

200402782

**Caroline Ribeiro de Borja Oliveira**

**AÇÃO NEUROTÓXICA DO VENENO DE *Bothrops  
neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) EM  
PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES ISOLADAS  
– PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E  
SEQÜÊNCIA DA PORÇÃO AMINO-TERMINAL DE  
DUAS PLA<sub>2</sub> NEUROTÓXICAS PRÉ-SINÁPTICAS,  
NEUWIEDITOXINAS-I E II**

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,  
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -  
UNICAMP, para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia da  
Farmacêutica – Caroline Ribeiro de Borja Oliveira.*

*Campinas, 03 de dezembro de 2002.*

*Prof. Dr. Léa Rodrigues Simioni  
- Orientadora -*

**Campinas**

**UNICAMP – 2002**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

---

*Caroline Ribeiro de Borja Oliveira*

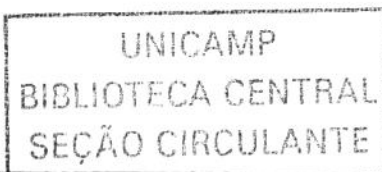
**AÇÃO NEUROTÓXICA DO VENENO DE *Bothrops  
neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) EM  
PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES ISOLADAS  
– PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E  
SEQÜÊNCIA DA PORÇÃO AMINO-TERMINAL DE  
DUAS PLA<sub>2</sub> NEUROTÓXICAS PRÉ-SINÁPTICAS:  
NEUWIEDITOXINAS-I E II**

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

**Orientação: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni**

**Campinas**

**UNICAMP - 2002**



|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | BC                                  |
| Nº CHAMADA | T/UNICAMP                           |
|            | OL4a                                |
| V          | EX                                  |
| TOMADO BC/ | 56994                               |
| PROC.      | 16-P-117104                         |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | R\$ 11,00                           |
| DATA       |                                     |
| Nº CPD     |                                     |

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

CM00193828-0

BIB ID 310649

OL4a

Oliveira, Caroline Ribeiro de Borja

Ação neurotóxica do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) em preparações neuromusculares isoladas – purificação, caracterização parcial e seqüência da porção amino-terminal de duas pla2 neurotóxicas pré-sinápticas, newieditoxinas – I e II / Caroline Ribeiro de Borja Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Lea Rodrigues Simioni

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

1. Junção neuromuscular. 2. Fosfolipase A2. 3.  
\*Neurotoxicologia. 4. \*Cobras. 5. Bioquímica. .I. Lea Rodrigues  
Simioni. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.



---

## **Banca Examinadora da Tese de Doutorado**

---

---

### **Orientador:**

**Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni**

---

---

### **Membros:**

---

**Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni**

---

**Prof. Dr. Marcos Dias Fontana**

---

**Prof. Dr. Antonio Carlos de Oliveira**

---

**Prof. Dr. Stephen Hyslop**

---

**Profa. Dra. Maria de Fatima Domingues Furtado**

---

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

---

**Data: 03/12/02**

---



**À minha mãe, Celina**, a maior responsável pela minha conduta de busca constante do conhecimento, torcedora incansável.

**Ao meu pai, Edson**, que, em vida, tornou-se o eterno exemplo de integridade presente para sempre no meu coração.

**À minha irmã, Pauline**, confidente e amiga de todas as horas, razão para que eu considere um irmão fundamental na vida de todos nós.

**A meus sogros, Alcebiades e Arlene**, preciosa família adquirida após a minha maturidade, sempre tão carinhosos, atenciosos e prestativos.

**A meu marido, Alberto**, amor da minha vida, companheiro, confidente, cúmplice, minha outra metade, incansável incentivador e colaborador.

**Às minhas filhas, Camila e Isabela** (ainda no meu ventre), razões maiores do meu empenho, justificativas para todos os sacrifícios, sentido da minha vida.

Senhor,

Agradeço pela tua luz, sempre presente em minha vida, por ter me conduzido pelo caminho da paz, do bem e do amor, por ter me presenteado com uma família maravilhosa e com amigos preciosos, razões da minha inspiração e da força para continuar sempre, por ter me dado saúde suficiente para realizar meu trabalho e por ter, em Tua infinita sabedoria, direcionado minha vida, mesmo quando eu, cega pela minha limitada visão e apressada pela ansiedade humana, questionava sua vontade. Hoje, entendo que a melhor colheita pode estar mais à frente, fora do alcance dos meus olhos, mas que nada foge do alcance dos Seus.

À minha orientadora, Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni,

Que abriu generosamente as portas do seu laboratório, permitindo que eu entrasse em contato com a ciência e entendesse a produção do conhecimento, acolhendo minhas dúvidas, minha insegurança, pacientemente aceitando meus fracassos, meus limites, respeitando o tempo necessário para o meu crescimento, para o amadurecimento científico, aplaudindo meus êxitos, aplausos esses tão sonoros ao meu coração. Agradeço do fundo desse mesmo coração por tanto carinho, atenção e confiança. Espero ter feito jus a pelo menos um pouquinho dessa confiança. Fica aqui registrado todo o meu carinho, respeito e admiração. Nunca poderei agradecer por tudo que recebi, porém agradeço a Deus todos os dias por ter batido em sua porta e peço que Ele lhe retribua, pois somente Ele será capaz de retribuir por uma relação que transformou a minha vida, que fez com que eu encontrasse meu caminho, descobrindo a minha vocação. Muito obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi, pelo incentivo sempre repleto de simpatia, pelo intenso carinho, pelo sorriso acolhedor e pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pela já conhecida alegria contagiante, pela agradável convivência e pelas valiosas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela expressiva e indispensável colaboração em todas as etapas deste trabalho e pela infinita disposição.

Ao Prof. Dr. Nadim Farah Heluany Sobrinho, por todo carinho, atenção, amizade, pela agradável presença e pelos ensinamentos.

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

Aos nossos colaboradores Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, Prof. Dr. José Roberto Giglio e Prof. Dr. Sérgio Marangoni, parceiros fundamentais na concretização dos ensaios bioquímicos.

A Gildo Bernardo Leite, sempre tão atencioso e prestativo, não só pelo apoio técnico e pelos inúmeros favores, mas principalmente pela amizade sincera e pelos sábios conselhos dos quais necessitei tantas vezes.

A Yoko Oshima Franco, meu anjinho-da-guarda, amiguinha virtual e real, a quem tanto recorri em todos os momentos, de quem tanto precisei. Fonte inspiradora. Quanta paciência... Você é o meu diário.

A André Marchi Durigon, irmão de coração, tão participante no meu crescimento científico. Foi muito produtiva a nossa parceria e eterna é a nossa amizade.

A Cháriston André Dal Belo, exemplo de perseverança e dedicação, amigo de todas as horas. Entre tantas qualidades, a sua generosidade e seriedade no trabalho fazem com que eu tenha orgulho de ser sua amiga. E obrigada pelos conselhos!

A Sara Castro Hernandez, amiguinha acolhedora, sua presença me faz tanto bem. Obrigada por tanto carinho, tanta meiguice, tanta solidariedade.

Aos amigos do laboratório, Daniela, Valdemir, Rosany, Ludmila, Daniel, Ricardo, pela agradável companhia, simpatia e colaboração.

A Gislaine, Wanderley, Hélio, Juliana, sempre tão prestativos e atenciosos, e todos os demais funcionários do Departamento de Farmacologia, pela agradável convivência, paciência e expressiva prestação de serviços burocráticos.

Ao Apoio Didático, pela atenção e ótimos serviços prestados.

À Fapesp e à Capes, pelo imprescindível suporte financeiro.

---

## Sumário

|                                                                                                        |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Resumo .....</b>                                                                                    | <b>xix</b>  |
| <b>Abstract .....</b>                                                                                  | <b>xxii</b> |
| <br>                                                                                                   |             |
| <b>1. Introdução .....</b>                                                                             | <b>26</b>   |
| 1.1. As serpentes venenosas brasileiras .....                                                          | 27          |
| 1.2. O veneno botrópico .....                                                                          | 27          |
| 1.3. Fosfolipases A <sub>2</sub> .....                                                                 | 35          |
| 1.4. <i>Bothrops neuwiedi</i> – Ação miotóxica e neurotóxica.....                                      | 46          |
| <br>                                                                                                   |             |
| <b>2. Objetivos .....</b>                                                                              | <b>49</b>   |
| <br>                                                                                                   |             |
| <b>3. Materiais e Métodos .....</b>                                                                    | <b>51</b>   |
| 3.1. Veneno .....                                                                                      | 52          |
| 3.2. Animais .....                                                                                     | 52          |
| 3.3. Ensaio biológico .....                                                                            | 52          |
| 3.4. Ensaio bioquímico .....                                                                           | 55          |
| 3.5. Análise estatística .....                                                                         | 58          |
| <br>                                                                                                   |             |
| <b>4. Resultados .....</b>                                                                             | <b>59</b>   |
| 4.1. Estudo miográfico do veneno total .....                                                           | 60          |
| 4.2. Estudo bioquímico do veneno total .....                                                           | 73          |
| 4.3. Estudo miográfico das frações parcialmente purificadas .....                                      | 75          |
| 4.4. Estudo bioquímico e miográfico dos polipeptídeos purificados .....                                | 83          |
| <br>                                                                                                   |             |
| <b>5. Discussão .....</b>                                                                              | <b>94</b>   |
| 5.1. Evidências da ação neurotóxica e miotóxica do veneno de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> ..... | 95          |
| 5.2. Fracionamento do veneno e purificação das frações farmacologicamente ativas .....                 | 97          |

---

|                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3. Determinação da estrutura primária da porção amino-terminal das toxinas neurotóxicas pré-sinápticas purificadas do veneno de <i>B. n. pauloensis</i> ..... | 99  |
| 5.4. Proposta de classificação baseada na estrutura e na atividade das NeuTXs-I e II .....                                                                      | 103 |
| <b>6. Conclusão</b> .....                                                                                                                                       | 111 |
| <b>7. Referências Bibliográficas</b> .....                                                                                                                      | 114 |

---

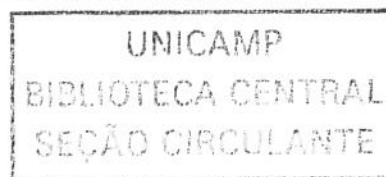
## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |                                          |
|------------------|------------------------------------------|
| ACh              | Acetilcolina                             |
| d-Tc             | d-tubocurarina                           |
| HPLC             | High Performance Liquid Chromatography   |
| PPTM             | Potencial de Placa Terminal em Miniatura |
| NeuTX-I          | Neuwietoxina-I                           |
| NeuTX-II         | Neuwietoxina-II                          |
| NeuTXs           | Neuwietoxinas                            |
| PLA <sub>2</sub> | Fosfolipase(s) A <sub>2</sub>            |
| TFA              | Ácido trifluoracético                    |

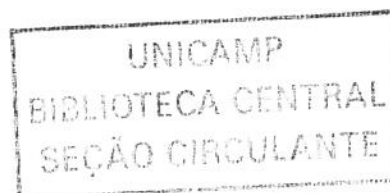


## LISTA DE FIGURAS

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Sequência de aminoácidos (A) da erabutoxina b, uma neurotoxina pós-sináptica isolada do veneno da serpente marinha <i>Laticauda semifaciata</i> .....                                                                                                                                                                  | 34 |
| 1.2 | Sítios de ação das fosfolipases.....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 36 |
| 1.3 | Reação catalisada pela fosfolipase A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ).....                                                                                                                                                                                                                                             | 36 |
| 1.4 | Classificação das PLA <sub>2</sub> .....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 38 |
| 1.5 | Serpentes peçonhentas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 40 |
| 4.1 | Efeito do veneno bruto de <i>B. n. pauloensis</i> sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, em baixas concentrações (1, 5 and 10 µg/ml), à 37°C.....                                                                                                                | 63 |
| 4.2 | Efeito do veneno bruto de <i>B. n. pauloensis</i> sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, em altas concentrações (50 e 100 µg/ml), à 37°C.....                                                                                                                    | 64 |
| 4.3 | Efeito do veneno bruto de <i>B. n. pauloensis</i> sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 20-24°C.....                                                                                                                                                          | 65 |
| 4.4 | Efeito do veneno de <i>B. n. pauloensis</i> sobre as respostas aos agonistas acetilcolina (ACh, 110 µM) e KCl (13.4 mM) em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, após 120 min de incubação (média ± S.E.M. de 3-6 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle, 100%)..... | 66 |
| 4.5 | Efeito do veneno de <i>B. n. pauloensis</i> em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica direta.....                                                                                                                                                                                  | 66 |
| 4.6 | Efeito do veneno bruto de <i>B. n. pauloensis</i> sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C.....                                                                                                                                                             | 69 |
| 4.7 | Registro do efeito do veneno bruto de <i>B. n. pauloensis</i> sobre o nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C.....                                                                                                                                                            | 70 |



|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.8  | Comparação do efeito do veneno bruto de <i>B. n. pauloensis</i> sobre preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C, na presença e na ausência de $\text{Ca}^{2+}$ .....                                                                                                                 | 71 |
| 4.9  | Efeito do veneno de <i>B. n. pauloensis</i> em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica direta.....                                                                                                                                                                                                  | 72 |
| 4.10 | Cromatografia do veneno de <i>B. n. pauloensis</i> por HPLC de exclusão molecular.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 74 |
| 4.11 | Efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C.                                                                                                                                                                                       | 76 |
| 4.12 | Registro do efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C .....                                                                                                                                                                      | 77 |
| 4.13 | Efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 20-24°C.....                                                                                                                                                                                | 78 |
| 4.14 | Efeito das frações parcialmente purificadas sobre as respostas aos agonistas acetilcolina (ACh, 110 $\mu\text{M}$ ) e KCl (13.4 mM) em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, após 120 min de incubação (média $\pm$ S.E.M. de 3-4 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle, 100%)..... | 79 |
| 4.15 | Efeito das preparações parcialmente purificadas sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C.....                                                                                                                                                                               | 81 |
| 4.16 | Registro do efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C .....                                                                                                                                                                      | 82 |
| 4.17 | Cromatografia do veneno de <i>B. n. pauloensis</i> por HPLC de fase reversa. Somente as frações correspondentes ao picos b e c, provenientes do pico 3, reproduziram a ação bloqueadora neuromuscular do veneno total.....                                                                                                             | 84 |



---

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>4.18</b> | Eletroforese em PAGE-SDS-Tricina das frações ativas, neuwieditoxina I (NeuTX-I) e neuwieditoxina-II (NeuTX-II), antes (-DTT) e após (+DTT) a redução por ditioneitol (DTT).....                                                                                                                                                           | 84 |
| <b>4.19</b> | Efeito das neuwieditoxinas I e II sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C.....                                                                                                                                                                                                | 85 |
| <b>4.20</b> | Comparação do efeito das neuwieditoxinas I e II sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C, com o efeito do veneno total, na mesma concentração.....                                                                                                                             | 86 |
| <b>4.21</b> | Efeito das neuwieditoxinas I (NeuTX-I) e II (NeuTX-II) sobre as respostas aos agonistas acetilcolina (ACh, 110 µM) e KCl (13,4 mM) em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, à 37°C, após 120 min de incubação (média ± S.E.M. de 3-4 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle, 100%)..... | 87 |
| <b>4.22</b> | Seqüências das porções amino-terminal das neuwieditoxinas I e II.....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 88 |
| <b>4.23</b> | Lista de abreviações de aminoácidos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 88 |
| <b>4.24</b> | Alinhamento da neuwieditoxina-I (NeuTX-I) com β-neurotoxinas por ordem de homologia (H%).....                                                                                                                                                                                                                                             | 90 |
| <b>4.25</b> | Alinhamento da neuwieditoxina-II (NeuTX-II) com β-neurotoxinas por ordem de homologia (H%).....                                                                                                                                                                                                                                           | 91 |
| <b>4.26</b> | Alinhamento da neuwieditoxina-I (NeuTX-I) com miotoxinas PLA <sub>2</sub> por ordem de homologia (H%).....                                                                                                                                                                                                                                | 92 |
| <b>4.27</b> | Alinhamento da neuwieditoxina-II (NeuTX-II) com miotoxinas PLA <sub>2</sub> por ordem de homologia (H%).....                                                                                                                                                                                                                              | 93 |

---

## LISTA DE TABELAS

|     |                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Efeitos farmacológicos das PLA <sub>2</sub> isoladas de venenos de serpentes.....                                                                                                                                                                    | 37 |
| 1.2 | Estrutura molecular das $\beta$ -neurotoxinas.....                                                                                                                                                                                                   | 43 |
| 1.3 | PLA <sub>2</sub> miotóxicas isoladas de venenos botrópicos.....                                                                                                                                                                                      | 45 |
| 4.1 | Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, incubada com o veneno bruto.....                                                     | 62 |
| 4.2 | Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, incubada com o veneno bruto.....                                                     | 69 |
| 4.3 | Atividade PLA <sub>2</sub> do veneno total e das frações parcialmente purificadas.                                                                                                                                                                   | 74 |
| 4.4 | Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, incubada com as frações parcialmente purificadas por HPLC de exclusão molecular..... | 76 |
| 4.5 | Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, incubada com as neuwieditoxinas I e II.....                                          | 86 |

## *Resumo*

Os efeitos neuromusculares do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram estudados através de preparações *biventer cervicis* de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo.

Em preparação de ave, o veneno produziu bloqueio irreversível e dependente da concentração das contrações musculares em resposta à estimulação elétrica indireta. Com 1-20  $\mu\text{g}$  de veneno/ml, as respostas ao KCl (13,4 mM) foram parcialmente ou completamente inibidas, enquanto que as respostas à ACh (110  $\mu\text{M}$ ) não foram afetadas. Com 50  $\mu\text{g}$ /ml, as respostas à ACh, ao KCl e à estimulação direta foram inibidas. O veneno induziu também contraturas dependentes da concentração a partir de 10  $\mu\text{g}$ /ml. À 20-24°C, o veneno (50  $\mu\text{g}$ /ml) produziu somente um bloqueio parcial ( $30,7 \pm 8,0\%$ , média  $\pm$  SEM;  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ) após 120 min sem afetar as respostas à ACh e ao KCl.

Em preparação de camundongo, 50  $\mu\text{g}$  de veneno/ml causaram bloqueio total das respostas à estimulação indireta e direta, e, quando o  $\text{Ca}^{2+}$  (1,8 mM) da solução nutritiva foi substituído pelo  $\text{Sr}^{2+}$  (4,0 mM), somente um bloqueio parcial da resposta à estimulação indireta foi obtido ( $40,3 \pm 7,8\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ) após 120 min de incubação.

Estes resultados indicam que o veneno de *B. n. pauloensis* é neurotóxico, atua preferencialmente em sítios pré-sinápticos, e que sua atividade farmacológica está relacionada a sua atividade enzimática.

O veneno foi fracionado por HPLC de exclusão molecular e sua atividade neuromuscular foi recuperada no primeiro, segundo e terceiro picos (pico 1, pico 2 e pico 3, respectivamente) do perfil cromatográfico. Em preparação de pintainho,

somente o pico 3 (10 µg/ml;  $n = 4$ ) causou bloqueio total das contrações musculares indiretamente evocadas sem inibir as respostas à ACh (110 µM) e ao KCl (13,4 mM). O pico 2 (10 µg/ml;  $n = 4$ ) também causou bloqueio total das contrações, não interferiu na resposta à ACh, porém aboliu a resposta ao KCl. Os picos 2 e 3 apresentaram atividade PLA<sub>2</sub> e o seu efeito bloqueador neuromuscular mostrou-se dependente da temperatura.

Os picos 2 e 3 foram fracionados por HPLC de fase reversa. Somente o segundo (pico b) e o terceiro (pico c) do perfil de eluição do pico 3, denominados neuwieditoxina-II (NeuTX-II) e neuwieditoxina-I (NeuTX-I), respectivamente, reproduziram a atividade neuromuscular do veneno total. Antes e após o ditioneitol (DTT), ambas as toxinas apresentaram 30 kDa e 15 kDa, respectivamente. A NeuTX-I e a NeuTX-II apresentaram, respectivamente, as seguintes seqüências amino-terminais: DLVQFGQMILKVAGRSLPKSYGAYGCYCGWGGRGK... e SLFEFAKMILEETKRLPFPYYGAYGCYCGWGQGQPKDAT...

O fato de a NeuTX-I possuir Gln-4, Phe-5 e Tyr-28, e a NeuTX-II possuir Phe-5 e Tyr-28, resíduos de aminoácidos conservados em todas as toxinas PLA<sub>2</sub> Asp-49 purificadas até hoje e, também, a sua alta identidade seqüencial com essas toxinas PLA<sub>2</sub> Asp-49, sugerem fortemente que as NeuTXs-I e II são também PLA<sub>2</sub> Asp-49. Além disso, as NeuTXs-I e II parecem ser os principais componentes responsáveis pela ação neurotóxica pré-sináptica do veneno de *B. n. pauloensis* e sugere-se que seus efeitos farmacológicos dependem de atividade PLA<sub>2</sub>.

## *Abstract*



Snakes of the genus *Bothrops* are the most important cause of snakebites in Brazil. The main complications in lethal cases are acute renal failure, shock, acute respiratory failure and sepsis. The neuromuscular effects of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) venom were studied in chick biventer cervicis and mouse phrenic nerve-diaphragm preparations.

In chick preparations, venom concentrations of 5-50 µg/ml produced an initial inhibition and a secondary augmentation of the twitches evoked indirectly followed by a progressive concentration-dependent and irreversible neuromuscular blockade. At venom concentrations of 1-20 µg/ml, the responses to KCl (13.4 mM) were partially or completely inhibited whereas those to acetylcholine (110 µM) were unaffected. At venom concentrations higher than 50 µg/ml, there was pronounced muscle contracture with inhibition of the responses to acetylcholine, KCl and direct stimulation. At 20-24°C, the venom (50 µg/ml) produced only partial neuromuscular blockade ( $30.7 \pm 8.0\%$  blockade, mean  $\pm$  SEM;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ) after 120 min and the initial inhibition and the secondary augmentation of the twitch responses caused by the venom were prolonged and pronounced and the response to KCl was unaltered.

In mouse preparation, At 20 µg/ml, the venom irreversibly inhibited ( $60 \pm 10\%$  inhibition, mean  $\pm$  SEM;  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ) indirectly evoked twitches. At 50 µg/ml, the venom blocked the indirectly ( $n = 5$ ) and directly ( $n = 6$ ) evoked twitches in mouse hemidiaphragms. In the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , at 50 µg/ml, only partial blockade ( $40.3 \pm 7.8\%$  inhibition;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ) was observed after a 120 min incubation.

These results indicated that *B. n. pauloensis* venom was neurotoxic, acting primarily at presynaptic sites, and that enzymatic activity could be involved in that pharmacological action.

The venom was fractionated by HPLC molecular exclusion (Protein Pack 300SW column). The neuromuscular activity of the venom was recovered in the first, second and third peaks (peak 1, peak 2 and peak 3, respectively) of the elution profile. Only the peak 3 was able to induce complete blockade (10 µg/ml;  $n = 3$ ) without inhibiting the responses to acetylcholine (110 µM) and KCl (13.4 mM). Peak 2 and peak 3 had PLA<sub>2</sub> activity and their neuromuscular blocking effect was temperature-dependent. Peak 1 and peak 2 blocked KCl-induced contractures. Peak 2 and peak 3 were fractionated by reverse phase HPLC (C-18 µ-Bondapak column). Only the second (peak b) and third (peak c) peaks from elution profile of peak 2, namely neuwieditoxin-II (NeuTX-II) and neuwieditoxin-I (NeuTX-I), respectively, reproduced the neuromuscular blocking action of venom. Tricine SDS-PAGE in the absence or presence of dithiothreitol (DTT) showed that both toxins had a molecular mass of 30 kDa and 15 kDa, respectively. The N-terminal sequence DLVQFGQMILKVAGRSLPKSYGAYGCYCGWGGRGK... of NeuTX-I showed 66% homology to the Asp49 PLA<sub>2</sub> myotoxin bothropstoxin-II, from *B. jaracussu* venom, and 54% homology with the presynaptic PLA<sub>2</sub> caudoxin, from *Bitis caudalis* venom, and taipoxin (α-subunit), from *Oxyuranus scutellatus* venom. The N-terminal sequence SLFEFAKMILEETKRLPFPYYGAYGCYCGWGQGQPKDAT... of NeuTX-II showed 92% homology to the Asp49 PLA<sub>2</sub> myotoxin Basp-III, from *B. asper*

venom, and 61% homology with the presynaptic PLA<sub>2</sub> crotoxin (basic subunit), from *Crotalus durissus terrificus* venom, trimucrotoxin, from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom, and ammodytoxin, from *Vipera ammodytes ammodytes* venom.

The fact that NeuTX-I have Gln-4, Phe-5 and Tyr-28, and NeuTX-II have Phe-5 and Tyr-28, amino acid residues conserved in all Asp49 PLA<sub>2</sub> variants purified so far, and that its amino acid sequences was similar to Asp49 PLA<sub>2</sub> strongly suggests that NeuTXs-I and II are Asp49 PLA<sub>2</sub>. In addition, NeuTXs-I and II may be the main components responsible for the neuromuscular blocking action of *B. n. pauloensis* venom and their pharmacological effects may depend on phospholipase A<sub>2</sub> activity. Based on our findings, the new toxins, NeuTXs-I e II, appear to belong to two class of PLA<sub>2</sub> toxins: (1) group II, which include those isolated from viperinae and crotalinae snake venoms; (2)  $\beta$ -neurotoxins group, which include presynaptic neurotoxic PLA<sub>2</sub> which have enzymatic activity.

## *1. INTRODUÇÃO*

### 1.1. As serpentes venenosas brasileiras

São encontradas no Brasil aproximadamente duzentos e cinquenta espécies de serpentes distribuídas em nove famílias, das quais somente duas englobam os quatro gêneros peçonhentos:

- (a) família Elapidae, da qual ocorre no país somente o gênero *Micrurus*, cujas serpentes são conhecidas como corais;
- (b) família Viperidae, subfamília Crotalinae, que inclui os gêneros peçonhentos *Bothrops*, as jararacas, *Crotalus*, as cascavéis, e *Lachesis*, as surucucus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Em pesquisa recente realizada pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), dentre os casos em que o gênero da serpente foi informado, as serpentes do gênero *Bothrops* foram responsáveis por 90,5% dos casos de acidente ofídico.

### 1.2. O veneno botrópico

Pela alta incidência do acidente por *Bothrops*, este gênero, cujas serpentes são encontradas em todo o território nacional, destaca-se entre os quatro citados. O veneno botrópico possui três atividades fisiopatológicas principais: proteolítica, coagulante e hemorrágica. A atividade proteolítica do veneno botrópico é induzida por certas substâncias presentes nesse veneno, como proteases, fosfolipases A<sub>2</sub> e hialuronidases, que causam lesão tecidual direta e conduzem à liberação de

mediadores da resposta inflamatória, como histamina e bradicinina, que aumentam a permeabilidade vascular e levam à formação de edema pelo extravasamento do conteúdo plasmático. E, de forma indireta, as ações coagulante e hemorrágica do veneno botrópico contribuem para a evolução do processo inflamatório, pois, enquanto a formação de trombos na microcirculação provoca hipóxia e conseqüente necrose tecidual, as hemorraginas presentes no veneno lesam o endotélio vascular, contribuindo para o extravasamento de líquidos no local da picada. As hemorraginas causam, inclusive, hemorragia à distância. Os responsáveis pela ação coagulante do veneno são componentes que atuam sobre os fatores de coagulação, ativando o fator X e a protrombina, estimulando assim a formação de trombina e, conseqüentemente, a formação de fibrina, ou atuando diretamente sobre o fibrinogênio. O consumo de fibrinogênio promovido pelo veneno provoca ainda um estado de incoagulabilidade sangüínea que intensifica as manifestações hemorrágicas produzidas pelas hemorraginas (SCHVARTSMAN, 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001)

Insuficiência renal aguda, choque, septicemia e insuficiência respiratória têm sido apontadas como as principais causas de morte nesses acidentes (AMARAL et al., 1986; RIBEIRO et al., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Entre os quatro gêneros peçonhentos encontrados no Brasil, somente *Crotalus* e *Micrurus* são conhecidos por interferir clinicamente na transmissão neuromuscular, produzindo paralisia da musculatura periférica. No caso dos acidentes por *Micrurus*, que são considerados sempre graves pelo alto risco de insuficiência respiratória, o tratamento baseia-se, entre outras medidas (como soroterapia e administração de anticolinesterásicos), em assistência ventilatória adequada

(VITAL BRAZIL and VIEIRA, 1996; PINHO e PEREIRA, 2001). Como os venenos botrópicos não produzem sinais aparentes de neurotoxicidade após o envenenamento, a insuficiência respiratória observada em alguns casos foi atribuída a edema pulmonar agudo (RIBEIRO et al., 1998). Entretanto, estudos têm demonstrado que a peçonha de *Bothrops* pode apresentar efeitos específicos sobre preparações neuromusculares isoladas, induzindo bloqueio da resposta muscular evocada, ou ainda produzir sinais de neurotoxicidade em pintainhos *in vivo*, como será demonstrado a seguir.

#### 1.2.1. Bothropstoxina – Ação específica sobre o músculo esquelético

Estes efeitos passaram a ser descritos a partir do estudo do veneno de *Bothrops jararacussu* em preparações neuromusculares de rã (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983), no qual os autores observaram que o veneno inibia as contrações musculares evocadas direta e indiretamente e abolia o potencial de ação composto do nervo e do músculo. Após o fracionamento do veneno, estas atividades foram reproduzidas por uma subfração, denominada Pool IV, composta de dois polipeptídios com um peso molecular de aproximadamente 14.000 cada, que continha 30% do conteúdo protéico do veneno total. A fração ativa apresentava baixos níveis de atividade fosfolipásica, era desprovida de atividade proteolítica e induzia um rápido e pronunciado efeito despolarizante. Este último foi considerado o responsável pelo bloqueio do potencial de ação composto. Estudos morfológicos demonstraram que, após a incubação com Pool IV, algumas fibras musculares esqueléticas apresentavam-se intensamente lesadas, enquanto

o terminal nervoso permanecia intacto. Mais tarde, o Pool IV foi purificado (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988) e caracterizado como uma miotoxina, a bothropstoxina-I (BthTX-I), uma fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) homóloga, o componente responsável pela atividade miotóxica do veneno bruto.

Miotoxinas são componentes de venenos que atuam especificamente sobre o músculo esquelético, preservando outras estruturas, como o tecido conjuntivo e o nervo (MEBS e OWNBY, 1990). Embora todas as miotoxinas dos venenos de *Bothrops* possuam estrutura de PLA<sub>2</sub>, algumas delas não apresentam atividade catalítica devido a substituições de aminoácidos no local de ligação do cálcio, especialmente do Asp-49 pela Lys-49 (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997). Essas PLA<sub>2</sub> miotóxicas são discutidas em detalhes no item 1.3.

#### 1.2.2. *Bothrops insularis* – Ação pré-sináptica

COGO et al. (1993), relataram os efeitos do veneno de *B. insularis* em pintainhos *in vivo* e sobre preparações isoladas de camundongo e pintainho. Poucos minutos após uma dose letal de veneno (i.m.), os pintainhos apresentaram paralisia flácida, seguida por flacidez do pescoço (head-drop), perda do tônus muscular, dispnéia, apnéia, convulsões e morte. Os autores sugeriram que este veneno atuasse tanto na membrana muscular como em sítio pré-sináptico. Esta sugestão partiu do fato de que o veneno produzia despolarização da membrana pós-juncional em diafragma de camundongo, assim como aumento da frequência de potenciais de placa terminal em miniatura (MEEPS), antes do bloqueio das contrações musculares evocadas direta e indiretamente. Após seu fracionamento,



(COGO et al., 1998), os efeitos pré-sinápticos do veneno, como aumento da frequência de potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) e facilitação da amplitude da contração anterior ao bloqueio, foram reproduzidos por uma PLA<sub>2</sub> parcialmente isolada, denominada F-IV. Essa fração com atividade PLA<sub>2</sub> induzia bloqueio da preparação neuromuscular de ave, sem afetar a contratura em resposta ao potássio ou a ACh. Os autores compararam o efeito da PLA<sub>2</sub> F-IV com o das neurotoxinas PLA<sub>2</sub> crotoxina, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (BREITHAUPT, 1976), notexina, isolada do veneno de *Notechis scutatus scutatus* (KARLSSON et al., 1972), e caudoxina, isolada do veneno de *Bitis caudalis* (LEE et al., 1982), também chamadas  $\beta$ -neurotoxinas, caracterizadas por sua atividade PLA<sub>2</sub>, que, assim como F-IV, apresentaram uma relação direta entre a atividade enzimática e os efeitos farmacológicos.

De acordo com seu modo de ação, as neurotoxinas podem ser divididas em dois grupos: (a) neurotoxinas que agem em nível pós-sináptico por prevenir a ligação da ACh com seu receptor, já designadas  $\alpha$ -neurotoxinas (CHANGEUX et al., 1970); (b) neurotoxinas que atuam em nível pré-sináptico, interferindo na liberação do neurotransmissor. Dois tipos de neurotoxinas pré-sinápticas foram reconhecidas: as neurotoxinas facilitadoras da neurotransmissão, que são destituídas de atividade enzimática e que bloqueiam o canal de potássio voltagem-dependente (ex: dendrotoxinas, HARVEY et al., 1984) ou inibem a acetilcolinesterase (ex: fasciculinas, RODRIGUEZ-ITHURRALDE et al., 1973), e as  $\beta$ -neurotoxinas, que se caracterizam por sua atividade PLA<sub>2</sub>. As  $\beta$ -neurotoxinas são descritas no item 1.3.1.

As  $\alpha$ -neurotoxinas ligam-se especificamente aos receptores nicotínicos da placa motora, impedindo, portanto, a transmissão do impulso nervoso. Essas toxinas formam uma extensa família de proteínas homólogas que podem ser divididas em dois subgrupos chamados  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeia curta e de cadeia longa. As  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeia curta contém 60-62 resíduos de aminoácidos com quatro pontes dissulfeto, enquanto as  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeia longa contém 66-74 resíduos de aminoácidos com cinco pontes dissulfeto (TAMIYA et al., 1999).

Entretanto, há exceções, assim como para todas as regras. Duas  $\alpha$ -neurotoxinas isoladas do veneno da serpente marinha *Laticauda colubrina* (Lc e Lb) possuem 69 aminoácidos e somente quatro pontes dissulfeto. Há ainda uma outra  $\alpha$ -neurotoxina isolada de outra espécie de serpente marinha *Laticauda semifasciata*, a toxina LSIII, que contém 66 aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (ENDO e TAMIYA, 1999).

Tanto as  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeia curta como as de cadeia longa são estruturalmente homólogas, pois elas têm em comum um número invariável de aminoácidos em sua sequência que são importantes para a conservação e conformação molecular. A presença e a localização constante das pontes dissulfeto contribuem consideravelmente para a estabilidade da molécula; a atividade letal da toxina é perdida quando ocorre a quebra dessas pontes (MEBS, 1989) (Figura 1.1).

Comumente encontradas em proteínas extracelulares, as pontes dissulfeto são ligações covalentes formadas entre dois resíduos de cisteína, através de uma

reação de oxidação, que estabilizam os dobramentos de uma cadeia polipeptídica. Estudos sobre a estrutura tridimensional destas toxinas demonstraram que as quatro pontes dissulfeto estão localizadas no centro da molécula como um “nó”, do qual emergem três anéis: um longo anel central e dois anéis mais curtos (Figura 1.1). No caso das  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeia longa, a quinta ponte dissulfeto é encontrada perto da extremidade do anel mais longo (MEBS, 1989).

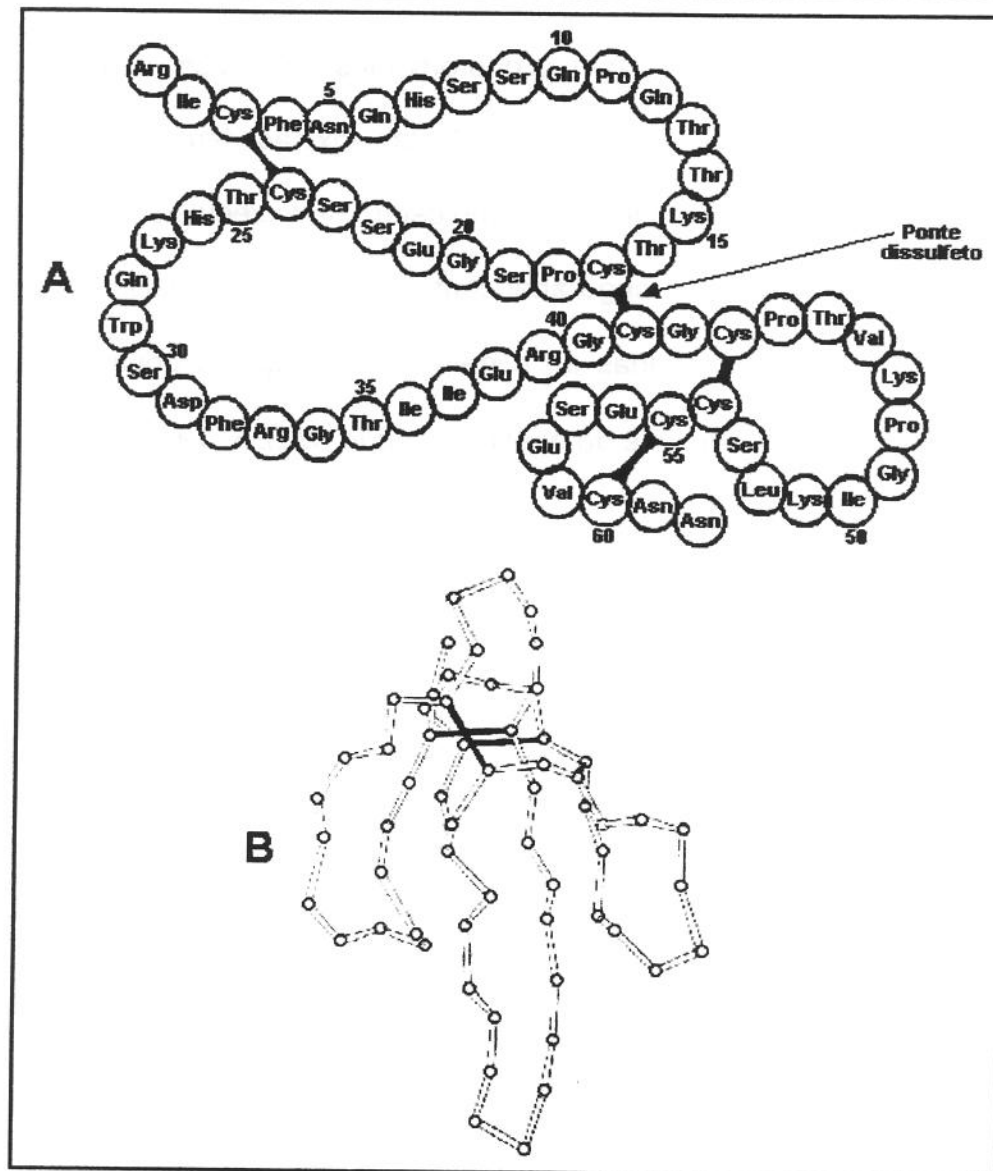


Figura 1.1. Sequência de aminoácidos (A) da erabutoxina b, uma neurotoxina pós-sináptica isolada do veneno da serpente marinha *Laticauda semifaciata*. A cadeia polipeptídica consiste de 62 aminoácidos e é estabilizada por quatro pontes dissulfeto. A estrutura tridimensional da molécula da toxina (B) apresenta três anéis emergindo de um núcleo central. Supõe-se que o anel mais longo carrega o centro ativo que interage com o receptor da ACh. Fonte: MEBS, 1989.

### 1.3. Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

Os venenos ofídicos são constituídos por diversas substâncias, cuja função é imobilizar, matar e digerir a presa. Alguns desses constituintes apresenta atividade PLA<sub>2</sub>. As fosfolipases são enzimas que hidrolisam glicerofosfolipídios. Estas enzimas são separadas em várias classes, denominadas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C e D, de acordo com o seu sítio de hidrólise, como ilustra a Figura 1.2. As PLA<sub>2</sub> hidrolisam fosfolipídios na posição sn-2 do esqueleto do glicerol, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Figura 1.3) (KINI, 1997).

As PLA<sub>2</sub> extracelulares possuem baixo peso molecular (13000-15000), ocorrem abundantemente na natureza e requerem Ca<sup>2+</sup> para manifestar sua atividade enzimática. O suco pancreático dos mamíferos e os venenos de serpentes estão entre as fontes mais ricas em PLA<sub>2</sub> extracelulares. Ao contrário das PLA<sub>2</sub> pancreáticas, as PLA<sub>2</sub> de venenos podem produzir potentes efeitos farmacológicos (Tabela 1.1). Ao comparar as seqüências de aminoácidos desses dois tipos de PLA<sub>2</sub>, observa-se que são poucas as substituições de resíduos de aminoácidos que convertem PLA<sub>2</sub> pancreáticas, desprovidas de toxicidade, em PLA<sub>2</sub> de venenos ofídicos altamente tóxicas, com especificidade para atuar em diferentes tecidos (SCOTT, 1997; CARREDANO et al., 1998).

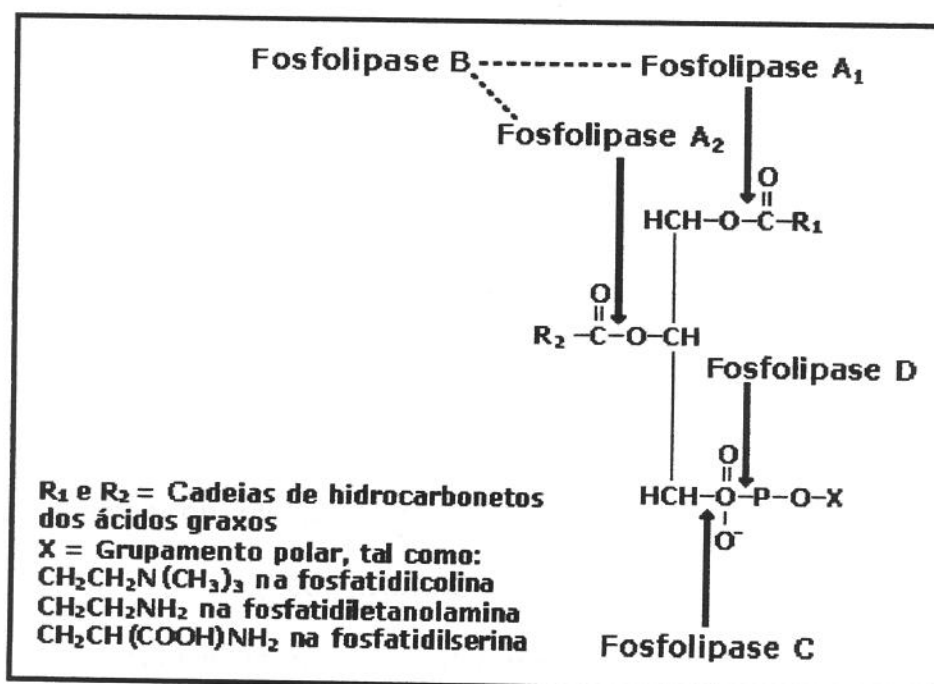


Figura 1.2. Sítios de ação das fosfolipases. As fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfoglicerolípídios, tais como fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilserina e fosfatidilinositol. A figura mostra os sítios de ação das diferentes classes de fosfolipases sobre o glicerofosfolípido. Note que as fosfolipases A<sub>2</sub> atuam na posição sn-2 do esqueleto do glicerol. Fonte: KINI, 1997.

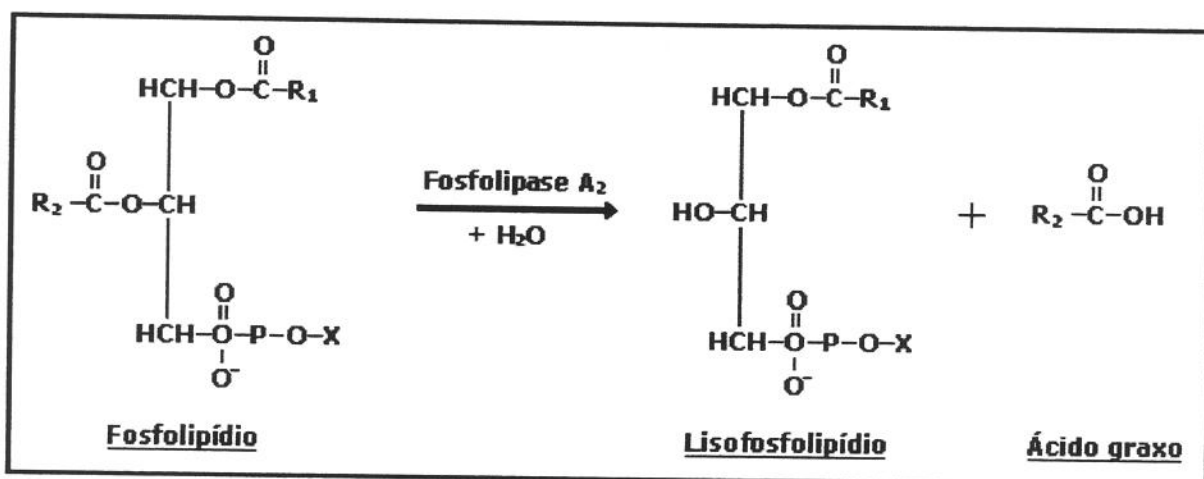


Figura 1.3. Reação catalisada pela fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Fonte: KINI, 1997.

Tabela 1.1. Efeitos farmacológicos das PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos de serpentes.

---

|                                           |
|-------------------------------------------|
| Neurotoxicidade                           |
| Pré-sináptica                             |
| Pós-sináptica                             |
| Miotoxicidade                             |
| Local                                     |
| Sistêmica                                 |
| Cardiotoxicidade                          |
| Efeito anticoagulante                     |
| Efeito iniciador de agregação plaquetária |
| Efeito inibidor de agregação plaquetária  |
| Atividade hemolítica                      |
| Hemorragia interna                        |
| Atividade anti-hemorrágica                |
| Atividade convulsionante                  |
| Atividade hipotensiva                     |
| Atividade edematogênica                   |
| Lesão de órgãos e tecidos                 |

---

Fonte: KINI, 1997

Embora seus efeitos farmacológicos sejam diferentes, as diversas PLA<sub>2</sub> de venenos ofídicos apresentam alta homologia (cerca de 40% a 90%) entre suas seqüências de aminoácidos. Por essa razão, não é fácil correlacionar as atividades farmacológicas de cada PLA<sub>2</sub> com suas diferenças estruturais. Assim, o estudo das relações entre a estrutura e a função desse grupo de proteínas é complexo e desafiante (KINI, 1997).

De acordo com a sua estrutura primária, as PLA<sub>2</sub> de baixo peso molecular (extracelulares/secretórias) podem ser divididas em quatro grupos (Figura 1.4). Pertencem ao Grupo I as PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae (serpentes marinhas dos oceanos Pacífico e Índico), e também as isoladas de pâncreas de mamíferos. As PLA<sub>2</sub> pertencentes ao Grupo II são as isoladas de venenos de serpentes da família Viperinae, bem como as

encontradas em células humanas, como as plaquetas. O Grupo III engloba as PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos de abelhas e o Grupo IV, o mais recente, inclui a conodipine-M, isolada do veneno de uma lesma marinha, *Conus magus* (MCINTOSH et al., 1995; KINI, 1997).

O Grupo II, que inclui as serpentes da família Viperinae, à qual pertence as serpentes do gênero *Bothrops*, é o de maior interesse para este trabalho. As serpentes da família Viperinae, bem como as integrantes de outras famílias, estão descritas na Tabela 1.2.

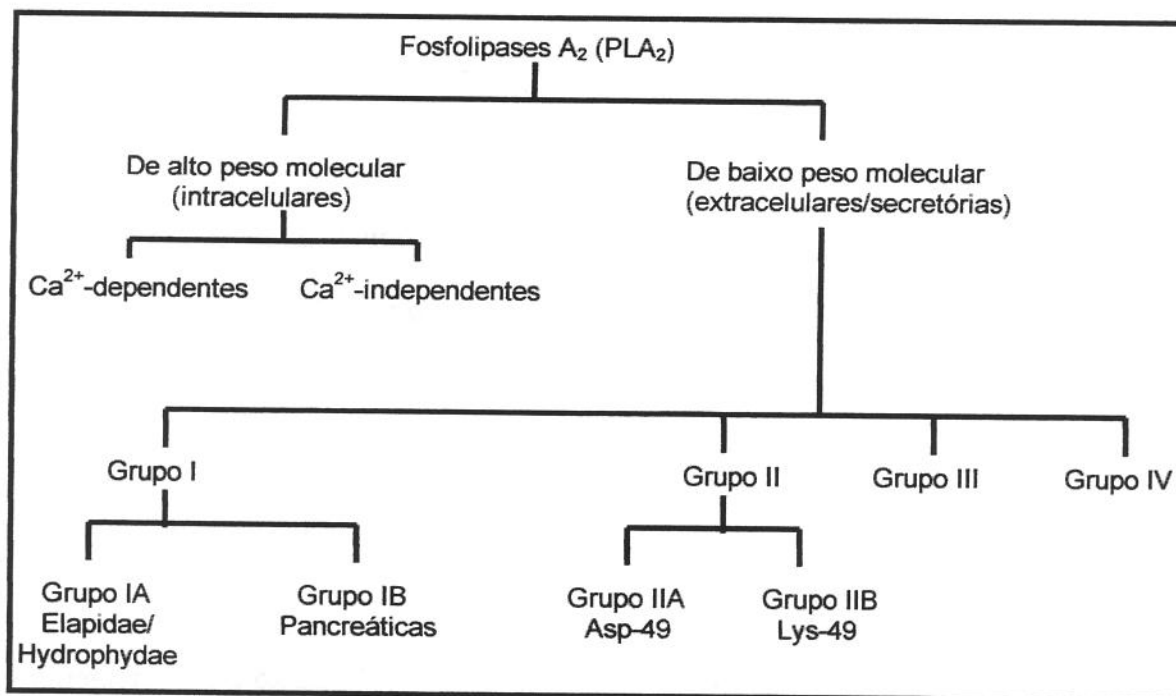


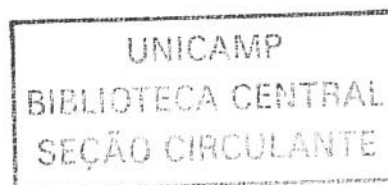
Figura 1.4 – Classificação das PLA<sub>2</sub>. As PLA<sub>2</sub> podem ser divididas em dois grandes grupos: as intracelulares, que possuem alto peso molecular, e as extracelulares ou secretórias, que apresentam baixo peso molecular. As intracelulares podem ser subdivididas, do ponto de vista catalítico, em dois subgrupos: as dependentes e as independentes de Ca<sup>2+</sup>. As PLA<sub>2</sub> de baixo peso molecular são divididas em quatro grupos, entre os quais, o grupo II, que inclui as PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos de serpentes da família Viperinae, é o de maior interesse para este trabalho. Fonte: KINI, 1997.



Em geral, as PLA<sub>2</sub> pertencentes ao Grupo II contém 120-125 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto. Entretanto, algumas Asp-49, tais como uma PLA<sub>2</sub> isolada do veneno de *Bitis gabonica* (JOUBERT et al., 1983) (ver Tabela 1.2), contém somente seis pontes dissulfeto.

Assim como os outros grupos, a maioria das PLA<sub>2</sub> pertencentes ao Grupo II possuem um resíduo aspartato na posição 49 (Asp-49), altamente envolvido com o sítio de ligação ao Ca<sup>2+</sup>. Porém, em algumas destas enzimas, o resíduo aspartato da posição 49 é substituído por lisina (Lys-49), o que impede uma ligação eficiente ao Ca<sup>2+</sup> (MARAGANORE et al., 1984; MARAGANORE e HEINRIKSON, 1986). Dessa forma, o Grupo II pode ser subdividido em PLA<sub>2</sub> Asp-49 e PLA<sub>2</sub> Lys-49, sendo que as últimas possuem atividade enzimática muito baixa, devido à substituição do aspartato-49 por lisina. No caso da ammodytoxina L, uma PLA<sub>2</sub> isolada do veneno de *Vipera ammodytes ammodytes* (veja a Tabela 1.2), a serina é o resíduo que ocupa a posição 49 (PUNGERCAR et al., 1990), o que também confere a essa PLA<sub>2</sub> baixa atividade catalítica.

Algumas PLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes requerem componentes protéicos adicionais para expressar sua ação farmacológica de forma completa. Esses componentes formam complexos com PLA<sub>2</sub>. A β-bungarotoxina, por exemplo, neurotoxina isolada do veneno da *Bungarus multicinctus*, é formada por dois componentes, os quais são covalentemente ligados. Já a crotoxina, a principal neurotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, é constituída por dois componentes ligados por diferenças de cargas. Há complexos que possuem mais de dois componentes, sendo sempre pelo menos um deles uma PLA<sub>2</sub> e os demais



moléculas PLA<sub>2</sub> –‘like’ (proteínas estruturalmente semelhantes às PLA<sub>2</sub>) com ou sem atividade catalítica. Todos esses complexos exibem neurotoxicidade pré-sináptica. As subunidades adicionais funcionam como chaperones, possibilitando a ligação específica das PLA<sub>2</sub> ao sítio pré-sináptico-alvo. Porém, várias PLA<sub>2</sub> monoméricas (compostas por uma única subunidade, ou seja, uma única PLA<sub>2</sub>), exibem neurotoxicidade pré-sináptica (KINI, 1997).

| Família/Subfamília*  | Gênero*             | Espécie*                                                                     |
|----------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Elapidae             | <i>Micrurus</i> +   | <i>M. nigrocinctus</i> , <i>M. frontalis</i> , <i>M. dumerilii</i>           |
|                      | <i>Naja</i>         | <i>N. naja</i> , <i>N. kaouthia</i> , <i>N. atra</i> , <i>N. nigricollis</i> |
|                      | <i>Pseudechis</i>   | <i>P. australis</i> , <i>P. colletti</i> , <i>P. papuanus</i>                |
|                      | <i>Dendroaspis</i>  | <i>D. angusticeps</i>                                                        |
|                      | <i>Notechis</i>     | <i>N. scutatus</i>                                                           |
|                      | <i>Bungarus</i>     | <i>B. multicinctus</i> , <i>B. caeruleus</i> , <i>B. fasciatus</i>           |
|                      | <i>Ophiophagus</i>  | <i>O. hannah</i>                                                             |
|                      | <i>Oxyuranus</i>    | <i>O. scutellatus</i>                                                        |
|                      | <i>Pseudonaja</i>   | <i>P. textilis</i> , <i>P. nuchalis</i>                                      |
|                      | <i>Austrelaps</i>   | <i>A. superbus</i>                                                           |
| Viperidae/Viperinae  | <i>Vipera</i>       | <i>V. russelli</i> , <i>V. ammodytes</i>                                     |
|                      | <i>Echis</i>        | <i>E. carinatus</i>                                                          |
|                      | <i>Bitis</i>        | <i>B. caudalis</i> , <i>B. gabonica</i>                                      |
| Viperidae/Crotalinae | <i>Agkistrodon</i>  | <i>A. halys</i> , <i>A. contortrix</i>                                       |
|                      | <i>Sistrurus</i>    | <i>S. catenatus</i>                                                          |
|                      | <i>Trimeresurus</i> | <i>T. mucrosquamatus</i> , <i>T. flavoviridis</i>                            |
|                      | <i>Lachesis</i> +   | <i>L. muta</i>                                                               |
|                      | <i>Bothrops</i> +   | <i>B. jararacussu</i> , <i>B. insularis</i> , <i>B. neuwiedi</i>             |
|                      | <i>Crotalus</i> +   | <i>C. durissus</i> , <i>C. viridis</i> , <i>C. scutulatus</i>                |

Figura 1.5. Serpentes peçonhentas. \*Esta figura não inclui todas as famílias, gêneros e espécies já descritos na literatura. Para obter informações mais detalhadas, consulte WUSTER et al. (1997, 1998 e 1999). +Gêneros encontrados no Brasil.

### 1.3.1. As $\beta$ -neurotoxinas

Do veneno da serpente *Bungarus multinctus*, foram isoladas neurotoxinas com atuação específica em sítio pré-sináptico, a  $\beta$ -bungarotoxina, e em sítio pós-sináptico, a  $\alpha$ -bungarotoxina. A denominação  $\beta$ -bungarotoxina deu origem ao nome que identifica a classe de neurotoxinas pré-sinápticas, as  $\beta$ -neurotoxinas (GUBENSEK et al., 1997), que são caracterizadas por sua atividade  $PLA_2$ .

A estrutura quaternária das  $\beta$ -neurotoxinas é heterogênea: como já exposto anteriormente, algumas consistem em um único polipeptídio ( $\beta$ -neurotoxinas monoméricas), enquanto outras consistem em várias subunidades (componentes), em que pelo menos uma delas é responsável pela atividade  $PLA_2$  da toxina ( $\beta$ -neurotoxinas multiméricas). A Tabela 1.2 expõe algumas  $\beta$ -neurotoxinas e a sua estrutura molecular.

Como se observa na Tabela 1.3, a  $\beta$ -bungarotoxina pertence a outro tipo de  $PLA_2$ , a classe das  $\beta$ -bungarotoxinas. Isolada do veneno da *Bungarus multicinctus* (CHANG e LEE, 1963), a  $\beta$ -bungarotoxina foi a primeira toxina pré-sináptica caracterizada farmacologicamente. Mais tarde, várias isotoxinas foram purificadas a partir do mesmo veneno (ABE et al., 1977; KONDO et al., 1982a; 1982b) e de outras espécies do gênero *Bungarus*. As  $\beta$ -bungarotoxinas são formadas pela associação covalente de dois diferentes polipeptídios através de uma ponte dissulfeto. O polipeptídio A é homólogo à classe I de  $PLA_2$  (KONDO et al., 1982b), enquanto que o polipeptídio B é homólogo aos inibidores de proteases, tais como os de pâncreas de mamíferos (KONDO et al., 1982a).

Algumas  $\beta$ -neurotoxinas, tais como a notexina e a crotoxina, exibem também considerável miotoxicidade, apesar de seu efeito neurotóxico pré-sináptico ser predominante em seu mecanismo de ação. Por outro lado, há enzimas PLA<sub>2</sub> em que a miotoxicidade é o efeito predominante. Essas enzimas são chamadas de miotoxinas.

Tabela 1.2. Estrutura molecular das  $\beta$ -neurotoxinas.

| Estrutura quaternária                     | Toxinas                | Veneno de origem                  | Estrutura da subunidade                                                                                                                           | Peso molecular (KDa) |
|-------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Classe I de PLA <sub>2</sub> (Elapidae)   |                        |                                   |                                                                                                                                                   |                      |
| Monoméricas                               | Notexina               | <i>Notechis s. scutatus</i>       | Um polipeptídio (uma PLA <sub>2</sub> )                                                                                                           | 13,6                 |
| Multiméricas                              | Ceruleotoxina          | <i>Bungarus fasciatus</i>         | Dois polipeptídios idênticos (duas PLA <sub>2</sub> )                                                                                             | 30                   |
|                                           | Taipoxina              | <i>Oxyuranus s. scutellatus</i>   | Três polipeptídios diferentes ( $\alpha$ e $\beta$ , duas PLA <sub>2</sub> com 13,8 kDa cada, e $\gamma$ , uma pró-PLA <sub>2</sub> com 18.8 kDa) | 45,6                 |
|                                           | Textilotoxina          | <i>Pseudonaja textilis</i>        | Cinco polipeptídios (cinco PLA <sub>2</sub> )                                                                                                     | 80                   |
| $\beta$ -bungarotoxina*                   | $\beta$ -bungarotoxina | <i>Bungarus multicinctus</i>      | Um polipeptídio (uma PLA <sub>2</sub> ) de 13.5 kDa e um inibidor de protease homólogo de 7 kDa                                                   | 20,5                 |
| Classe II de PLA <sub>2</sub> (Viperidae) |                        |                                   |                                                                                                                                                   |                      |
| Monoméricas                               | Agkistrodotoxina       | <i>Agkistrodon b. brevicaudus</i> | Um polipeptídio (uma PLA <sub>2</sub> )                                                                                                           | 13,5                 |
|                                           | Caudoxina              | <i>Bitis caudalis</i>             | Um polipeptídio (uma PLA <sub>2</sub> )                                                                                                           | 13,5                 |
|                                           | Ammodytoxina A         | <i>Vipera a. ammodytes</i>        | Um polipeptídio (uma PLA <sub>2</sub> )                                                                                                           | 13,5                 |
| Multiméricas                              | Crotoxina              | <i>Crotalus d. terrificus</i>     | Um polipeptídio (uma PLA <sub>2</sub> ) com 13,5 kDa e um polipeptídio PLA <sub>2</sub> proteolísado com 10 kDa                                   | 23,5                 |
|                                           | Crotoxina-like         |                                   |                                                                                                                                                   |                      |
|                                           | Mojave toxina          | <i>Crotalus s. scutulatus</i>     | Idem à crotoxina                                                                                                                                  | 23,5                 |
|                                           | Concolor toxina        | <i>C. v. concolor</i>             | Idem à crotoxina                                                                                                                                  | 23,5                 |
|                                           | Vegrandis toxina       | <i>C. vegrandis</i>               | Idem à crotoxina                                                                                                                                  | 23,5                 |
|                                           | Canebrake toxina       | <i>C. h. atricaudatus</i>         | Idem à crotoxina                                                                                                                                  | 23,5                 |

\*Embora seja formada por dois componentes, a  $\beta$ -bungarotoxina não pertence ao grupo das PLA<sub>2</sub> multiméricas, pois os seus dois componentes são covalentemente ligados.  
 Fonte: BON et al., 1994; BON, 1997.

### 1.3.2. Miotoxinas

Miotoxinas são componentes de venenos que atuam especificamente sobre o músculo esquelético, preservando outras estruturas, como o tecido conjuntivo e o nervo (MEBS e OWNBY, 1990). O termo miotoxicidade local pode ser aplicado a toxinas que produzem degeneração do músculo no local da injeção ou após a incubação com preparações neuromusculares isoladas (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1997). Como exemplo, a bothropstoxina-I, uma miotoxina  $PLA_2$  isolada do veneno da *Bothrops jararacussu* (Tabela 1.4), produz contratura, bloqueio da resposta a estímulo elétrico direto, despolarização em preparações neuromusculares isoladas, bem como alterações morfológicas das fibras musculares, preservando o terminal nervoso (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; HELUANY et al., 1992). Outras miotoxinas produzem miotoxicidade sistêmica, ou seja, distante do local de injeção, causando conseqüente mioglobínúria (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1997). Esse é caso de uma  $PLA_2$  isolada do veneno da *Pseudechis australis*, uma serpente australiana, que induz mioglobínúria em camundongos após a injeção subcutânea de 5 mg de toxina/kg.

Várias miotoxinas  $PLA_2$  foram isoladas de venenos botrópicos (Tabela 1.3). Todas essas proteínas são básicas. Os venenos botrópicos também contém  $PLA_2$  ácidas (VIDAL e STOPPANI, 1971; ALAGON et al., 1980; NISENBOM et al., 1986a, 1986b; NISENBOM et al., 1988; MORENO et al., 1988; VALIENTE et al., 1992; MACHADO et al., 1993; DANIELE et al., 1995), mas não há relatos de miotoxidade produzida por essas  $PLA_2$  (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997).

Tabela 1.3. PLA<sub>2</sub> miotóxicas isoladas de venenos botrópicos.

| Espécie               | Toxina                             | kDa    | Atividade<br>PLA <sub>2</sub> | Referência                     |
|-----------------------|------------------------------------|--------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>B. asper</i>       | Miotoxina I                        | 10.700 | (+)                           | GUTIERREZ et al., 1984         |
|                       | Miotoxina II                       | 13.300 | (-)                           | LOMONTE e GUTIERREZ, 1989      |
|                       | Miotoxina III                      | 13.900 | (+)                           | KAISER et al., 1990            |
|                       | Miotoxina IV                       | 15.500 | (-)                           | DIAZ et al., 1995              |
|                       | Miotoxina PLA <sub>2</sub>         | 14.100 | (+)                           | MEBS E SAMEJIMA, 1986          |
| <i>B. nummifer</i>    | Miotoxina                          | 16.000 | (-)                           | GUTIERREZ et al., 1986         |
|                       | Miotoxina pico IV                  | 15.000 | ND                            | BRUSES et al., 1993            |
| <i>B. jararacussu</i> | Pool IV                            | 13.869 | (-)                           | RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983 |
|                       | S <sub>III</sub> -SP <sub>IV</sub> |        |                               | HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988 |
|                       | (Bothropstoxina I)                 |        |                               | CINTRA et al., 1993            |
|                       | Bothropstoxina II                  | 15.784 | (+)                           | HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988 |
| <i>B. insularis</i>   | Miotoxina                          | 15.000 | (+)                           | SELISTRE et al., 1990          |
| <i>B. atrox</i>       | Miotoxina                          | 13.400 | (-)                           | LOMONTE et al., 1990           |
| <i>B. moojeni</i>     | Miotoxina I                        | 13.400 | (-)                           | LOMONTE et al., 1990           |
|                       | Miotoxina II                       | 13.400 | (-)                           | LOMONTE et al., 1990           |
|                       | MOO-1                              | 15.000 | (+)                           | MOURA-DA-SILVA et al., 1991    |
| <i>B. pradoi</i>      | PRA-1                              | 15.000 | (+)                           | MOURA-DA-SILVA et al., 1991    |
| <i>B. godmani</i>     | Miotoxina I                        | 14.300 | (+)                           | DIAZ et al., 1992              |
|                       | Miotoxina II                       | 13.400 | (-)                           | DIAZ et al., 1992              |
| <i>B. pirajai</i>     | Piratoxina I                       | 15.500 | (-)                           | MANCUSO et al., 1995           |

(-) refere-se a ausência PLA<sub>2</sub> de atividade ou atividade extremamente baixa (< 2μEq de ácidos graxos/min). Algumas dessas miotoxinas tem demonstrado ser variantes Lys-49 (veja o texto).  
 ND = não determinada. Fonte: GUTIÉRREZ e LOMONTE (1997)

#### 1.4. *Bothrops neuwiedi* – Ação miotóxica e neurotóxica

Várias são as espécies de *Bothrops* existentes no território nacional. Dentre elas, a *B. neuwiedi*, popularmente conhecida como jararaca-pintada, jararaca do rabo branco ou boca-de-sapo, apresenta ampla distribuição geográfica e exibe doze subespécies. A *B. neuwiedi pauloensis* é a representante dessa espécie que ocorre em regiões abertas, como campos e cerrados, nas zonas central e sudoccidental do Estado de São Paulo.

Vários estudos têm sido realizados com o veneno de *B. neuwiedi*, visando conhecer suas propriedades e composição. Nesses estudos, diversas PLA<sub>2</sub> com diferentes características e atividades biológicas foram isoladas desse veneno. Inicialmente, VIDAL e STOPPANI (1971) purificaram desse veneno duas proteínas com atividade fosfolipásica (P-1 e P-2), correspondentes ao segundo e terceiro picos do perfil de eluição. Mais tarde, MOURA-DA-SILVA et al. (1991) isolaram proteínas básicas com atividade PLA<sub>2</sub> e miotóxica de alguns venenos botrópicos, incluindo o de *B. neuwiedi*. Em seguida, três PLA<sub>2</sub> (P-1, P-2 e P-3) enzimaticamente ativas, com importante atividade edematogênica, foram isoladas do veneno de *B. neuwiedi* e quatorze aminoácidos das suas seqüências amino-terminal foram identificados. Essas PLA<sub>2</sub> não foram letais quando injetadas intraperitonealmente em camundongos numa dose única de 5 µg/g e não apresentaram atividade miotóxica. As seqüências determinadas apresentaram alta homologia com PLA<sub>2</sub> isoladas de *Crotalus atrox* e os autores sugeriram sua inclusão no grupo II de PLA<sub>2</sub> (DANIELE et al., 1995; DANIELE et al., 1997).



GEOGHEGAN et al. (1999) purificaram uma PLA<sub>2</sub> miotóxica do veneno de *B. neuwiedi*, a qual denominaram miotoxina I. Essa PLA<sub>2</sub> também apresentou atividade edematogênica e não foi letal quando aplicada intraperitonealmente (4.7 mg/kg) em camundongos. A miotoxina I não apresentou atividade enzimática e sua seqüência amino-terminal (40 aminoácidos) exibiu alta identidade com as miotoxinas Lys-49 de crotalídeos do grupo II de PLA<sub>2</sub>.

Recentemente, ZAMUNER et al. (1995), ao avaliarem os efeitos neurotóxico e miotóxico de alguns venenos botrópicos, verificaram que o veneno de *B. neuwiedi* causava flacidez do pescoço ('head-drop'), perda do tônus muscular e insuficiência respiratória em ave, além de bloqueio da resposta contrátil em preparações isoladas de aves, observando ser a intensidade do bloqueio dose-dependente e sugerindo que o mesmo ocorria por um mecanismo pré-sináptico, já que mantinha a resposta ao agonista do receptor nicotínico à ACh. Em seguida, BORJA-OLIVEIRA et al. (2002) verificaram que lotes de veneno de *B. neuwiedi* obtidos de serpentes de diferentes procedências apresentavam variações quanto a suas atividades neurotóxica e miotóxica em preparações isoladas de ave. O perfil eletroforético dos lotes de veneno mais ativos exibiu uma banda extra que estava ausente nos venenos menos ativos.

RODRIGUES et al. (1998) relataram que o veneno de *B. neuwiedi pauloensis* apresentava variações individuais quanto à presença de miotoxinas na composição de seus venenos. Um estudo posterior deu continuidade a estes achados, revelando algumas características funcionais de uma PLA<sub>2</sub> miotóxica isolada do veneno, BnSP7, relacionadas à sua estrutura. Modificações químicas e a incubação com heparina neutralizaram o efeito bloqueador neuromuscular da

miotoxina. A determinação da estrutura primária demonstrou que a BnSP7 tratava-se de uma miotoxina Lys-49.

## *2. OBJETIVOS*

Os objetivos deste trabalho foram:

- 2.1. Estudar os efeitos do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em preparações neuromusculares isoladas de aves e camundongos;
- 2.2. Isolar, caracterizar bioquimicamente, determinar a seqüência amino-terminal do(s) componente(s) com atividade neurotóxica pré-sináptica em preparações neuromusculares isoladas, bem como compará-los com as toxinas estruturalmente semelhantes descritas na literatura e propor-lhe(s) uma classificação.

### *3. MATERIAIS E MÉTODOS*

### 3.1. Veneno

O lote de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* utilizado neste trabalho é resultante de um 'pool' de venenos serpentes da mesma subespécie, procedentes de São Paulo-SP, gentilmente fornecido pelo Instituto Butantan.

### 3.2. Animais

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4 a 8 dias), fornecidos pela Granja Ito S/A, e camundongos machos da linhagem SWISS, com peso entre 18 e 30 g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 sem luz).

### 3.3. Ensaios biológicos

#### 3.3.1. Preparação *biventer cervicis* de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de GINSBORG e WARRINER (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl

118,6; KCl 4,69; CaCl<sub>2</sub> 1,88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17; MgSO<sub>4</sub> 1,17; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,65; pH 7,0. A solução foi areada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 0,5 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximos e as contraturas em resposta à adição de KCl (13,4 mM) e ACh (110 µM) foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. O registro das contraturas para o potássio e para a ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno ou frações) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno ou frações ou após bloqueio total).

Na preparação de ave, as concentrações de veneno bruto utilizadas foram 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/ml. Após a purificação parcial em HPLC de exclusão molecular, para as frações, as concentrações utilizadas foram 10, 20 e 50 µg/ml. Após a purificação total em HPLC de fase reversa, a concentração utilizada para os ensaios com os polipeptídeos isolados foi de 10 µg/ml. Em alguns experimentos, a temperatura foi mantida a 20-24°C (temperatura ambiente), durante a incubação com o veneno, para inibir a atividade enzimática. Para o registro das respostas à estimulação direta (50 V), utilizou-se d-tubocurarina (d-Tc) (Abbot Laboratórios do Brasil Ltda) na concentração de 8 µg/ml (para total curarização).

### 3.3.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946). Os animais foram sacrificados por meio de secção e sangria dos vasos do pescoço, depois de serem anestesiados com cloral hidratado. Após a retirada do diafragma, juntamente com o nervo frênico correspondente, o mesmo foi fixado em cuba contendo 5 ml da solução nutritiva Tyrode, com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 0,49; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,1; pH 7,0. A solução foi aerada constantemente com carbogênio e mantida a 37°C. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 2 g/cm. A preparação foi exposta a estimulação (estimulador Grass S48) indireta, com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, ou direta, após prévia curarização (d-Tc, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, 5 µg/ml), com pulsos de 50 V, 2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. As contrações musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM.

Para os ensaios miográficos com a preparação de camundongo, utilizaram-se concentrações de 10, 20, 50 e 100 µg/ml de veneno bruto. Para inibir a atividade enzimática, foram realizados alguns ensaios em que o Ca<sup>2+</sup> (1,8 mM) da solução nutritiva foi substituído por Sr<sup>2+</sup> (4,0 mM) durante a incubação com o veneno ou com as frações ativas (após a purificação parcial em HPLC de exclusão molecular).



### 3.4. Ensaios bioquímicos

#### 3.4.1. HPLC de exclusão molecular

O veneno de *B. neuwiedi pauloensis* (25 mg) foi adicionado em uma coluna (Protein Pack 300SW - 0.78 cm x 30 cm) sob um fluxo constante de 0.3 ml/min. As amostras foram eluídas usando como tampão bicarbonato de amônio, pH 7.9, 0.25 M, e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. As frações foram liofilizadas, armazenadas à -20°C e ensaiadas em preparações neuromusculares de pintainho e camundongo.

#### 3.4.2. Determinação de atividade PLA<sub>2</sub>

A atividade PLA<sub>2</sub> foi medida através do método descrito por CHO E KEZDY (1991) e HOLZER e MACKESSY (1996) modificado (BEGHINI et al., 2001). A mistura padrão continha 200 µl de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0), 20 µl de substrato, 20 µl de água deionizada e 20 µl de amostra, em um volume final de 260 µl. Após a adição da amostra (20 ug), à 37°C, a atividade enzimática foi calculada pelo aumento da absorbância após 20 min a 425 nm e expressa em nmol/min/mg.

### 3.4.3. HPLC de fase reversa

A frações parcialmente purificadas por HPLC de exclusão molecular, correspondentes aos picos 2 e 3 (2 mg cada) do perfil cromatográfico, foram dissolvidas em 0,1 ml de ácido trifluoroacético (TFA 0,1%, v/v). A solução resultante foi clarificada por centrifugação a 10.000 rpm por 1 min e o sobrenadante aplicado a uma coluna C-18  $\mu$ -Bondapak (0,78 x 30 cm) (Waters 991-PDA system). A coluna foi equilibrada em solução de TFA 0,1% em água obtida por sistema Milli Q. A coluna foi eluída com um gradiente linear de acetonitrila 66% (0-100%, v/v) a um fluxo de 2,0 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações coletadas foram liofilizadas, estocadas a -20°C, e, em seguida, ensaiadas em preparação *biventer cervicis* de pintainho.

### 3.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina

O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo com a metodologia descrita por SCHAGGER e VON JAGOW (1987), a partir de uma solução estoque de acrilamida-bisacrilamida e tampão para gel (Gel Buffer). O gel de corrida compõe-se de 4,0 g de glicerol 89%, em 10 ml de tampão para gel (Tris-HCl 3M, SDS 0,3%, pH 8,43), PSA 0,025% (100 mg/ml), 6,1 ml de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida e Temed 0,05%, em volume final de 30 ml para cada gel. O gel de separação (spacer gel) foi preparado com tampão gel 10 ml, solução estoque de acrilamida 10 ml para um volume final de 30 ml com água Milli Q. Os

géis foram adicionados simultaneamente entre duas placas de vidro (sistema duplo de placas SE 250 Might Small – Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA). O gel superior foi confeccionado usando 1,0 ml de solução estoque de acrilamida em 3,1 ml de gel buffer, 100 µl de PSA (100 mg/ml) e 0,1% de Temed, em um volume final de 12,5 ml.

As amostras (10 a 50 µg de proteína) foram dissolvidas em tampão de amostra comercial (sample buffer, Laemmli – Sigma). Para as amostras reduzidas, foi empregado DTT no mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram aplicadas no volume máximo de 15 µl. A corrida eletroforética foi desenvolvida em temperatura ambiente, tampão cátodo Tris-HCl 0,1 M, SDS 0,1%, pH 8,25, e tampão para ânodo Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9, com duração aproximada de 7 horas sob uma corrente de 25 mA. Após a corrida, o gel foi retirado das placas e colocado em uma solução contendo Coomassie blue R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v), para coloração das bandas de proteínas. A descoloração do gel, para remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, foi efetuada por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v).

#### 3.4.5. Determinação da sequência primária amino-terminal

As proteínas purificadas provenientes do HPLC de fase reversa ativas que produziram efeito neurotóxico pré-sináptico em preparação *biventer cervicis* de pintainho, denominadas neuwieditoxina-I e neuwieditoxina-II, foram reduzidas e

carboximetiladas com tampão guanidina HCL 6N em presença de DTT 2M e iodoacetoamida. Após a redução e carboximetilação, as amostras foram desalificadas em coluna C4. Estas proteínas insentas de sal foram então colocadas em um sequenciador automático gás-líquido, Procise F (Applied Biosystem) e a identificação dos PTH-aminoácidos (feniltioidantoína-aminoácidos) foi feita comparando-se os tempos de retenção dos picos com os do padrão de aminoácidos previamente analisados no sistema cromatográfico.

### 3.5. Análise estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos  $\pm$  erro padrão. A significância foi obtida através do teste não-pareado *t*-Student e considerada como  $p < 0,05$ .

## *4. RESULTADOS*

## 4.1. Estudo miográfico do veneno total

### 4.1.1. Preparação *biventer cervicis* de pintainho

#### 4.1.1.1. Estimulação elétrica indireta

Em experimentos realizados para a determinação do tempo necessário para a obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil do músculo à 37°C, foram utilizadas seis diferentes concentrações de veneno bruto, 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/ml. O bloqueio neuromuscular mostrou-se invariavelmente irreversível e dependente da concentração (Figuras 4.1 e 4.2 e Tabela 4.1). Com exceção da concentração de 20 µg/ml, todas as concentrações utilizadas foram estatisticamente diferentes entre si. A Tabela 4.1 apresenta o tempo necessário para obtenção de 50% em cada concentração.

Na concentração de 1 µg/ml (Figura 4.1A), à 37°C, a inibição da resposta contrátil atingiu somente  $44 \pm 7\%$  (n=3) em 120 min de incubação, com margem de bloqueio significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle a partir dos 85 min. Com 5 µg de veneno/ml, obteve-se bloqueio total sem ocorrência de contratura (Figura 4.1A e C). A partir das concentrações acima de 10 µg/ml, o veneno induziu contratura, que se tornava mais pronunciada à medida que se aumentava a concentração do veneno (Figuras 4.1 e 4.2).

À 37°C, o veneno produziu uma discreta inibição inicial da resposta contrátil, seguida por uma sutil facilitação precedendo um progressivo bloqueio neuromuscular (Figuras 4.1 e 4.2). Esses efeitos iniciais mostraram-se mais

evidentes à 20-24°C (Figura 4.3). Nesta temperatura, o efeito bloqueador neuromuscular do veneno mostrou-se significativamente reduzido ( $p < 0,05$  em  $t_{40}$ - $t_{120}$ ; 50 µg/ml), atingindo apenas  $30 \pm 8\%$  ( $n = 3$ ) em 120 minutos de incubação. O efeito obtido à 20-24°C foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) daquele obtido à 37°C após 30 min.

Nos experimentos-controle realizados à 37°C, o registro das contrações permaneceu estável (99,5% de resposta durante 120 minutos em Krebs;  $n=4$ ), sem a ocorrência de contratura (Figura 4.1A e B).

#### 4.1.1.2. Resposta contraturante à ACh e ao KCl

A incubação da preparação com o veneno bruto de *B. n. pauloensis* reduziu visivelmente a resposta contraturante ao potássio, mantendo total ou parcialmente a resposta à adição da ACh, sempre que a dose do veneno utilizada fosse igual ou inferior a 20 µg/ml. No entanto, nas concentrações superiores a 20 µg/ml, ou seja, 50 e 100 µg/ml, a contratura induzida pela ACh mostrou-se, algumas vezes, parcialmente inibida e, na maioria dos casos, abolida (Figuras 4.1, 4.2 e 4.4).

Nos ensaios realizados à 20-24°C, o bloqueio da resposta à ACh em preparações incubadas com o veneno na concentração de 50 µg/ml foi significativamente ( $p < 0,05$ ) menos intenso ( $31 \pm 14\%$ ;  $n=3$ ). Já a resposta à adição de potássio permaneceu idêntica àquela do final do experimento (Figuras 4.3 e 4.4).

#### 4.1.1.3. Estimulação elétrica direta

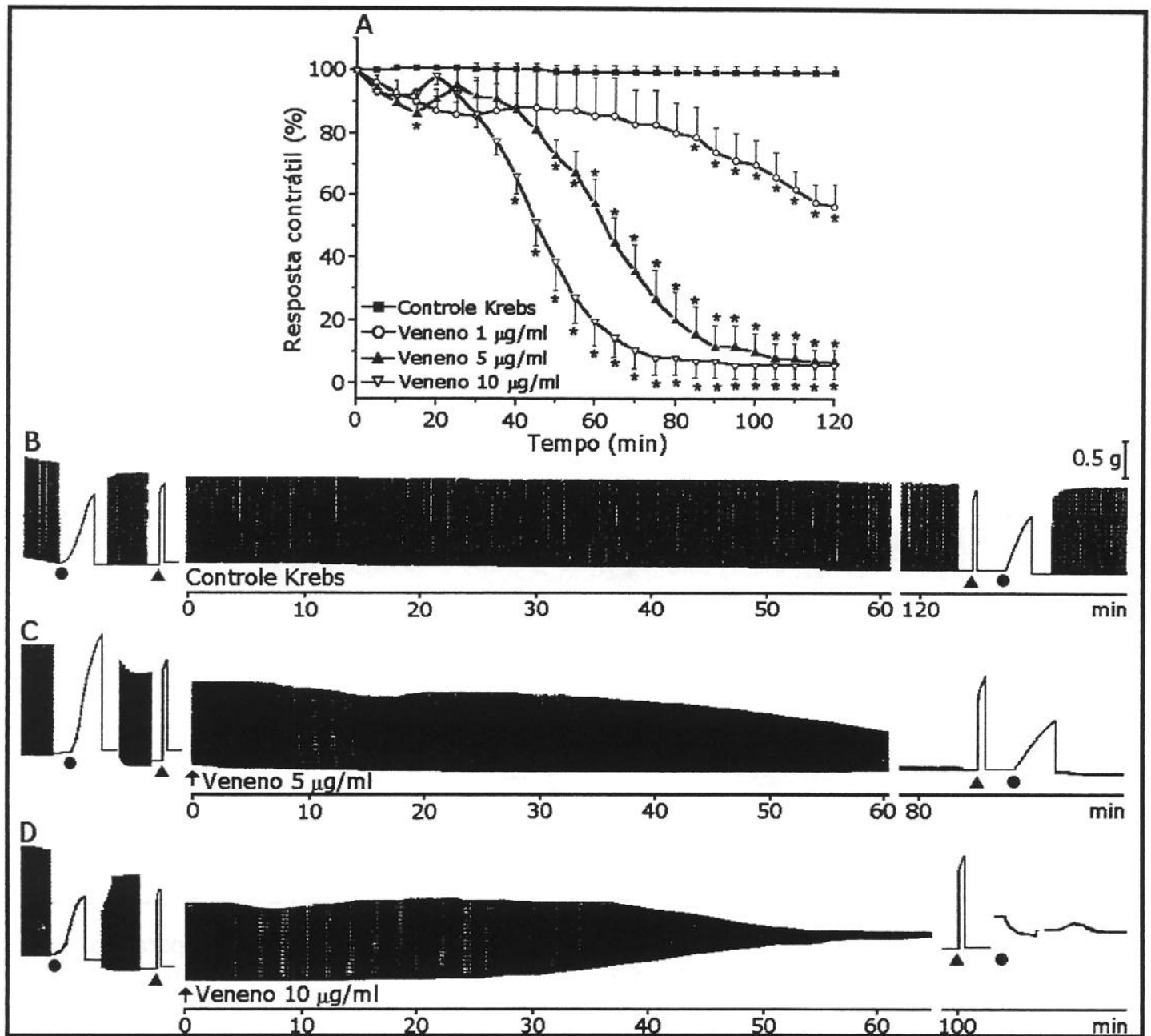
A preparação *biventer cervicis* de pintainho foi previamente tratada com d-Tc na concentração de 8 µg/ml (necessária para a curarização total) e submetida à estimulação direta antes e 90 minutos depois da incubação com o veneno. O bloqueio parcial ( $60 \pm 7\%$  em 120 min; n=3) somente ocorreu quando se utilizou 50 µg de veneno/ml (Figura 4.5).

**Tabela 4.1.** Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, incubada com o veneno bruto. Todos os dados incluídos na tabela foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0.05$ ). A concentração de 20 µg/ml de veneno não foi incluída por não produzir um efeito estatisticamente diferente dos obtidos com as demais. Na concentração de 1 µg/ml, o veneno não induziu 50% de bloqueio após 120 min de incubação.

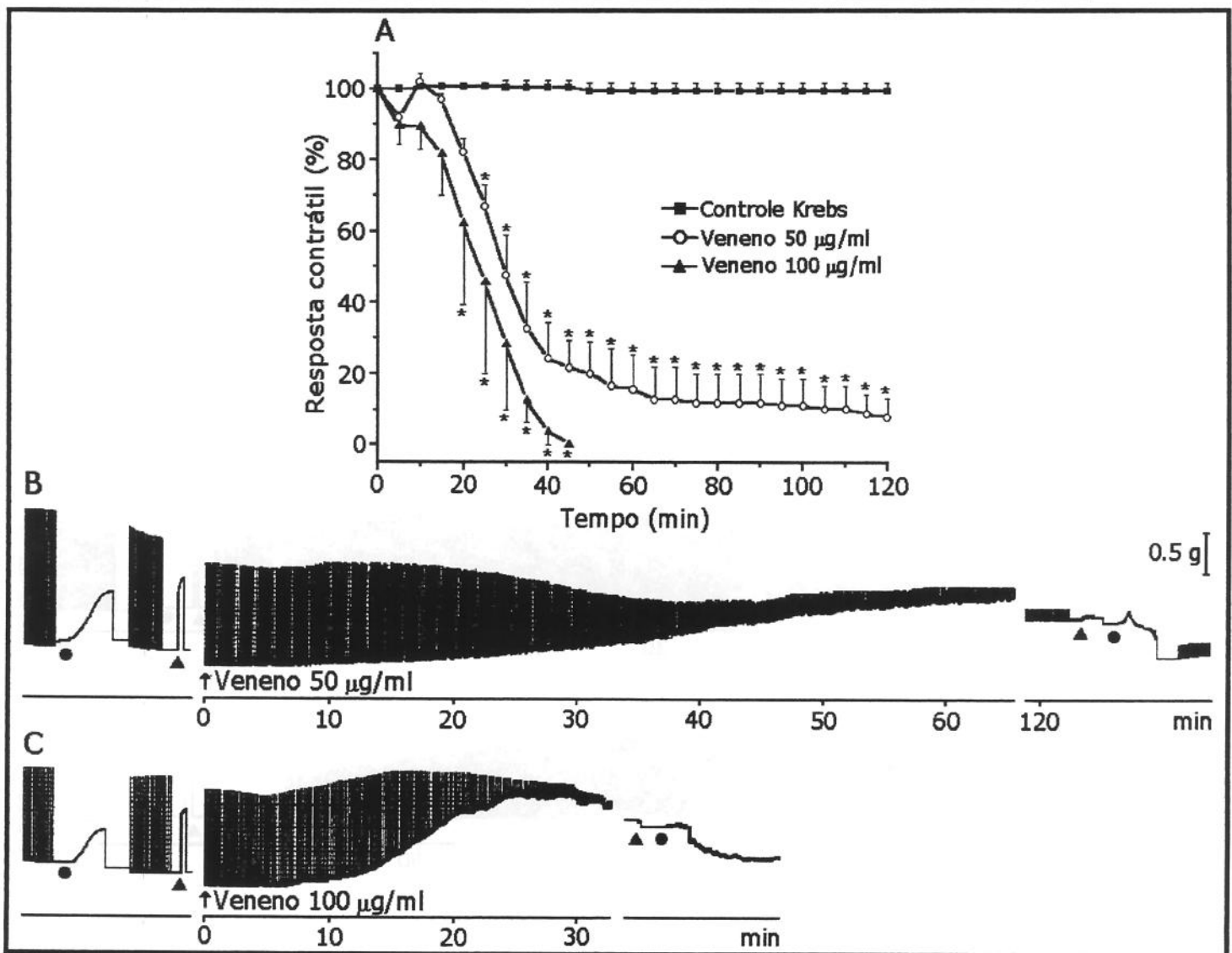
| Concentração (µg/ml) | Tempo para 50% de bloqueio (min) | N |
|----------------------|----------------------------------|---|
| 1                    | -                                | 3 |
| 5                    | $64,5 \pm 4,3$                   | 4 |
| 10                   | $46,5 \pm 3,5$                   | 4 |
| 50                   | $30,7 \pm 3,0$                   | 3 |
| 100                  | $24,0 \pm 4,2$                   | 3 |

Os resultados estão expressos pela média de experimentos  $\pm$  erro padrão.

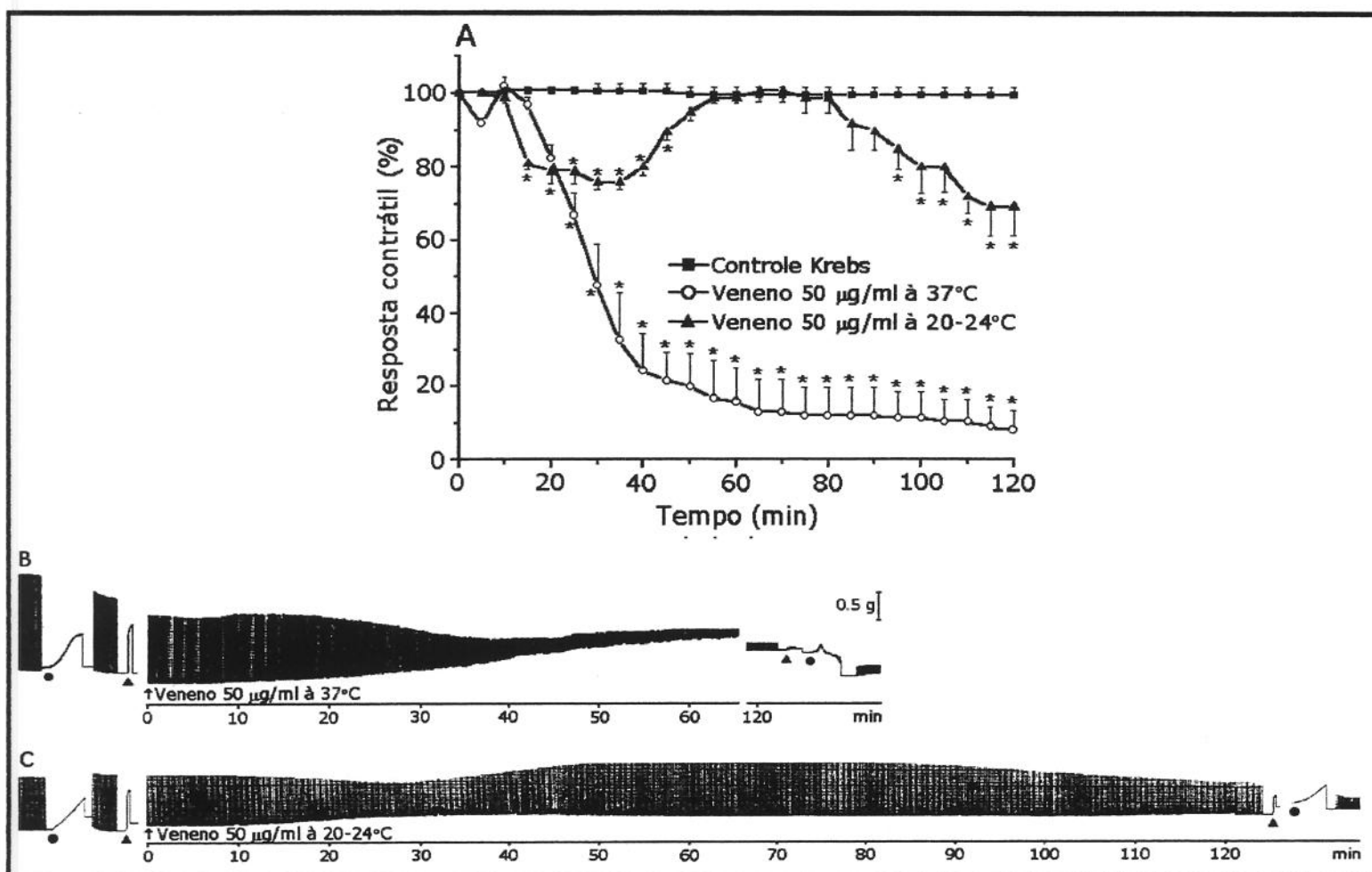




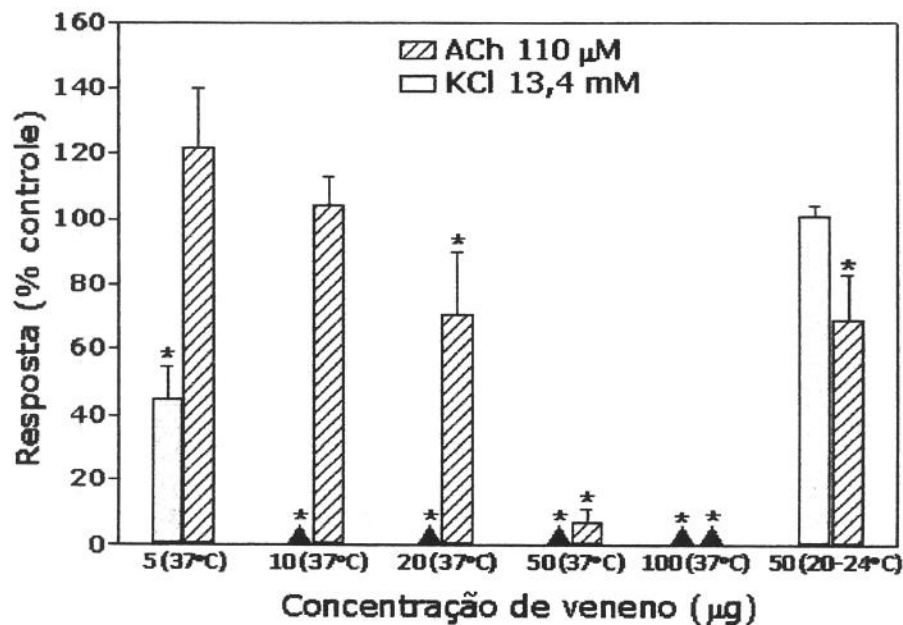
**Figura 4.1.** Efeito do veneno bruto de *B. n. pauloensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, em baixas concentrações (1, 5 and 10 µg/ml), à 37°C. Em A, o gráfico da resposta contrátil em função do tempo, comparando as preparações tratadas com veneno com o controle realizado somente com a solução nutritiva (controle Krebs). Cada ponto representa a média de 3-6 experimentos  $\pm$  S.E.M. Em B, o registro representativo da resposta contrátil da preparação incubada somente com Krebs. Em C e D, as preparações tratadas com o veneno, nas concentrações indicadas, que foi adicionado (seta) após 15 min de estabilização. As respostas à ACh (▲, 110 µM) e ao KCl (●, 13,4 mM) foram obtidas antes e após a incubação com o veneno. Note o bloqueio total produzido por 5 µg de veneno/ml com manutenção das respostas à ACh e ao KCl na ausência de contratura, bem como a contratura e o bloqueio da resposta ao KCl induzidos por 10 µg de veneno/ml. Estes resultados são representativos de 3-6 experimentos. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.



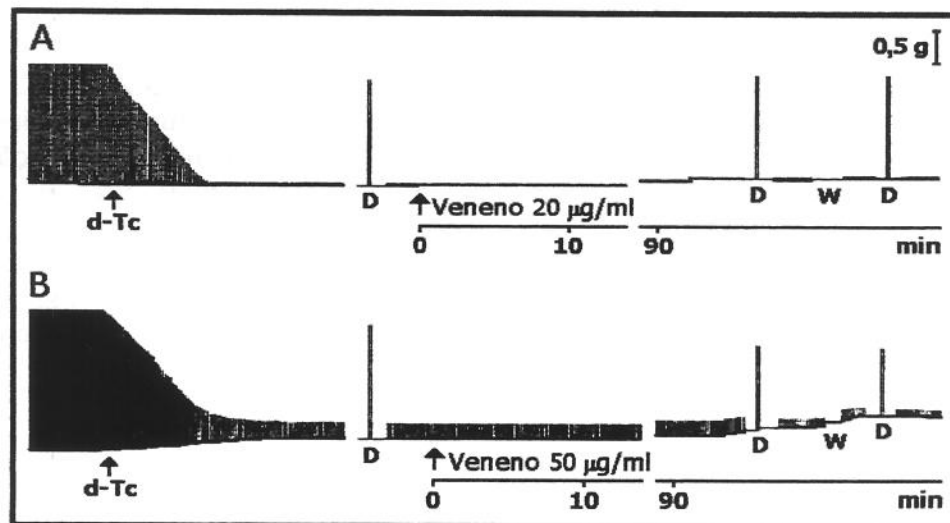
**Figura 4.2.** Efeito do veneno bruto de *B. n. pauloensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, em altas concentrações (50 e 100 µg/ml), à 37°C. Em A, o gráfico da resposta contrátil em função do tempo, comparando as preparações tratadas com veneno com o controle Krebs. Cada ponto representa a média de 3-6 experimentos  $\pm$  S.E.M. Em B, o registro representativo da resposta contrátil da preparação incubada somente com Krebs. Em C e D, as preparações tratadas com o veneno, nas concentrações indicadas, que foi adicionado (seta) após 15 min de estabilização. As respostas à ACh ( $\blacktriangle$ , 110 µM) e ao KCl ( $\bullet$ , 13,4 mM) foram obtidas antes e após a incubação com o veneno. Note o bloqueio da resposta à ACh que iniciou-se a partir de 50 µg de veneno/ml e as contraturas de intensidade dependente da concentração, obtidas a partir de 10 µg de veneno/ml (Figura 4.1). Estes resultados são representativos de 3-6 experimentos. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.



**Figura 4.3.** Efeito do veneno bruto de *B. n. pauloensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 20-24°C. Em A, o gráfico da resposta contrátil em função do tempo, comparando as preparações incubadas com o veneno à 20-24°C com aquelas incubadas à 37°C, na mesma concentração. Cada ponto representa a média de 3-6 experimentos  $\pm$  S.E.M. Em B e C, os registros representativos das respostas contráteis das preparações incubadas com veneno à 37°C e à 20-24°C, respectivamente, que foi adicionado (seta) após 15 min de estabilização. As respostas à ACh ( $\blacktriangle$ , 110  $\mu\text{M}$ ) e ao KCl ( $\bullet$ , 13,4 mM) foram obtidas antes e após o tratamento com o veneno. Estes resultados são representativos de 3-4 experimentos. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.



**Figura 4.4.** Efeito do veneno de *B. n. pauloensis* sobre as respostas aos agonistas ACh (110  $\mu$ M) e KCl (13.4 mM) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, após 120 min de incubação (média  $\pm$  S.E.M. de 3-6 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle, 100%). As preparações foram incubadas com o veneno nas concentrações e temperaturas indicadas sob cada histograma. Os símbolos ( $\blacktriangle$ ) sobre o eixo de X indicam que o veneno bloqueou totalmente a resposta ao agonista. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle Krebs.



**Figura 4.5.** Efeito do veneno de *B. n. pauloensis* em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica direta. Em A e B, as preparações tratadas com veneno, nas concentrações indicadas (seta, tempo zero). Os estímulos diretos (D) foram aplicados antes e após o tratamento com d-Tc, e após várias lavagens com Krebs. Estes resultados são representativos de 3-5 experimentos.

#### 4.1.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

##### 4.1.2.1. Estimulação elétrica indireta

A preparação nervo-músculo de camundongo mostrou-se menos sensível à ação bloqueadora neuromuscular do veneno bruto em comparação com a preparação de ave, quando submetida a estímulo elétrico indireto. Nessa preparação, o bloqueio neuromuscular, também irreversível e dependente da concentração, ocorreu somente em concentrações acima de 20 µg/ml (Figuras 4.6 e 4.7). Em concentrações mais baixas, a margem de bloqueio não foi significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (Figuras 4.6 e 4.7B). A Tabela 4.2 apresenta o tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio em cada concentração utilizada.

Realizaram-se também experimentos em que o  $\text{Ca}^{2+}$  (1,8 mM) foi substituído pelo  $\text{Sr}^{2+}$  (4,0 mM), quando se obteve uma inibição significativa ( $p < 0,05$  em  $t_{90}$ - $t_{120}$ ) em relação aos experimentos-controle ensaiados com  $\text{Ca}^{2+}$ , porém muito menos intensa do que a obtida nos ensaios em que o veneno (na mesma concentração) foi incubado na presença de cálcio. A margem de bloqueio, nessas condições, foi de  $40 \pm 8\%$ , após 120 min de incubação com o veneno, na concentração de 50 µg/ml (Figura 4.8).

Nos experimentos-controle, a resposta contrátil manteve-se estável (99,6% de resposta,  $n=3$ ), durante 120 minutos, com incubação em Tyrode (Figura 4.6 A e B).

#### 4.1.2.1. Estimulação elétrica direta

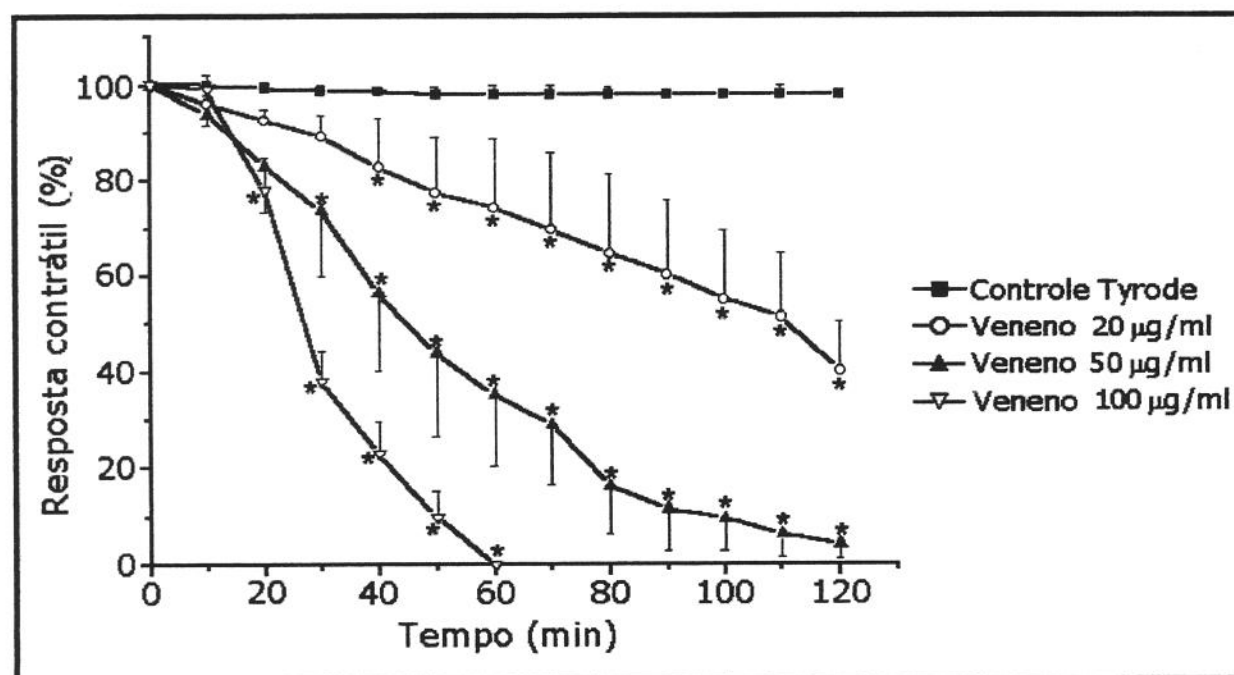
À semelhança do que ocorreu com a preparação de ave, observou-se também bloqueio da contração muscular em resposta à estimulação elétrica direta na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Este efeito também foi observado somente a partir de 50  $\mu\text{g}$  de veneno/ml ( $74 \pm 18\%$  de bloqueio em 90 minutos;  $n = 6$ ) e ilustrado na Figura 4.9.

Na concentração de 20  $\mu\text{g}$ /ml, o bloqueio não foi significativo em relação ao controle (Fig. 4.9). Os resultados obtidos com a concentração de 50  $\mu\text{g}$ /ml passaram a ser estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) daqueles obtidos com 20  $\mu\text{g}$  de veneno/ml a partir de 30 min de incubação. Quando compararam-se as respostas entre estímulo direto e indireto, 50  $\mu\text{g}$  de veneno/ml não apresentaram diferenças significativas, demonstrando que, nessa concentração, o bloqueio da resposta à estimulação direta não se diferencia daquele obtido sob estimulação indireta. Já com 20  $\mu\text{g}$  de veneno/ml, a resposta à estimulação direta mostrou-se estatisticamente diferente daquela em resposta à estimulação indireta após 30 min de incubação.

**Tabela 4.2.** Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, incubada com o veneno bruto. Todos os dados incluídos na tabela foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0.05$ ). Na concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$ , o veneno não induziu bloqueio estatisticamente significativo.

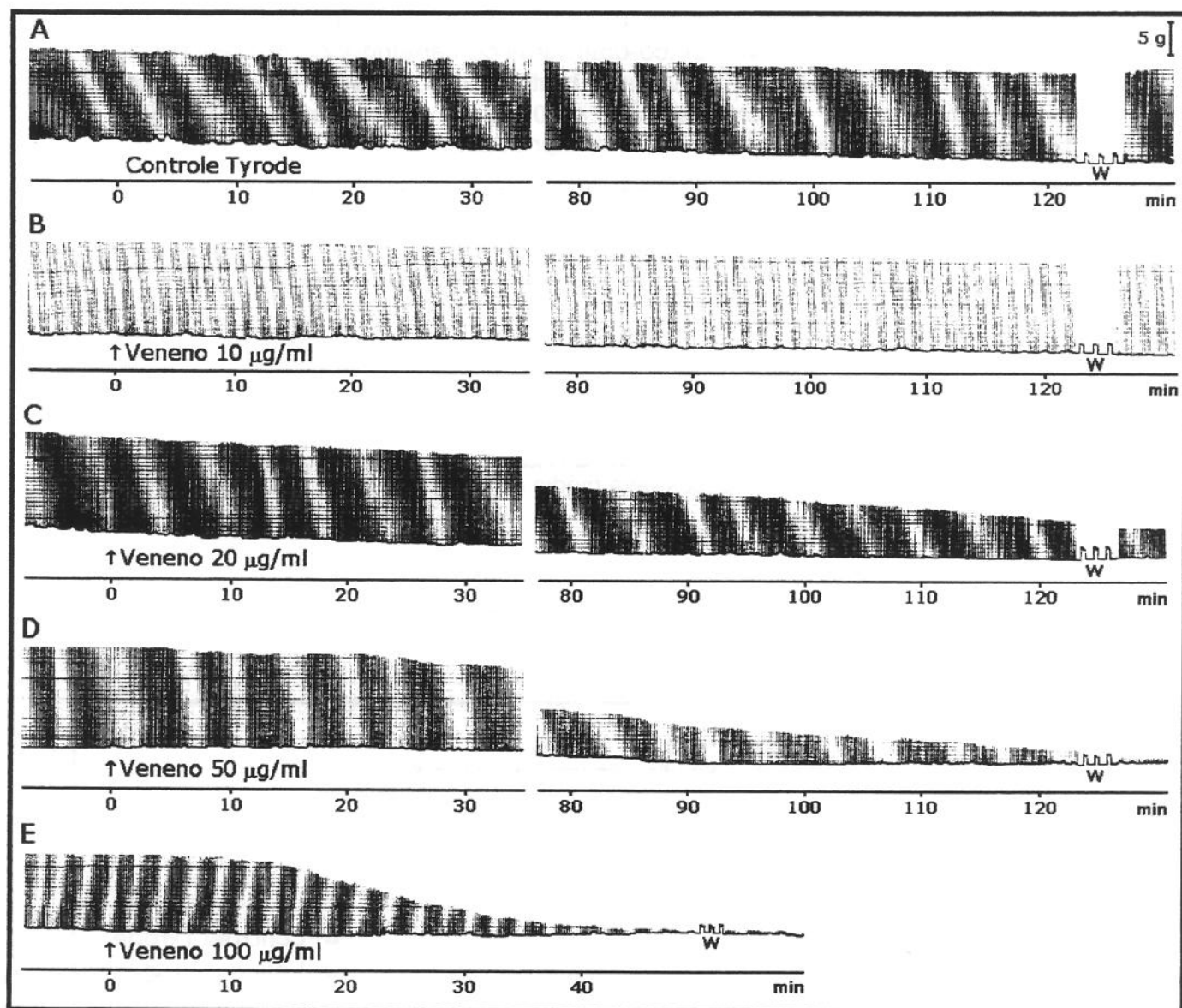
| Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Tempo para 50% de bloqueio (min) | N |
|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| 10                                | -                                | 4 |
| 20                                | $100,7 \pm 7,0$                  | 6 |
| 50                                | $40,0 \pm 12$                    | 4 |
| 100                               | $28,3 \pm 6,4$                   | 3 |

Os resultados estão expressos pela média de experimentos  $\pm$  erro padrão.



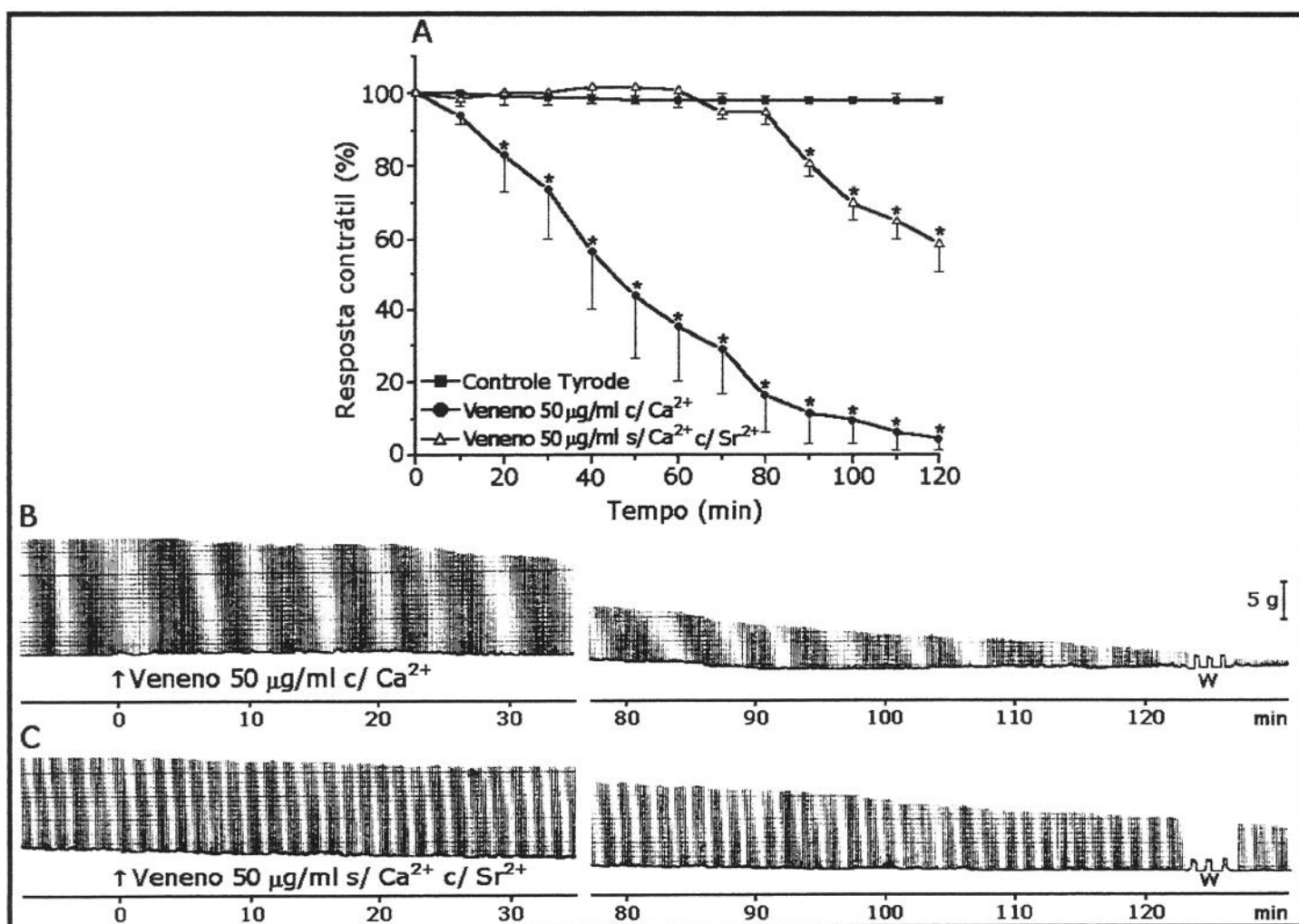
**Figura 4.6.** Efeito do veneno bruto de *B. n. pauloensis* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C. O gráfico da resposta contrátil em função do tempo compara as preparações tratadas com veneno, nas concentrações indicadas, com o controle realizado somente com a solução nutritiva (controle Tyrode). Cada ponto representa a média de 3-8 experimentos  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle Tyrode.



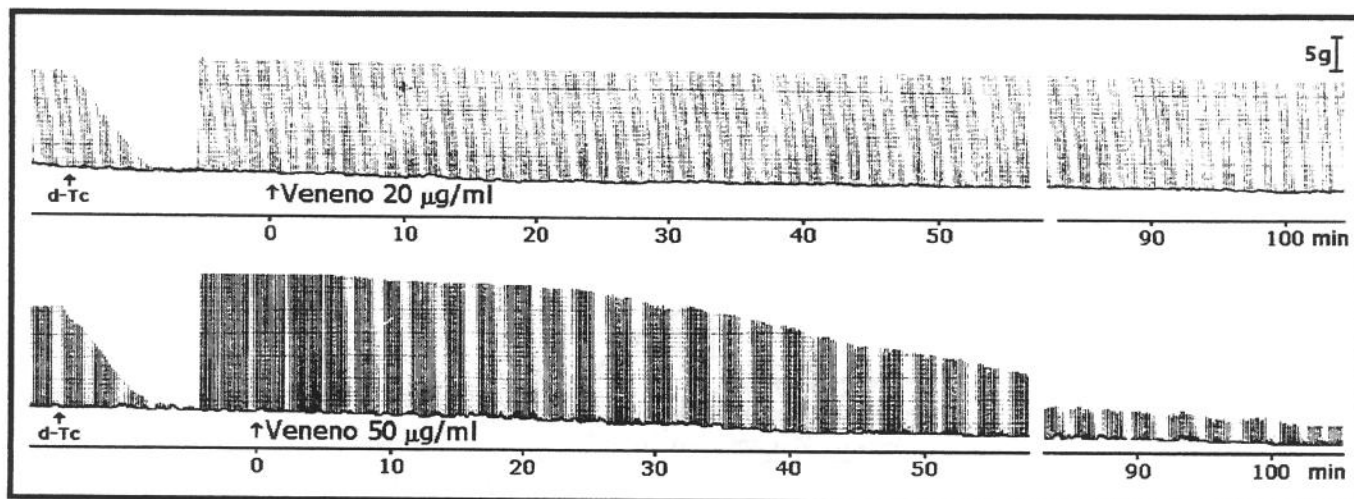


**Figura 4.7.** Registros do efeito do veneno bruto de *B. n. pauloensis* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C. Em A, o registro representativo da resposta contrátil da preparação incubada somente com Tyrode. Em B, C, D e E, as preparações tratadas com o veneno, nas concentrações indicadas, que foi adicionado (seta) após 15 min de estabilização. Estes resultados são representativos de 3-6 experimentos.





**Figura 4.8.** Comparação do efeito do veneno bruto de *B. n. pauloensis* sobre preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C, na ausência e na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em A, o gráfico da resposta contrátil em função do tempo, comparando as preparações incubadas com o veneno na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  com aquelas em que o  $\text{Ca}^{2+}$  foi substituído por  $\text{Sr}^{2+}$ . Cada ponto representa a média de 3-6 experimentos  $\pm$  S.E.M. Em B e C, os registros representativos do efeito observado no gráfico. O veneno foi adicionado (seta) após 15 min de estabilização. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.

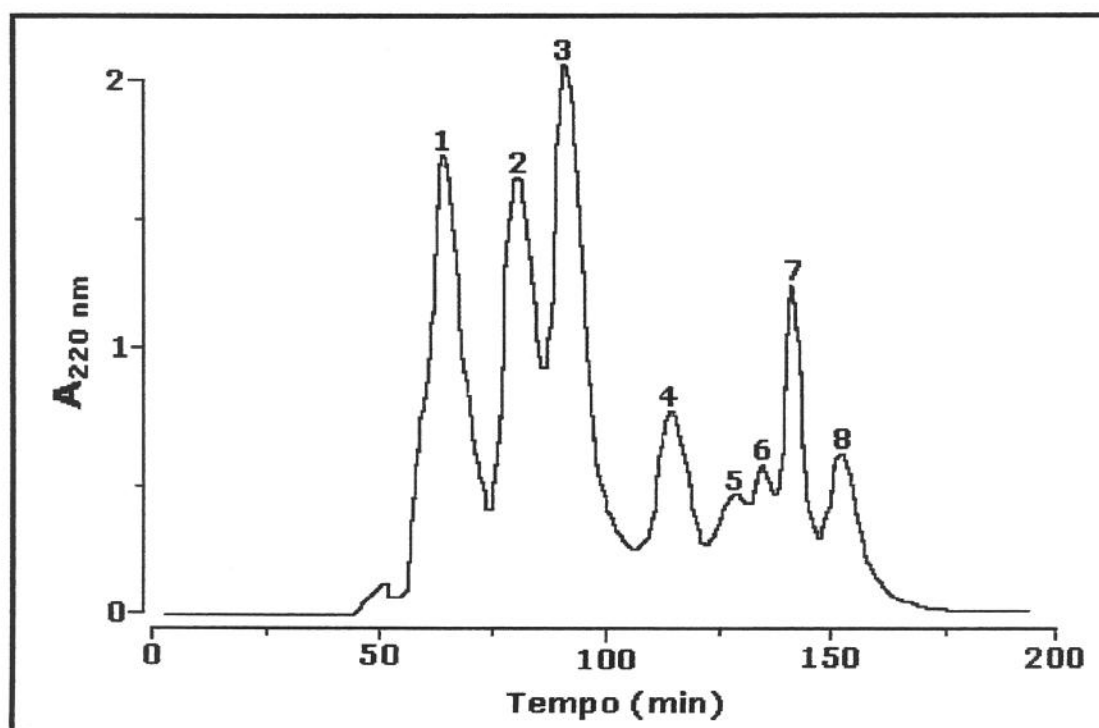


**Figura 4.9.** Efeito do veneno de *B. n. pauloensis* em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica direta. Após o tratamento com d-Tc, aplicou-se estimulação direta (50 V) e as preparações foram incubadas com o veneno, nas concentrações indicadas (seta, tempo zero). Estes resultados são representativos de 3-6 experimentos.

## 4.2. Estudo bioquímico do veneno total

### 4.2.1. HPLC de exclusão molecular e atividades enzimáticas

O fracionamento do veneno de *B. n. pauloensis* em uma coluna Protein Pack 300SW resultou em oito picos (Figura 4.10). O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. A atividade PLA<sub>2</sub>, presente no veneno, foi investigada em cada pico e encontrada nos picos 2 e 3 e sua estimativa foi apresentada na Tabela 4.3.



**Figura 4.10.** Cromatografia do veneno de *B. n. pauloensis* por HPLC de exclusão molecular.

**Tabela 4.3.** Atividade  $\text{PLA}_2$  do veneno total e das frações parcialmente purificadas. Entre as frações correspondentes ao oito picos obtidos, somente aquelas correspondentes aos picos 2 e 3 apresentaram atividade  $\text{PLA}_2$ , sendo a do pico 3 mais expressiva.

| Fração | Atividade $\text{PLA}_2$ (nmoles/min) |
|--------|---------------------------------------|
| Veneno | 12,7                                  |
| Pico 2 | 25,8                                  |
| Pico 3 | 48,2                                  |

### 4.3. Estudo miográfico das frações parcialmente purificadas

#### 4.3.1. Preparação *biventer cervicis* de pintainho

As frações parcialmente purificadas, provenientes do fracionamento por HPLC de exclusão molecular (Figura 4.10), foram incubadas com preparações isoladas de ave. A atividade neuromuscular do veneno total foi recuperada nos picos 1, 2 e 3 do perfil de eluição (Tabela 4.4 e Figuras 4.11 e 4.12).

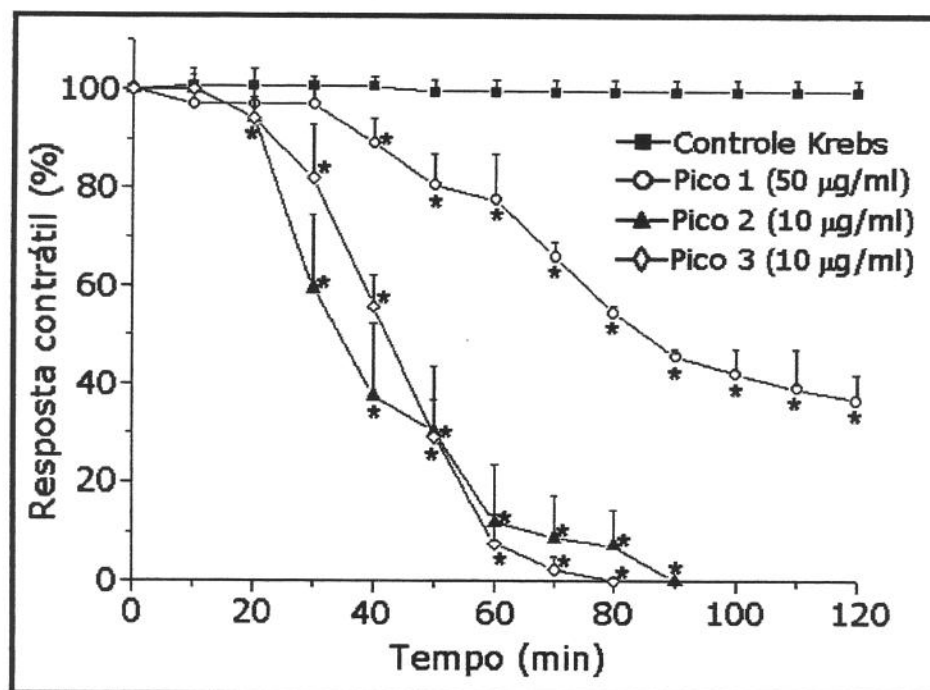
Somente o pico 3 (10 µg/ml) produziu bloqueio neuromuscular completo sem inibir as respostas à ACh e ao KCl. O pico 2 (10 µg/ml) determinou bloqueio total das respostas à estimulação indireta e ao KCl, preservando a resposta à ACh. Já o pico 1 produziu bloqueio parcial somente quando utilizou-se 50 µg de fração/ml, inibindo a resposta à ACh ( $70 \pm 12\%$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ) e abolindo totalmente a contratura ao KCl (Figuras 4.12, 4.13 e 4.14). Em concentrações mais baixas (10 e 20 µg/ml), o pico 1 não produziu bloqueio significativo, mas inibiu as respostas à ACh e ao KCl. As frações correspondentes aos demais picos (4-8) não apresentaram qualquer efeito nesta preparação (dados não demonstrados em figura).

À 20-24°C, o efeito do pico 3 foi abolido, enquanto que o pico 2 produziu um aumento da amplitude da contração muscular, não observado à 37°C, e um posterior bloqueio somente parcial das contrações indiretamente evocadas, preservando a contratura ao KCl e inibindo parcialmente a resposta à ACh ( $30 \pm 8\%$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ).

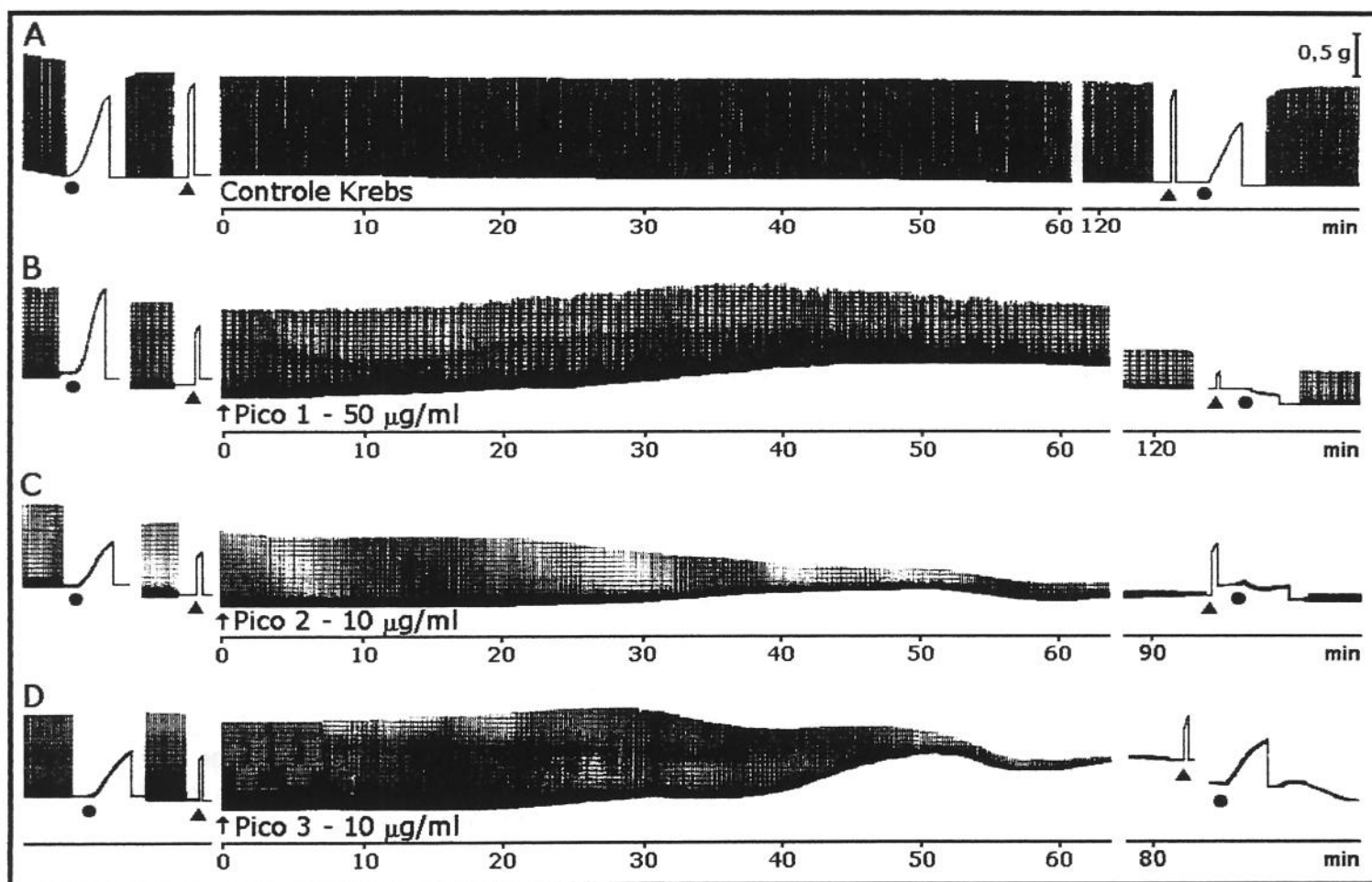
**Tabela 4.4.** Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, incubada com as frações parcialmente purificadas por HPLC de exclusão molecular. O dados obtidos entre os picos 2 e 3 não foram significativamente diferentes entre si.

| Fração (concentração) | Tempo para 50% de bloqueio (min) | N |
|-----------------------|----------------------------------|---|
| Pico 1 (50 µg/ml)     | 85,2 ± 3,4                       | 3 |
| Pico 2 (10 µg/ml)     | 37,7 ± 7,0                       | 4 |
| Pico 3 (10 µg/ml)     | 39,5 ± 3,7                       | 4 |

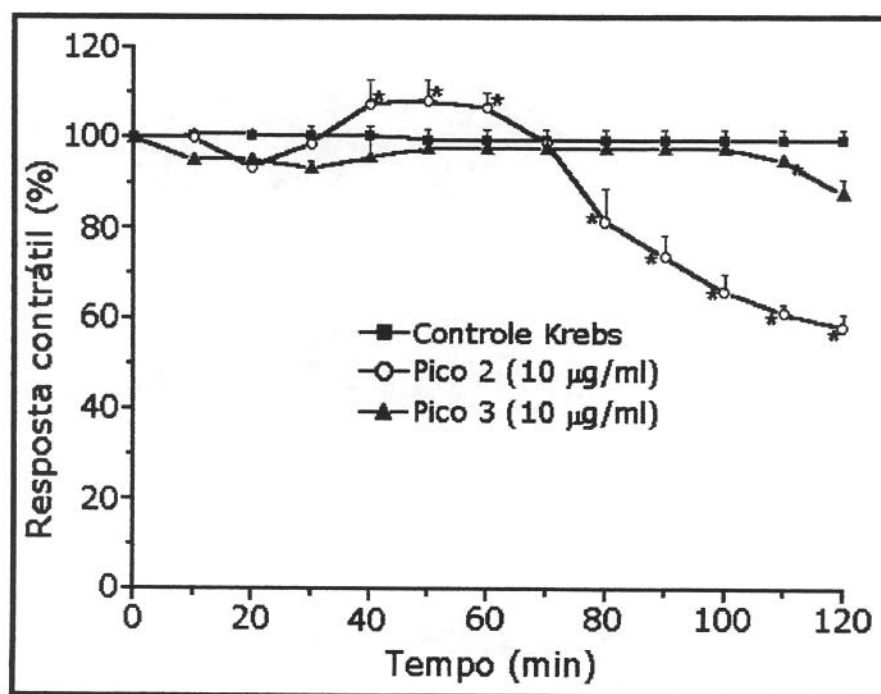
Os resultados estão expressos pela média de experimentos ± erro padrão.



**Figura 4.11.** Efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C. O gráfico da resposta contrátil em função do tempo compara as preparações tratadas com as frações, nas concentrações indicadas com o controle Krebs. Cada ponto representa a média de 3-4 experimentos ± S.E.M. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.

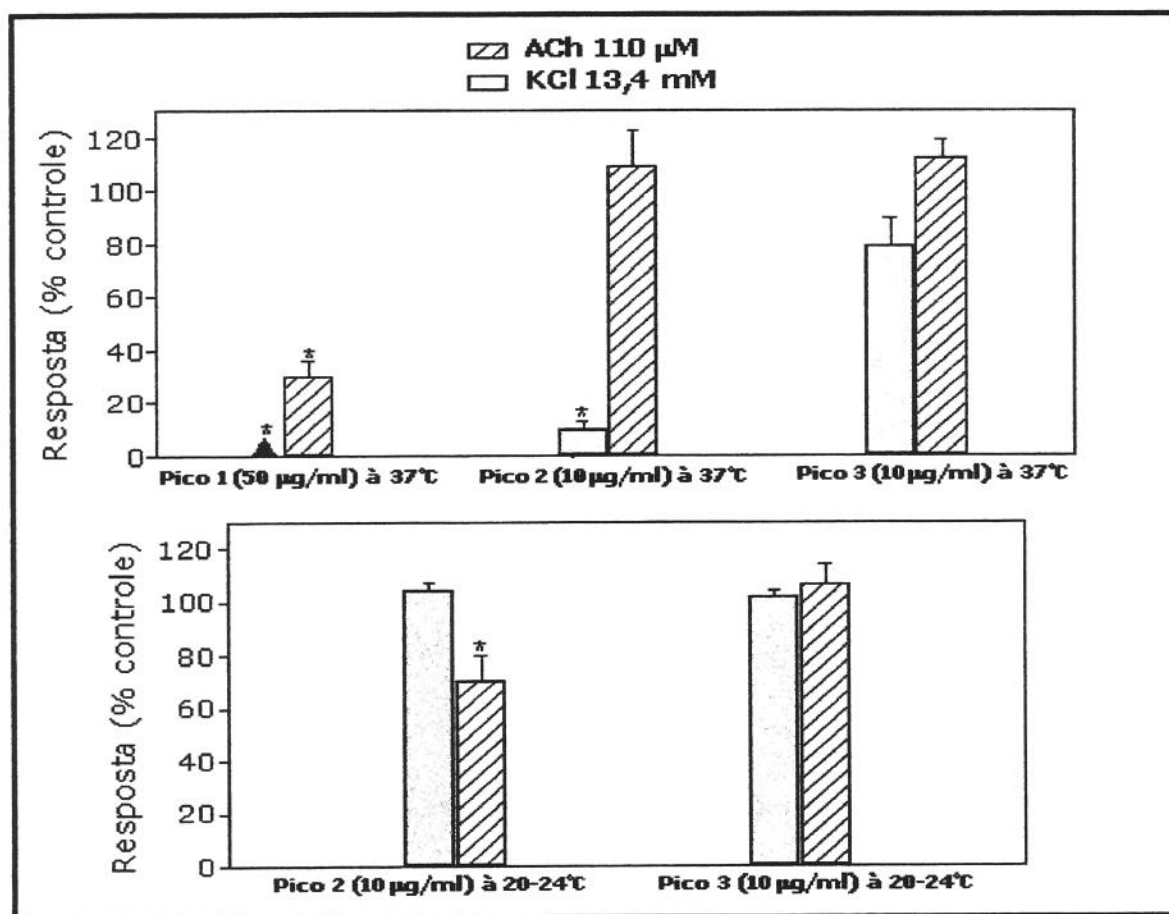


**Figura 4.12.** Registro do efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C. Em A, o registro representativo da resposta contrátil da preparação incubada somente com Krebs. Em B, C e D, as preparações tratadas com as frações, nas concentrações indicadas, que foram adicionadas (seta) após 15 min de estabilização. As respostas à ACh ( $\blacktriangle$ , 110  $\mu\text{M}$ ) e ao KCl ( $\bullet$ , 13,4 mM) foram obtidas antes e após a incubação com o veneno. Note que somente o pico 3 produziu bloqueio total sem inibir as respostas à ACh e ao KCl. Estes resultados são representativos de 3-4 experimentos.



**Figura 4.13.** Efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 20-24°C. O gráfico da resposta contrátil em função do tempo compara as preparações incubadas com o veneno à 20-24°C com o controle Krebs. Cada ponto representa a média de 3 experimentos  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.

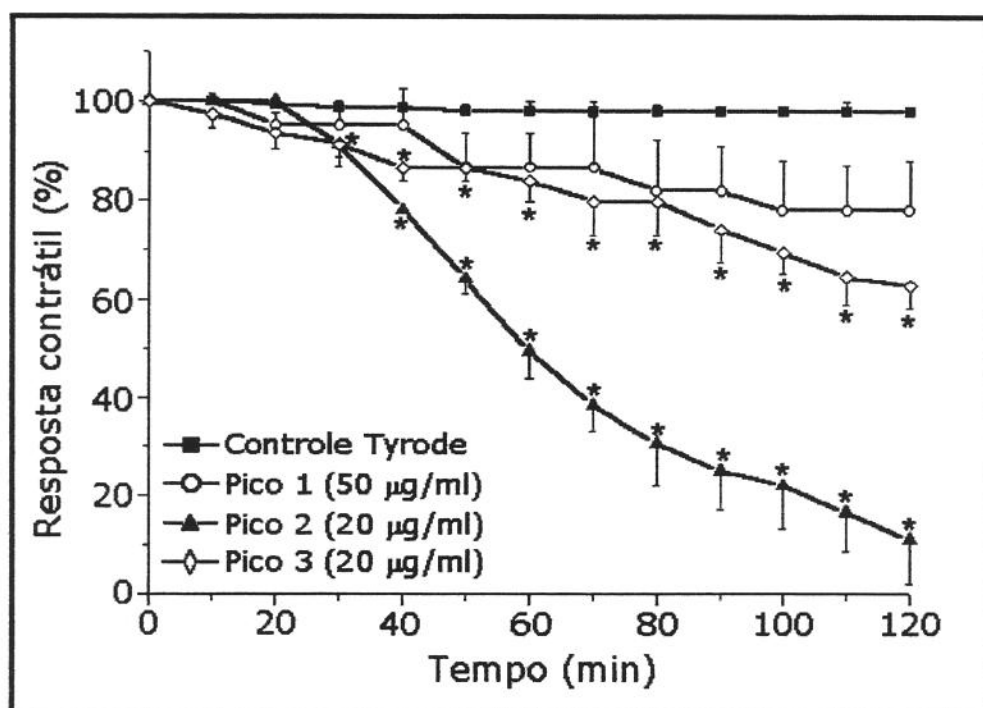




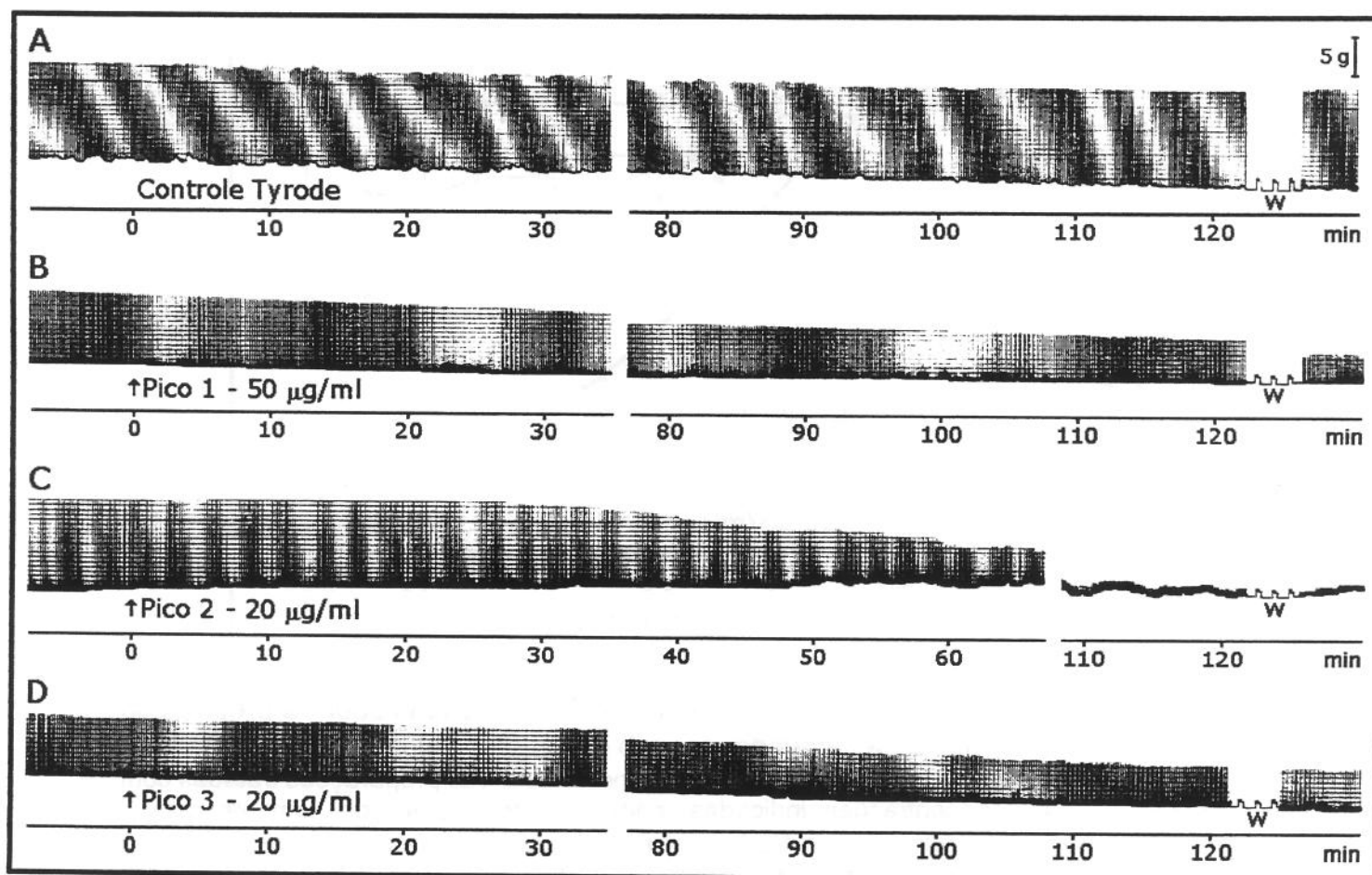
**Figura 4.14.** Efeito das frações parcialmente purificadas sobre as respostas aos agonistas ACh (110  $\mu$ M) e KCl (13.4 mM) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, após 120 min de incubação (média  $\pm$  S.E.M. de 3-4 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle, 100%). As preparações foram incubadas com as frações nas concentrações e temperaturas indicadas sob cada histograma. Os símbolos ( $\blacktriangle$ ) sobre o eixo de X indicam que o veneno bloqueou totalmente a resposta ao agonista. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle Krebs.

#### 4.3.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

As Figuras 4.15 e 4.16 mostram o efeito dos picos 1, 2 e 3 na preparação de camundongo. Nessa preparação, o pico 3 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) produziu somente um bloqueio parcial ( $37.3 \pm 4.3$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ) após 120 min de incubação, enquanto que o pico 2 foi o mais ativo, determinando 50% de bloqueio aos  $55,4 \pm 4,2$  min e  $90,0 \pm 10,3\%$  de inibição em 120 min (20  $\mu\text{g/ml}$ ;  $n = 3$ ). Uma alta concentração de fração, 50  $\mu\text{g/ml}$ , foi necessária para que o pico 1 produzisse algum nível de bloqueio ( $28,0 \pm 5,4\%$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ), pois concentrações inferiores (10-20) não produziram nenhum efeito estatisticamente significativo. As frações correspondentes aos demais picos (4-8) não induziram qualquer efeito significativo (dados não mostrados em figura).



**Figura 4.15.** Efeito das preparações parcialmente purificadas sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C. O gráfico da resposta contrátil em função do tempo compara as preparações tratadas com as frações, nas concentrações indicadas, com o controle realizado somente com a solução nutritiva (controle Tyrode). Cada ponto representa a média de 3-4 experimentos  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle Tyrode.



**Figura 4.16.** Registro do efeito das frações parcialmente purificadas sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C. Em A, o registro representativo da resposta contrátil da preparação incubada somente com Tyrode. Em B, C e D, as preparações tratadas com as frações, nas concentrações indicadas, que foram adicionadas (seta) após 15 min de estabilização. Estes resultados são representativos de 3-4 experimentos.

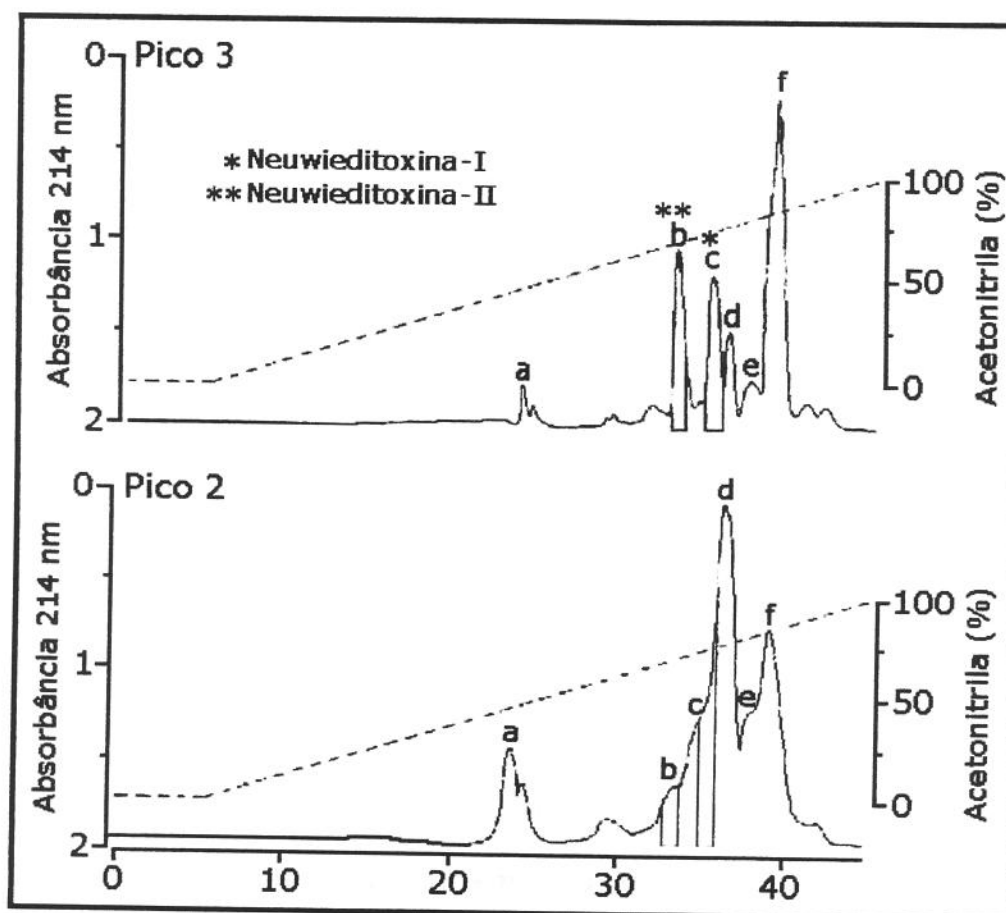
#### 4.4. Estudo bioquímico e miográfico dos polipeptídios purificados

##### 4.4.1. HPLC de fase reversa

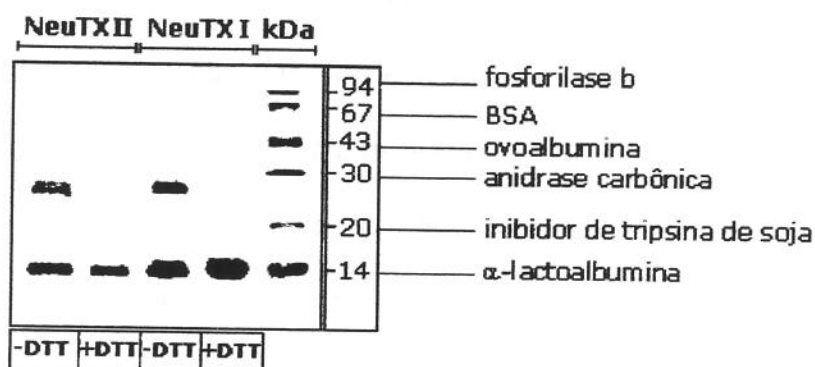
As duas frações parcialmente purificadas mais ativas em preparações neuromusculares isoladas foram fracionadas por HPLC de fase reversa. A repurificação de cada fração resultou em 6 picos (Figura 4.17), entre os quais o segundo e o terceiro picos deram origem às frações que melhor reproduziram os efeitos do veneno total em preparação de ave, denominadas neuwieditoxina-II (NeuTX-II) e neuwieditoxina-I (NeuTX-I), respectivamente. A NeuTX-I representou cerca de 5-7% do veneno total e a NeuTX-II, 3,5%. Após a redução por ditioneitol (DTT), cada uma delas, resultou em uma banda de aproximadamente 14 kDa (Figura 4.18).

Na preparação *biventer cervicis* de pintainho, a NeuTX-I (10 µg/ml) produziu bloqueio neuromuscular total em  $65 \pm 5$  min (n=3), sem afetar as respostas à ACh e ao potássio e sem produzir contraturas. A NeuTX-II produziu bloqueio total em  $85 \pm 5$  min (n=3), sem inibir as respostas à ACh e sem induzir contratura, porém inibiu a resposta ao KCl em  $67 \pm 8\%$  (Figuras 4.19, 4.20, 4.21 e Tabela 4.5).

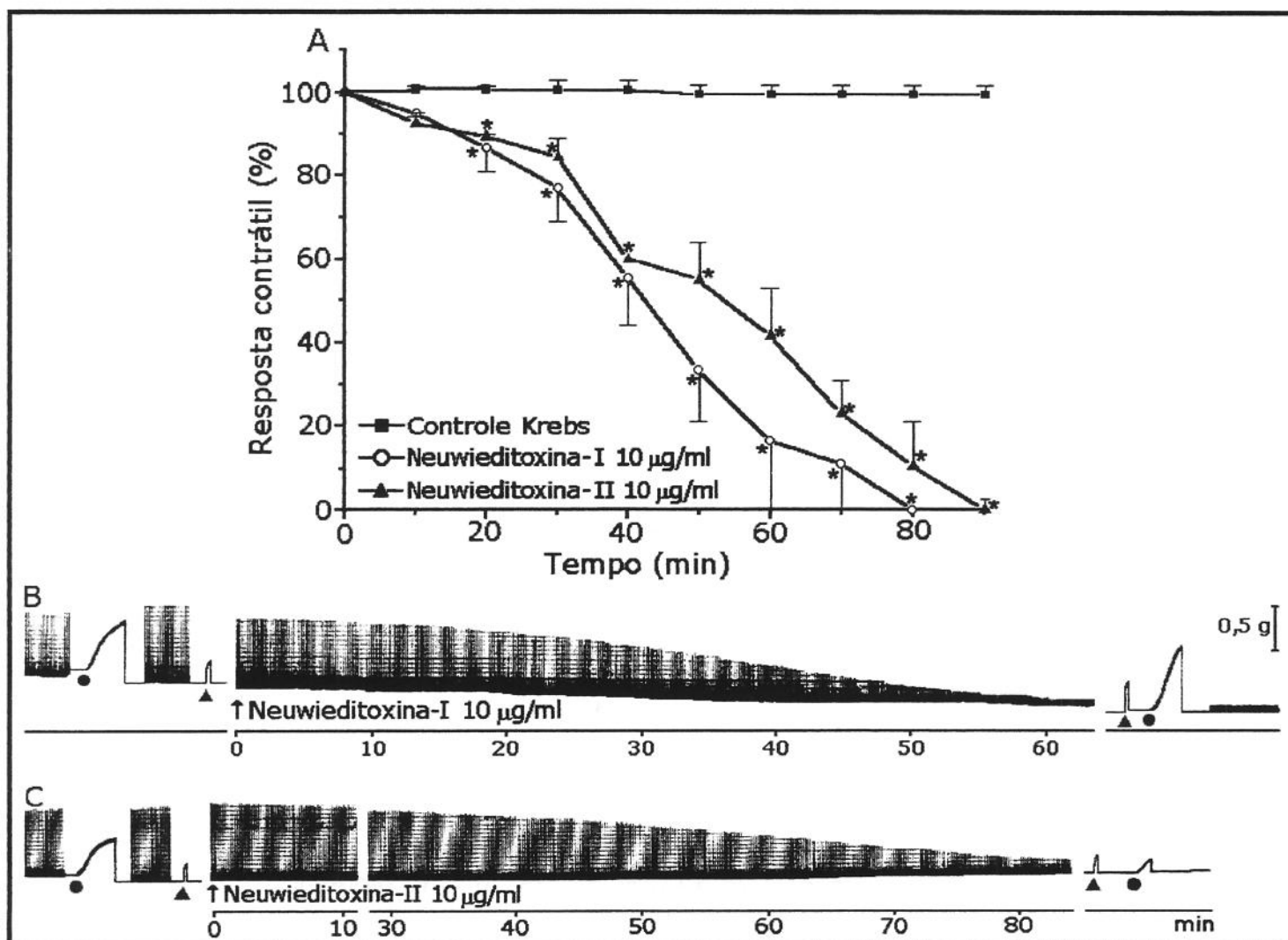
Em relação ao veneno total, o efeito de ambas as toxinas foi estatisticamente diferente do veneno total aos 20 min para ambas as toxinas, e aos 90 min e 100 min de incubação para a NeuTXs-I e II, respectivamente.



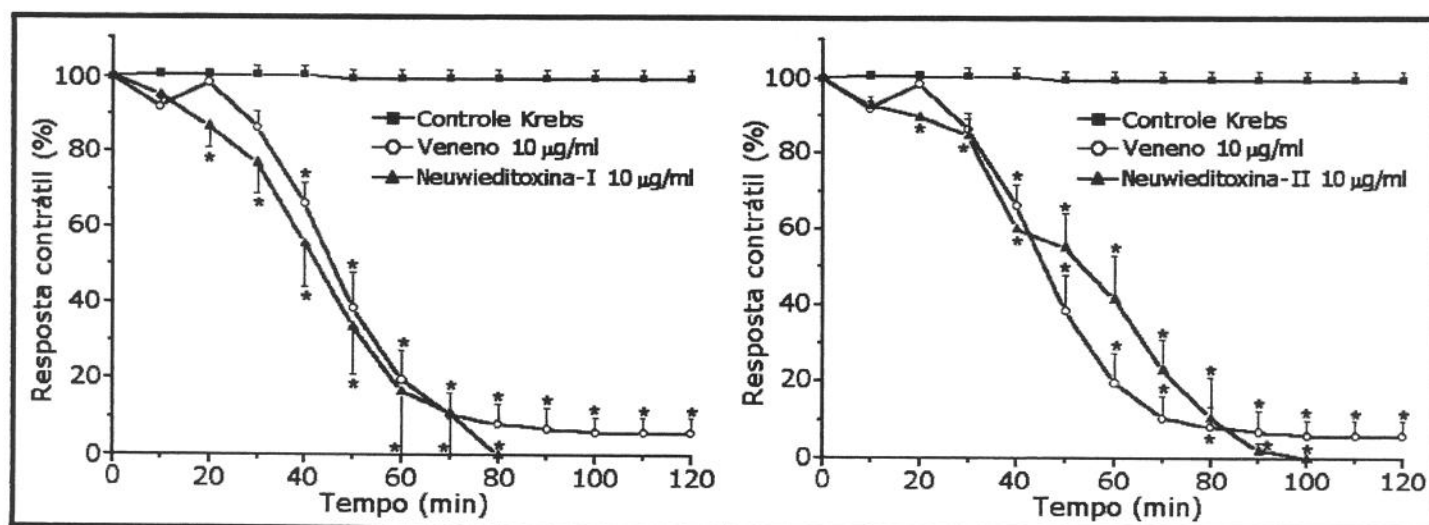
**Figura 4.17.** Cromatografia do veneno de *B. n. pauloensis* por HPLC de fase reversa. Somente as frações correspondentes aos picos b e c, provenientes do pico 3, reproduziram a ação bloqueadora neuromuscular do veneno total. Essas frações foram denominadas NeuTX-I (pico c) e NeuTX-II (pico b).



**Figura 4.18.** Eletroforese em PAGE-SDS-Tricina das frações ativas, NeuTX-I (NeuTX-I) e NeuTX-II (NeuTX-II), antes (-DTT) e após (+DTT) a redução por ditioneitol (DTT). À direita, estão indicados os marcadores de massa molecular utilizados.



**Figura 4.19.** Efeito das NeuTXs-I e II sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C. Em A, o gráfico da resposta contrátil em função do tempo, comparando as preparações tratadas com as toxinas com o controle realizado somente com a solução nutritiva (controle Krebs). Cada ponto representa a média de 3 experimentos  $\pm$  S.E.M. Em B e C, as preparações tratadas com as toxinas, nas concentrações indicadas, que foram adicionadas (seta) após 15 min de estabilização. As respostas à ACh ( $\blacktriangle$ , 110  $\mu$ M) e ao KCl ( $\bullet$ , 13,4 mM) foram obtidas antes e após a incubação com as toxinas. Note o bloqueio total produzido pela NeuTX-I com manutenção das respostas à ACh e ao KCl na ausência de contratura, bem como o bloqueio parcial da resposta ao KCl induzido pela NeuTX-II. Estes resultados são representativos de cada 3 experimentos. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.



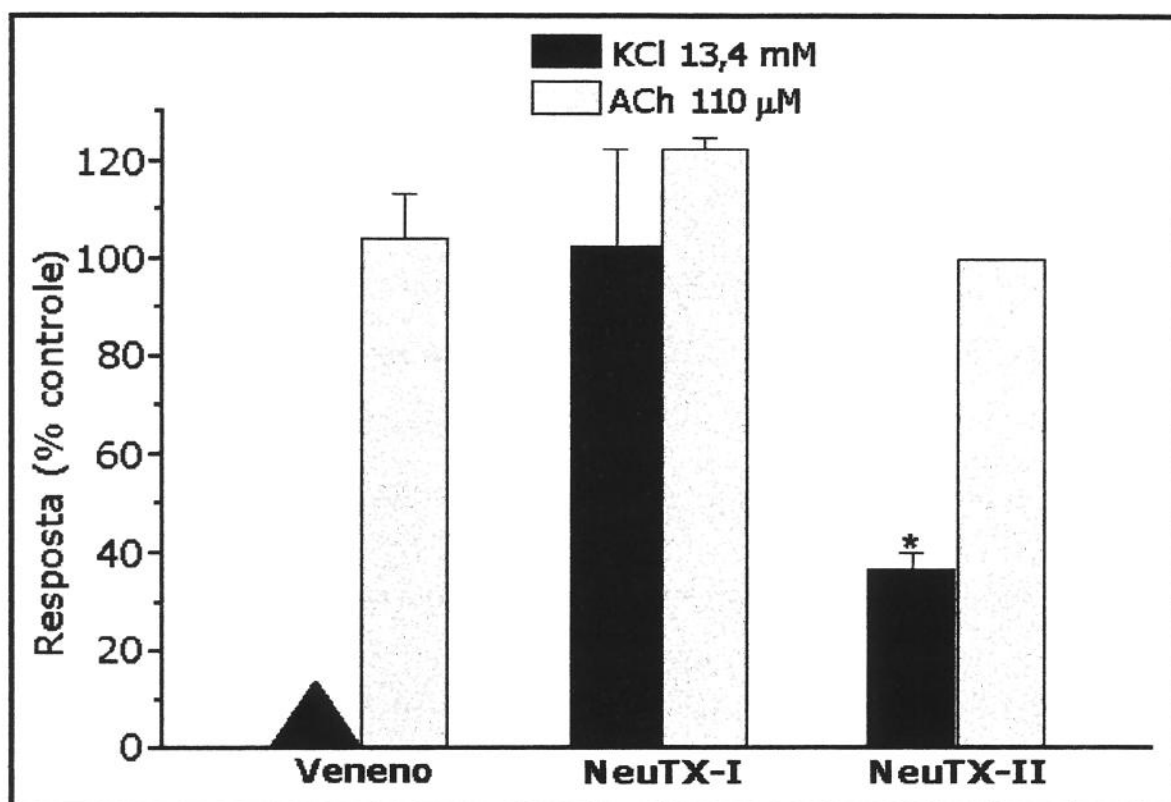
**Figura 4.20.** Comparação do efeito das NeuTXs-I e II sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, à 37°C, com o efeito do veneno total, na mesma concentração. Os gráficos das respostas contráteis em função do tempo comparam as preparações tratadas com as toxinas com o veneno total e com o controle realizado somente com a solução nutritiva (controle Krebs). Cada ponto representa a média de 4 experimentos  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle.

**Tabela 4.5.** Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta, incubada com as NeuTXs-I e II. Os dados incluídos na tabela não foram estatisticamente diferentes dos demais ( $p < 0.05$ ). O efeito do veneno total (10 µg/ml) foi incluído para fins de comparação.

| Amostra (50 µg/ml) | Tempo para 50% de bloqueio (min) | N |
|--------------------|----------------------------------|---|
| Veneno total       | 46,5 $\pm$ 3,5                   | 4 |
| NeuTX-I            | 40,2 $\pm$ 6,0                   | 3 |
| NeuTX-II           | 54,0 $\pm$ 8,7                   | 3 |

Os resultados estão expressos pela média de experimentos  $\pm$  erro padrão.

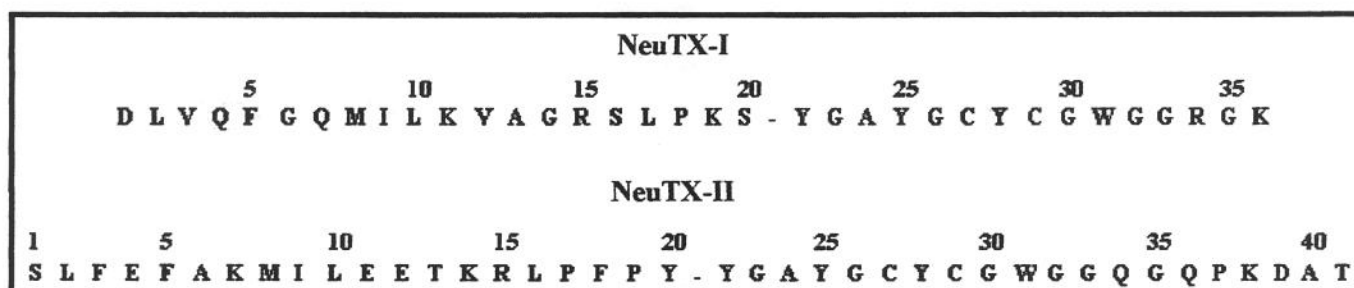




**Figura 4.21.** Efeito das NeuTXs I e II sobre as respostas aos agonistas ACh (110  $\mu$ M) e KCl (13,4 mM) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, à 37°C, após 120 min de incubação (média  $\pm$  S.E.M. de 3-4 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle, 100%). O efeito do veneno foi incluído para fins de comparação. As preparações foram incubadas com as toxinas nas concentrações indicadas sob cada histograma. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle Krebs.

#### 4.4.2. Determinação da sequência amino-terminal das NeuTXs-I e II

As seqüências das porções amino-terminal das NeuTXs-I e II são dadas na Figura 4.22. Foram identificados 36 resíduos de aminoácidos para a NeuTX-I e 41 resíduos para a NeuTX-II. Essas toxinas apresentaram 53% de homologia entre si. A Figura 4.23 apresenta as abreviações de aminoácidos empregadas neste trabalho, usualmente utilizadas na apresentação de seqüências de toxinas.



**Figura 4.22.** Sequências das porções amino-terminal das NeuTXs-I e II. Em destaque (cinza), os principais resíduos de aminoácidos altamente conservados nas PLA<sub>2</sub> Asp-49.

|                 |     |   |
|-----------------|-----|---|
| Ácido Aspártico | Asp | D |
| Ácido Glutâmico | Glu | E |
| Alanina         | Ala | A |
| Arginina        | Arg | R |
| Asparagina      | Asn | N |
| Cisteína        | Cys | C |
| Fenilalanina    | Phe | F |
| Glicina         | Gly | G |
| Glutamina       | Gln | Q |
| Histidina       | His | H |
| Isoleucina      | Ile | I |
| Leucina         | Leu | L |
| Lisina          | Lys | K |
| Metionina       | Met | M |
| Prolina         | Pro | P |
| Serina          | Ser | S |
| Tirosina        | Tyr | Y |
| Treonina        | Thr | T |
| Triptofano      | Trp | W |
| Valina          | Val | V |

**Figura 4.23.** Lista de abreviações de aminoácidos. Em destaque (cinza), as abreviações já convencionais, as quais foram utilizadas na apresentação deste trabalho.

#### 4.4.3. Comparação das seqüências das toxinas NeuTXs I e II com as das $\beta$ -neurotoxinas e miotoxinas PLA<sub>2</sub> descritas na literatura

As Figuras 4.24, 4.25, 4.26 e 4.27 alinham as seqüências amino-terminal das toxinas NeuTXs-I e II com as das  $\beta$ -neurotoxinas e PLA<sub>2</sub> miotóxicas descritas na literatura e apresentam a porcentagem de homologia encontrada entre elas.

A NeuTX-I apresentou 57-66% de homologia com miotoxinas de venenos botrópicos (BthTX-I e II, Bneu-I, piratoxinas I e II, Basp-II e BnSP-7), bem como 51-54% de homologia em relação a algumas  $\beta$ -neurotoxinas monoméricas de venenos serpentes da família Viperidae (caudoxina, agkistrodotoxina, ammoditoxina) e multiméricas da família Elapidae (subunidade  $\alpha$  da taipoxina e subunidade B da textilotoxina).

A NeuTX-II apresentou alto grau de homologia, 92%, com a Basp-III, de *B. asper*, e 61-66% de homologia em comparação com outras miotoxinas botrópicas (BnSP-7, BthTX-I e II, piratoxinas I e II, Basp-II e Bneu) e também com a ACLMT, miotoxina de *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Em relação às  $\beta$ -neurotoxinas, a NeuTX-II apresentou 51-61% de homologia quando comparada a multiméricas (subunidades B da crotoxina, da trimucrotoxina e da mojavetoxina) e monoméricas (ammoditoxina, agkistrodotoxina e caudoxina).

|                    | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | H% |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |     |
|--------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|
| NeuTX-I            | D | L | L  | V  | Q  | F  | G  | Q  | M  | I | L | K | V | A | G | R | S | L | P | K | S | - | Y | G | A | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | R | G | K  | 100 |
| Caudox*            | N | L | L  | I  | Q  | F  | G  | N  | M  | I | S | A | M | T | G | K | S | S | L | A | - | - | Y | A | S | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | K | G | Q  | 54  |
| Taipox- $\alpha$ * | N | L | L  | L  | Q  | F  | G  | F  | M  | I | R | C | A | N | R | R | S | R | P | V | W | H | Y | M | D | Y | G | C | Y | C | G | K | G | G | S | G | T  | 54  |
| AgkisTX            | N | L | L  | L  | Q  | F  | N  | K  | M  | I | K | E | E | T | G | K | N | I | P | F | Y | - | A | F | - | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | Q | G | K  | 51  |
| AmodiTX            | S | L | L  | L  | E  | F  | G  | M  | M  | I | L | G | E | T | G | K | N | P | L | T | S | F | Y | S | F | Y | G | C | Y | C | G | V | G | G | K | G | T  | 51  |
| TextilTX-B         | D | L | V  | E  | F  | G  | F  | M  | I  | R | C | A | N | R | N | S | Q | P | A | W | Q | Y | M | D | Y | G | C | Y | C | G | K | R | G | S | G | T | 51 |     |
| TrimucrTX          | N | L | L  | L  | Q  | F  | N  | K  | M  | I | K | I | M | T | K | K | N | A | I | P | F | - | Y | S | S | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | Q | G | K  | 48  |
| Mojave-B*          | H | L | L  | L  | Q  | F  | N  | K  | M  | I | K | E | E | T | G | K | N | A | I | P | F | - | Y | A | F | Y | G | C | Y | C | G | G | G | G | Q | G | K  | 48  |
| Notec-II-5*        | N | L | V  | Q  | F  | S  | Y  | L  | I  | Q | C | A | N | H | G | R | R | P | T | R | H | Y | M | D | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | S | G | T | 48 |     |
| TextilTX-A         | N | L | V  | Q  | F  | S  | Y  | L  | I  | R | C | A | N | K | Y | K | R | P | G | W | H | Y | A | N | Y | G | C | Y | C | G | S | G | G | R | G | T | 48 |     |
| Taipox- $\beta$ 1* | N | L | V  | Q  | F  | G  | K  | M  | I  | Q | C | A | I | R | N | R | R | P | A | L | D | F | M | N | Y | G | C | Y | C | G | K | G | G | S | G | T | 48 |     |
| Notex*             | N | L | V  | Q  | F  | S  | Y  | L  | I  | Q | C | A | N | H | G | K | P | P | T | W | H | Y | M | D | Y | G | C | Y | C | G | A | G | G | S | G | T | 46 |     |
| TextilTX-C         | N | L | I  | Q  | F  | S  | N  | M  | I  | K | C | T | I | P | G | S | Q | P | L | L | D | Y | A | N | Y | G | C | Y | C | G | P | G | N | N | G | T | 46 |     |
| CroTX*             | S | L | L  | Q  | F  | N  | K  | M  | I  | K | F | E | T | R | K | N | A | V | P | F | - | Y | A | F | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | Q | R | R | 43 |     |
| $\beta$ -BuTX      | N | L | I  | N  | F  | M  | E  | M  | I  | R | Y | T | I | P | C | E | K | T | W | G | E | Y | A | D | Y | G | C | Y | C | G | A | G | G | S | G | R | 40 |     |

**Figura 4.24.** Alinhamento da neuwieditoxina-I (NeuTX-I) com  $\beta$ -neurotoxinas por ordem de homologia (H%). Caudoxina (Caudox), de *Bitis caudalis* (VILJOEN et al., 1982); taipoxina (Taipo $\alpha$ , subunidade  $\alpha$ ), de *Oxyuranus scutellatus* (LIND e EAKER, 1982); agkistrodotoxina (AgkisTX), de *Agkistrodom halys pallas* (KONDO et al., 1989); ammoditoxina A (AmodiTX), de *Vipera ammodytes ammodytes* (RITONJA e GUBENSEK, 1985); textilotoxina (Textil-B, subunidade B), de *Pseudonaja textilis textilis* (TYLER et al., 1987); trimucrotoxina (TrimucrTX), de *Trimeresurus mucrosquamatus* (TSAI et al., 1995); mojavetoxina (Mojave-B, subunidade B), de *Crotalus scutulatus scutulatus* (AIRD et al., 1990); notechis-II-5 (Notec-II-5), de *Notechis scutulatus scutulatus* (HALPERT e EAKER, 1976); textilotoxina (TextilTX-A, subunidade A), de *Pseudonaja textilis textilis* (TYLER et al., 1987); taipoxina (Taipo $\alpha$ - $\beta$ 1, subunidade  $\beta$ 1), de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (LIND, 1982); notexina (Notex), de *Notechis scutulatus scutulatus* (HALPERT e EAKER, 1975); textilotoxina (TextilTX-C, subunidade C), de *Pseudonaja textilis textilis* (TYLER et al., 1987); crotoxina CroTX (subunidade básica), de *Crotalus durissus terrificus* (AIRD et al., 1986);  $\beta$ -bungarotoxina ( $\beta$ -BuTX, componentes A1 e A2), de *Bungarus multicinctus* (KONDO et al., 1978; KONDO et al., 1982a). Em destaque (cinza), os resíduos comuns.

\* Miotóxicas (miototoxicidade local).

|             | 1 | 5   | 10  | 15      | 20              | 25        | 30      | 35      | 40      | H%  |
|-------------|---|-----|-----|---------|-----------------|-----------|---------|---------|---------|-----|
| NeuTX-II    | S | L F | E F | A K M I | L E E T K R R L | P F P Y - | Y G A Y | G C Y C | G W G G | 40  |
| CroTX-B*    | S | L L | Q F | N K M I | K F E T R K N A | V P F -   | Y A F Y | G C Y C | G W G G | 100 |
| TrimucrTX   | N | L L | Q F | N K M I | K I M T K K N A | I P F -   | Y S S Y | G C Y C | G W G G | 62  |
| AmodiTX     | S | L L | E F | G M M I | L G E T G K N P | L T S F   | Y S F Y | G C Y C | G V G G | 62  |
| Mojave B*   | H | L L | Q F | N K M I | K E E T G K N A | I P F -   | Y A F Y | G C Y C | G G G G | 60  |
| AgkisTX     | N | L L | Q F | N K M I | K E E T G K N I | P F Y -   | A F -   | Y G C Y | G W G G | 60  |
| Caudox*     | N | L I | Q F | G N M I | S A M T G K S S | L A -     | Y A S Y | G C Y C | G W G G | 52  |
| Taipox-α*   | N | L L | Q F | G F M I | R C A N R R     | S R P V   | W H Y   | G C Y C | G K G G | 47  |
| β-BuTX      | N | L I | N F | M E M I | R Y T I         | P C E K T | W G E Y | A D Y   | G C Y C | 42  |
| Notec-II-5* | N | L V | Q F | S Y L I | Q C A N H G     | R R P T   | R H Y   | M D Y   | G C Y C | 40  |
| Notex*      | N | L V | Q F | S Y L I | Q C A N H G     | K P P T   | W H Y   | M D Y   | G C Y C | 40  |
| Taipox-β1*  | N | L V | Q F | G K M I | Q C A I         | R N R R   | P A L D | F M N Y | G C Y C | 40  |
| TextilTX-A  | N | L V | Q F | S Y L I | R C A N K Y     | K R R P   | G W H Y | A N Y   | G C Y C | 40  |
| TextilTX-B  | D | L V | E F | G F M I | R C A N R R     | N S Q P   | A W Q Y | M D Y   | G C Y C | 40  |
| TextilTX-C  | N | L I | Q F | S N M I | K C T I         | P G S Q   | P L L D | Y A N Y | G C Y C | 37  |

**Figura 4.25.** Alinhamento da neuwieditoxina-II (NeuTX-II) com β-neurotoxinas por ordem de homologia (H%). Crotoxina (CroTX-B, subunidade básica), de *Crotalus durissus terrificus* (AIRD et al., 1986); trimucrotoxina (TrimucrTX), de *Trimeresurus mucrosquamatus* (TSAI et al., 1995); ammoditoxina A (AmodiTX), de *Vipera ammodytes ammodytes* (RITONJA e GUBENSEK, 1985); mojavetoxina (Mojave B, subunidade básica), de *Crotalus scutulatus scutulatus* (AIRD et al., 1990); agkistrotoxina (AgkisTX), de *Agkistrodon hakys pallas* (KONDO et al., 1989); caudoxina (Caudox), de *Bitis caudalis* (VILJOEN et al., 1982); taipoxina-α (Taipox-α, subunidade α da taipoxina), de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (LIND e EAKER, 1982); β-bungarotoxina (β-BuTX, componentes A1 e A2), de *Bungarus multicinctus* (KONDO et al., 1978; KONDO et al., 1982a); notechis-II-5 (Notec-II-5), de *Notechis scutatus scutatus* (HALPERT e EAKER, 1976); notexina (Notex), de *Notechis scutatus scutatus* (HALPERT e EAKER, 1975); taipoxina β1 (Taipox-β1, subunidade β1 da taipoxina), de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (LIND, 1982); textiltoxina (TextilTX, subunidades A, B e C, respectivamente), de *Pseudonaja textilis* (TYLER et al., 1987). Em destaque (cinza), os resíduos comuns. \*Miotóxicas (miototoxicidade local).

|                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |     |    |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|----|
| NeuTX-I             | 1 | D | L | V | Q | F | G | Q | M | I | L | K | V | A | - | G | R | S | L | P | K | S | Y | G | A | Y | G | C | Y | C | G | W | G | R | G | K  | 35  | H% |
| BthTX-II            |   | D | L | W | Q | W | G | Q | M | I | L | K | E | T | - | G | K | L | P | F | P | Y | Y | T | T | Y | G | C | Y | C | G | W | G | R | G | K  | 100 |    |
| Bneu-I              |   | S | L | V | E | L | G | K | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | P | V | T | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G  | K   | 66 |
| BthTX-I             |   | S | L | F | E | L | G | K | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G  | K   | 57 |
| PrTXs               |   | S | L | F | E | L | G | K | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G  | K   | 57 |
| Basp-II             |   | S | L | F | E | L | G | K | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G  | K   | 57 |
| BnSP-7              |   | S | L | F | E | L | G | K | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G  | K   | 54 |
| Mio <i>B. atrox</i> |   | S | L | V | E | L | G | K | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | P | L | T | S | Y | G | V | Y | G | C | N | C | G | V | G | S | R | H  | K   | 51 |
| ACLMT               |   | S | L | L | E | L | G | K | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | A | I | T | S | Y | G | S | Y | G | C | N | C | G | W | G | H | R | G  | K   | 51 |
| Basp-III            |   | S | L | I | E | F | A | K | M | I | L | E | E | T | - | K | R | L | P | F | P | Y | Y | T | T | Y | G | C | Y | C | G | W | G | Q | Q | 48 |     |    |
| GodMT-II            |   | S | M | Y | Q | L | W | H | M | I | L | Q | E | T | - | G | K | N | A | V | P | S | Y | G | L | Y | G | C | N | C | G | V | G | S | R | G  | K   | 48 |

**Figura. 4.26.** Alinhamento da neuwieditoxina-I (NeuTX-I) com miotoxinas PLA<sub>2</sub> por ordem de homologia (H%). Bothropstoxina-II (BthTX-II), de *B. jaracussu* (PEREIRA et al., 1998); Bneu-I, de *B. neuwiedi* (GEOGHEGAN et al., 1999); bothropstoxina-I (BthTX-I), de *B. jaracussu* (CINTRA et al., 1993); piratoxinas I e II (PrTXs), de *B. pirajai* (TOYAMA et al., 2000); Basp-II, miotoxina-II de *B. asper* (FRANCIS et al., 1991); BnSP-7, de *B. neuwiedi* (SOARES et al., 2000); miotoxina de *B. atrox* (Mio *B. atrox*) (MARAGANORE et al., 1984); ACLMT, miotoxina de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (JOHNSON e OWNBY, 1993); miotoxina III (Basp-III) de *B. asper* (KAISER et al., 1990); miotoxina II (godMT-II), de *B. godmani* (de SOUSA et al., 1998). Em destaque (cinza), os resíduos em comum. Esquema de alinhamento proposto por RENETSEDER et al., 1985.



|                     | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | H% |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |     |    |
|---------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|----|
| NeuTX-II            | S | L | F  | E  | F  | A  | K  | M  | I  | L  | E | E | T | - | K | R | L | P | F | P | Y | Y | G | A | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | Q | P | K | D | A | T | 40 | 100 |    |
| Basp-III            | S | L | I  | E  | F  | A  | K  | M  | I  | L  | E | E | T | - | K | R | L | P | F | P | Y | Y | T | T | Y | G | C | Y | C | G | W | G | G | Q | P | K | D | A | T | 92 |     |    |
| BnSP7               | S | L | F  | E  | L  | G  | K  | M  | I  | L  | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G | Q | P | K | D | A  | T   | 67 |
| BthTX-I             | S | L | F  | E  | L  | G  | K  | M  | I  | L  | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G | K | P | K | D | A  | T   | 65 |
| PrTXs               | S | L | F  | E  | L  | G  | K  | M  | I  | L  | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G | K | P | K | D | A  | T   | 65 |
| Basp-II             | S | L | F  | E  | L  | G  | K  | M  | I  | L  | Q | E | T | - | G | K | N | P | A | K | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G | K | P | K | D | A  | T   | 65 |
| BthTX-II            | D | L | W  | Q  | W  | G  | Q  | M  | I  | L  | K | E | T | - | G | K | L | P | F | P | Y | Y | T | T | Y | G | C | Y | C | G | W | G | R | G | K | P | V | D | P | T  | 62  |    |
| Bneu-I              | S | L | V  | E  | L  | G  | K  | M  | I  | L  | Q | E | T | - | G | K | N | P | V | T | S | Y | G | A | Y | G | C | N | C | G | V | L | G | R | G | K | P | K | D | A  | T   | 62 |
| ACLMT               | S | L | L  | E  | L  | G  | K  | M  | I  | L  | K | E | T | - | G | K | N | A | I | T | S | Y | G | S | Y | G | C | N | C | G | W | H | R | G | Q | P | K | D | A | T  | 62  |    |
| Mio <i>B. atrox</i> | S | L | V  | E  | L  | G  | K  | M  | I  | L  | Q | E | T | - | G | K | N | P | L | T | S | Y | G | V | Y | G | C | N | C | G | V | G | S | R | H | K | P | K | D | A  | T   | 57 |
| GodMT-II            | S | M | Y  | Q  | L  | W  | H  | M  | I  | L  | Q | E | T | - | G | K | N | A | V | P | S | Y | G | L | Y | G | C | N | C | G | V | G | S | R | G | K | P | K | D | A  | T   | 52 |

**Figura. 4.27.** Alinhamento da neuwieditoxina-II (NeuTX-II) com as miotoxinas PLA<sub>2</sub> por ordem de homologia (H%).  
 Miotoxina III (Basp-III) de *B. asper* (KAISER et al., 1990); BnSP-7, de *B. neuwiedi* (SOARES et al., 2000); bothropstoxina-I (BthTX-I), de *B. jaracussu* (CINTRA et al., 1993); piratoxinas I e II (PrTXs), de *B. pirajai* (TOYAMA et al., 2000); Basp-II, miotoxina-II de *B. asper* (FRANCIS et al., 1991); bothropstoxina-II (BthTX-II), de *B. jaracussu* (PEREIRA et al., 1998); Bneu-I, de *B. neuwiedi* (GEOGHEGAN et al., 1999); ACLMT, miotoxina de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (JOHNSON e OWNBY, 1993); miotoxina de *B. atrox* (Mio *B. atrox*) (MARAGANORE et al., 1984); miotoxina II (godMT-II), de *B. godmani* (de SOUSA et al., 1998). Em destaque (cinza), os resíduos comuns. Esquema de alinhamento proposto por RENESEDER et al., 1985.

## *5. DISCUSSÃO*



### 5.1. Evidências da ação neurotóxica e miotóxica do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*

Os venenos botrópicos, por conta dos sinais clínicos observados após o envenenamento em humanos, não são considerados neurotóxicos. A insuficiência respiratória descrita em relatos clínicos (RIBEIRO et al., 1998; BUCARETCHI et al., 2001) foi atribuída a edema pulmonar agudo. Porém, em 1993, COGO et al. publicaram as primeiras evidências sobre a neurotoxicidade do veneno de *Bothrops insularis*, que causou flacidez do pescoço (head-drop), perda do tônus muscular, apnéia e morte em aves, além de produzir bloqueio da resposta à estimulação indireta, precedido por aumento da amplitude da contração muscular, e aumento da frequência de potenciais de placa teminal em miniatura (PPTM) em preparação neuromuscular de camundongo. Em 1996, ZAMUNÉR et al. relataram que o veneno de *B. neuwiedi* causara head-drop, perda do tônus e insuficiência respiratória em aves, bem como bloqueio da resposta contrátil em preparações neuromusculares isoladas de ave, com preservação da resposta ao agonista do receptor colinérgico, ACh. Em seguida, BORJA-OLIVEIRA et al. (2002) confirmaram as observações feitas por ZAMUNÉR et al. (1996) em preparações neuromusculares isoladas de ave sobre o efeito pré-sináptico do veneno de *B. neuwiedi* e verificou que esse efeito não era encontrado em todos os lotes de veneno da mesma espécie; os venenos mais potentes em produzir bloqueio neuromuscular apresentaram uma banda extra em seu perfil eletroforético. Evidenciando a ação pré-juncional do veneno de *B. n. pauloensis*, DURIGON et al.

(submitted) relataram o aumento da frequência de PPTM e a presença de PPTMs gigantes em diafragma isolado de camundongo incubado com o veneno. Esses achados demonstraram que, na verdade, alguns venenos botrópicos eram capazes de produzir neurotoxicidade, ainda que esse fato não tivesse sido evidenciado clinicamente.

Em 1998, COGO et al., publicaram o isolamento de uma fração com atividade PLA<sub>2</sub> do veneno de *B. insularis* que reproduzia os efeitos neurotóxicos pré-sinápticos do veneno total e demonstraram, ainda, que esses efeitos eram dependentes de Ca<sup>2+</sup> e de temperatura, o que conduziu à forte sugestão de que os efeitos farmacológicos da PLA<sub>2</sub> eram dependentes de atividade enzimática. BORJA-OLIVEIRA et al. (2003) também demonstraram que os efeitos bloqueadores neuromusculares do veneno de *B. n. pauloensis* eram dependentes de temperatura em preparação de ave e da presença de Ca<sup>2+</sup> em preparação de camundongo e esses resultados levaram a suspeitas de que o veneno de *B. neuwiedi pauloensis* possuísse PLA<sub>2</sub> neurotóxicas pré-sinápticas, embora a baixa temperatura e a substituição de Ca<sup>2+</sup> por Sr<sup>2+</sup> inibissem componentes enzimaticamente ativos aleatoriamente. Vários cátions divalentes, incluindo o Sr<sup>2+</sup> podem ligar-se ao mesmo sítio do Ca<sup>2+</sup>, permitindo a transmissão neuromuscular, mas não podem substituir o Ca<sup>2+</sup> na catálise e, portanto são úteis inibidores da atividade PLA<sub>2</sub> (SCHIAVO et al., 2000). Porém, a literatura é vasta em relatos sobre PLA<sub>2</sub> neurotóxicas pré-sinápticas isoladas de venenos ofídicos, chamadas β-neurotoxinas, as quais apresentam invariavelmente certas características, como as de atuarem pré-sinápticamente, possuírem atividade enzimática e, ainda, a de

ser sua ação neurotóxica dependente da enzimática. Além disso, é característica da maioria dessas toxinas apresentar miotoxicidade quando em concentrações mais altas. Realmente, ZAMUNÉR (1997) observou que o veneno de *B. neuwiedi*, em altas concentrações (200 µg/ml), aumentava a liberação de creatina-quinase, através da dosagem da solução nutritiva que banhava o músculo isolado de ave incubado com o veneno. Além disso, o veneno de *B. n. pauloensis*, em altas concentrações (10-100 µg/ml), exibiu efeitos miotóxicos, como contratura e bloqueio da resposta ao potássio em preparação de ave e bloqueio das contrações à estimulação direta em preparações curarizadas de ave e de camundongo. DURIGON et al. (submitted) relataram também a redução do potencial de membrana em regiões distantes da placa terminal promovida pelo veneno em diafragma isolado de camundongo. Todas essas evidências foram suficientes para justificar a investigação sobre a possibilidade de existência de  $\beta$ -neurotoxinas no veneno de *B. n. pauloensis*.

## **5.2. Fracionamento do veneno e purificação das frações farmacologicamente ativas**

Após a purificação do veneno total, somente as frações correspondentes ao segundo e terceiro reproduziram o efeito total, determinando bloqueio neuromuscular completo em preparação de ave sem inibir a resposta ao agonista colinérgico ACh. O pico 3 foi mais específico em sua ação pré-sináptica, pois preservou também a resposta ao potássio, enquanto que o pico 2 a aboliu.

Essas frações também foram as únicas que exibiram atividade PLA<sub>2</sub>, confirmando a relação entre a atividade farmacológica e a enzimática. Da mesma forma que o veneno total, o efeito das frações correspondentes aos picos 2 e 3 mostrou-se dependente da temperatura. É interessante notar que o pico 3, que apresentou uma atividade enzimática mais pronunciada, teve seu efeito bloqueador neuromuscular completamente neutralizado pela baixa temperatura. Já o pico 2, que apresentou uma atividade catalítica menor, teve sua atividade neuromuscular apenas parcialmente abolida. Essas observações sugerem que a fração correspondente ao pico 3 apresenta uma maior relação entre a atividade farmacológica e a enzimática.

O fato de a preparação de camundongo ter sido menos sensível à ação das frações correspondentes aos picos ativos foi inesperado, uma vez que o próprio veneno bruto também apresentou esse comportamento.

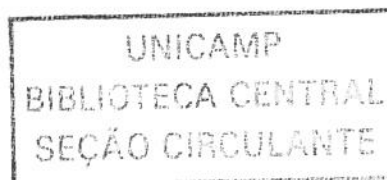
Após a repurificação das duas frações ativas, picos 2 e 3, somente duas frações provenientes do pico 2, picos b e c, reproduziram o efeito pré-sináptico do veneno total. O pico c, denominado NeuTX-I, produziu bloqueio completo sem inibir as respostas aos agonistas ACh e potássio, enquanto o pico b, denominado NeuTX-II, bloqueou também a resposta ao potássio. Em consideração ao fato de que algumas  $\beta$ -neurotoxinas exibem miotoxicidade, ambas as toxinas foram caracterizadas, apresentando, após a redução por DTT, 14 kDa, para serem, posteriormente, seqüenciadas e analisadas.

### 5.3. Determinação da estrutura primária da porção amino-terminal das toxinas neurotóxicas pré-sinápticas purificadas do veneno de *B. n. pauloensis*

As proteínas são macromoléculas contendo um número variável de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. As cadeias assim constituídas chamam-se cadeias polipeptídicas e, ao atingirem certa dimensão, recebem o nome de proteína. É comum considerar proteínas os polipeptídios com peso molecular a partir de 6.000 (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

Há proteínas cuja molécula tem apenas uma cadeia polipeptídica (assim como as PLA<sub>2</sub> monoméricas), enquanto outras possuem múltiplas cadeias, em geral umas diferentes das outras (como as PLA<sub>2</sub> monoméricas) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000). A textilotoxina, por exemplo, é uma neurotoxina pré-sináptica multimérica que contém cinco subunidades. FOHLMAN et al. (1976) sugeriram que as subunidades da textilotoxina atuam como chaperones, contribuindo para o transporte da subunidade A para o sítio-alvo no terminal nervoso, permitindo, assim, um bloqueio mais eficiente da liberação da ACh.

A estrutura primária é a seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, específica para cada proteína. Por convenção, ela é escrita na direção amino terminal → carboxila terminal (MARZZOCO e TORRES, 1990).



### 5.3.1. A estrutura primária amino-terminal da NeuTX-I

Via de regra, a glutamina localizada na posição 4 (Q-4) e a fenilalanina na posição 5 (F-5) são resíduos altamente conservados nas PLA<sub>2</sub> Asp-49 (D-49), assim como nas  $\beta$ -neurotoxinas monoméricas caudoxina (VILJOEN et al., 1982), agkistrodotoxina (KONDO et al., 1989), ammoditoxina (RITONJA e GUBENSEK, 1985), trimucrotoxina (TSAI et al., 1995), notechis-II-5 (HALPERT e EAKER, 1976) e notexina (HALPERT e EAKER, 1975), e nas multiméricas taipoxina (LIND e EAKER, 1982; LIND, 1982), textilotoxina (TYLER et al., 1987), mojavetoxina (AIRD et al., 1990) e crotoxina (AIRD et al., 1986). Esses resíduos estavam conservados na seqüência primária amino-terminal da NeuTX-I. As Tabelas 1.5 e 1.6 (na introdução) fornecem dados referentes à classificação de famílias de serpentes e de  $\beta$ -neurotoxinas. Além disso, as Lys-49 (K-49) possuem o aminoácido glutamina na posição 11 (Q-11), ao contrário do que se observa na seqüência das Asp-49 (D-49) e da NeuTX-I. Estes achados fortemente sugerem que a NeuTX-I é uma PLA<sub>2</sub> Asp-49.

Realmente, as miotoxinas Lys-49 (K-49), tais como a bothropstoxina-I, as piratoxinas I e II, a miotoxina II de *B. asper*, a BnSP-7 de *B. neuwiedi* e a miotoxina II de *B. godmani*, apresentam leucina na posição 5 (L-5) e glutamina na posição 11 (Q-11), em contraste com a NeuTX-I.

As PLA<sub>2</sub> Asp-49 (D-49) apresentam resíduos altamente conservados, tais como Y-28, C-29, G-30, G-32, G-33, P-37, D-39, D-42, R-43, C-44, C-45, H-48, D-49, C-50, C-51 e Y-52. Pelo que pôde ser observado na seqüência amino-terminal da NeuTX-I, que apresentou-se somente até a posição 36, todos os aminoácidos

descritos acima estavam conservados. Os segmentos 44-50 (ainda desconhecido no caso da NeuTX-I) e 28-32 representam as regiões mais diretamente envolvidas na função catalítica (ARNI e WARD, 1996). De fato, as miotoxinas Lys-49 bothropstoxina I, piratoxinas I e II, a miotoxina de *B. asper* e a miotoxina BnSP-7 de *B. neuwiedi*, que são enzimaticamente inativas, apresentam N-28, ao invés de Y-28, L-32, no lugar de G-32, e obviamente K-49, ao invés de D-49, sendo esta última substituição decisiva para a perda da atividade catalítica. O resíduo Y-28, presente na NeuTX-I, nas  $\beta$ -neurotoxinas e nas miotoxinas enzimaticamente ativas, é importante para a flexibilidade da conformação que estrutura o sítio de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (ARNI e WARD, 1996).

A comparação da seqüência amino-terminal da NeuTX-I apresentou um nível importante de homologia com miotoxinas de venenos botrópicos, bem como em relação a algumas  $\beta$ -neurotoxinas de venenos serpentes das famílias Viperidae e Elapidae. Porém, não houve uma maior homologia entre a NeuTX-I, que é proveniente de veneno botrópico, família Viperidae, subfamília Crotalinae, e as toxinas de venenos da mesma família. Como exemplo, enquanto a subunidade  $\alpha$  da taipoxina, isolada do veneno da *Oxyuranus scutellatus scutellatus*, família Elapidae, apresentou 54% de homologia em relação à NeuTX, a subunidade básica da crotoxina, subfamília Crotalinae, apresentou apenas 43%.

Entre as miotoxinas, a NeuTX apresentou maior semelhança com a bothropstoxina-II, que é também uma Asp-49, ou seja, enzimaticamente ativa. Porém, não foi descrito para bothropstoxina-II efeito neurotóxico pré-sináptico. Apesar de também ser uma Asp-49, a bothropstoxina-II não apresenta o resíduo



F-5, presente na NeuTX-I e nas  $\beta$ -neurotoxinas. No lugar de F-5, a bothropstoxina-II apresenta triptofano (W), fato que pode justificar sua baixa, embora presente, atividade PLA<sub>2</sub>, pois os demais resíduos estratégicos conhecidos por compor o sítio de ligação ao Ca<sup>2+</sup>, como Y-28, G-30, G-32, e especialmente D-49, além de H-48, Y-52 e D-99, todos direta e indiretamente envolvidos na catálise, estão conservados na estrutura primária dessa miotoxina (PEREIRA et al., 1998).

### 5.3.2. A estrutura primária amino-terminal da NeuTX-II

A NeuTX-II, apresentou, entre os 40 resíduos de aminoácidos determinados, a maioria dos resíduos característicos das Asp-49 (D-49) na sua porção amino-terminal. Apesar de não apresentar a glutamina localizada na posição 4 (Q-4), exibiu a fenilalanina na posição 5 (F-5), bem como a tirosina na posição 28 (Y-28). A bothropstoxina-II, por exemplo, embora seja uma Asp-49 (D-49), também não possui a glutamina na posição 4 (Q-4). É importante ressaltar ainda que as PLA<sub>2</sub> Lys-49 (K-49) possuem o aminoácido glutamina na posição 11 (Q-11), que não está presente na sequência da NeuTX-II. Todas essas observações sugerem fortemente que a NeuTX-II é também uma PLA<sub>2</sub> Asp-49 (D-49).

A NeuTX-II apresentou, de longe, maior grau de homologia (92%) com a Basp-III, a miotoxina III, isolada do veneno de *B. asper*. A Basp-III é uma Asp-49 altamente miotóxica. Com 66% de homologia em relação à NeuTX-II, a BnSP7, uma miotoxina Lys-49 isolada do veneno de *B. neuwiedi*, já foi ensaiada em preparação *biventer cervicis* de ave e concentrações a partir de 50  $\mu$ g dessa



toxina/ml eram necessárias para produzir bloqueio parcial das contrações indiretamente evocadas (SOARES et al., 2000). A BthTX-I, que apresentou 63% de homologia, foi isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* e considerada como sendo uma miotoxina por produzir mionecrose sem afetar o terminal nervoso (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Porém, recentemente, a BthTX-I, que produz bloqueio em preparações neuromusculares isoladas (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; HELUANY et al., 1992), demonstrou atuar também em sítio pré-sináptico ao induzir o surgimento de potenciais de placa terminal em miniatura gigantes (OSHIMA-FRANCO, 2001).

Ao comparar a seqüência da NeuTX-II com as  $\beta$ -neurotoxinas, observou-se um maior grau de homologia principalmente em relação àquelas cujo veneno de origem pertence a serpentes da família Viperidae, como a crotoxina, de *Crotalus durissus terrificus*, a trimucrotoxina, de *Trimeresurus mucrosquamatus*, ammodyttoxina, de *Vipera ammodytes ammodytes* e agkistrodotoxina, de *Agkistrodom halys pallas*. Como já discutido, essa relação não foi observada no caso da NeuTX-I.

#### **5.4. Proposta de classificação baseada na estrutura e na atividade das NeuTXs-I e II**

O fato de as NeuTXs I e II apresentarem características típicas de toxinas PLA<sub>2</sub> Asp-49 era esperado, uma vez que a fração que lhes deu origem apresentou atividade PLA<sub>2</sub> e sua atividade farmacológica mostrou-se dependente da

temperatura. Na realidade, a suspeita do envolvimento de PLA<sub>2</sub> Asp-49 no efeito bloqueador neuromuscular do veneno de *B. n. pauloensis* ocorreu desde que este feito manifestou sua dependência de Ca<sup>2+</sup> e de temperatura. Assim, fica estabelecida a suspeita de certa relação entre a estrutura e a atividade das NeuTXs-I e II.

Realmente, a semelhança das NeuTXs I e II com as  $\beta$ -neurotoxinas não é somente estrutural. Assim como descrito por HARVEY et al. (1994), espera-se que neurotoxinas pré-sinápticas produzam bloqueio das contrações evocadas indiretamente sem abolir as respostas à ACh e ao potássio e/ou induzir contraturas em preparações *biventer cervicis* de ave. Entretanto, a maioria das  $\beta$ -neurotoxinas apresenta algum efeito miotóxico, embora seu efeito neurotóxico pré-sináptico ocorra em baixas concentrações e seja, em geral, predominante. Neste trabalho, demonstrou-se que a NeuTX-I realmente produz bloqueio completo da resposta a estímulo indireto em músculo de ave, preservando as respostas à ACh e ao potássio. Já a NeuTX-II parece possuir um efeito miotóxico mais pronunciado, pois inibe também a resposta ao potássio. Esses resultados são coerentes com aqueles obtidos com o veneno bruto, que produziu bloqueio da resposta ao potássio em concentrações acima de 10  $\mu$ g/ml, que foi a mesma concentração utilizada nos ensaios realizados com as NeuTXs I e II. De fato, esperava-se que o veneno de *B. n. pauloensis* estudado possuísse componentes que atuassem no sítio pré-sináptico, bem como na fibra muscular. A notexina, uma PLA<sub>2</sub> Asp-49 monomérica do veneno de *Notechis scutatus scutatus*, é classificada como  $\beta$ -neurotoxina, por seu efeito neurotóxico pré-sináptico (KARLSSON et al.,

1972), e também como miotoxina, por seu expressivo efeito miotóxico (LEE et al., 1976). Em preparação *biventer cervicis* de pintainho, a notexina, a mojavetoxina e a caudoxina inibiram a resposta à ACh e produziram contraturas em altas concentrações (HO, KO, LEE, 1986). A neuwiditoxina-I apresentou maior identidade seqüencial (54%) com as  $\beta$ -neurotoxinas caudoxina e a subunidade  $\alpha$  da taipoxina, toxinas mionecróticas. O mesmo ocorreu com a NeuTX-II em relação à subunidade B da crotoxina (62%), também mionecrótica.

Embora as NeuTXs sejam estruturalmente mais parecidas com as miotoxinas, todas essas miotoxinas são botrópicas, o que pode justificar a semelhança estrutural. Por outro lado, o efeito farmacológico das NeuTXs é mais semelhante ao das neurotoxinas, com as quais as NeuTXs apresentam mais de 50% de homologia, sendo que não pertencem ao mesmo gênero e nem sempre à mesma família. Realmente, o nível de homologia das NeuTXs-I e II com a ACLMT, uma miotoxina de um veneno do gênero *Agkistrodon* (JOHNSON e OWNBY, 1993), é de 50% e 61%, respectivamente, o que mostra que a semelhança com as miotoxinas diminui muito quando essa pertence a outro gênero. A caudoxina (1-10  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\beta$ -neurotoxina monoméricas do veneno de *Bitis caudalis*, família Viperidae e subfamília Viperinae, em *biventer cervicis* de pintainho, produz bloqueio completo sem afetar a resposta à ACh, inibindo, em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, na mesma concentração, a resposta à estimulação indireta sem afetar a evocada diretamente. Em baixo  $\text{Ca}^{2+}$ , ou seja, substituindo os 1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  por 0,6 mM, essa toxina produz um efeito trifásico na resposta evocada indiretamente em nervo frênico-diafragma de camundongo, ou seja,

inibição imediata, seguida por aumento da amplitude e então bloqueio progressivo completo e irreversível (LEE et al., 1982). Em altas concentrações, a caudoxina produz bloqueio da resposta à ACh, contratura e mionecrose (HO et al., 1986).

Apesar dos inúmeros esforços para elucidar o mecanismo de ação das  $\beta$ -neurotoxinas, este ainda permanece sem total esclarecimento. Sabe-se que essas neurotoxinas, tais como a  $\beta$ -bungarotoxina, a taipoxina, a crotoxina, a notexina e a ammodytoxina, são primariamente caracterizadas pela habilidade de bloquear a liberação de ACh do terminal nervoso e por produzir, comumente, o chamado efeito trifásico na liberação do neurotransmissor. Antes de induzir o bloqueio irreversível (fase 3), essas neurotoxinas produzem uma diminuição inicial (fase 1), seguida pelo aumento da liberação do neurotransmissor (fase 2, efeito facilitatório). O veneno de *B. n. pauloensis* produz uma sutil inibição e um discreto aumento da amplitude da contração em preparação *biventer cervicis* de pintainho à 37°C. À 20-24°C, apesar da ausência de bloqueio neuromuscular, a inibição seguida pelo aumento da amplitude tornaram-se mais evidentes. Sabendo-se que o efeito facilitatório das  $\beta$ -neurotoxinas é independente de atividade fosfolipásica (CHANG et al., 1973; CHANG et al., 1977; LANDON et al., 1980; SU e CHANG, 1981, 1984; CHANG e SU, 1982), esse resultado, ainda que pouco expressivo e pouco conclusivo em registros miográficos, levou à suspeita da presença de um ou mais componentes no veneno total com um comportamento semelhante ao das  $\beta$ -neurotoxinas.

A crotoxina, principal componente tóxico do veneno de *C. durissus terrificus*, bloqueia a transmissão neuromuscular primariamente por um

mecanismo pré-sináptico, impedindo a liberação de ACh e causando a morte por insuficiência respiratória (HAWGOOD e BON, 1990). Essa toxina é composta por dois componentes: uma PLA<sub>2</sub> pouco tóxica, chamada crotactina, e um componente não enzimático, denominado crotapotina (RUBSAMEN et al., 1971; HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971). A crotapotina potencializa a atividade da subunidade PLA<sub>2</sub>, comportando-se como um chaperone e prevenindo a ligação inespecífica da PLA<sub>2</sub> com os fosfolípidios da membrana. No nível pré-sináptico, a crotoxina causa o já discutido efeito trifásico, ou seja, induzindo uma inibição inicial, seguida por facilitação e finalmente bloqueio da liberação de ACh do terminal nervoso (CHANG e LEE, 1977; VITAL BRAZIL e EXCEL, 1970). SU e CHANG (1984) observaram que o terceiro efeito, isto é, o bloqueio, ao contrário da inibição inicial e da facilitação, ocorria devido a uma ação enzimática. E, de fato, foi demonstrado que o efeito colinérgico da crotoxina era abolido quando sua ação enzimática era bloqueada pela substituição de Ca<sup>2+</sup> por Ba<sup>2+</sup> (ativador e inibidor da atividade PLA<sub>2</sub>, respectivamente) ou pela modificação química do resíduo His-48 por BPB (p-bromophenacyl-bromide) (DELOT e BON, 1992). A alquilação do resíduo His-48 por BPB, altamente conservado nas PLA<sub>2</sub> Asp e Lys-49 conduz praticamente à perda total da ação enzimática nas variantes cataliticamente ativas e reduz significativamente a letalidade e a atividade miotóxica (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; DIAZ-OREIRO e GUTIERREZ, 1997; YANG e KING, 1980; TOYAMA et al., 1998; MELO e OWNBY, 1999).

Algumas investigações eletrofisiológicas preliminares indicaram que o estágio facilitatório do efeito trifásico de algumas  $\beta$ -neurotoxinas estava associado

ao bloqueio de alguns tipos de canais de potássio do terminal nervoso (PETERSEN et al. 1986; DREYER e PENNER, 1987; ROWAN e HARVEY, 1988). Afinal, os canais de potássio voltagem-dependentes são responsáveis pela repolarização da membrana após a deflagração do potencial de ação; o bloqueio desses canais no terminal nervoso retardaria a repolarização. Dessa forma, os canais de cálcio voltagem-dependentes permaneceriam abertos por um período maior do que o normal, o que aumentaria o influxo de cálcio e, conseqüentemente, a liberação de ACh (PENNER e DREYER, 1986). Em condições que impediam a atividade  $PLA_2$  das  $\beta$ -neurotoxinas (baixa temperatura, remoção de  $Ca^{2+}$ , substituição de  $Ca^{2+}$  por  $Sr^{2+}$ ) os efeitos sobre os canais de potássio permaneciam idênticos, indicando que a atividade  $PLA_2$  não desempenhava qualquer papel no bloqueio da corrente iônica ao potássio (DREYER e PENNER, 1987; ROWAN e HARVEY, 1988).

Recentemente, Fathi et al. (2001) investigaram a possibilidade de uma ação inibitória da  $\beta$ -bungarotoxina, taipoxina, notexina, crotoxina e amoditoxina sobre os canais de potássio voltagem-dependentes, através de registros de patch-clamp em canais de potássio clonados, expressos em células de mamífero, e verificaram que essas neurotoxinas não afetaram a corrente de potássio através dos canais clonados. Assim, os autores sugeriram que o mecanismo do efeito facilitatório dessas  $\beta$ -neurotoxinas poderia não estar associado com o bloqueio direto dos canais de potássio voltagem-dependentes. Entretanto, em um estudo anterior, GUILLEMARE et al. (1992) demonstrou que a  $\beta$ -bungarotoxina bloqueia os canais de potássio expressos em oócitos de anfíbio (*Xenopus*), o que conduz à

conclusão de que diferentes sistemas de expressão podem afetar as propriedades dos canais. É importante também levar em consideração que correntes obtidas de canais clonados podem não refletir exatamente o comportamento dos canais não clonados, ou seja, aqueles não produzidos geneticamente (naturais). A estrutura dos canais naturais e a dos canais clonados pode nem sempre ser a mesma e é possível que canais clonados percam, algumas vezes, certas proteínas regulatórias, embora ainda estejam funcionais (FATHI et al., 2001).

As  $\beta$ -neurotoxinas podem ser úteis ferramentas de pesquisa, uma vez que podem contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na neurotransmissão. Contudo, o uso dessas toxinas tem suas limitações, devido ao extenso dano que podem produzir às membranas. Como já exposto, não somente o terminal nervoso é afetado; após o contato com essas toxinas, o músculo esquelético pode exibir sinais de degeneração ou até completa destruição (MEBS e OWNBY, 1990).  $\beta$ -neurotoxinas, tais como caudoxina, crotoxina, mojavetoxina, notechis-II-5, taipoxina e notexina, produzem mionecrose (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1997). A notexina é altamente miotóxica (HARRIS et al., 1975) e, portanto, não é boa candidata a ferramenta farmacológica específica para estudar o mecanismo da liberação. Embora a caudoxina tenha também demonstrado causar mionecrose local, a dose requerida para tal efeito é muito maior do que aquelas necessárias para as outras PLA<sub>2</sub> básicas. De qualquer forma, essas PLA<sub>2</sub> miotóxicas podem ser usadas também como modelo para o estudo dos processos de degeneração e regeneração das células musculares.



Uma investigação mais detalhada da estrutura e do mecanismo de ação das NeuTXs somente poderá ser realizada após o isolamento dessas toxinas em quantidades maiores. Como a presença de neurotoxicidade no veneno de *B. neuwiedi* é uma característica rara (BORJA-OLIVEIRA et al., 2002), é provável que um screening miográfico com vários lotes de veneno, considerando também a subespécie, seja necessário. O passo seguinte seria produzir um 'pool' constituído pelos lotes com alta neurotoxicidade e, então, partir para o isolamento das NeuTXs, que seria identificada principalmente pela sequência primária amino-terminal descrita neste trabalho. A determinação da sequência primária completa das NeuTXs, bem como uma análise mais profunda do seu mecanismo de ação, podem contribuir com os estudos da relação entre estrutura e função, ainda carentes de esclarecimentos.

Enfim, pelos resultados obtidos, sugerimos que as NeuTXs I e II são PLA<sub>2</sub> Asp-49 que devem ser incluídas entre as PLA<sub>2</sub> de venenos ofídicos pertencentes à classe II (Crotalídeos e Viperídios). Pelo nosso conhecimento, as NeuTXs I e II são as primeiras PLA<sub>2</sub> neurotóxicas pré-sinápticas de um veneno botrópico purificadas, caracterizadas e seqüenciadas. A única outra PLA<sub>2</sub> neurotóxica purificada de um veneno botrópico, a P-IV de *B. insularis* (COGO et al., 1998), não chegou ainda a ter sua seqüência determinada. Sugerimos, ainda, que as NeuTXs I e II sejam classificadas entre as  $\beta$ -neurotoxinas, uma vez que atuam pré-sinápticamente, possuem atividade PLA<sub>2</sub> e considerável grau de homologia, no que diz respeito a sua seqüência primária amino-terminal, com essas neurotoxinas.



## *6. CONCLUSÃO*

Os resultados deste trabalho conduziram às seguintes conclusões:

- O bloqueio neuromuscular total produzido pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, em baixas concentrações, na vigência da resposta à ACh, sugere uma ação preferencial em sítios pré-sinápticos. Por outro lado, o bloqueio da resposta ao potássio, a presença de contratura, bem como o bloqueio da resposta à estimulação direta em altas concentrações, indicam que o veneno atua diretamente sobre a membrana muscular.
- Considerando que o veneno possui atividade PLA<sub>2</sub> e que sua ação neuromuscular é dependente da temperatura e do Ca<sup>2+</sup>, sugere-se que sua atividade farmacológica esteja diretamente relacionada a atividade enzimática.
- Os efeitos farmacológicos do veneno em preparações neuromusculares isoladas podem ser atribuídos em parte à presença de duas PLA<sub>2</sub> neurotóxicas pré-sinápticas denominadas NeuTXs I e II, capazes de produzir bloqueio total em preparações *biventer cervicis* de ave, sem afetar as respostas à ACh.
- À semelhança do que ocorre com as PLA<sub>2</sub> pré-sinápticas, chamadas β-neurotoxinas, as seqüências primárias das porções amino-terminais das NeuTXs-I e II sugerem fortemente que estas toxinas são PLA<sub>2</sub> Asp-49, o que, somado ao fato de o pico que lhes deu origem concentrar a maior atividade PLA<sub>2</sub> do veneno,

corroborar a sugestão da estreita relação que há entre a atividade farmacológica e a enzimática.

➤ Como a fração correspondente ao segundo pico do perfil cromatográfico resultante da purificação parcial apresentou atividade neurotóxica pré-sináptica (além da miotóxica) que não foi recuperada após a repurificação, sugere-se que a atividade farmacológica dos componentes correspondentes a esse pico foi perdida durante o processo de purificação e que, provavelmente, há outros peptídios neurotóxicos pré-sinápticos presentes no veneno estudado, ainda não caracterizados.

➤ Os resultados em conjunto nos permitem sugerir que as NeuTXs-I e II sejam incluídas em duas classes de toxinas: (1) no grupo II de PLA<sub>2</sub> de venenos, que agrupa aquelas encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae e (2) no grupo das β-neurotoxinas, que agrupa as PLA<sub>2</sub> neurotóxicas pré-sinápticas com atividade enzimática.

## *7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABE, T.; ALEMA, S.; MILEDI, R. Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of *Bungarus* snakes. **Eur J Biochem**, 80:1-12, 1977.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch Biochem Biophys**, 249:296-300, 1986.

AIRD, S.D.; KRUGGEL, W.G.; KAISER, I.I. Amino acid sequence of the basic subunit of Mojave toxin from the venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus s. scutulatus*). **Toxicon**, 28:669-673, 1990.

ALAGON, A.C.; MOLINAR, R.R.; POSSANI, L.D.; FLETCHER, P.L.; CRONAN, J.E.; JULIA, J.Z. Venom from the snake *Bothrops asper* Garman. Purification and characterization of three phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochem J**, 185:695-704, 1980.

AMARAL, C.F.S.; RESENDE, N.A.; SILVA, O.A. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev Inst Med Trop**, 30:475-480, 1997.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A<sub>2</sub> – A structural review. **Toxicon**, 34: 827-841, 1996.

BEGHINI, D.G.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; SODEK, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. **J Protein Chem**, 19: 603-607, 2000.

BON, C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. In: **Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Structure, function and mechanism**. Kini, R.M. (ed.), pp. 1-28, John Wiley and Sons – Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.

BON, C.; CHOUMET, V.; DELOT, E.; FAURE, G.; ROBBE-VINCENT, A.; SALIOU, B. Different evolution of phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins (β-neurotoxins) from Elapidae and Viperidae snakes. **Ann NY Acad Sci**, 710:142-148, 1994.

BORJA-OLIVEIRA, C.R.; DURIGON, A.M.; VALLIN, A.C.C.; TOYAMA, M.H., SOUCCAR, C.; MARANGONI, S. et al. The pharmacological effects of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Braz J Med Biol Res**, 36:617-624, 2003.

BORJA-OLIVEIRA, C.R.; SOARES A.M.; ZAMUNER, S.R.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J.R.; PRADO-FRANCESCHI et al. Intraspecific variation in the neurotoxic and myotoxic activities of *Bothrops neuwiedi* snake venoms. **J Venom Anim Toxins**, 8:88-101, 2002.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristic of the *Crotalus* phospholipase A<sub>2</sub> and crotoxin complex. **Toxicon**, 14:221-233, 1976.

BRUSES, J.L.; CAPASO, J; KATZ, E.; PILAR, G. Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. **J Neurochem**, 60:1030-1042, 1993.

BUCARETCHI, F.; HERRERA, S.R.F.; HYSLOP, S.; BARACAT, E.C.E.; VIEIRA, R.J. Snakebites by *Bothrops spp* in children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, 43: 329-333, 2001.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. **Brit J Pharmacol**, 1:38-61, 1946.

CARREDANO, E.; WESTERLUND, B.; PERSSON, B.; SAARINEN, M.; RAMASWAMY, S.; EAKER, D. et al. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, 36(1):75-92, 1998.

CINTRA, A.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem**, 12:57-64, 1993.

CHANG, C.C.; CHEN, T.F.; LEE, C.Y. Studies of the presynaptic effect of  $\beta$ -bungarotoxin on neuromuscular transmission. **J Pharmacol Exp Ther**, 184:339-345, 1973.

CHANG, C.C.; LEE, C.Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular action. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 144: 241-257, 1963.

CHANG, C.C.; LEE, J.D.; EAKER, D.; FOHLMAN, J. The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with beta-bungarotoxin and crotoxin. **Toxicon**, 15:571-576, 1977.

CHANG, C.C.; SU, M.J. Presynaptic toxicity of the histidine-modified, phospholipase A<sub>2</sub>-inactive, beta-bungarotoxin, crotoxin and notexin. **Toxicon**, 20:895-905, 1982.

CHANGEUX, J.P.; KASAI, M.; LEE, C.Y. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, 67:1241-1247, 1970.

CHO, W.; KEZDY, F.J. Chromogenic substrate and assay of phospholipase A<sub>2</sub>. **Meth Enzymol**, 197: 75-79, 1991.



COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects of *Bothrops insularis* 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. et al. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A<sub>2</sub> fraction. **Toxicon**, 36:1323-1332, 1998.

DANIELE, J.J.; BIANCO, I.D.; DELGADO, C.; CARRILLO, D.B.; FIDELIO, G.D. A new phospholipase A<sub>2</sub> isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (Yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, 35:1205-15, 1997.

DANIELE, J.J.; BIANCO, I.D.; FIDELIO, G.D. Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedii* venom. **Arch Biochem Biophys**, 318: 65-70, 1995.

DELOT, E.; BON, C. Differential effects of presynaptic phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins on Torpedo synaptosomes. **J Neurochem**, 58:311-9, 1992.

DIAZ, C.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, 298:135-142, 1992.

DIAZ, C; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIERREZ, J.M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A<sub>2</sub> variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Nat Toxins**, 3:26-31, 1995.

DIAZ-OREIRO, C.; GUTIERREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon**, 35:241-52, 1997.

DREYER, F.; PENNER, R. The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals. **J Physiol**, 386:455-463, 1987.

ENDO, T.; TAMIYA, N. Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. **Pharmacol Ther**, 34:403-451, 1999.

ERLANGER, B. P.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch Biochem Biophys**, 95:271-278, 1961.

FATHI, H.B.; ROWAN, E.G.; HARVEY, A.L. The facilitatory actions of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins at the neuromuscular junction are not mediated through voltage-gated K<sup>+</sup> channels. **Toxicon**, 39:1871-1882, 2001.

FOHLMAN, J.; EAKER, D.; KARLSSOON, E.; THESLEFF, S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. **Eur J Biochem**, 68:457-469, 1976.

FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; KAISER, I.I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub>. **Arch Biochem Biophys**, 284:352-359, 1991.

GEOGHEGAN, P.; ANGULO, Y.; CANGELOSI, A.; DIAZ, M.; LOMONTE, B. Characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub>-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yarara chica) from Argentina. **Toxicon**, 37:1735-1746, 1999.

GINSBORG, B.L.; WARRINER, J. The isolated chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation. **Brit J Pharmacol**, 15:410-411, 1960.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; PONRAJ, D.; THWIN, M.M. Phospholipase A<sub>2</sub> – A complex multifunctional protein puzzle. In: **Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes**.

**Structure, function and mechanism.** Kini, R.M. (ed.), pp. 1-28, John Wiley and Sons – Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.

GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Monomeric phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins. In: **Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Structure, function and mechanism.** Kini, R.M. (ed.), pp. 1-28, John Wiley and Sons – Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.

GUILLEMARE, E.; HONORE, E.; PRADIER, L.; LESAGE, F.; SCHWEITZ, H.; ATTALI, B. et al. Effects of the level of mRNA expression on biophysical properties, sensitivity to neurotoxins, and regulation of the brain delayed-rectifier K<sup>+</sup> channels Kv1.2. **Biochemistry**, 31:12463-8, 1992.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> – A complex multifunctional protein puzzle. In: **Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Structure, function and mechanism.** Kini, R.M. (ed.), pp. 1-28, John Wiley and Sons – Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.

GUTIERREZ, 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, 1996.

GUTIERREZ, 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, 1984.

HALPERT, J.; EAKER, D. Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin from the venom of *Notechis scutatus scutatus* (Australian tiger snake). **J Biol Chem**, 250:6990-6997, 1975.

HALPERT, J.; EAKER, D. Isolation and amino acid sequence of a neurotoxic phospholipase A from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. **J Biol Chem**, 251:7343-7347, 1976.

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 Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 2: 383, 1975.

HARVEY, A.L.; ANDERSON, A.L.; MONGUA, P.M.; KARLSSON, E. Toxins from mamba venoms that facilitate neuromuscular transmission. **J Toxicol Toxin Rev**, 3:91-137, 1984.

HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ A.; PRESTON, S.; HARRIS, J.B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. **Toxicon**, 32:257-65, 1994.

HAWGOOD, B.; BON, C. Snake venom presynaptic toxins. **Handbook of Natural Toxins: Reptile and Amphibian Venoms**, 5:3-52, 1990.

HELUANY, N.F.; HOM-SI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, 30:1203-10, 1992.

HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc Natl Acad Sci USA**, 68:1560-3, 1971.

HO, C.L.; KO, J.L.; LEE, C.Y. Differences in pharmacological actions between beta-bungarotoxin and other neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub> purified from snake venoms. **Proc Natl Sci Counc Repub China B**, 10:196-202, 1986.

HOGUE, A.R.; ROMANO-HOGUE SARWL. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Mem Inst Butantan**, 373-496, 1978/79.

HOLZER, M.; MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, 35:1149-1155, 1995.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26:615-627, 1988.

JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. **Toxicon**, 31:243-55, 1993.

JOUBERT, F.J.; TOWNSHEND, G.S.; BOTES, D.P. Snake Venoms. Purification, some properties of two phospholipases A<sub>2</sub> (CM-I and CM-II) and the amino-acid sequence of CM-II and *Bitis nasicornis* (horned adder) venom. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, 364:1717-1726, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Bases macromoleculares da constituição celular. In: **Biologia Molecular e Celular**. 7ª edição. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 2000.

- KAISER, I.I.; GUTIERREZ, 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.; EAKER, D.; RYDEN, L. Purification of a presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. **Toxicon**, 10:405-13, 1972.
- KINI, R. M. Phospholipase A<sub>2</sub> – A complex multifunctional protein puzzle. In: **Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Structure, function and mechanism**. Kini, R.M. (ed.), pp. 1-28, John Wiley and Sons – Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.
- KONDO, K.; NARITA, K.; LEE, C.Y. Amino acid sequences of the two polypeptide chains in beta1-bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus*. **J Biochem (Tokyo)**, 83: 101-15, 1978.
- KONDO, K.; TODA, H.; NARITA, K.; LEE, C.Y. Amino acid sequence of  $\beta_2$ -bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom. The amino acid substitutions in the B chains. **J Biochem (Tokyo)**, 91:1519-1530, 1982a.
- KONDO, K.; TODA, H.; NARITA, K.; LEE, C.Y. Amino acid sequences of three  $\beta_2$ -bungarotoxins ( $\beta_3$ -,  $\beta_4$ - and  $\beta_5$ -bungarotoxins) from *Bungarus multicinctus* venom.



Amino acid substitutions in the A chains. **J Biochem (Tokyo)**, 91:1531-1548, 1982b.

KONDO, K.; ZHANG, J.; XU, K.; KAGAMIYAMA H. Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin, agkistrodotoxin, from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **J Biochem (Tokyo)**, 105:196-203, 1989.

LANDON, D.N.; WESTGAARD, R.H.; MACDERMOT, J.; THOMPSON, E.J. The morphology of rat soleus neuromuscular junctions treated *in vitro* with purified beta-bungarotoxin. **Brain Res**, 202:1-20, 1980.

LEE, C.Y.; CHEN, Y.M.; KARLSSON, E. Postsynaptic and muscletropic effects of notexin, a presynaptic neurotoxin from the venom of *Notechis scutatus scutatus* (Australian tiger snake). **Toxicon**, 14:493-4, 1976.

LEE, C.Y.; HO, C.L.; BOTES, D.P. Site of action of caudoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from the horned puff adder (*Bitis caudalis*) venom. **Toxicon**, 20:637-47, 1982.

LIND, P. Amino-acid sequence of the beta 1 isosubunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). **Eur J Biochem**, 128:71-75, 1982.

- LIND, P.; EAKER, D. Amino-acid sequence of the alpha-subunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). **Eur J Biochem**, 124:441-447, 1982.
- LOMONTE, B.; GUTIERREZ, 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.; GUTIERREZ, J.M.; FURTADO, M.F.; OTERO, R.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O. et al. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, 28:1137-1146, 1990.
- MACHADO, O.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R. Purification, physicochemical characterization and N-terminal-amino acid sequence of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararaca* venom. **Braz J Med Biol Res**, 26:163-6, 1993.
- MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; DE ARAUJO, H.S. et al. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, 33:615-626, 1995.
- MARAGANORE, J.M.; HEINRIKSON, R.L. The lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A<sub>2</sub>. **J Biol Chem**, 261:4797-4804, 1986.

MARAGANORE, J.M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F.J.; HEINRIKSON, R.L. A new class of phospholipases A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J Biol Chem**, 259:13839-13843, 1984.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Proteínas. In: **Bioquímica Básica**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1990.

MCINTOSH, J.M.; GHOMASHCHI, F.; GELB, M.H.; DOOLEY, D.J., STOEHR, S.J.; GIORDANI, A.B. et al. Conodipine-M, a novel phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. **J Biol Chem**, 270:3518-3526, 1995.

MEBS, D. Snake venoms: toolbox of the neurobiologist. **Endeavour**, 13:157-161, 1989.

MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther**, 48:223-36, 1990.

MEBS, D; SAMEJIMA, Y. Isolation and characterization of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from crotalid venoms. **Toxicon**, 24:161-8, 1986.

MELO, P.A.; OWNBY, CL. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA<sub>2</sub> myotoxins. **Toxicon**, 37:199-215, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2<sup>a</sup>. edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

MORENO, E.; ALAPE, A.; SANCHEZ, M.; GUTIÉRREZ, J.M. A new method for the detection of phospholipase A<sub>2</sub> variants: identification of isozymes in the venoms of newborn and adult *Bothrops asper* (terciopelo) snakes. **Toxicon**, 26:363-371, 1988.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 29:713-723, 1991.

NISENBOM, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.J.; VIDAL, J.C. Contribution of phospholipase A<sub>2</sub> to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz) venom. **Toxicon**, 24:807-817, 1986a.

NISENBOM, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.J.; VIDAL, J.C. Effect of chemical modification with p-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal

properties of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz) venom. **Toxicon**, 26:1137-1144, 1988.

NISENBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. Phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, 24:259-272, 1986b.

OSHIMA-FRANCO, Y. **Nova abordagem no estudo da farmacologia da bothropstoxina-I (*Bothrops jararacussu*)**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil, 2001.

PENNER, R.; DREYER, F. Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. **Pflugers Arch**, 406:190-7, 1986.

PEREIRA, M.F.; NOVELLO, J.C.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; LANDUCCI, E.T.; OLIVEIRA, B. et al. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom with low phospholipase A<sub>2</sub> activity. **J Protein Chem**, 17:381-386, 1998.

PETERSEN, M.; PENNER, R.; PIERAU, F.K.; DREYER, F.  $\beta$ -bungarotoxin inhibits a non-inactivating potassium current in guinea pig dorsal root ganglion neurones. **Neurosci Lett**, 68:141-5, 1986.

- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev Ass Med Brasil**, 47: 24-29, 2001.
- PUNGERCAR, J; LIANG, N.S.; STRUKELJ, B.; GUBENSEK, F. Nucleotide sequence of a cDNA encoding ammodytin L. **Nucleic Acids Res**, 18:4601, 1990.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE, B.W.; DIJKSTRA, J.; DRENT, P.B.; SIGLER, J. A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J Biol Chem**, 260:11627-11634, 1985.
- RIBEIRO L.A.; ALBUQUERQUE, M.J.; PIRES DE CAMPOS, V.A.F.; KATZ, G.; TAKAOKAM, N.Y.; LEBRÃO, M.L. et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/98. **Rev Assoc Med Bras**, 44:312-318, 1998.
- RITONJA, A.; GUBENSEK, F. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. **Biochim Biophys Acta**, 828:306-312, 1985.
- RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; FONTES, M.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 121A:215-22, 1998.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELL, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, 10:475-89, 1983.

RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D.; SILVEIRA, R.; BARRETO, L.; DAJAS, F. Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. **Neurochem Int**, 5: 267-274, 1973.

ROWAN, E.G.; HARVEY, A.L. Potassium channel blocking actions of beta-bungarotoxin and related toxins on mouse and frog motor nerve terminals. **Br J Pharmacol**, 94:839-47, 1988.

RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 270:274-88, 1971.

SCOTT, D.L. Phospholipase A<sub>2</sub>: Structure and catalytic properties. In: **Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Structure, function and mechanism**. Kini, R.M. (ed.), pp. 1-28, John Wiley and Sons – Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem**, 166:368-79, 1987.

SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiol Rev**, 80:717-66, 2000.

SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. Ed. Sarvier. 1ª. edição, 1992.

SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.; DE SOUZA, G.E.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, 28:261-73, 1990.

SOARES, A.M.; ANDRIO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; MARANGONI, S. et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, 373:7-15, 2000.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V. et al. Structural and functional



characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, 378:201-209, 2000.

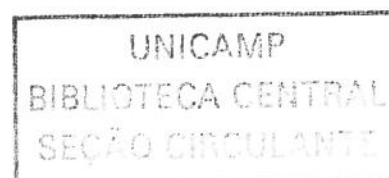
de SOUSA, M.V.; MORHY, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M. Amino acid sequence of a myotoxic Lys-49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Biochim Biophys Acta**, 1384: 204-208, 1998.

SU, M.J.; CHANG, C.C. Effect of bivalent cations on the presynaptic action and phospholipase A<sub>2</sub> activity of notexin. A comparison with other complex presynaptic neurotoxins. **Proc Natl Sci Counc (ROC)**, B5: 82-90, 1981.

SU, M.J.; CHANG, C.C. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A<sub>2</sub> activity (beta-bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). **Toxicon**, 22:631-40, 1984.

TAMIYA, T.; OHNO, S.; NISHIMURA, E.; FUJIMI, T.J.; TSUCHIYA, T. Complete nucleotide sequences of cDNAs encoding long chain  $\alpha$ -neurotoxins from sea krait, *Laticauda semifasciata*. **Toxicon**, 37: 181-185, 1999.

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. et al. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops*



*pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **J Protein Chem**, 17:713-8, 1998.

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, 82:245-250, 2000.

TSAI, I.H.; LU, P.J.; WANG, Y.M.; HO, C.L.; LIAW, L.L. Molecular cloning and characterization of a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochem J**, 311:895-900, 1995.

TYLER, M.I.; BARNETT, D.; NICHOLSON, P.; SPENCE, I.; HOWDEN, M.E. Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). **Biochim Biophys Acta**, 915:210-216, 1987.

VALIENTE, C.; MORENO, E.; SITTENFELD, A.; LOMENTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. An electrophoretic study on phospholipase A<sub>2</sub> isoenzymes in the venoms of Central American crotaline snakes. **Toxicon**, 30:815-823, 1992.

VIDAL, J.C.; STOPPANNI, A.O.M. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch Biochem Biophys**, 145: 543-556, 1971.

VILJOEN, C.C.; BOTES, D.P.; KRUGER, H. Isolation and amino acid sequence of caudoxin, a presynaptic acting toxic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the horned puff adder (*Bitis caudalis*). **Toxicon**, 20:715-737, 1982.

VITAL BRAZIL, O.; EXCEL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J Physiol**, 212:34-35, 1970.

VITAL BRAZIL O; VIEIRA RJ. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases (1). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 38:61-67, 1996.

WUSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. **Toxicon**, 35:319-40, 1997.

WUSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, Nº. 2. **Toxicon**, 36:299-307, 1998.

WUSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, Nº. 3. **Toxicon**, 37:1123-9, 1999.

YANG, C.C.; KING, K. Chemical modification of the histidine residue in basic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Naja nigricollis*. **Biochim Biophys Acta**, 614:373-88, 1988.

ZAMUNÉR, S.R. **Capacidade neutralizante de antiveneno comercial sobre as atividades neurotóxica e miotóxica de venenos botrópicos**. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil, 1997.

ZAMUNER, S.R.; PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L. The screening of *Bothrops* venoms for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparation. **Toxicon**, 34: 314-315, 1996.