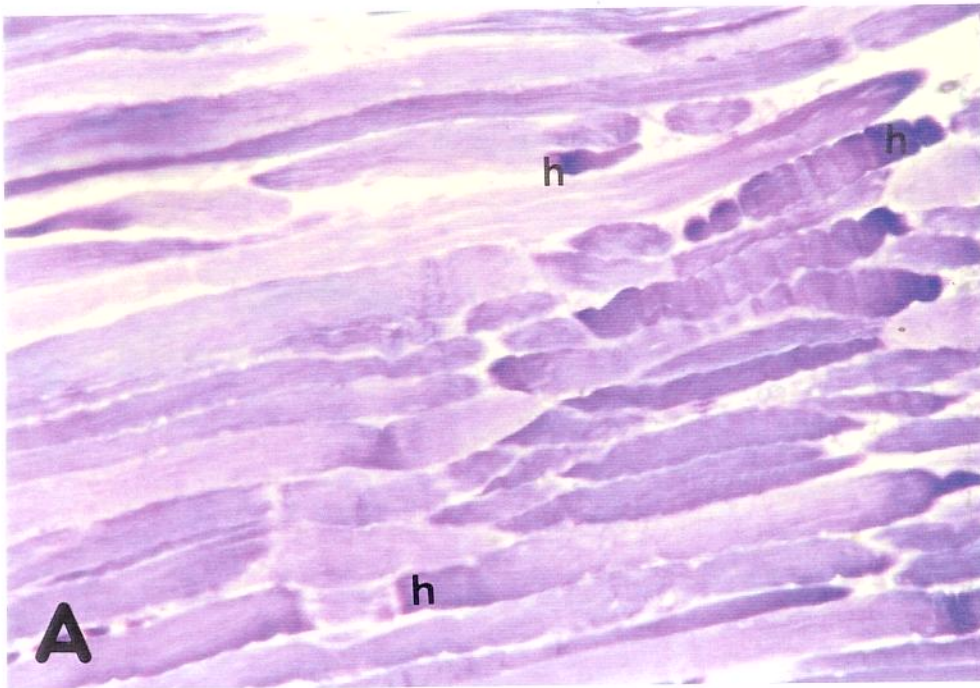
PIRAJAI.

Em **A**, bloqueio dose-dependente das contrações musculares provocados pela PrTX-I. As barras verticais representam a média $\pm$ o erro padrão dos experimentos (n=3). **B**, **C**, e **D** correspondem ao registro isométrico das contrações musculares da preparação nervo frênico-diafragma incubado com as doses de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. W= lavagem da preparação.

A**B****C****D**

**FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIAS DA PREPARAÇÃO NFD
INCUBADA COM A MIOTOXINA PrTX-I/120 MIN.**

A, B e C, secções longitudinais de músculo diafragma nas doses de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Observe que a lesão muscular é dose-dependente. Com a dose de 5 $\mu\text{g/ml}$, as fibras musculares embora apresentem aparência cérea, não apresentam sinais de desestruturação; h= áreas de hipercontração (**A**). Em **B**, regiões de hipercontração (h) ao lado de áreas destituídas de material miofibrilar (*). A dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ causou mionecrose extensa observando-se um aspecto “rendado” devido a hipercontração das miofibrilas (**C**). 225 x



IV-DISSCUSSÃO GERAL

Nossos resultados revelaram que o veneno total da serpente *Bothrops pirajai* produz alterações da musculatura esquelética demonstradas por métodos fisiológicos, bioquímicos, histológicos e ultraestruturais. Esta serpente apresenta pontos em comum com a serpente *B. jararacussu*, no que diz respeito às características fenotípicas (AMARAL, 1926) e aos componentes do veneno (MANCUSO *et al.*, 1995). Ao compararmos nossos resultados com os de FRANCO *et al.* (1997) com o veneno de *jararacussu*, notamos que estes venenos têm capacidade de induzir mionecrose e bloquear a resposta contrátil do músculo EDL sob estimulação elétrica indireta. Esta comparação foi possível, porque para ambos os venenos foi utilizada a mesma dose (50 µg/ml) em preparações de EDL *in vitro*, e o mesmo período de 120 min.

A análise morfológica do músculo EDL incubado com o veneno total de *B. pirajai* demonstrou que o mesmo produz um severo quadro de mionecrose. As lesões no músculo foram dose-dependentes, quanto ao número de fibras afetadas, e à intensidade qualitativa das alterações. O bloqueio da resposta contrátil também foi dose-dependente. Nos ensaios bioquímicos ficou evidente que o veneno foi capaz de elevar os níveis de creatinoquinase (CQ) no banho, mesmo na menor dose (10 µg), o que indica o alto potencial lesivo do veneno mesmo. Os achados miográficos, morfológicos e enzimáticos, portanto, mostraram direta correlação entre si, e demonstram a grande sensibilidade do músculo EDL aos efeitos miotóxicos do veneno.

O músculo EDL de camundongos é de contração rápida, e a maioria de suas fibras são do tipo glicolíticas (ELLISMAN *et al.*, 1976; TAKEKURA *et al.*, 1994). Essas fibras, também denominadas brancas, têm baixo conteúdo de mioglobina e pequeno número de mitocôndrias. Contraem-se rapidamente,

mas não suportam esforço pesado e contínuo. A energia para sua atividade é derivada de glicólise anaeróbica. As fibras de contração rápida possuem densidade maior de canais de Na^+ nas junções neuromusculares (RUFF, 1992; MILTON & BEHFOROUZ, 1995), a qual é determinada pelo tipo de inervação.

As alterações ultraestruturais induzidas pelo veneno de *B. pirajai* assemelham-se àquelas causadas pelo veneno de *B. jararacussu* (SANTO NETO, 1987). Ambos determinam desorganização das miofibrilas, intumescimento das mitocôndrias, do retículo sarcoplasmático, hipercontração das miofibrilas, lesões nos vasos e terminais nervosos.

Em micrografias eletrônicas comprovamos que as alterações podem iniciar-se com ruptura do sarcolema, seguindo-se desorganização das miofibrilas, hipercontração e necrose celular. Ao final de 120 min as alterações são extensas atingindo as cristas e matriz das mitocôndrias, com alterações de sua forma e ruptura das mesmas. Além disso, houve desorganização do retículo sarcoplasmático e dos túbulos T, que se apresentaram como inúmeras vesículas distribuídas no sarcoplasma. As fibras nervosas mielinicas mostraram alterações no axônio e na mielina, que formava alças redundantes, e houve também severas alterações mitocondriais. Os terminais nervosos foram total ou parcialmente destruídos, mostrando-se depletados de vesículas sinápticas e com mitocôndrias profundamente alteradas. A par com isso houve alterações nas células de Schwann, que, ao invés de permanecerem como cobertura do terminal pré-sináptico, emitiam prolongamentos que envolviam o terminal semi destruído, ou ocupavam a goteira sináptica.

Esses resultados mostram que o veneno além, de miotóxico, também age no terminal nervoso da junção neuromuscular. Estudos eletrofisiológicos

com doses menores do veneno, permitirão confirmar as características de neurotoxicidade do veneno poderão ajudar a esclarecer suas ações pré e/ou pós-sináptica.

Venenos ofídicos são misturas complexas de vários princípios ativos que podem ter ações específicas. Para investigar os componentes responsáveis pelas lesões musculares estudamos duas frações, as miotoxinas Piratoxina-I (PrTX-I) e Piratoxina -III (PrTX-III).

A Piratoxina-I (PrTX-I) é uma miotoxina recentemente isolada do veneno de *B. pirajai*. Corresponde a 47,3% da quantidade total de proteínas (MANCUSO *et al.*, 1995), não tem atividade fosfolipásica (testada em lecitina da gema de ovo), sendo caracterizada com uma enzima PLA₂-Lys49 (PLA₂-“like”), ou seja uma enzima PLA₂ homóloga às PLA₂-Asp49.

A outra fração isolada do veneno de *B. pirajai* é a PrTx-III. Esta demonstrou moderadas atividades fosfolipásica e anticoagulante e potente atividade miotóxica (TOYAMA *et al.*, 1998). Os autores verificaram que esta fração é idêntica à fração SIV-SP₃ isolada por MANCUSO *et al.* (1995) os quais verificaram que a mesma representa 18,8% do peso total de proteínas do veneno.

Estudos com PrTX-I na preparação EDL, mostraram que aquela, diferentemente do que foi observado com o veneno bruto, não alterou a resposta contrátil do EDL e nem produziu alterações histológicas nas fibras musculares. Estes resultados sugeriram que a PrTX-I não teria atividade miotóxica *in vitro*. Contudo na preparação nervo frênico-diafragma (NFD) a PrTx-I, nas doses de 5, 10 e 20 µg/ml causou necrose celular dose-dependente. Na maior dose houve destruição das fibras musculares, desorganização total dos sarcômeros em decorrência de hipercontração das

miofibrilas, que levou à aglutinação das mesmas e foi responsável pelo aspecto “rendado” que as fibras necróticas exibiam. Estes resultados foram corroborados pelo estudo miográfico, ou seja, houve bloqueio total da resposta contrátil com a dose de 20 µg/ml, e quase total com a de 10 µg/ml. Por outro lado, ao estudar a resposta contrátil (miografia) do diafragma, com o veneno bruto, verificamos que a preparação NFD era bem menos sensível ao veneno total da *B. pirajai* que a fração PrTX-I.

Portanto, a preparação EDL mostrou ser quatro vezes mais sensível ao veneno total em relação à preparação NFD. O contrário ocorreu com a miotoxina PrTX-I que não apresentou atividade na preparação EDL e, no entanto, demonstrou alta atividade miotóxica na preparação NFD. O músculo diafragma é um músculo misto, com 60 % de fibras vermelhas de contração lenta, 20 % de fibras brancas de contração rápida e 20 % de fibras do tipo intermediário. Segundo PADIKULA & GAUTHIER (1970) e MACARDLE & ALBUQUERQUE (1973), o diafragma tem alta capacidade oxidativa.

As fibras oxidativas tem alto conteúdo de mioglobina, pigmentos que lhe dão a cor vermelha. Contraem-se lentamente, e são capazes de manter atividade contínua e vigorosa não se exaurindo com facilidade. A energia para a contração dessas fibras deriva da fosforilação oxidativa e, por isso possuem grande quantidade de mitocôndrias. Os resultados do presente trabalho, obtidos com o veneno total e com a PrTX-I, nas preparações EDL e NFD, mostraram diferentes sensibilidades destas à ação dessas substâncias. É possível que essas diferenças devam-se às características bioquímicas e fisiológicas dos diferentes tipos de fibras musculares.

ALBUQUERQUE & THESLEFF (1968) e WOOD & SLATER (1995) observaram que o EDL e o Soleus de rato exibem sensibilidades diferentes à acetilcolina exógena, e que esta diferença desaparece após desnervação. Aliás,

como já comentado anteriormente, o tipo de fibra muscular é determinado pelo tipo de inervação. CURRAN & PARRY (1975), GERTLER & ROBBINS (1978) e FLORENDO *et al.*, (1983) observaram que as fibras musculares do EDL apresentam frequência maior de potenciais de placa terminal em miniatura (mepps) do que as do sóleo. Esses resultados foram confirmados por WAERHAUG & LOMO (1994), que também relataram que o tipo de motoneurônio e não a fibra muscular é que determina o caráter rápido ou lento da junção neuromuscular. Por outro lado, NAGAOKA *et al.*, (1994) relataram que o EDL mostra maior mobilização de Na^+ para o meio intracelular do que o sóleo. De acordo com JACKSON (1993), MCARDLE *et al.*, (1992) e MCARDLE & JACKSON (1994) esta condição pode propiciar a susceptibilidade do músculo a agentes tóxicos e facilitaria lesões musculares. O aumento na concentração de Na^+ intracelular leva à interrupção das trocas entre Na^+ intracelular e Ca^{2+} intracelular. Dessa forma os níveis citossólicos de Ca^{2+} ultrapassam os níveis ótimos de funcionalidade, ativando proteases cálcio-dependentes, que destruiriam a célula (WROGEMAN & PENA, 1978). MELO & OWNBY (1996), demonstraram que o músculo EDL (contração rápida) e o músculo Soleus (contração lenta) apresentaram diferenças quanto à sensibilidade a alguns venenos e miotoxinas comprovadas através da liberação da enzima CK e alterações morfológicas.

Nossos resultados mostraram alta sensibilidade do EDL ao veneno bruto e baixa à PrTX-I, e por outro lado, alta sensibilidade do diafragma à PrTX-I e baixa ao veneno total. Estes resultados sugerem que há diferentes mecanismos causadores de mionecrose em função da interação veneno/toxina/tipo de músculo. Especulações sobre a maior permeabilidade ao íon Na^+ das fibras glicolíticas, ou a susceptibilidade das mitocôndrias, abundantes nas fibras oxidativas, serem fatores envolvidos nesses mecanismos podem ser colocadas. Músculos com capacidade oxidativa e os

com capacidades mista (oxidativa e glicolítica) parecem ser mais susceptíveis a lesões causadas pelas miotoxinas com estrutura de PLA₂ do que os músculos glicolíticos (HARRIS *et al.*, 1975; HARRIS & JOHNSON, 1978, HARRIS, 1985).

Outra fração do veneno de *B. pirajai* estudada no presente projeto, a PrTX-III, foi isolada primeiramente por MANCUSO *et al.* (1995), e mais recentemente por TOYAMA *et al.* (1998) utilizando o método de HPLC. Essa fração foi testada em preparação EDL, e a avaliação dos seus efeitos foi realizada através da medida de CQ no banho de incubação, análise miográfica e análise morfológica à microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

Os resultados obtidos com a PrTX-III revelaram que esta foi capaz de bloquear a resposta muscular sob estímulo elétrico indireto da preparação EDL, nas mesmas condições utilizadas com o veneno total.

Paralelamente, testamos esta fração isolada por TOYAMA *et al.*, (1998) em HPLC, no músculo gastrocnêmio de camundongo na dose de 1.3 µg/g (3h), intra-muscular (i.m.). Os resultados mostraram que a fração possui potente atividade miotóxica.

Nossos resultados dos experimentos *in vitro* sugerem que esta fração poderia ser incluída na classificação das fosfolipases A₂ com atividade neurotóxica pré-sináptica. Esta hipótese necessita ser confirmada através de estudos eletrofisiológicos, com doses mais baixas da fração, no sentido de verificarmos se há ligação desta toxina com os receptores presentes na região pré-sináptica da junção neuromuscular. Se os resultados forem positivos, a fração Piratoxina-III (PrTX-III) poderá ser incluída dentro da classe das miotoxinas PLA₂-Asp49, com atividade neurotóxica. São consideradas miotoxinas com atividade neurotóxica a fração PLA₂ do veneno de *B.*

insularis (COGO *et al.*, 1998), a miotoxina PLA₂ do veneno de *B. asper* (ARROYO & GUTIÉRREZ, 1981) e a botropstoxina-I (BThTX-I), uma PLA₂-Lys49 do veneno de *B. jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983; HOMSI-BRADENBURGO *et al.*, 1988), dentre os venenos botrópicos.

As alterações ultraestruturais provocadas pela fração PrTX-III no músculo EDL foram também semelhantes às causadas pelo veneno total de *B. pirajai*.

A parcial caracterização dos efeitos do veneno da serpente *B. pirajai* nos trouxe relevantes informações quanto ao efeito deste veneno e suas frações miotóxicas na musculatura esquelética e nos componentes da junção neuromuscular. Estudos futuros são necessários, na tentativa de investigar mais detalhadamente os efeitos miotóxicos e neurotóxicos observados no presente estudo.

V-CONCLUSÕES

- ✓ O veneno total de *Bothrops pirajai* possui potente atividade miotóxica, demonstrada por bloqueio dose-dependente da resposta contrátil do músculo EDL, alterações morfológicas culminando em mionecrose; e elevada liberação da enzima creatinoquinase (CQ).
- ✓ As alterações ultraestruturais causadas pelo veneno total de *Bothrops pirajai* indicam a presença de toxinas que agem no terminal nervoso e no músculo esquelético.
- ✓ As preparações neuromusculares nervo frênico-diafragma (NFD) e *extensor longo dos dedos* (EDL) apresentaram diferenças de sensibilidade, frente ao veneno total de *Bothrops pirajai* e à miotoxina PrTX-I, possivelmente devido às diferenças de composição das fibras musculares nestes músculos.
- ✓ A fração miotóxica PrTX-III do veneno de *B. pirajai* causou bloqueio neuromuscular dose-dependente na preparação EDL, provocando severas alterações morfológicas e ultraestruturais pré- e pós-sinápticas nos terminais nervosos motores e nas fibras musculares, e com liberação de CQ no banho. Esta fração, portanto, possui potentes atividades neurotóxica e miotóxica.
- ✓ As miotoxinas Piratoxina -I e Piratoxina-III são, muito provavelmente, os componentes responsáveis pela potente atividade miotóxica do veneno de *B. pirajai*.

Several reasons can be cited which motivate the study of natural substances such as the characterization of the active principles and its biological effects. Among them, the ophidic venoms stand out because it is common the occurrence of accidental envenomation after snake bites in tropical countries. In Brazil, ophidic accidents account for a major part in the context of Public Health where the genus *Bothrops* is responsible for about 90% of them. Myonecrosis is one of the local effects whose rapid onset is difficult to control and deserves special attention in the treatment approaches after envenomation. Myonecrosis is triggered by myotoxic proteins specifically acting in muscle fibers at the bite site. Due to the scarcity of studies about the biological actions of *Bothrops pirajai* ("jararacussu of Bahia") snake venom, a rare and exclusive specimen living in Bahia and northeastern of Minas Gerais, the present work was proposed viewing to investigate myotoxic and neurotoxic activities of crude venom and its fractions Piratoxin-I (PrTX-I) and Piratoxin-III (PrTX-III). The studies were performed in mice isolated muscle preparations of the *extensor digitorum longus* (EDL) and phrenic nerve-diaphragm (PND) muscles through myographic, histological and ultrastructural analysis and determination of creatinokinase (CK) in the incubation bath. The venom and the fraction PrTX-III (10, 25 and 50 mg/ml) caused a dose-dependent twitch-tension blockade of the EDL muscle fibers, histological and ultrastructural changes of muscle cells and nerve endings culminating in complete necrosis of both and increased CK release in the bath. PrTX-I caused a dose-dependent blockade (5, 10 and 20 mg/ml) of the twitch tension in PND muscle fibers and severe myonecrosis. However, PrTX-I did not affect muscle fibers nor caused alterations on the twitch tension responses in EDL. These differences could be accounted for a distinct sensitivity of EDL and PND muscle fibers to the venom and PrTX-I possibly related to the amount of slow- and fast-contracting fibers present in each one. Our results suggest that PrTX-I and PrTX-III of *B. pirajai* venom would be the components accounting for the myotoxic activity of venom despite a distinct mechanism of action could be implied. Additionally, these preliminary results suggest a potent neurotoxic activity, also observed with the whole venom.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E. X. & THESLEFF, S. A comparative study of membrane properties of innervated and chronically denervated fast and slow skeletal muscles of the rat. **Acta physiol. scand.** 73: 471-480, 1968.
- AMARAL, A. Novos gêneros e espécies de ophídios brasileiros (Contribuição III para o conhecimento dos ophídios do Brasil). **Arch. Museu Nac.** 26: 120-121, 1926.
- AMARAL, C.F.S.; DOURADO, H.V.; KOUYOUMDJIAN, J.A.; CARDOSO, J.L.; CAMPOS, J.A.; AZEVEDO-MARQUES, M. & LOPES, P.F.A. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. **Centro de Documentação do Ministério da Saúde**, Brasília, 1987, p. 53.
- AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R.J.; CARNEIRO, J.C. & CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 28: 220-227, 1986.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M. & TULINSKY, A. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. **Acta Cryst. D51**: 311-317, 1995.
- ARROYO, O. & GUTIÉRREZ, J.M. Estudio ultrastructural de la mionecrosis inducida en ratón por el veneno de terciopelo (*Bothrops asper*) de Costa Rica. **Toxicon** 19: 773-782, 1981.
- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Archs. Biochem. Biophys.** 275: 63-71, 1989.
- BARRAVIERA, B. & PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: (BARRAVIERA, B. ed.) **Venenos animais: uma visão integrada**. Ed. Publicações Científicas Ltda, Rio de Janeiro, 1994, pp. 261-280.
- BIEBER, A.L. Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: (LEE, C.Y. ed.) **Snake venoms: Handbook of experimental pharmacology**. vol. 52, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York, 1979.

- BIEBER, A.L.; MCPARLAND, R.H. & BECKER, E.R. Amino acid sequence of myotoxins from *Crotalus viridis concolor*. **Toxicon** 25: 667-680, 1987.
- BJARNASON, J. & FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.** 2: 325-372, 1994.
- BJARNASON, J.B. & TU, A.T. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. **Biochemistry** 17: 3395-3404, 1978.
- BOLAÑOS, R. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Editorial Universidad da Costa Rica, San José, 1982, p.136.
- BÜLBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmac.** 1: 38-61, 1946.
- CAMERON, D.L. & TU, A.T. Characterization of myotoxin α from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Biochemistry** 16: 2546-2553, 1977.
- CANDURI, F.; MANCUSO, L.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; WARD, R.J. & ARNI, R.K. Crystallization of piratoxin I, a myotoxic Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. **Toxicon** 36: 547-551, 1998.
- CATE, R.L. & BIEBER, A.L. Purification and characterization of Mojave (*Crotalus scutulatus*) toxin and its subunits. **Archs. Biochem. Biophys.** 189: 397-408, 1978.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V. & WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29: 1279-1303, 1991.
- CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. & GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Protein Chem.** 12: 57-64, 1993.
- COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J. & RODRIGUES-SIMIONI, L. Efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops insularis* na preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo. **Mem. Inst. Butantan** 52: 78, 1990a.
- COGO, J.C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J. The effects of *B. insularis* venom on isolated nerve muscle preparation. **Toxicon** 28: 605, 1990b.

- COGO, J.C., PRADO-FRANCESCHI, J., CRUZ-HÖFLING, M.A., CORRADO, A.P. & RODRIGUES-SIMIONI, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon** **31**: 1237-1247, 1993.
- COGO, J.C., PRADO-FRANCESCHI, J., GIGLIO, J.R., CORRADO, A.P., CRUZ-HÖFLING, M.A. DONATO, J.L. , LEITE, G.B. & RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. **Toxicon** **36**: 1323-1332, 1998.
- CONDREA, E. Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins. **Experientia** **30**: 121-129, 1974.
- COUTEAUX, R.; MIRA, J.C. & D'ALBIS, A. Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. **Biol. Cell.** **62**: 171-182, 1988.
- CRUZ-HÖFLING, M.A.; SILVA-CARVALHO, I.; LEITE, G.B.; CORRADO, A.P. & RODRIGUES-SIMIONI, L. Myonecrosis induced by guanidine in the mouse isolated phrenic nerve diaphragm preparation. **Gen. Pharmac.** **28**: 593-597, 1997.
- CURRAN, M. & PARRY, D.J. Neuromuscular function in fast and slow muscles of genetically dystrophic mice. **Expl. Neurol.** **47**: 150-161, 1975.
- DENSON, K.W.E.; RUSSEL, F.S.; ALMAGRO, D. & BISHOP, R.C. Characterization of coagulant activity of some snake venoms. **Toxicon** **10**: 557-562, 1972.
- DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic PLA₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Archs. Biochem. Biophys.** **298**: 135-142, 1992.
- DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B., GENÉ, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochem. Biophys. Acta** **1070**: 455-460, 1991.
- DUCHEN, L.W.; EXCELL, B.J.; PATEL, R. & SMITH, B. Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre and regeneration. A light and electron microscopic study

- of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. **J. Neurol. Sci.** **21**: 391-417, 1974.
- ENGLE, C.M.; BECKER, R.R.; BAILEY, T. & BIEBER, A.L. Characterization of two myotoxic proteins from the venom of *Crotalus viridis concolor*. **J. Toxicol.-Toxin Rev.** **2**: 267-283, 1983.
- FERREIRA, M.L.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; FRANÇA, F.O.S.; CARDOSO, J.L. & MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon** **30** : 1603-1608, 1992.
- FLETCHER, J.E. & LIZZO, F.H. Contracture induction by snake venom cardiotoxin in skeletal muscle from humans and rats. **Toxicon** **25**: 1003-1010, 1987.
- FLORENDO, J.A., REGER, J.F. & LAW, P.K. Electrophysiological differences between mouse *extensor digitorum longus* and soleus. **Expl. Neurol.** **82**: 404-412, 1983.
- FOHLMAN, J. & EAKER, D. Isolation and characterization of a lethal myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the common sea snake *Enhydrina schisotosa* causing myoglobinuria in mice. **Toxicon** **15**: 385-393, 1977.
- FOX, J.W.; ELZINGA, M. & TU, A.T. Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin α isolated from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Biochemistry** **18**: 678-684, 1979.
- FRANCO, Y.O. Atividade neutotóxica e miotóxica dos venenos *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu* e de suas principais toxinas, perante antivenenos. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas-Campinas (SP.), 1997, p.133.
- GERTLER, R. A. & ROBBINS, N. Differences in neuromuscular transmission in red and white muscles. **Brain Res.** **142**: 160-164, 1978.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.M.; HAWGOOD, B.J. & EKDER, 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. & CERDAS, L. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. **Rev. Biol. Trop.** **32**: 213-222, 1984.

- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan** 51: 211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33: 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L.; ARROYO, O.; ROJAS, E.; LOMONTE, B.Y. & GENÉ, J.A. Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente "terciopelo" (*Bothrops asper*). **Acta méd. costarric.** 25: 255-262, 1982.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; GENE, J.A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z. & SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon** 27: 735-745, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. & CERDAS, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon** 24: 885-894, 1986.
- GUTIÉRREZ, J.M.; NUÑEZ, J.; DÍAZ, C.; CINTRA, A.C.O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. & GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Molec. Pathol.** 55: 217-229, 1991.
- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. & ODELL, G.V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** 22: 115-128, 1984a.
- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. & ODELL, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Molec. Pathol.** 40: 367-379, 1984b.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; NUÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G. & OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH₁, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Exp. Molec. Pathol.** 62: 28-41, 1995.

- HARRIS, J.B. & JOHNSON, M.A. Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. **Clin. Exp. Pharmac. Physiol.** 5: 587-600, 1978.
- HARRIS, J.B., JOHNSON, M.A. & KARLSSON, E. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 2: 383-404, 1975.
- 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. & MALTIN, C.A. Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin, of the Australian taipan, *Oxyuramus scutellatus*. **Br. J. Pharmac.** 76: 61-75, 1982.
- HARVEY, A.L. Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanism of action. **J. Toxicol. Toxin. Rev.** 4: 41-69, 1985.
- HARVEY, A.L. Cytolytic toxins. In: (SHIER, W.R. & MEBS, D. eds.) **Handbook of Toxinology**. New York, Marcel Dekker, 1990. pp. 48-53.
- HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGUE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes Elapidae e Viperidae. **Mem. Inst. Butantan** 36: 109-208, 1972.
- HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGUE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Mem. Inst. Butantan** 42/43: 373-496, 1978/79.
- HOMMA, M. & TU, A.T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br. J. Exp. Path.** 52: 538-542, 1971.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** 26: 615-627, 1988.
- HOWARD, B.D. & GUNDERSEN, C.B. Effects and mechanisms of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. **A. Rev. Pharmac. Toxic.** 20: 307, 1980.

- JACKSON, M.J. Molecular mechanisms of muscle damage. In: (PARTRIDE, T., ed.) **Molecular and Cell Biology of Muscular Dystrophy**. London: Chapman and Hall, 1993. pp. 257-281.
- JACKSON, M.J.; PATH, M.C.R.; BROOKE, M.H.; KAISER, K. & EDWARDS, R.H.T. Creatine kinase and prostaglandin E2 release from isolated Duchenne muscle. **Neurology** **41**: 101-104, 1991.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Biochemistry of snake venoms. **Clin. Toxicol.** **3**: 389-431, 1970.
- JONES, D.A.; JACKSON, M.J. & EDWARDS, R.H.T. Release of intracellular enzymes from an isolated mammalian skeletal muscle preparation. **Clin. Sci.** **65**: 193-201, 1983.
- KAISER, E. & MICHL, H. Chemistry and pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: (BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E.E. eds.) **Venomous animals and their venoms**. Vol 2. New York, Academic Press, 1971. pp. 307-318.
- KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D. & ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.** **278**: 319-325, 1990.
- KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: (LEE, C.Y. ed.) **Snake Venoms**. Berlin, Springer Verlag, 1979. pp.159-212.
- KINI, R.M. & EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venoms phospholipases A₂. **Toxicon** **27**: 613-635, 1989.
- KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** **25**: 65-106, 1987.
- LAURE, C. J. Die Primärstruktur des Crotamins. Hoppe-Seyler's Z. **Physiol. Chem.** **356**: 213-215, 1975.
- LEE, C.Y.; CHANG, C.C.; CHIU, T.H.; CHIU, P.J.S.; TSENG, T.C. & LEE, S.Y. Pharmacological properties of cardiotoxin isolated from Formosa cobra venom. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.** **259**: 360-374, 1968.

- LIN SHIAU, S.Y.; HUANG, M.C.; TSENG, W.C. & LEE, C.Y. Comparative studies on the biological activities of cardiotoxin, melitin and prymnesin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac.* **287**: 349-358, 1975.
- LÔBO-ARAÚJO, A.; DONATO, J.L.; LEITE, G.B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J. Efeitos na junção neuromuscular do veneno de *Bothrops lanceolatus*. *Mem. Inst. Butantan* **52**: 77-80, 1990.
- LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* **27**: 725-733, 1989.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.; OTERO, R.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O.; CARMONA, E. & ROVIRA, M.E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28**: 1137-1146, 1990.
- MAEDA, N.; TAMIYA, N.; PATTABHIRAMAN, T.R. & RUSSELL, F.E. Some chemical properties of the venom of the rattlesnake *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon* **16**: 431-441, 1978.
- MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.B.; LACHAT, J.J.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.L. & GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon* **33**: 615-626, 1995.
- MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T. & REICHL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* **22**: 193-206, 1984.
- MANDELBAUM, F.R. & ASSAKURA, M.T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon* **26**: 379-385, 1988.
- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: (OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAY, Y. eds.) *Animal, Plant and Microbial Toxins*. London, Plenum Press, 1976. pp.111-121.

- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Hemorrhagic factors from the venom of two species of *Bothrops* snakes. In: **Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Protéicas**, 12, Campinas, 1988. V.1 Anais. São Paulo, Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1988. pp. 9-24.
- MCARDLE, A. & JACKSON, M.J. Intracellular mechanisms involved in damage to skeletal muscle. **Basic Appl. Myol.** 4: 43-50, 1994.
- MCARDLE, A.; EDWARDS, R.H.T. & JACKSON, M.J. Effects of contractile activity on muscle damage in the dystrophin-deficient mdx mouse. **Clin. Sci.** 80: 367-371, 1991.
- MCARDLE, A.; EDWARDS, R.H.T. & JACKSON, M.J. Accumulation of calcium by normal and dystrophin-deficient mouse muscle during contractile activity *in vitro*. **Clin. Sci.** 82: 455-459, 1992.
- MCARDLE, A.; EDWARDS, R.H.T. & JACKSON, M.J. Release of creatine kinase and prostaglandin E2 from regenerating skeletal muscle fibers. **J. appl. Physiol.** 76: 1274-1278, 1994a.
- MCARDLE, A.; EDWARDS, R.H.T. & JACKSON, M.J. Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient mdx mouse. **Muscle Nerve** 17: 1378-1384, 1994b.
- MEBS, D. Myotoxic activity of phospholipase A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon** 24: 1001-1008, 1986.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M. & SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon** 21: 393-404, 1983.
- MEBS, D. & OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther** 48: 223-236, 1990.
- MEBS, D. & PANHOLZER, F. Isolation of a hemorrhagic principle from *Bitis arietans* (puff adder) snake venom. **Toxicon** 20: 509-512, 1982.

- MELO, P.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. & SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon** 31: 285-291, 1993.
- MELO, P.A.; NASCIMENTO, M.C.; MORS, W.B. & SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** 32: 595-603, 1994.
- MELO, P.A. & OWNBY, C.L. Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. **Toxicon** 34: 653-669, 1996.
- MELO, P.A. & SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscles by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **Toxicon** 26: 87-95, 1988.
- MILTON, R.L. & BEHFOROUZ, M.A. Na channel density in extra junctional sarcolemma of fast and slow twitch mouse skeletal muscle fibres: functional implications and plasticity after motoneuron transplantation to a slow muscle. **J. Muscle Res. Cell Motility** 16: 430-439, 1995.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento por animais peçonhentos**. Brasília, D.F., 1997.
- MOKRI, B. & ENGEL, A.G. Duchenne dystrophy: Electron microscopic finding pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane at the muscle fiber. **Neurology** 25: 1111-1120, 1975.
- NAGAOKA, R., YAMASHITA, S., MISUNO, M. & AKAIKE, N. Intracellular Na⁺ and K⁺ shifts induced by contractile activities of rat skeletal muscles. **Comp. Biochem. Physiol.** 109A: 957-965, 1994.
- NAHAS, L.; DENSON, K.W.E. & MACFARLANE, R.G. A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.** 12: 354-367, 1964.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S. & BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* venom. **Thromb. Haemost.** 41: 314-328, 1979.

- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: (LEE, C.Y. ed.) **Snake venoms: Handbook of Experimental Pharmacology**. vol 52, Springer-Verlag. Berlim Heidelberg, New York, 1979. pp. 480-546.
- OHSAKA, A.; JUST, M. & HABERMANN, E. Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. **Bioch. Biophys. Acta** **323**: 415-428, 1973.
- OWNBY, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: (TU, A.T. ed.) **Rattlesnake venoms, their actions and treatment**. New York, Marcel Dekker, 1982. pp. 163-209.
- OWNBY, C.L.; BJARNASON, J. & TU, A.T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Am. J. Pathol** **93**: 201-218, 1978.
- OWNBY, C.L.; CAMERON, D. & TU, A.T. Isolation of a myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Am. J. Pathol.** **85**: 149-158, 1976.
- OWNBY, C.L. & COLBERG, T.R. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). **Toxicon** **26**: 459-474, 1988.
- OWNBY, C.L.; FLETCHER, E. & COLBERG, T.R. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle *in vivo*. **Toxicon** **31**: 697-709, 1993.
- OWNBY, C. L. & GEREN, C.R. Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. **Toxicon** **25**: 517-526, 1987.
- OWNBY, C.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; COLBERG, T.R. & ODELL, G.V. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin α from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon** **20**: 877-885, 1982.
- OWNBY, C.L.; NIKAI, T.; IMAI, K. & SUGIHARA, H. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). **Toxicon** **28**: 837-846, 1990.

- PADYKULA, H.A. & GAUTHIER, G.F. The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white, and intermediate skeletal muscles fibers. **J. cell Biol.** **46**: 27-41, 1970.
- PAGALA, M.; RAVINDRAN, K.; AMALADEVI, B.; NAMBA, T. & GROB, D. Potassium and caffeine contractures of mouse muscles before and after fatiguing stimulation. **Muscle Nerve** **17**: 852-859, 1994.
- QUEIROZ, L.S. & PETTA, C.A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev. Inst. Med Trop. São Paulo** **26**: 247-253, 1984.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. & MANDELBAUM, F.R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon** **23**: 341-345, 1985.
- RIBEIRO, L.A. Estudo epidemiológico de acidentes por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, atendidos no Hospital Vital Brazil, 1988. Tese de Mestrado-Universidade de São Paulo-São Paulo, 1991.
- RIEPEL, O. A cladistic classification of primitive snakes based on skull structure. **Z. Zool. Syst. EvolForsch.** **17**: 140, 1979.
- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. & KUMAR, V. **Patologia estructural y funcional**. México, Nueva Editorial Interamericana, 1987. p. 1434.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N. & CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience** **10**: 475-489, 1983.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; COGO, J.C.; ASSAKURA, M.T. & MANDELBAUM, F.R. Muscular-blocking activity of *Bothrops moojeni* venom and its active fractions. **Mem. Inst. Butantan** **52**: 77, 1990.

- RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; JIANG, M.S. & FLETCHER, J.E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a lys 49 phospholipase A_2 myotoxin. **Toxicon** **33**: 1479-1489, 1995.
- ROSENFELD, G. Moléstias por venenos animais. **Pinheiros Terap.** **17**: 3-15, 1965.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: (BÜCHERL, W.; BÜCHERL, E.E. & DEULOFEU, V., eds.) **Venomous Animals and Their Venoms**. Vol. 2. Academic Press, New York, 1971. pp. 345-384.
- ROSENFELD, G.; HAMPE, G.; KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms: determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Mem. Inst. Butantan**, **29**: 143.
- RUFF, R.L. Na current density at and away from end plates on rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers. **Am. J. Physiol.** **262**: C229-C234, 1992.
- SAMEJIMA, Y.; AOKI, Y. & MEBS, D. Structural studies on a myotoxin from *Crotalus adamanteus* venom. In: (GOPALAKRISHNAKONE, P. & TAN, C.K. Eds.) **Progress in Venom and Toxin Research**, National Singapore University., 1988. pp.186-187.
- SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M.N.; AGOSTINI-COTTA, G. & DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon** **30**: 95-103, 1992.
- SANTO-NETO, H. Aspectos morfológicos das alterações musculares produzidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e seus componentes: estudos em microscopia óptica e eletrônica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo-SP., 1987.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE SÃO PAULO. Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, Diagnóstico e Tratamento. Manual de Vigilância Epidemiológica. 1993. p. 61.
- SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; DE SOUZA, G.E.P. & GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing

- toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** 28: 261-273, 1990.
- SELISTRE, H.S.; WHITE, S.P. & OWNBY, C.L. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of proteins. **Toxicon** 34: 1237-1242, 1996.
- SUAREZ-KURTZ, G. & EASTWOOD, A.B. Release of sarcoplasmic enzymes from frog skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** 241: C98-C105, 1981.
- TAKEKURA, H.; KASUGA, N. & YOSHIOKA, T.Y. Differences in ultrastructural and metabolic profiles within the same type of fibres in various muscles of young and adults rats. **Acta physiol. Scand.** 150: 335-344, 1994.
- TOYAMA, M.H.; COSTA, P.D.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A. & MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **J. Protein Chem.** (submetido), 1998.
- TOYAMA, M.H.; MANCUSO, L.C.; GIGLIO, J.R.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B. & MARANGONI, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. **Biochem. Molec. Biol. Int.** 37: 1047-1055, 1995.
- TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. & MARANGONI, S. The amino acid sequence of piratoxin-I (PrTX-I), a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **J. Protein Chem.** 17: 713-718, 1998.
- TU, A.T. **Venoms: chemistry and molecular biology.** (WILEY & SONS eds.), New York, 1977. p. 560.
- TU, A.T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: (TU, A.T. ed.) **Rattlesnake Venoms, Their Actions and Treatment.** New York, Marcel Dekker, 1982.

- UNDERWOOD, G. **A contribution to the classification of snakes**. London: British Museum (Natural History), 1967.
- VILLARROEL, M.S.; ZELANTE, F.; ROSA, R.R. & FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *Bothrops jararaca*. **Mem. Inst. Butantan**, 42/43: 345-355, 1978/79.
- VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: (CORBETT, C.E., ed.) **Farmacodinâmica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982. pp. 1044-1074.
- WAERHAUG, O. & LOMO, T. Factors causing different properties at neuromuscular junctions in fast and slow rat skeletal muscles. **Anat. Embryol.** 190: 113-125, 1994.
- WOOD, S.J. & SLATER, C.R. Action potential generation in rat slow and fast-twitch muscles. **J. Physiol. Lond.** 486: 401-410, 1995.
- WROGEMAN, K & PENA, S. D. J. Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell necrosis in muscle diseases. **Lancet** i: 672-673, 1976.

De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas
Referências Bibliográficas: NB 66/78 (BIREME)

VIII-APÊNDICE

Este trabalho foi submetido para publicação no periódico *Journal of Protein Chemistry*, e embora não integrante do projeto de tese, foi desenvolvido durante esse período, e oferece informações sobre a estrutura da miotoxina PrTx-III e seu efeito no músculo esquelético *in vivo*, o que amplia os conhecimentos acerca do veneno como um todo.

**Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49
phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin
with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high
myotoxic activity**

Marcos Hikari Toyama¹, Patrícia Dourado Costa³, José Camillo Novello¹,
Benedito de Oliveira¹, José Roberto Giglio⁴, Maria Alice da Cruz-Höfling² and
Sergio Marangoni^{1*}.

¹Departamento de Bioquímica, ²Departamento de Histologia e Embriologia,
Instituto de Biologia, UNICAMP; ³Departamento de Farmacologia, Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo,
Brazil.

⁴Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, USP/Ribeirão
Preto, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed.

ABSTRACT

MP-III 4R PLA₂ was purified from the venom of *Bothrops pirajai* venom (Bahia's jararacussu) after three chromatographic steps, which started with RP-HPLC.

The complete amino acid sequence of MP-III 4R PLA₂ from *Bothrops pirajai* was determined by amino acid sequence of reduced and carboxymethylated MP-III 4R and the isolated peptides from clostripain and protease V8 digest.

MP-III 4R is a D49 PLA₂ with 121 amino acid residues with molecular weight estimated at 13800, 14 half cysteines. This protein showed moderate PLA₂ and anticoagulant activity. This PLA₂ hasn't high homology degree with other bothropic PLA₂-like myotoxin (~75%) and non-bothropic myotoxins (~60%).

MP-III 4R is a new PLA₂, which was isolated by using exclusively analytical and preparative HPLC methods. Based on the N-terminal sequence and biological activities, MP-III 4R was identified as similar to piratoxin-III (PrTX-III) which were isolated by conventional chromatography based on molecular exclusion, ion exchange chromatography.

Clinical manifestations indicate that at the site of injection of toxin, there may be pain of variable intensity because the animals remain licking the limb. No clinical sign indicating general toxicity was noticed.

Myotoxicity was observed in gastrocnemius muscle cells after exposure to MP-III 4R, with high frequency (70%) of affected muscle fibers.

Key words: *Bothrops pirajai*, D49 PLA₂, anticoagulant PLA₂, amino acid sequence, PrTX-III, MP-III 4R.

INTRODUCTION

The genus *Bothrops* comprises several species which are largely distributed from South to North America (Hoge and Romano –Hoge, 1978/79). Among the bioactive proteins from *Bothrops* venoms, the phospholipase A₂ (PLA₂, E.C. 3.1.14) and PLA₂-like myotoxin are outstanding as its major component. Phospholipase A₂s are calcium-dependent enzymes which hydrolyze the 2 ester bonds of 1,2 diacyl-3sn phosphoglycerides (Chang *et al.*, 1994, Shimohigachi *et al.*, 1995, Ogawa, *et al.*, 1996).

They are found in most tissues, mainly in pancreatic juice of mammals and venom of snakes and insects. PLA₂ enzymes are classified onto four groups (I, II, III and IV), according to their extracellular or intracellular origin, their primary structure and disulfide bonding (Denis *et al.*, 1994).

Snake venom PLA₂s are usually distributed into two major groups: I (Elapidae and Hydrophidae) and II (Crotalidae and Viperidae). Group II comprises the catalytic active D49 and the inactive or little active K49 PLA₂ (Selistre de Araújo, *et al.*, 1996). In addition to the catalytic, the PLA₂s may show neurotoxic, myotoxic, pro- or anti-platelet aggregation, hemolytic, anticoagulant, cardiotoxic and edematogenic activities (Kini and Evans, 1989; Arni and Ward, 1996).

The myotoxic PLA₂s are responsible for the intense myonecrosis produced by the Bothropic venoms. Some of them have anticoagulant and or edematogenic activity (Mancuso *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 1998). Besides the muscle cells, other cells as macrophages, fibroblasts and neurons are apparently additional *in vitro* targets of these toxins (Gutiérrez and Lomonte, 1995). The specific receptors on the plasma membrane of the muscles are unknown (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Fletcher *et al.*, 1996).

In this paper we described the procedure of MP-III 4R purification from *Bothrops pirajai* snake venom, which started with RP-HPLC on preparative μ -Bondapak C18 column, followed by cation ion exchange HPLC and the last repurification step on the analytical RP-HPLC. In the previous paper (Mancuso *et al.*, 1995) described the purification and the partial characterization of PrTX-III by conventional method as molecular exclusion and cation ion exchange chromatography. MPIII-4R was isolated from the *Bothrops pirajai* venom by using exclusively the HPLC method and it is showed that the fraction is the same PrTX-III, previously described by Giglio's group. MPIII-4R is one of the few examples of bothropic PLA₂ that has three different kinds of biological activities as a moderate anticoagulant and PLA₂ and high myotoxic activities. Besides this work presents the complete amino acid sequence of this new PLA₂ and establishes correlation between its structure and biological activities, PLA₂, anticoagulant and myotoxic. The examination of pathological changes induced in mice skeletal muscle cells was performed *in vivo*.

Material and Methods

Venom, Chemicals and Reagents

Bothrops pirajai snake venom was a gift from CEPLAC, CEPEC (Ministry of Agriculture, Itabuna, Bahia, Brazil). All chemicals and reagents used in this work were of analytical or sequence grade.

Reverse Phase HPLC

Purification of BP-III was made according method described by Toyama *et al.*, (1995). Twenty mg of the desiccated whole venom were dissolved with 750 μ l of 0.1% (v / v) trifluoroacetic acid (Solvent A). The resulting solution was clarified by centrifugation and the supernatant was applied on top of a 0.78 cm x 30 cm μ -Bondapack C-18 column (Waters 991-PDA system). Elution of peaks were proceeded with a linear gradient from zero to 66.5% (v / v) Acetonitrile (Solvent B) in 0.1% (v / v) trifluoroacetic acid, at a flow rate of 2.0 ml / min. Absorbances were monitored at 280 nm. Fractions were collected, lyophilized and stored at -20 ° C.

Ion exchange HPLC chromatography

BP-III fraction was dissolved in 250 μ l of 0.05M Ammonium bicarbonate, pH 7.8 (Buffer A). After homogenization, MP-III solution was clarified by centrifugation at 10.000 rpm by 3 min. The supernatant was applied on Protein Pack SP 5PW, 0.78 X 7.0 cm. The elution of samples was performed using a linear gradient of concentration from 0.05M to 1.0 M Ammonium bicarbonate.

The chromatographic run was monitored at 280 nm and constant elution flow of 2.0 ml/min.

Measurement of PLA₂ activity

The PLA₂ measurement was made following to method described by Cho and Kézdy, (1991) and Holzer and Mackessy (1996). In our experiments we used a PLA₂ solution at 1.0 mg/ml of concentration and used a 100 μ g by test. The PLA₂ activity was measured in 20 min of incubation at 37° C, in 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0 with 2.5 mM CaCl₂. After that the reaction was stopped by addiction of Triton solution.

Anticoagulant activity

Anticoagulant activity was assayed by measuring the recalcification time of fresh, platelet-poor, rat plasma. The plasma (0.5 ml) was incubated with saline or isolated venom fraction (0.1ml), at 37° C for 3 min and the time for clotting after addition of 0.1ml of 0.25M CaCl₂ was measured (Alvarado and Gutiérrez, 1988; Selistre *et al.*, 1990).

Reduction and carboxy methylation of MP-III 4R

One milligram of the purified MP-III 4R toxin was dissolved in 6M guanidine chloride (Merck, Darmstadt, Germany) containing 0.4M Tris-HCl and 2 mM EDTA, at final pH 8.15, reduced with DTT and carboxy-methylated with ¹⁴C-iodoacetic acid (Marangoni *et al.*, 1995). Desalting was performed on a Sephadex G 25 column in 1M acetic acid at 25° C and the eluted RC-MP-III 4R was lyophilized.

Digestion of the MP-III 4R and purification of the resulting peptides

Reduced and carboxymethylated MP-III 4R (RC-MP-III 4R) was digested with *Staphylococcus aureus* protease V8 for 16 hr at 37° C, using a 1:30 enzyme to substrate molar ratio and stopping the reaction by lyophilization (Houmard and Drapeau, 1972). RC-MP-III 4R was also digested with clostripain for 8 h at 37° C and lyophilized (Cintra *et al.*, 1993).

Both protease V8 and clostripain digests were fractionated by reverse phase HPLC using a Waters PDA 991 system and a C18 μ Bondapack column under a concentration gradient of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (v/v).

Sequence procedure

Direct sequence from the N-terminal and of the toxin was carried out with the native protein followed by those of the isolated peptides from the RC-MP-III 4R, using an Applied Biosystem 477 A automatic sequencer. The phenylthioiodantoin (PTH) amino acid was identified according to their retention time compared to those of the 20 PTH amino acid standards.

Peptides containing (¹⁴C) CM-Cys were monitored by following the radio-active label using a liquid scintillation counter (Beckman, model L-250).

Light Microscopy

Swiss mice weighing 25-30 g were injected in the right thigh gastrocnemius muscle with either 0.1 ml of MP-III 4R (1.3 μ g/g), dissolved in Tyrode solution (n=3) or with 0.1 ml of Tyrode solution alone (controls) (n=3). After 3 hours, the animals were killed by cervical dislocation and samples of muscle were fixed for 10-12 h in Bouin's fixative. The gastrocnemius samples were then washed three times (10 min each) in distilled water, dehydrated in graded series of ethanol (70%, 95% and 100%) and embedded in Historesin JB-4 (LKB-Bromma, Sweden). Sections 2-3 μ m thick were cut using a Leica RM 2035 microtome (Leica, Wien, Austria) and stained with 0.5% Toluidine blue solution for examination by light microscopy. Photomicrographs were taken using a Zenalumar Zeiss light microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Results

MP-III 4R was isolated by HPLC methods as described above after three chromatographic steps. This fraction showed a moderate PLA₂ and anticoagulant activities and strong myotoxic activity. The first chromatographic step was made according the method described by Toyama *et al.*, (1995), which used the RP HPLC for initial purification of the PLA₂.

The MP-III fraction (Fig. 1), obtained after RP HPLC, was repurified on Protein Pack SP 5PW (Waters) (0.78 X 8 cm) ion exchanger HPLC column. Thirty mg of MP-III fraction are dissolved on 0.05M ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8 and clarified before applied on the column. The elution of fraction (MP-I, MP-II, MP-III, BpIV, BpV, BpVI) were made using a linear gradient of 1.0M ammonium bicarbonate, pH 7.8.

Thus in the first chromatography were obtained six major fractions (Fig.1) among which them a new myotoxic fraction MP-III with moderate PLA₂ and anticoagulant activities, that was repurified on ion exchange HPLC. After this chromatographic step, five major fraction were purified (Fig. 2). MP-III 4 isolated in this second chromatography showed an anticoagulant, PLA₂ and myotoxic activities. This fraction MP-III 4 was subjected to new RP HPLC for further purification (Fig. 3). The protein isolated from the MP-III 4 from ion exchange chromatography shows a single elution peak that was called as MP-III 4R. This protein has molecular weight around 14 kDa in SDS-PAGE and showed a basic protein.

Enzymatic assay was made according Cho and Kézdy, (1991) and Holzer and Mackessy (1996) and showed values of 102.31 (nmoles/min/mg) in which it indicates a moderate PLA₂ activity. The anticoagulant activity using doses of 2.5 – 3.5 µg showed recalcification time up to 45 min, that was also considerate moderate.

The Fig. 4 shows the chromatographic profile of the of *S. aureus* V8 protease digest of 500 µg of reduced and 14C alkylated MP-III 4R, which was purified in RP-HPLC analytical µ-Bondapack C18 column. The chromatographic profile of purification of MP-III 4R digest with clostripain performed in same conditions of the purification of protease V8, is shown in Fig. 5.

The complete sequence of MP-III 4R is shown in the Fig. 6. The sequence of the first 42 N-terminal amino acids was obtained by direct automated sequence from the RC-MP-III 4R. The rest of the sequence was determined from the amino acid sequence of the peptides purified from the protease V8 and clostripain digest purification (Fig. 6). The effective important peptides that contributed for determination of the primary structure were Clt 5, Clt 18, Clt 12, SV8 2 and SV8 4.

The myotoxic activity of MP-III 4R D49 was assayed using direct histological examination of sections of the injected skeletal muscle. At 3 hours after injection, the predominant pattern of myonecrosis was characterized by densely clumped myofilaments, alternating with both clear areas of sarcoplasm which appeared to be empty and hypercontract regions of cells (Fig. 8 B). Comparison with histological sections of control gastrocnemius (Fig. 8 A) revealed the marked disintegration of muscle cells of envenomated mice which loss striation, became swollen and with ruptured sarcolemma, indicating a powerful myotoxic activity of MP-III 4R D49. This toxin did not cause hemorrhage.

Discussion

In this paper, we described a new procedure for the isolation of PLA₂ from the whole venom. Classically, the bothropic and other PLA₂ were purified using the molecular exclusion or ion exchange chromatography for initial step, followed by ion exchange rechromatography and last RP-HPLC step. *Bothrops* myotoxins isoforms described can not be resolved by common chromatographic method based on size, such as molecular exclusion or SDS-PAGE, or net charge using ion exchange method or chromatofocusing methods, which have failed to isolate the high basic myotoxins. Recently, RP HPLC has been used for separation of these isoforms (Gutiérrez and Lomonte, 1995). Recently, Toyama *et al.*, (1995) showed an alternative method of purification of two myotoxins from *Bothrops pirajai* venom, which started with RP-HPLC. This method showed advantages in relation to the conventional chromatographic methods when there is few amount of venom to be purified. In our experiments we used around 20 mg of whole venom which is considered a very low amount when compared to conventional chromatography that normally uses around 250 mg to 1.0g.

In the present work, the MP-III 4R PLA₂ isolated from *Bothrops pirajai* whole venom showed three kinds of biological activities: a moderate PLA₂, and anticoagulant activities, and a strong myonecrotic-inducing effect.

Phospholipases A₂ are classified in four groups and the snake venom PLA₂ belong to groups I and II. Type II PLA₂s can be subdivided into two subgroups: D-49 (Asp-49 PLA₂) which has an aspartic acid residue calcium binding site and high enzymatic activity and K-49 PLA₂-like (Lys-49 PLA₂-like), which has a lysine residue at position 49 and low enzymatic activity (Selistre de Araújo *et al.*, 1996). MP-III 4R exhibits a sequence homology degree around 60% when compared to K-49 PLA₂ and this value up to 75% of homology when compared to other D-49 PLA₂.

MP-III 4R, isolated from whole venom of *Bothrops pirajai* has a moderate PLA₂ activity if compared to others from Crotalic venoms. MP-III 4R has 70% of homology when compared to BthTX-II, a myotoxin isolated from *Bothrops jararacussu* venom (Fig. 7), which has low lipolytic activity (i.e. low PLA₂ activity) and its primary structure was completely determined by Pereira *et al.*,

(1998). According to these authors, the presence of Y28, G30, G32, D49, H48, Y52 and D99 are direct or indirectly involved in the catalysis. BthTX-II shows presence of mutation F5 → W5, which is considered a strategic position for enzymatic catalysis expression. The presence of F5 in the MP-III 4R (PLA₂ activity), shows that residue contributes to the presence of hydrophobic inner in the N-terminal region that is highly conserved and folding a "hydrophobic wall" which is responsible for the access of phospholipids to the catalytic site. In the active PLA₂ there is a conserved triplet that contributes to form this hydrophobic wall: F5, A103 and F106 (Arni and Ward, 1996), which are conserved in MP-III 4R.

Kini and Iwanaga (1986) and Kini and Evans (1987, 1989) have proposed several models to explain the pharmacological and biological activities of PLA₂. In these models, the PLA₂ has two separate sites: one responsible for the catalytic activity and a pharmacological site responsible for the expression of the biological activity. The pharmacological site could be located at the surface of the PLA₂ molecule.

According to the model proposed by Kini and Evans (1987), the anticoagulant site should be located in the region between residues 53 and 76. This region is positively charged in the strong and negatively charged in the weak and in the non anticoagulant PLA₂. The anticoagulant region is placed in a distinct and separate region of the predicted neurotoxic and myotoxic sites.

Although, Corredano *et al.*, (1998) showed crystallographic studies of two PLA₂s. In which the presence of glutamic acid at position 53 is common in the strong anticoagulant PLA₂ and should be important to expression of anticoagulant activity.

MP-III 4R doesn't have the presence of E53 that changed to K53. This replacement will be considered an important contribution to the low anticoagulant activity.

MP-III 4R is a rare example of PLA₂ (class II) with phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities, which has determined its complete amino acid sequence.

MP-III 4R is a fraction that was capable of inducing necrosis of mouse skeletal muscle cells. It has detectable moderate PLA₂ activity, but strong myotoxicity. In this context, it induces a qualitatively similar myonecrotic picture

greatly similar to those produced by other Bothrops venoms, independent of their lacking or not PLA₂ activity (see, Gutiérrez and Lomonte, 1986). Some of these myotoxins does not reveal histological alterations of blood vessels or nerves after intra-muscular injection, suggesting that muscular lesion occurs through a direct effect in cell membrane (Gutiérrez *et al.*, 1984, 1991). The PLA₂ activity of MP-III 4R, though mild, probably contributes for membrane plasmatic destabilization resulting in a generalized increase in membrane permeability to macromolecules and ions. In skeletal muscle, the increase in calcium levels results in hypercontraction of the myofilaments, activation of calcium-dependent proteases and endogenous phospholipases which cause further cell damage (Gutiérrez *et al.*, 1984; Gutiérrez and Lomonte, 1995).

Probably, MP-III 4R PLA₂ plays important role in the *Bothrops pirajai* venom because it has multi-functionality. Different from PrTX-I and PrTX-II that act only in the myonecrosis process. MP-III 4R should have other mechanism of action different from other PLA₂ described to *Bothrops pirajai* (Bahia's jararacussu) and *Bothrops jararacussu* (jararacussu).

References

- Alvarado, J. and Gutiérrez, J. M. (1988). Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae) *Rev. Biol. Trop.* 36 (2B): 563 – 565.
- Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996) Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon* 34(8): 827-841.
- Brusés, J. L., Capaso, J., Katz, E. and Pilar, G. (1993) Specific *in vitro* biological activity of snake venom myotoxins. *J. Neurochem.* 60: 1030-1042.
- Carredano, E., Westerlund, B., Persson, B., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Eaker, D and Eklund., H. (1998). The three-dimensional structure of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. *Toxicon* 36 (1) : 75 – 92.
- Chang, L.-s., Kuo, K-w., Lin, S-r. and Chang , C-c. (1994). Functional involvement of Lys-6 in the enzymatic activity of phospholipase A₂ from *Bungarus multicinctus* (Taiwan Banded Krait) snake venom. *J. Protein Chem.*, 13(7): 641 – 648.
- Cho, W. and Kézdy, F.J. (1991) Chromogenic substrate and assay of phospholipase A₂. In: *Method in Enzymology* 197, pp: 75 –79. Academic Press Inc.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B. and Giglio, J.R. (1993). Bothropstoxin I: Amino acid sequence and function. *J. Protein. Chem.* 12(1):57-64
- Dennis, E.A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, 269(18): 13057 – 13060.
- Fleer, E. A. M., Verheij, H.M. and De Hass, G.H. (1978) The primary structure of bovine pancreatic phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.* 82: 261 – 269.
- Fletcher, J.E. and Jiang, M.S. (1995) Presynaptically-acting snake venom phospholipase A₂ enzyme attack unique substrate. *Toxicon* 33(12): 1565 – 1576.
- Francis, B. , Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. and Kaiser, I.I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 352 – 359.

- Gowda, V.T., Schmidt, J. and Middlebrock, J.L. (1994) Primary sequence determination of the most basic myonecrotic phospholipase A₂ from the venom of *Vipera russelli*. *Toxicon* 32(6): 665 – 675.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C. L. and Odell, G. V. (1984) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22: 115-128.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan* 51 (4): 211-223.
- Gutiérrez, J.M., Nuñez, J., Díaz, C., Cintra, A. C. O., Homsí-Brandeburgo, M. and Giglio, J. R. (1991) Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. molec. Path.* 55: 217-229.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33(11): 1405 – 1424.
- Holzer, M. and Mackessy, S. P. (1996). An Aqueous Endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 35: 1149 – 1155.
- Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972) Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc. Acad. Sci, USA* 69(12): 3506 – 3509.
- Kaiser, I.I., Gutiérrez, J.M., Plummer, D., Aird, S.D. and Odell, G.V. (1990). The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys.* 278(2): 319 – 325.
- Kini, R.M. and Evans, H.J. (1987) Structure – Function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 262 (30): 14402 – 14407.
- Kini, R.M. and Evans, H.J. (1989) A common cytolytic region in myotoxins, hemolysin, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 34: 277 – 286.
- Kini, R.M. and Iwanaga, S. (1986) Structure-function relationship of phospholipase. II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24(9): 295 – 905.
- Mancuso, L.C., Correa, M.M., Vieira, C.A, Cunha, O.A.B., Lachat, J.J., Selistre, H.S.A., Ownby, C.L. and Giglio, J.R. (1995). Fraction of *Bothrops pirajai*

- snake venom: Isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon*, 33, 615-626.
- Maraganore, J.M. and Henrikson, R.L. (1986) The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.* 261; 4797 – 4804.
- Marangoni, S., Toyama, M. H., Arantes, E.C., Giglio, J. R., da Silva, C.A., Carneiro, E. M., Gonçalves, A. A. and Oliveira, B. (1995) Amino acid sequence of TsTX-V, an α -toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of β -cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochem. Biophys. Acta* 1243; 309 – 314.
- Nakai, M., Nakashima, K.I., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Hattori, S., Chang, C.C. and Ohno, M. (1995) Purification and primary structure of a myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ with low lipolytic activity from *Trimeresurus gramineus* venom. *Toxicon* 33 (11): 1469 – 1478.
- Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K.I., Sasaki, H., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, Y. and Ohno, M. (1992) Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂ isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8557 – 8561.
- Ogawa, T., Nakashima, K-I., Nobushima, I., Deshimaru, M., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Sakaki, Y., Hattori, S. and Ohno, M. (1996). Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂ isozymes for acquisition of diverse physiological functions. *Toxicon* 34(11/12): 1229 – 1236.
- Pereira, M.E., Novello, J.C., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Landucci, E.T., Oliveira, B., and Marangoni, S. (1998) The amino acid sequence of Bothropstoxin-II, an Asp-49 Myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacussu) venom with low phospholipase A₂ activity. *J. Protein. Chem.* 17(4):381-386.
- Selistre de Araújo, H.S., White, S.P. and Ownby, C.L. (1996). Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of protein. *Toxicon* 34(11/12): 1237-1242.
- Shimohigashi, Y., Tani, A., Matsumoto, H., Nakashima, K-I., Yamaguchi, Y., Oda, N., Takano, Y., Kamiya, H., Kishino, J., Arita, H. and Ohno, M. (1995). Lysine-49 phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane acting enzymes. *J. Biochem.* 118: 1037 – 1044.

- Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homsí-Brandeburgo, Toyama, M.H., Lombard, F.R., Arni, A.K. and Giglio, J.R. (1998) A rapid procedure for the isolation of myotoxin II from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom: Biochemical characterization, myonecrotic activity and cristalization. *Toxicon*, 36 (in press)
- Toyama, M. H., Mancuso, L. C., Giglio, J.R., Novello, J.C., Oliveira B. and Marangoni, S., (1995) A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II: Two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: N-terminal. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37 (6): 1047 - 1055.
- Toyama, M.H. , Soares, A.M., Vieira, C.A., Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R. and Marangoni, S (1998). The amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* venom, and its biological activity after alkylation with *p*-Bromophenancyl bromide. *J. Protein Chem* (in press).

Legends of figures:

Figure 1. Chromatographic profile of purification of *Bothrops pirajai* whole venom by RP-HPLC on μ -Bondapack C18 semi-preparative column (7.8 X 300 mm). The purification of fraction were made using a linear gradient of Acetonitrile (Solvent B).

Figure 2. Chromatographic profile of purification of MP-III 4R performed on Protein Pack, SP 5PW cation exchange column. The elution of samples was performed using a linear gradient of concentration from 0.05M to 1.0 M ammonium bicarbonate.

Figure 3. Repurification of MP-III 4R performed on analytical RP-HPLC column (0.39 X 300 mm). The repurification were made using a linear gradient of concentration of Acetonitrile (Buffer B).

Figure 4. Chromatographic profile of purification of the peptides produced by digesting the RC-PrTX-II protein with protease V8 from *Staphilococcus aureus* V8. The RP-HPLC carried on μ -Bondapack C18 (0.39 X 30 cm) column using a discontinuous acetonitrile gradient, at constant flow rate of 1.0 ml/ min and the detection of peaks were made using an Absorbance at 220 nm.

Figure 5. Purification of peptides produced by digesting the RC-PrTX-II protein with clostripain.

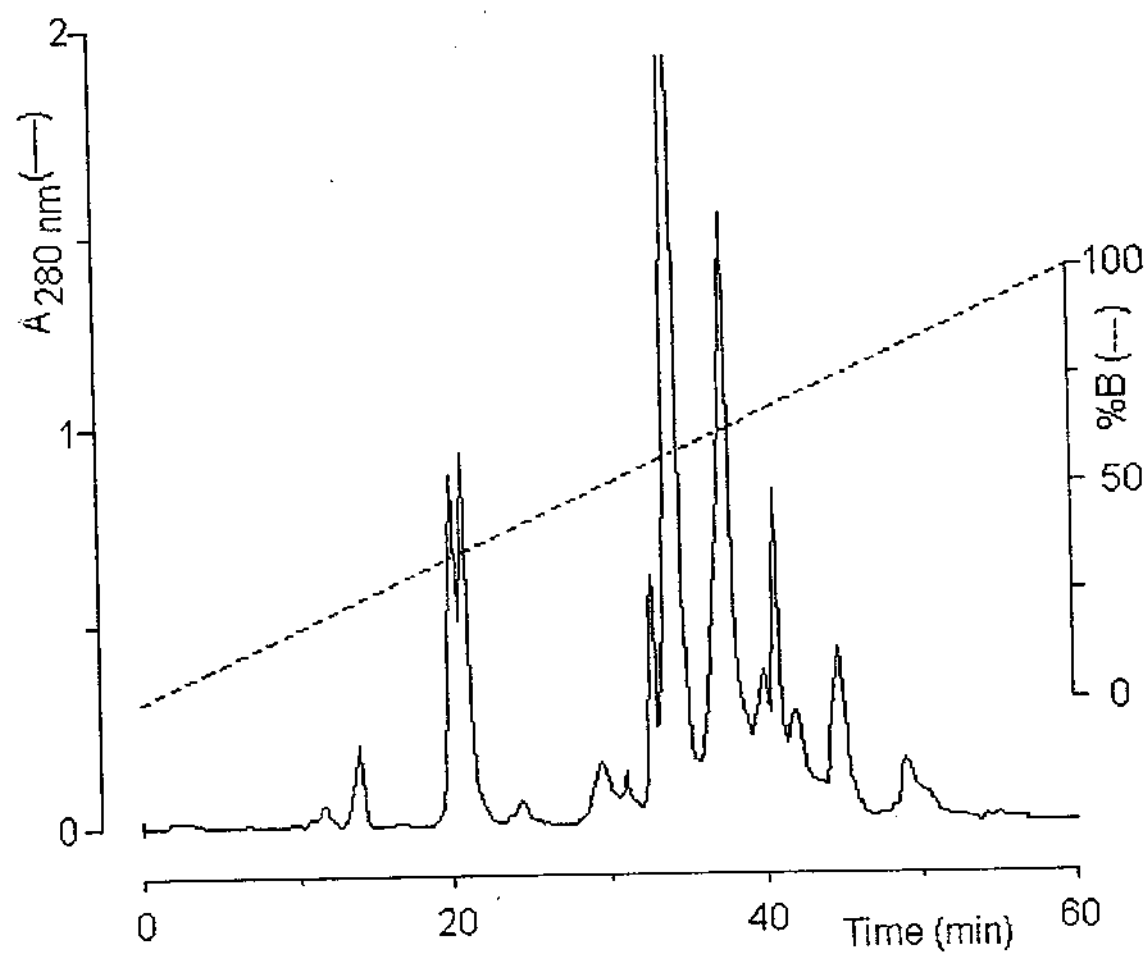
Figure 6. The primary structure of Lys-49 PLA₂-like MP-III 4R, showing the alignments of the peptides from the *Staphilococcus aureus* V8 protease (SV8) and from the clostripain (Clp) digest. The first 45 residues were directly sequenced.

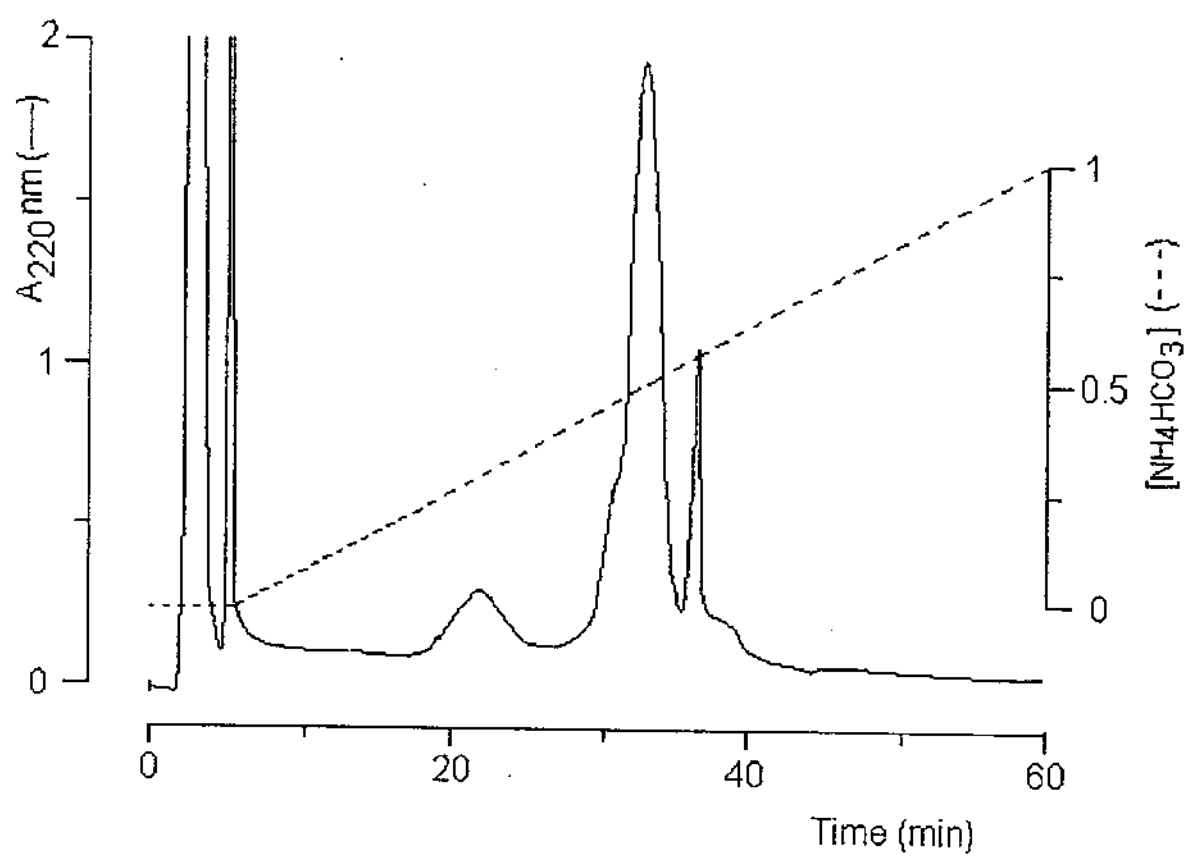
Figure 7. The amino acid alignment of MP-III 4R with other PLA₂. PrTX-I (Toyama *et al.*, 1998), BthTX-I (Cintra *et al.*, 1993), Myotoxin II (Francis *et al.*, 1991), App K-49 (Maraganore and Heirikson, 1986), T.g PLA₂-V (Nakai *et al.*,

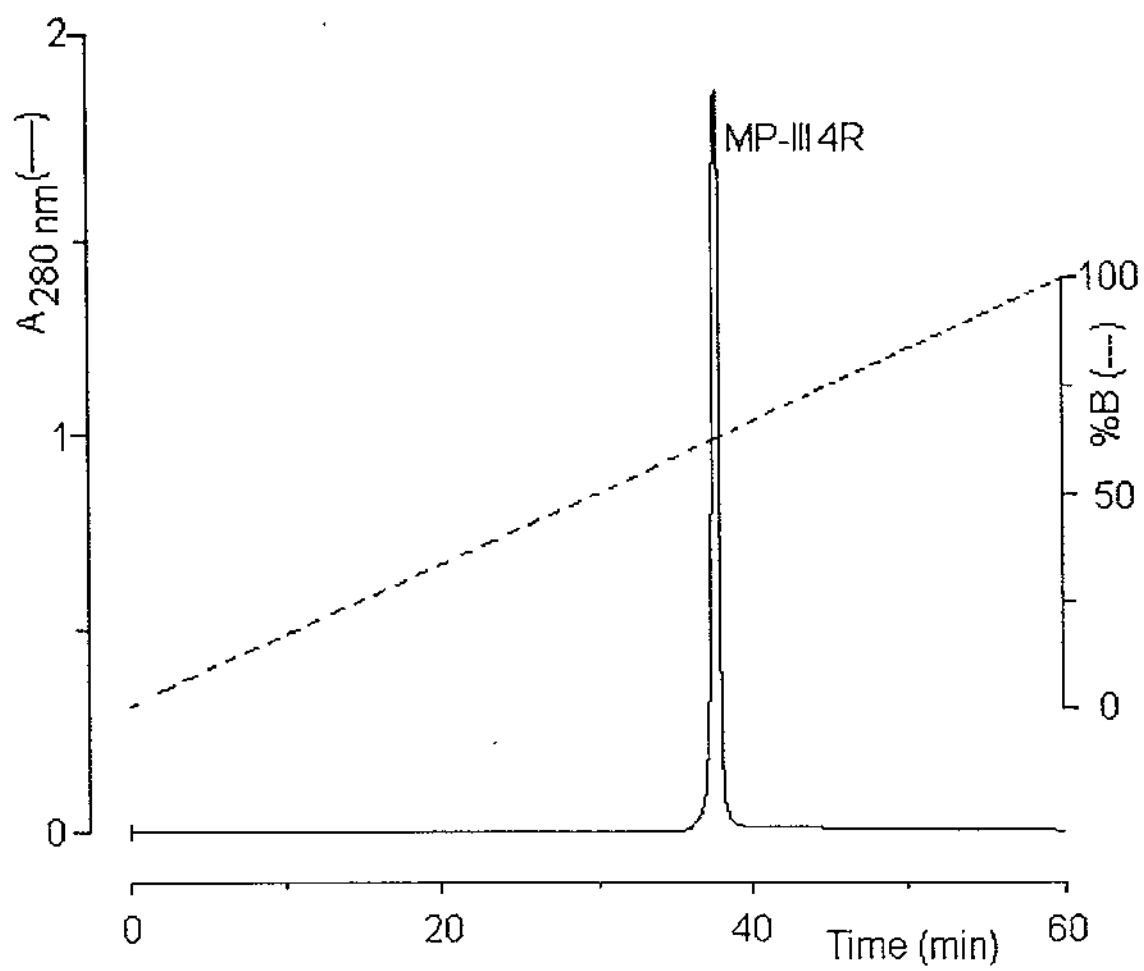
1995), BthTX-II (Pereira *et al.*, 1998), Myotoxin III (Kaiser *et al.*, 1990), VRV-PL-VIIIa (Gowda *et al.*, 1994), TFPLA₂P (Ogawa *et al.*, 1992) and Bp PLA₂ (Fleer *et al.*, 1978). The symbols ★ (L/F), ✱ (L/F), ⊗ (E/D) and ⊕ (K/P).

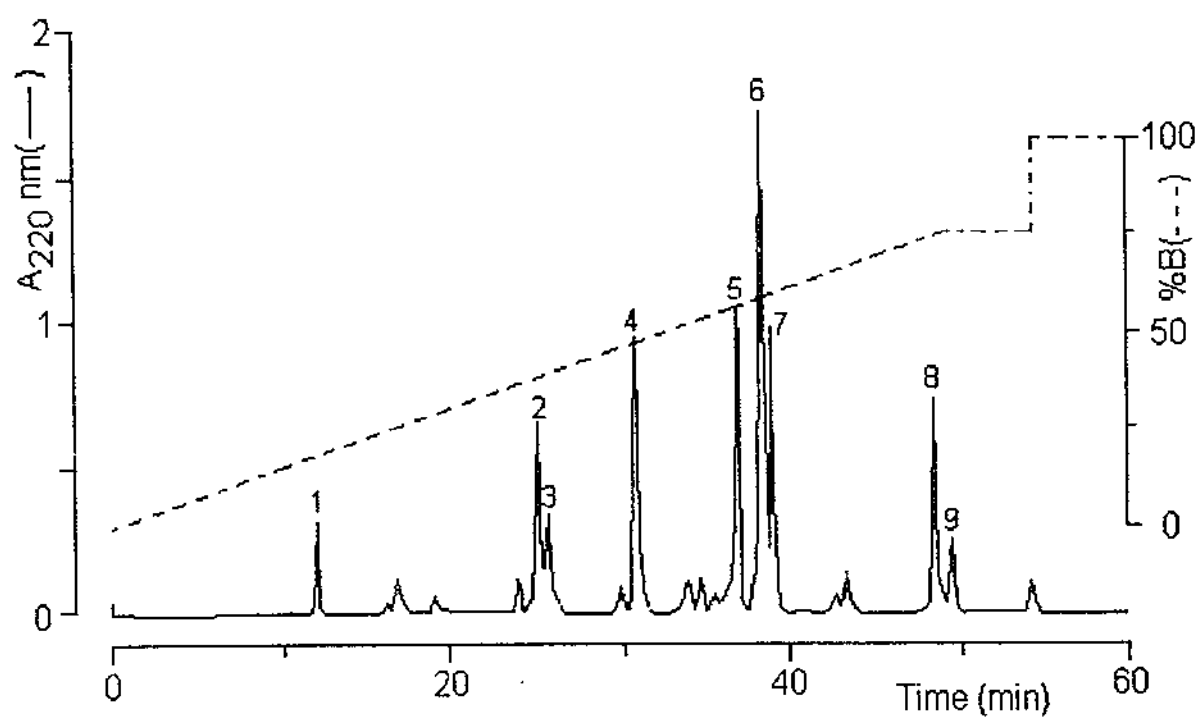
Figure 8. Light micrograph of skeletal muscle from a mouse after i.m. injection of MP-III 4R (1.3 µg/g)

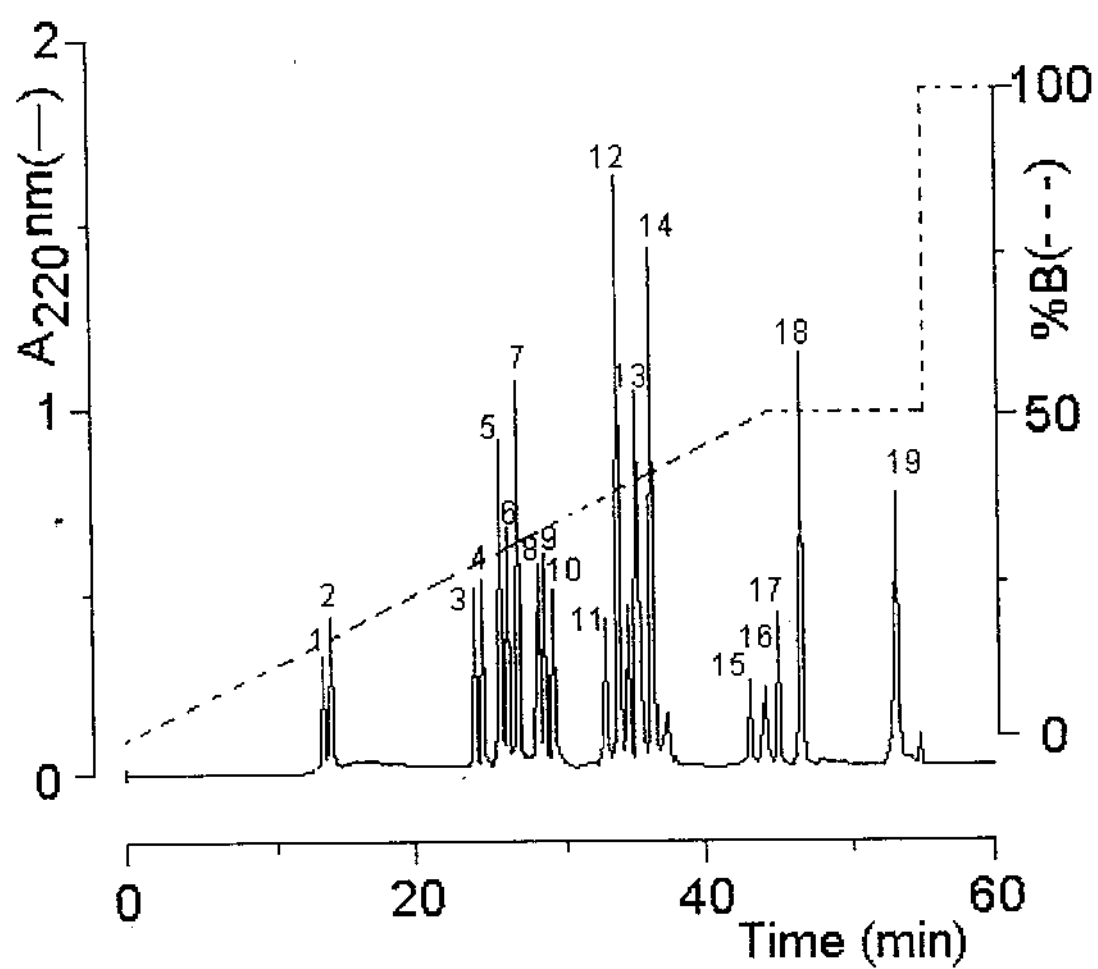
Control gastrocnemius injected with Tyrode solution. Longitudinal section of fibers with normal cross striation, peripheral nuclei and regular diameters. (B) Right gastrocnemius showing extensive myonecrosis 3h after injection of toxin. Note the necrotic cells characterized by total disorganization of myofibrils; the cells have lost striated appearance, showed hypercontracted areas (h) and tortuous clump of condensed myofibrils (arrowhead) intercalated among empty areas (e). Bars = 50 µm.











	1	10	20	30	40	50	60	70
PTX-III	DLWQGMILKETGKLPFPYTYGGCYCGVGGRRGLGTKDTRDCCVHDCCKKLTGCPKTDDRYSYSL							
PTX-I	SLEELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGP-KDATDRCCVHKKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWK							
PTX-II	SLEELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGP-KDATDRCCVHKKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWK							
BhTX-I	SLEELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGP-KDATDRCCVHKKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWK							
Myotoxin II	SLEELGKMILQETGKMTAKSYGAYGCNCGVLGRGP-KDATDRCCVHKKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWK							
App K49	SVLELGKMILQETGKNAITSYGSYGCNCGVHGRGP-KDATDRCCFVHKKCCYKKLTDCNHKTDRIYSYSWK							
T.g PLA ₂ -V	SVLELGKMIFQETGKNPATSYGLYGCNCGPGGRKP-KDATDRCCVHKKCCYKKLTDCDPIKDRYSYSWV							
BhTXII	DLWQGMILKETGKLPFPYTYTYGCYCGWGGGQGP-VDPTRDCCFVHDCCK-VTNCPPKNDRIYSYSRV							
Myotoxin III	SLIEFAKMILEETKRLFPYPYPYGCYCGWGGQGP-KDATDRCCFVHDCCKGKLSNCKPKTDRIYSYSRK							
VRV-PL-VIIIa	SLLEFGKMILEETGKLAIPSYSSYGCYCGWGGKGP-KDATDRCCFVHDCCKGNLPDCNPKSDRIYKYKRV							
TFPA2P2	HLMQFENMIKKVTGRSGIWWYGSYGCYCGKGGEGRP-QDPSDRCCFVHDCCKGKVNCGNPKKAVYIYSLE							

	80	90	100	110	120
PTX-III	DLTIVC-GEDDPC-KELCECDKAIAVCFRENLTGTYNKKYRYHLKP-C-KKADKPC				
PTX-I	DKTIVC-GENNPCLKECECDKAVAICLRENLTGTYNKLYRYHLKPF-C-KKADD-C				
PTX-II	DKTIVC-GENNPCLKECECDKAVAICLRENLTGTYNKKYRYHLKPF-C-KKADD-C				
BhTX-I	DKTIVC-GENNPCLKECECDKAVAICLRENLTGTYNKKYRYHLKPF-C-KKADP-C				
Myotoxin II	DKTIVC-GENNSCLKECECDKAVAICLRENLTGTYNKKYRYLYLKPF-C-KKADA-C				
App K49	NKAIIC-EENPCLKEMCECDKAVAICLRENLDTYNKKYKAYFKLKC-KKPDTC				
T.g PLA ₂ -V	NKAIIVC-GEDNPCLKEMCECDKAVAICFRENLDTYDKKKINLKLFC-KKTSEQC				
BhTX-II	SYNY-C-LGG-PCDKQICECDKAIAVCFRENLTGTYNKK-AVHLKPFCKEPAET-C				
Myotoxin III	SGVITC-GEETPCEKQICECDKAAAVCFRENLTGTYNKKRYMAYPD★LC-KKPA@@C				
VRV-PL-VIIIa	NGAIIVC-EKGTSCENRICECDKAAAI CFRQNLNTYSKKYMLYPDFLC-KGELK-C				
TFPA2P2	NGDIVC-GGDDPCLKEMCECDKAVAICFRENLDTYDKKKINLKLFC-KKTSEQC				

