UNICAMP

Este exemplar foi definitivamente corrigido conforme resolução CCPG/036/83
Piracicaba, 7 de outubro 1992

EFEITOS INDUZIDOS PELA BOTHROPSTOXINA, UM COMPONENTE DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*, SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Nadim Farah Heluany Sobrinho

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

H369e
18136/BC

Piracicaba
1992

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"QUE OS NOSSOS ESFORÇOS DESAFIEM AS IMPOSSIBILIDADES: LEMBRAI-VOS DE QUE AS GRANDES PROEZAS DA HISTORIA FORAM CONQUISTADAS DO QUE PARECIA IMPOSSIVEL"

CHARLES CHAPLIN

A Maria Stela - esposa abnegada cujo amor me anima à constante luta por um ideal.

Aos meus filhos queridos - André e Daniel - pelo incentivo e colaboração sempre constantes.

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais - por uma realização.

Homenagem

Póstuma

A

Maurício Gomes Lomba

O Primeiro Professor Dr. do Depto. de Farmacologia da Unicamp.

Meu melhor amigo, grande incentivador...

... foi para a sua Passárgada...

... e deixou ideais.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni pela orientação recebida, pela perseverança e compreensão, uma bela amizade.

A Profa. Dra. Júlia Prado-Franceschi por ter participado na orientação deste trabalho e pela duradora amizade.

Ao Professor Emérito Dr. Oswaldo Vital Brazil por ter me iniciado nas veredas da ciência, sempre um amigo.

A um grande amigo, Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pelas sugestões e ajuda ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder pelo grande incentivo e colaboração durante esta tese. Uma antiga amizade.

Ao Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho pelo incentivo e por sua conduta imparcial e segura na coordenação da C.P.G. - F.O.P.

A Profa. Dra. Maria de Lourdes Garboggini da Gama pelo carinho e atenção que dispensou na elaboração desta tese.

Ao professor Dr. José Roberto Giglio e à professora Dra. Maria Inês Homsi-Brandeburgo, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, por nos ter dado a oportunidade de realizar esse trabalho através do fornecimento da toxina; um grande laço de amizade foi formado.

Ao amigo biólogo Gildo Bernardo Leite pela eficiente assessoria técnica ao longo desta tese, e pelo seu grande espírito solidário, continue.

Aos amigos Docentes e Funcionários dos Departamentos de Farmacologia da FCM e da FOP - UNICAMP pelo estímulo que me proporcionaram na execução desta tese. Assim como à todos os professores da equipe de pós-graduação em Farmacologia (FOP) que durante os anos que aí estive, contribuiram para a minha formação científica.

INDICE

1. INTRODUÇAO 01

2. OBJETIVOS 15

3. MATERIAIS 16

3.1. Veneno, produtos químicos e fármacos 16

3.2. Animais 17

3.3. Equipamentos 17

4. METODOS 18

4.1. Ensaios Bioquímicos 18

4.1.1. Cromatografia em Sephadex G-75 18

4.1.2. Cromatografia em Sp. Sephadex C-25 18

4.1.3. Atividade fosfolipásica A_2 19

4.1.4. Atividade hemolítica 19

4.2. Ensaios Biológicos 20

4.2.1. Registro miográfico e eletrofisiológico em camundongos ... 20

4.2.1.1. Registro miográfico 20

4.2.1.2. Registro eletrofisiológico 21

4.2.1.3. Registro do potencial composto do músculo 23

4.2.2. Registro miográfico e eletrofisiológico em pintainhos 24

4.2.2.1. Registro miográfico 24

4.2.2.2. Registro eletrofisiológico 25

5. RESULTADOS 26

5.1. Fracionamento e purificação da peçonha de *B. jararacussu* 26

5.1.1. Centrifugação do veneno bruto em formiato de amônio com separação do sobrenadante 26

5.1.2. Filtração em gel de Sephadex G-75 e localização de atividades enzimáticas 28

5.1.2.1. Atividades coagulante e proteolítica 28

5.1.3. Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25 e atividade fosfolipásica 30

5.1.3.1. Atividade fosfolipásica A_2 e hemolítica 30

5.1.4. Grau de pureza 32

5.2. Ensaios Biológicos 34

5.2.1. Efeitos da BthTX sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, em condições normais de cálcio externo ($[Ca^{2+}]$ = 1,8 mM) 34

5.2.1.1. Registro da força de contração muscular 34

5.2.1.2. Medida do potencial de repouso 36

5.2.1.3. Registro do potencial de ação composto do músculo. 36

5.2.2. Efeitos da BthTX sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, em presença de elevada concentração de cálcio externo ($[Ca^{2+}]$ = 10 mM) 40

5.2.2.1. Registro da força de contração muscular 40

5.2.2.2. Medida do potencial de repouso 40

5.2.3. Efeitos da BthTX sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, pré-incubados com d-Tc (10 µg/ml) ou com TTX (1 µg/ml) 43

5.2.3.1. Medida do potencial de repouso da fibra muscular. 43

5.2.4. Efeito da BthTX sobre a preparação biventer cervicis de pintainho 46

5.2.4.1. Amplitude das respostas musculares à BthTX e Ach... 46

5.2.4.2. Efeito do Krebs modificado sobre a atividade da BthTX 48

5.2.4.3. Efeito da d-Tc (1Ø µg/ml) sobre a capacidade contraturante da BthTX 48

5.2.4.4. Medida do potencial de repouso da fibra muscular... 51

6. DISCUSSÃO 54

7. RESUMO 57

8. CONCLUSOES 58

9. ABSTRACT 60

1Ø. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 61

1. INTRODUÇÃO

Desde a Pré-História, a serpente esteve e está envolvida com o homem, quer pelo temor, quer pelo pavor ou pelo respeito. A influência das serpentes nas antigas civilizações foi de grande relevância. O deus grego da cura e da medicina, Esculápio, trazia uma serpente enrolada no cabo de um bastão, dando origem ao símbolo das profissões médicas e farmacêuticas. Por sua astúcia, a serpente foi adotada como símbolo também de Mercúrio - o deus da guerra - e mais tarde, do comércio.

Na Africa, na Asia, na América do Sul, e até na Europa, as serpentes já foram adoradas. No antigo Egito a naja - deusa Ejo - era adorada. A crença de que elas podiam, por exemplo, "nascer de novo", por trocarem de pele, tornou-as símbolos de saúde e de vida. Na maioria dos casos a serpente representava a força do bem, mas seu lado ruim podia aparecer sempre, retirando sua benéfica influência.

Foi somente no século XVII que o florentino Francisco Redi demonstrou a toxicidade do líquido que corria do aparelho venenoso de uma víbora.

O estudo das peçonhas teve como precursor em nosso país João Batista de Lacerda que, no século passado, realizou

no Museu Nacional algumas pesquisas sobre a farmacologia do veneno de serpentes brasileiras. Deve-se, entretanto, a Vital Brazil Mineiro da Campanha, o grande desenvolvimento que alcançaram no Brasil as investigações sobre a profilaxia e o tratamento dos acidentes causados por tanatofídios, escorpiões e aranhas.

Para o estudo das peçonhas em geral e também no contexto deste trabalho, cabe a definição dos termos peçonha, veneno e toxina, bem como a exposição sucinta da sistemática das serpentes venenosas (HOGE, A.R., ROMANO, S.A., 1972; VITAL BRAZIL, O., 1982).

A palavra "peçonha" (em inglês "venom" e em francês "venim") designa uma substância tóxica, produzida por um animal através de um órgão secretor, ou grupo altamente desenvolvido de células secretoras, que pode ser inoculada no ato da picada (MELLO LEITAO, 1948).

Animais peçonhentos possuem, portanto, o aparelho inoculador de peçonha, constituído pelas glândulas ou células secretoras, o ducto venenoso, os dentes ou presas e toda uma estrutura necessária para inocular a peçonha ou veneno.

"Veneno" (em inglês "poison") por sua vez, designa uma substância que, em quantidades relativamente pequenas, pode matar ou prejudicar seriamente a função de um órgão ou tecido.

Animais venenosos possuem tecidos parcial ou totalmente tóxicos. O envenenamento geralmente ocorre pela ingestão desses tecidos.

A palavra "peçonha" portanto tem um sentido mais restrito do que "veneno". Assim, toda peçonha é veneno, mas nem todo veneno é peçonha (RUSSELL, 1987).

O termo toxina, inicialmente empregado para descrever substâncias produzidas por organismos patogênicos, é hoje aplicado a substâncias derivadas de tecidos vegetais, animais ou de microorganismos e que exercem efeitos nocivos sobre outra planta ou animal. Ele é geralmente utilizado no sentido de "veneno" ou "peçonha", podendo designar a peçonha ou veneno integrais ou apenas um de seus componentes. É no sentido de componente que será utilizado, neste trabalho, o termo "toxina".

As serpentes "verdadeiramente venenosas" ou peçonhentas podem ser classificadas, segundo sua dentição, em 3 famílias: *Hidrophiidae, Elapidae e Viperidae* , possuindo esta última duas sub-famílias: *Viperinae* e *Crotalinae*.

As glândulas de veneno destas serpentes se localizam nos lados da cabeça (e pescoço) e enviam seus ductos ao longo das laterais supra labiais do maxilar penetrando numa bolsa complexa que envolve a base dos dentes maxilares modificados (presas), de tal modo que o veneno pode descer através de um

sulco ou ranhura mais ou menos profundo, ou através de um canal central neles existente (GANS, 1978).

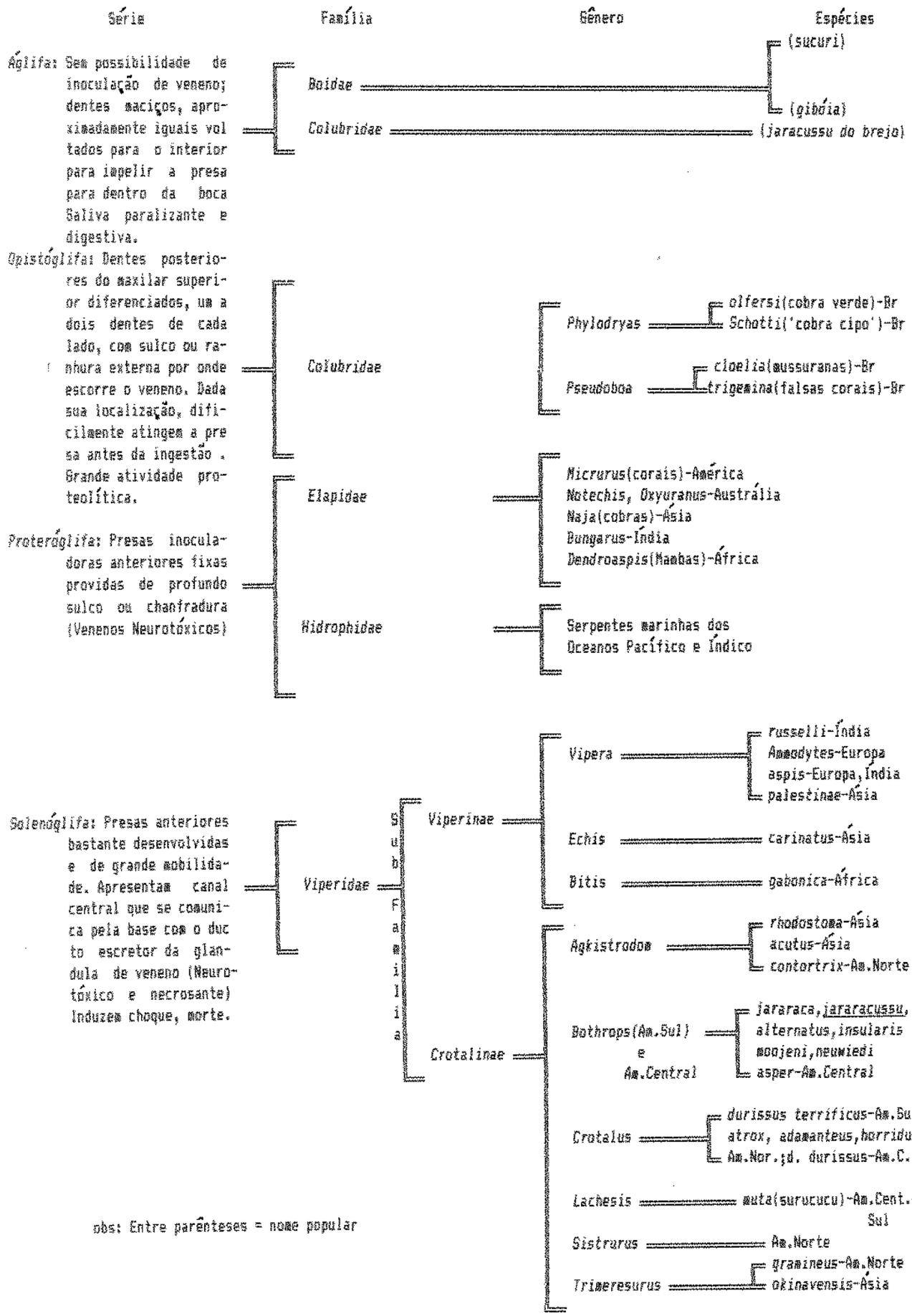
RUSSELL (1979) mostrou que nas glândulas de *Crotalinae*, a inervação dos músculos é diferente daquela que controla o mecanismo da picada, permitindo que a serpente controle a quantidade de veneno a ser injetada.

Quanto a dentição maxilar, as serpentes superiores podem ser divididas em 4 (quatro) grupos ou séries (UNDERWOOD, 1979; VITAL BRAZIL, O., 1982): *Aglifas, Opistóglifas, Proteróglifas* e *Solenóglifas*, das quais somente as duas últimas são consideradas peçonhentas (Tanatofídeos). O quadro a seguir mostra em resumo a classificação de serpentes superiores com as principais características de cada série.

O "aparelho de veneno" das serpentes *Viperinae* e *Crotalinae* é o mais eficiente em termos de velocidade e quantidade de veneno injetado. As conexões frouxas entre os ossos da cabeça destas serpentes e a extrema mobilidade dos mesmos, devido a músculos craniais apropriados, possibilitam o direcionamento das presas para frente, em posição de ataque, permitindo que a serpente possa ferir e injetar o veneno enquanto sua boca permanece aberta fazendo um ângulo em torno de 90 (noventa) graus.

Ao mesmo tempo, durante a projeção da presa, a bainha retrai para cima aderindo fortemente à base, colocando o

Sistemática sucinta de serpentes superiores - Segundo sua dentição



obs: Entre parênteses = nome popular

ducto da glândula de veneno em justaposição com a abertura superior da presa. Um sistema tipo seringa é assim formado, o qual, junto com as longas presas, permite uma penetração profunda e a eficiente injeção do veneno (KOCHVA, 1987).

GANS (1978) apresenta a provável base da sequência evolucionária para o desenvolvimento das glândulas de veneno em três etapas:

1) A secreção se iniciou para lubrificar os alimentos, condicionar as membranas bucais e facilitar a limpeza e digestão de materiais que podem aderir aos tecidos, e em particular aos dentes.

2) A ocorrência de algumas enzimas misturadas com as secreções forneceu uma pré-adaptação para a elaboração de proteínas e polipeptídeos tóxicos, facilitando a utilização de pequenos corpos alimentares ingeridos, ou imobilizando presas maiores.

3) Um conjunto de secreções ainda mais complexo e de maior volume facilitou a quebra interna do bolo alimentar, assim como a defesa contra predadores.

Esta seqüência pode explicar em grande parte a complexidade dos venenos das serpentes, onde aproximadamente 90% dos seus constituintes são proteínas, e os 10% restantes constituem compostos de baixo peso molecular, tais como

peptídeos, nucleotídeos e diversos ions (BIEBER, 1979), apresentando grande diversidade de propriedades biológicas.

Cumpre salientar a importância dos estudos dos venenos das serpentes destinados a elucidar a sua complexa composição química, bem como a diversidade de ações simultâneas sobre os sistemas sanguíneo, respiratório, cardiovascular, nervoso, etc., que apresentam as peçonhas dos tanatofídeos.

Nenhum outro produto natural apresenta uma mistura tão efetiva e de diferentes fatores, para exercer esses efeitos. Como conseqüência, a utilização do veneno bruto ou de frações impuras nas investigações científicas leva muitas vezes a observações e resultados contraditórios ou dúbios.

Foi graças ao progresso das ciências neste século, em particular a partir do desenvolvimento de novos métodos e técnicas bioquímicas para o isolamento e purificação dos componentes dos venenos, que a obtenção de proteínas puras e bem caracterizadas bioquimicamente possibilitou o estudo farmacológico e fisiopatológico de toxinas. Este estudo tem levado a resultados mais conclusivos e a um melhor entendimento dos efeitos destas toxinas, bem como do seu mecanismo de ação a nível molecular, fazendo delas valiosos instrumentos de pesquisa. Assim, as toxinas isoladas dos venenos de serpentes têm sido usadas nos estudos sobre excitação nervosa e condutividade (ROSENBERG, 1971); na

caracterização de receptores protéicos colinérgicos (CHANGEUX e col., 1970; ALBUQUERQUE e col., 1979); nos efeitos sobre membranas celulares (CONDREA, 1974) e sobre músculos esqueléticos (FOHLMAN e EAKER, 1977; GUTIERREZ e col., 1984).

Algumas das toxinas isoladas dos venenos de serpentes são proteínas ou polipeptídeos que interferem na transmissão do impulso nervoso, atuando na sinápse, ou na excitabilidade de células musculares, afetando processos vitais do organismo.

As toxinas que agem sobre músculos e nervos, podem ser agrupadas em quatro classes quanto à sua atividade biológica (HARRIS, 1984):

1) Neurotoxinas pós-sinápticas (longas e curtas). Elas se ligam aos receptores da membrana pós-sináptica causando um bloqueio neuroefetor.

2) Cardiotoxinas ou toxinas de membranas, que interferem com a integridade funcional de membranas biológicas.

3) Neurotoxinas pré-sinápticas, que inibem a liberaçao de acetilcolina dos terminais nervosos motores.

4) Miotoxinas, que danificam as fibras musculares.

Das duas mil espécies de serpentes, aproximadamente 450 espécies e 800 subespécies são consideradas venenosas.

Dentre as serpentes venenosas existentes no Brasil, destaca-se o gênero Bothrops como o responsável por cerca de 90% do total de acidentes ofídicos que ocorrem no país (ROSENFELD, 1971).

Uma das espécies desse gênero, cujos acidentes são gravíssimos e de alta freqüência, é a *Bothrops jararacussu*. Esta serpente é de grande porte, podendo atingir até 2,20 m. de comprimento. Possui cabeça grande, negra, e bem triangular, com estria amarela pós-ocular, ostentando no dorso colorido de tom aveludado, em que o negro contrasta lindamente com o amarelo-dourado, origem de seu nome popular "surucucu doirada". Suas presas chegam a atingir 2cm, e ela produz grande quantidade de veneno (até 5,5ml ou aproximadamente 400mg na primeira extração) (SILVA JUNIOR, M., 1956; BELLUOMINI, 1967) (Figura 1).

A *B. jararacussu* está distribuída geograficamente em quase todo o território sul-americano (SILVA JUNIOR, M., 1956; HOGE, A.R., ROMANO, S.A., 1972): Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina e principalmente no Brasil nas seguintes regiões: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Sul da Bahia. Vivem em baixadas úmidas e alagadiças (Figura 2).

O estudo do veneno de *Bothrops jararacussu* teve seu início no limiar desse século, com VITAL BRAZIL e RANGEL PESTANA (1909).

FIG. 1 - BOTHROPS JARARACUSSU - comprimento até 2,20 m.; cabeça grande, negra e triangular; estria amarela pós-ocular; dorso colorido de tom aveludado (negro contrastando com amarelo-dourado). É uma solenóglifa com presas atingindo até 2 cm. (foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Giuseppe Puorto, Instituto Butantan).

FIG. 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA DA *BOTHROPS JARARACUSSU*. Ocorre desde o centro-oeste, litoral de leste e sul até a Argentina. Vivem em baixadas úmidas e alagadiças, é o mais imponente representante de *Bothrops*.

VITAL BRAZIL (1911), observando os sinais e sintomas do envenenamento humano e o produzido em animais, descreveu não só muitas de suas características como também algumas de suas propriedades enzimáticas. Este autor observou que:

1º) os sinais e sintomas exibidos no envenenamento pela jararacussu se assemelhavam muito àqueles observados no acidente crotálico;

2º) o veneno exibia intensa atividade coagulante e discreta atividade proteolítica quando comparado com o de outras espécies do gênero Bothrops;

3º) VITAL BRAZIL (19Ø3) verificou que o soro anticrotálico exercia forte ação neutralizante sobre a peçonha de *B. jararacussu*;

4º) soro botrópico sozinho não neutralizava perfeitamente o veneno de jararacussu, fato confirmado por P. FRANCESCHI e col. (comunicação pessoal): em testes de imunodifusão observaram que a peçonha de jararacussu forma linhas de precipitação mais definidas frente ao anti-soro crotálico do que frente ao botrópico.

Posteriormente GONÇALVES (1956) descreveu que o veneno de *B. jararacussu* contém um peptídeo "crotamine-like"; enquanto VITAL BRAZIL, O. (1966) verificou que esse veneno apresentava, à semelhança da crotoxina, a propriedade de

inibir a contratura causada pela acetilcolina no diafragma desnervado de rato.

Mais recentemente, QUEIROZ e col. (1984) estudaram os efeitos locais do veneno de *B. jararacussu*, após injeção (80µg) em músculo tibial anterior de camundongo. Os autores constataram que o veneno produziu necrose da fibra muscular seguida de alterações vasculares e trombose. A recuperação da fibra muscular era muito deficiente, podendo resultar em seqüela permanente.

De um modo geral, os venenos botrópicos das espécies brasileiras foram muito pouco estudados em seus componentes isolados e o veneno de *B. jararacussu* em particular, somente foi fracionado pela primeira vez em 1971 por VIDAL e STOPANI, que dele isolaram duas fosfolipases A_2. No entanto, novas perspectivas surgiram a partir do primeiro trabalho sistemático de RODRIGUES-SIMIONI e col. (1983), que pesquisaram a ação deste veneno e de uma de suas frações sobre a junção neuromuscular do músculo cutâneo peitoral de rã. Esta fração ("pool" IV) resultante da gelfiltração do veneno bruto em Sephadex G-50, contendo principalmente duas proteínas básicas cada uma com peso molecular de aproximadamente 14.000, apresentou atividade hemolítica indireta na presença de íons Ca^{2+}, baixa atividade fosfolipásica A_2, não apresentou atividade proteolítica e era responsável pela maior parte da atividade farmacológica exibida pelo veneno total. Dos estudos realizados, os autores

observaram que a ação bloqueadora das respostas musculares a estímulos elétricos direto e indireto independe da atividade da fosfolipase A_2. Sugeriram então uma ação semelhante à das cardiotoxinas para a(s) proteína(s) responsável(eis) pela atividade tóxica.

No presente estudo propomo-nos a estudar a atividade farmacológica da fração resultante da purificação do pico principal (SIII), o qual apresenta atividade semelhante ao do pool IV de RODRIGUES-SIMIONI e col. (1983). O pico SIII em subseqüente recromatografia resultou em quatro fosfolipases, além de uma fração de maior massa, a SIII-SPV, isenta de atividade fosfolipásica, mas conservando ainda ação bloqueadora neuromuscular e mionecrosante do veneno total.

A fração SIII-SPV miotóxica, recebeu o nome de Bothropstoxina (BthTX) (HOMSI-BRANDEBURGO e col., 1988).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivos:

1) Determinar o modo de ação da Bothropstoxina (BthTX) na junção neuromuscular de camundongos e pintainhos.

2) Correlacionar a ação despolarizante e contraturante da BthTX em preparações nervo musculares.

3. MATERIAIS

3.1. VENENO, PRODUTOS QUIMICOS E FARMACOS

Peçonha - a peçonha de *Bothrops jararacussu* utilizada nesta pesquisa, foi adquirida no Instituto Butantan.

d-Tc - d-tubocurarina, Abbotty.

Neostigmine (Prostigmine), Roche.

TTX - tetrodotoxina p.f. Sigma.

EGTA - 1,2 - di-(2-aminoetoxi) etano-N, N, N´, N´, ácido tetracético, Sigma, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Anibal Vercesi.

Sephadex G-75, Pharmacia.

SP-Sephadex C-25, Pharmacia.

SDS - Page - duodecil sulfato de sódio - gel de poliacrilamida para eletroforese, Sigma.

DNS-Cl (dansyl cloreto) e padrões de dansyl aminoácidos , Sigma.

Os sais utilizados (p.a.) foram adquiridos da Merck.

3.2. ANIMAIS

Camundongos e pintainhos.

Os camundongos de linhagem SPF (swiss) de ambos os sexos utilizados eram procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP, peso (30 à 40g).

Os pintainhos de 1 dia da linhagem HY-Line W 36 foram gentilmente fornecidos pela Granja ITO S/A., e utilizados entre 4º e 12º dia, peso (40 à 120g).

3.3. EQUIPAMENTOS

Banho Maria - Fabbe.

Osciloscópio TEKTRONICS, modelo 3 100 com memória.

Câmara Polaroide mod. 5C.

Estimuladores GRASS mod. S4 e S44.

Fisiógrafo E&M mod. P.M.P. 4A (Narco).

Transdutores de força e deslocamento - Linear Core F50 (Narco).

Micro manipulador completo, com lupa zoom de até 80 X de aumento - marca Wild/Leitz.

Esticador de vidro, para feitura de micro eletrodos - marca David Kopf Instruments.

4. METODOS

4.1. ENSAIOS BIOQUIMICOS

4.1.1. CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-75

O sephadex foi equilibrado em tampão formiato de amônio a Ø,Ø5M, pH = 3,5 e empacotado numa coluna de 125 x 2cm de diâmetro com fluxo constante de 15ml/hora em temperatura ambiente. O volume de cada tubo foi de 5ml e a leitura foi feita em espectrofotômetro em absorbância igual a 28Ønm.

4.1.2. CROMATOGRAFIA EM SP. SEPHADEX C-25

A resina Sp. Sephadex C-25 foi equilibrada em tampão acetato de amônio Ø,3M, pH = 5,Ø e empacotada numa coluna de 1,1 x 27cm. A eluição da coluna foi feita usando-se um gradiente convexo de concentração de Ø,1 a 1,ØM de acetato de amônio (NH_4Ac). A um erlenmeyer, inicialmente contendo 25Øml do tampão de acetato de amônio Ø,1M, pH = 5,Ø a volume constante e diretamente conectado à coluna, ligou-se um funil de separação em nível superior com tampão acetato de amônio 1,ØM. Os picos delimitados foram liofilizados a seguir e guardados em ampolas seladas a -2Ø°C.

4.1.3. ATIVIDADE FOSFOLIPASICA A_2

Esta foi determinada pela titulação potenciométrica dos ácidos graxos liberados durante a reação a pH 8,Ø, e 28°C, como descrito por DE HAAS e col. (1968), usando como fonte de lecitina uma gema de ovo de galinha em emulsão, suspensa em 3ØØml de água destilada contendo 6mM $CaCl_2$ e desoxicolato de sódio 2,7mM. Os ácidos graxos liberados foram titulados potenciometricamente com solução padrão de NaOH Ø,Ø935N, usando um pHmetro Beckman com escala expandida. A atividade fosfolipásica foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto e a atividade específica pelo número de µ equivalentes de base consumida por minuto por mg de proteína. Em cada ensaio foram utilizados 1Øµg de proteína.

4.1.4. ATIVIDADE HEMOLITICA

Foram utilizadas hemácias humanas lavadas e suspensa em 1:7 de tampão Tris-salina (Ø,8% NaCl, Ø,Ø2% KCl, Tris HCl 1ØmM, pH = 7,4). Alíquotas da suspensão de eritrócitos (1ml) foram incubadas com diferentes concentrações de BthTX e SIII (Ø,1ml) e Ø,1ml de Tris-salina contendo ou não $CaCl_2$ à 22mM. A concentração final de $CaCl_2$ foi de 3,6mM. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente (25 - 3Ø°C) as amostras foram centrifugadas a 15Ø x g. Aos sobrenadantes foi adicionado um cristal de $NaNO_3$ para oxidar a hemoglobina. A absorbância a 41Ønm foi determinada com brancos obtidos de

amostras incubadas sem SIII ou BthTX (CONDREA e col., 1964; CONDREA 1979).

As técnicas de eletroforese, dansylação e análise de amino ácidos foram realizados pela Dra. Maria Inez H. Brandeburgo, do Departamento de Bioquímica de Ribeirão Preto, USP.

4.2. ENSAIOS BIOLOGICOS

4.2.1. REGISTRO MIOGRAFICO E ELETROFISIOLOGICO EM CAMUNDONGOS

Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo - A atividade biológica das frações de *B. jararacussu* foi testada sobre a capacidade da fração ativa (BthTX) em bloquear a transmissão neuromuscular, usando técnicas miográfica e eletrofisiológica.

4.2.1.1. REGISTRO MIOGRAFICO

Técnica: Foram usados camundongos de ambos os sexos e peso superior a 30 gramas. Após sacrifício do animal através de uma pancada na cabeça e sangria por secção dos vasos do pescoço, procedeu-se à retirada e montagem do hemidiafragma esquerdo com o nervo motor correspondente, de acordo com a técnica (modificada) descrita por BÜLBRING usando ratos (1946). Como meio nutritivo usou-se a solução de Tyrode glicosada com a seguinte composição em mM/l (NaCl 137; KCl

2,7; $CaCl_2$ 1.8; $MgCl_2$ Ø,25; NaH_2PO_4 Ø,3; $NaHCO_3$ 11,9; glicose 11,1). Quando necessário, o $CaCl_2$ foi aumentado para 1ØmM, ou excluído da composição. Em outras condições, além da exclusão do Ca^{2+}, foi adicionado o EGTA. O volume da cuba foi de 2Øml e sua temperatura mantida constante a 37ºC. Borbulhou-se a preparação com carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) no banho. A preparação foi estimulada direta e indiretamente através de seu nervo motor usando-se estimuladores Grass modelos S4 e S44. O diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante (2g/cm) através de um fio, ligado a um transdutor miográfico Linear Core F5Ø acoplado a um fisiógrafo E & M modelo P.M.P. 4A para registro das tensões produzidas pelas contrações do músculo. Empregaram-se sempre estímulos supra-maximais usando-se os seguintes parâmetros: estimulação indireta - freqüência de Ø,1Hz e duração de Ø,2mseg e estimulação direta - freqüência de Ø,1Hz, duração de 2mseg e intensidade variável (de 7Ø a 9ØV).

Método: Após o equilíbrio da preparação (3Ø') foram adicionados doses variadas de 1Ø, 2Ø, 3Ø, 4Ø e 6Øµg/ml da toxina em estudo: BthTX (SIII SPV).

4.2.1.2. REGISTRO ELETROFISIOLOGICO

Técnica: Utilizaram-se camundongos de 3Ø a 4Øg cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado com um segmento do nervo frênico correspondente, segundo técnica já descrita (4.2.1.1.). O músculo foi estendido e fixado com sua face

torácica voltada para cima no fundo de uma cuba de perspex com 3cm de comprimento, 1,8cm de largura e Ø,8cm de profundidade, através de alfinetes apropriados. A cuba foi preenchida com 2,5ml de solução nutritiva glicosada de composição já citada. A oxigenação foi feita pelo borbulhamento de carbogênio. O banho foi mantido à temperatura ambiente (25 - 3Ø°C). Os potenciais bioelétricos das fibras musculares foram captados através de microeletrodos de vidro preenchidos com solução de KCl 3M e de resistência compreendida entre 7 - 15MOhms, e registrados em osciloscópio Tektronix. As micropipetas foram previamente preparadas e conservadas em geladeira até o momento de uso (NASTUK e HODGKIN, 195Ø; FATT e KATZ, 1952).

Método: O registro do potencial de membrana das fibras musculares foi feito sob controle microscópico, inserindo-se a micropipeta no interior de um fibra muscular e medindo-se o deslocamento vertical do feixe luminoso, no "ecran" do osciloscópio, no momento da penetração da fibra, segundo as técnicas descritas por NASTUK e HODGKIN (195Ø) e FATT e KATZ (1952). Foram feitas de 5 a 1Ø medidas em pontos distintos da região da placa terminal e calculados a média aritmética, o desvio e o erro padrão. Procedimento semelhante foi feito fora da região da placa terminal.

Além do procedimento descrito acima, introduziu-se a micropipeta aleatoriamente em fibras na região da placa terminal mantendo-a implantada por até 6Ø minutos. Observou-

se no "ecran" do osciloscópio as deflexões do feixe, indicando as variações dos valores dos potenciais de membrana. Em algumas experiências, as preparações foram incubadas com TTX (1µg/ml) durante 2Ø minutos antes da adição da BthTX.

4.2.1.3. REGISTRO DO POTENCIAL COMPOSTO DO MUSCULO

Técnica: Utilizaram-se camundongos de 3Ø a 4Øg cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado com um segmento do nervo frênico correspondente, segundo técnica já descrita. O músculo foi estendido e fixado com sua face torácica voltada para cima no fundo de uma cuba de perspex com 3cm de comprimento, 1,8cm de largura e Ø,8cm de profundidade, através de alfinetes apropriados. A cuba foi preenchida com 2,5ml de solução nutritiva glicosada de composição já citada. A oxigenação foi feita pelo borbulhamento de carbogênio. O banho foi mantido à temperatura ambiente (25 - 3Ø°C). O potencial composto do músculo foi registrado em resposta à estimulação elétrica (supra maximal) indireta, usando eletrodo de platina posicionado na superfície da solução nutritiva perpendicularmente à região de inserção do nervo no músculo. O sinal passando por um seguidor catódico era captado pelo osciloscópio e fotografado através de câmara Polaroide modelo 5C.

Método: Em todas as preparações foi usada uma única dose de BthTX. Registrou-se o potencial de ação composto do

músculo antes da adição de BthTX (10µg/ml) - controle. O período de contato da toxina com a preparação foi de 60 minutos. Durante este período registrou-se o potencial de ação composto do músculo aos 30 e 60 minutos.

4.2.2. REGISTRO MIOGRAFICO E ELETROFISIOLOGICO EM PINTAINHOS

Preparação músculo biventer cervicis de pintainho

4.2.2.1. REGISTRO MIOGRAFICO

Técnica: A preparação foi isolada de acordo com o método de GINSBORG e WARRINER (1960). Em todos os experimentos foram usadas aves de 4 a 12 dias. O músculo foi suspenso em uma cuba de 1,5ml em solução de Krebs com a seguinte composição em mM (NaCl 118,1; KCl 4,8; $CaCl_2$ 2,5; $MgSO_4$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; $NaHCO_3$ 25; glicose 11,1). Esta solução foi borbulhada de modo constante com carbogênio a 37°C. Quando necessário, o $CaCl_2$ foi excluído da composição, e em outras condições, além da exclusão do Ca^{2+}, foi adicionado o EGTA. Submeteu-se a preparação a uma tensão constante de 0,2 a 0,5g com ou sem estimulação elétrica. As respostas da preparação à acetilcolina (Ach) e Botropstoxina (BthTX) foram registradas isometricamente através de transdutor de força e deslocamento (Linear Core F50) acoplado a um fisiógrafo E & M modelo P.M.P. 4A.

Método: Cada preparação foi usada para uma única dose de BthTX. Algumas preparações foram tratadas com d-Tc, outras com TTX antes de BthTX.

4.2.2.2. REGISTRO ELETROFISIOLOGICO

Técnica: O registro do potencial de repouso foi feito através da técnica de microeletrodo intracelular, já citada para preparações de camundongo (4.2.1.2.) e adaptada para o músculo biventer cervicis segundo GINSBORG (1960). O volume da cuba foi de 2,5ml.

Método: A preparação ficou em contato com a solução de Tyrode durante 30 minutos (tempo para estabilização da preparação). Em seguida a solução foi renovada e iniciaram-se as medidas (amostra de cinco fibras) do potencial de repouso (controle). Após a adição da BthTX (30µg/ml) ao banho, as leituras foram realizadas durante 90 minutos.

5. RESULTADOS

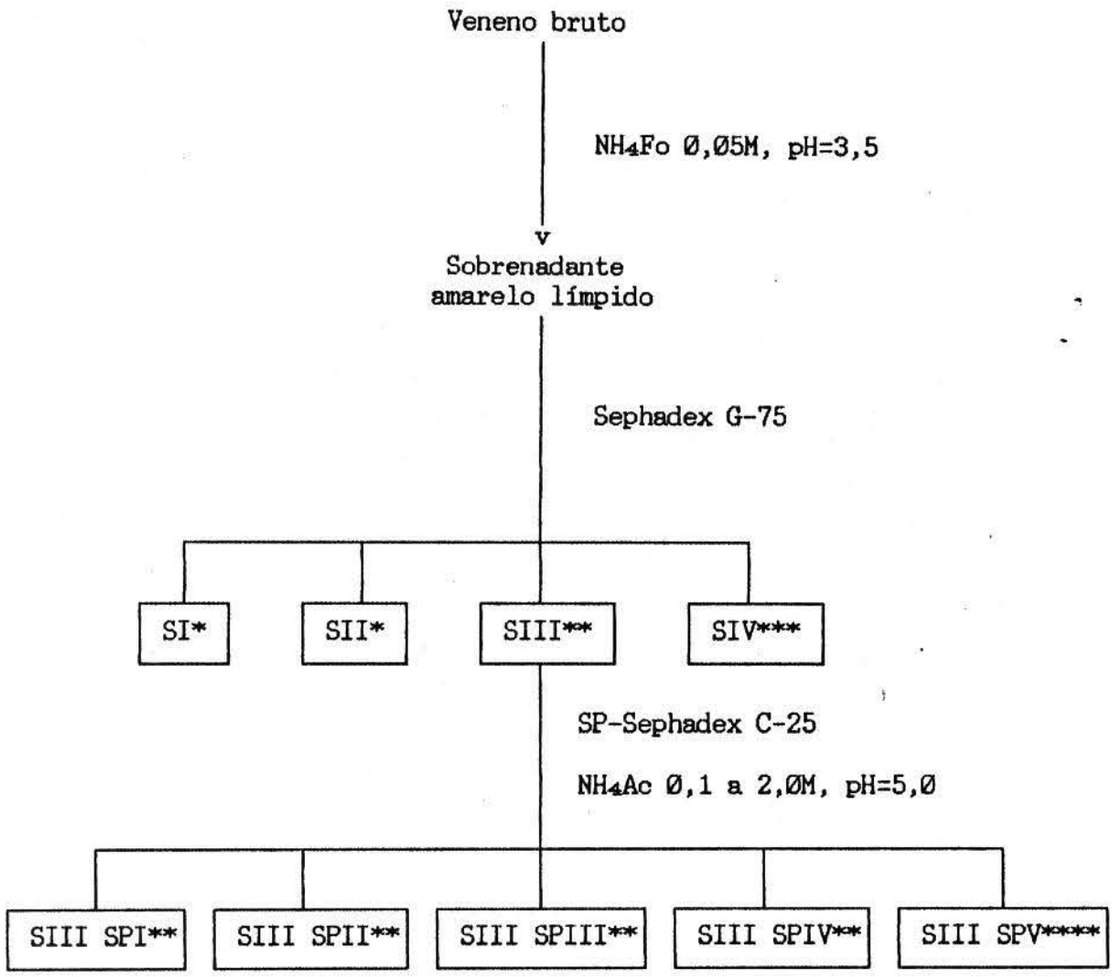
5.1. FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DA PEÇONHA DE *B. JARARACUSSU*

O trabalho de separação, purificação e cromatografia das proteínas biologicamente ativas do veneno de *B. jararacussu*, foi executado nos laboratórios do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela Dra. Maria Inês Homsi Brandeburgo.

O fluxograma da purificação de proteínas ativas do veneno de *B. jararacussu* é mostrado na Figura 3.

5.1.1. CENTRIFUGAÇÃO DO VENENO BRUTO EM FORMIATO DE AMONIO COM SEPARAÇÃO DO SOBRENADANTE

Do veneno bruto seco de *B. jararacussu*, foram tomados cerca de 100mg e diluídos em tampão formiato de amônia (NH_4Fo) e o pH ajustado para 3,5 com ácido fórmico. O veneno diluído foi centrifugado a 480 x G durante 10' à 0°C, obtendo-se daí uma suspensão amarelada e límpida.



* Atividades coagulante e proteolítica

** Atividade fosfolipásica

*** Peptídeos potenciadores de bradicinina

**** Bothropstoxina (BthTX)

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DE PROTEINAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS DO VENENO DE *B. jararacussu*.

5.1.2. FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 E LOCALIZAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMATICAS

Alíquotas desse sobrenadante (suspensão amarelada e límpida - 5.1.1.) foram retiradas para leitura de absorbância a 280nm e dosagem de proteínas. O restante do sobrenadante foi submetido a filtração em gel Sephadex G-75 (já descrito em materiais e métodos), obtendo um fracionamento parcial da peçonha de *B. jararacussu* conforme mostra a Figura 4. As frações assim obtidas, designadas SI a SIV, foram delimitadas conforme indicado e depois liofilizadas. Procedeu-se à refiltração em gel de Sephadex G-75 da fração SIII, nas mesmas condições anteriores, para monitoração de possíveis contaminantes.

5.1.2.1. ATIVIDADES COAGULANTE E PROTEOLITICA

As atividades coagulante e proteolítica foram detectadas somente nas frações SI e SII, e juntas representam somente 32,5% da atividade original. A fração SIII concentrou toda a atividade fosfolipásica A_2 do veneno bruto e não apresentou atividade proteolítica. A fração SIV continha peptídeos ativos potenciadores de bradicinina. Quanto à atividade fosfolipásica A_2, cabe ressaltar que esta enzima foi purificada cerca de duas vezes, devido a diversos testes empregados para esta determinação, sendo considerada uma fração com alto grau de pureza.

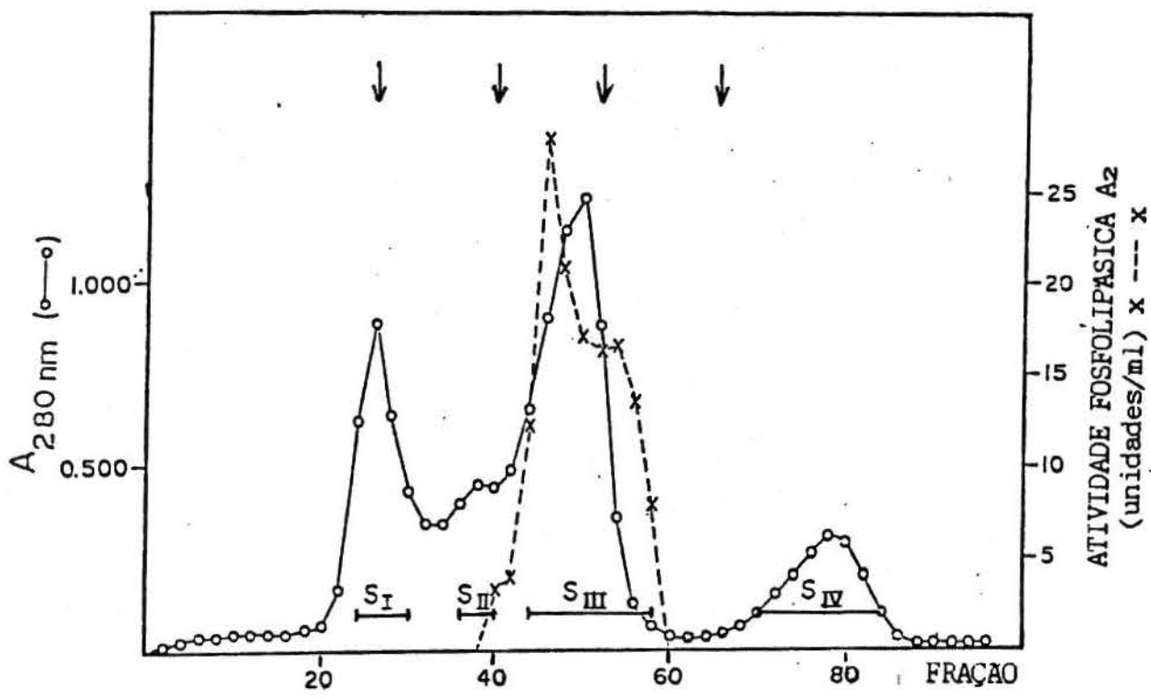


FIG. 4 - FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-75 DE 100 MG DO VENENO BRUTO DE *B. jararacussu* EM TAMPÃO FORMIATO DE AMONIO 0,05M, PH = 3,5. Foi utilizada uma coluna de 125 x 2 cm, com fluxo de 15 ml/hora, temperatura ambiente e coletados 5 ml/tubo. As barras horizontais indicam onde os "pools" foram recolhidos e as setas indicam os marcadores de P.M.: 1) ovoalbumina (44.000); 2) anidrase carbônica (31.000); 3) citocromo c (12.400) e 4) basic pancreatic trypsin inhibitor (trasylol) (6.600).

x —— x atividade fosfolipásica

o —— o absorbância em 280 nm

5.1.3. CROMATOGRAFIA DE TROCA IONICA EM SP-SEPHADEX C-25 E ATIVIDADE FOSFOLIPASICA

A fração SIII, obtida da filtração em Sephadex G-75 (5.1.2.), foi cromatografada em coluna de troca iônica contendo SP-Sephadex C-25, conforme já descrito em métodos (4.1.2.). Deste fracionamento obtiveram-se cinco sub-frações assim designadas: SIII SPI, SIII SPII, SIII SPIII, SIII SPIV e SIII SPV (ou BthTX), das quais somente as três primeiras apresentaram atividade fosfolipásica, como mostra a Figura 5. Cada sub-fração foi delimitada como indicado e, após diálise, liofilização e dosagem de proteínas, foi feita a distribuição em quantidades específicas de 100 e 200µg de cada amostra em tubos de pyrex apropriados que foram selados a vácuo e guardados a -5°C. Os valores do gradiente convexo de concentração de NH_4Ac, apresentados na Figura 5, são experimentais e foram determinados através da medida da condutividade nos tubos e lançados em uma reta padrão, traçada com concentrações molares conhecidas de NH_4Ac e quantificadas através de um condutivímetro.

5.1.3.1. ATIVIDADE FOSFOLIPASICA A_2 E HEMOLITICA

A atividade fosfolipásica destas cinco sub-frações foi testada por ensaio potenciométrico (item 4.1.3. em métodos). Por este método a sub-fração SIII SPI foi purificada por 5 vezes em relação ao veneno bruto, SIII SPII foi a que apresentou maior atividade fosfolipásica específica

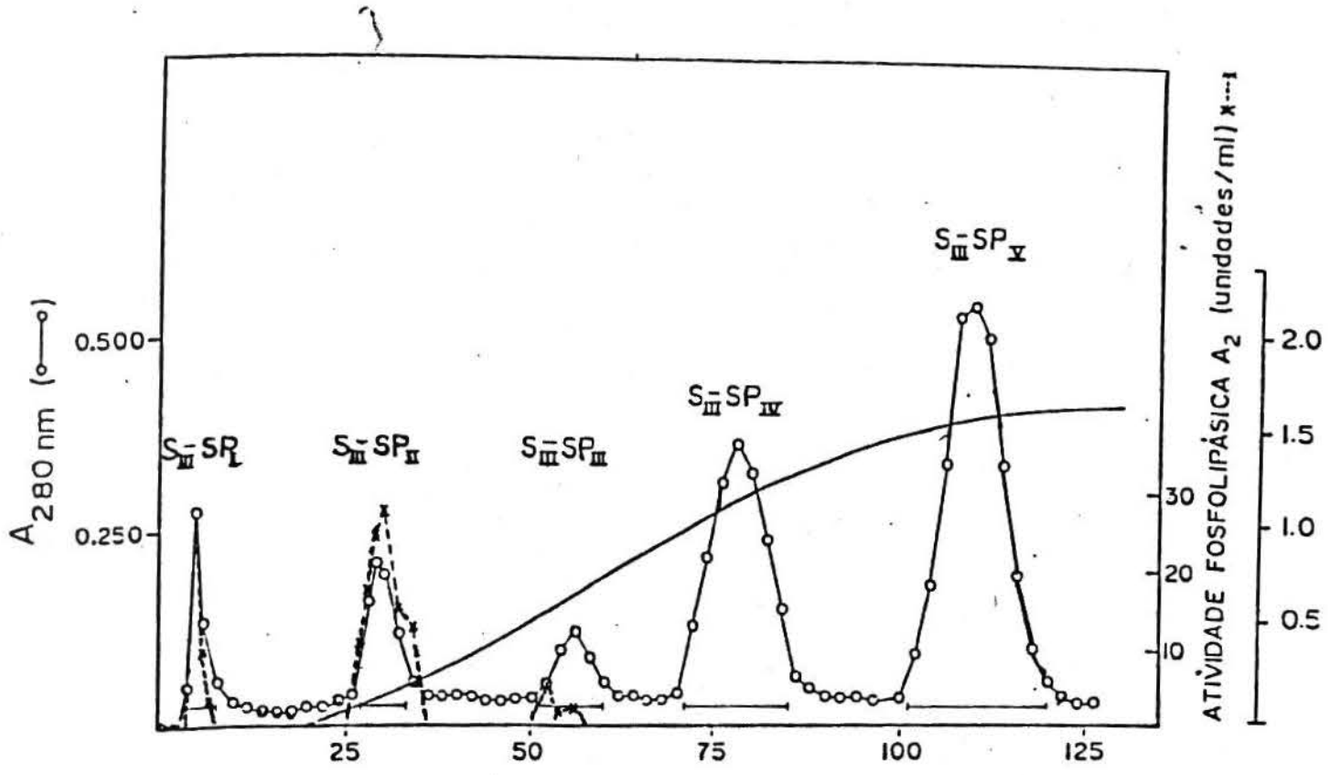


FIG. 5 - RECROMATOGRAFIA DE 15 MG DA FRAÇÃO SIII (FIG. 4) EM COLUNA DE SP-SEPHADEX C-25. A eluição foi realizada com um sistema tampão em gradiente convexo usando-se acetato de amônio pH = 5,0 de 0,1 a 2,0M. Foi utilizada uma coluna de 1,1 x 27cm, com fluxo de 15ml/hora, coletando-se 2,5 ml/tubo de efluente e temperatura ambiente.

e foi purificada por 10 vezes, enquanto que SIII SPIII apresentou atividade fosfolipásica específica muito baixa, igual a do veneno total. A sub-fração SIII SPIV apresentou atividade fosfolipásica residual, devendo ser mencionado que esta atividade só foi detectada quando se utilizaram 40µg da sub-fração, ao passo que para as outras amostras o mesmo teste foi realizado com no máximo 10µg de proteína. Mesmo assim, a atividade específica de SIII SPIV foi menor que a do veneno bruto, resultando num fator de purificação menor que 1.

Por outro lado, SIII SPV (BthTX) não apresentou atividade fosfolipásica em ensaios realizados com até 200µg de proteína. Também não apresentou atividade hemolítica direta (4.1.4. em métodos) quando testada com a mesma quantidade de proteína (BthTX 200µg), Figura 6, mesmo na presença de Ca^{2+} 3,6mM, concentração final.

5.1.4. GRAU DE PUREZA

O grau de pureza da BthTX foi demonstrado pela detecção de apenas uma banda em eletroforese em gel de poliacrilamida e confirmado em SDS - Page e também pelo seqüenciamento da região N- terminal até o décimo resíduo: Ser^{1} - Leu^{2} - Phe^{3} - Gly^{4}, Leu^{5} - Gly^{6} - His^{7} - Met^{8} - $Ileu^{9}$ - Leu^{10}.

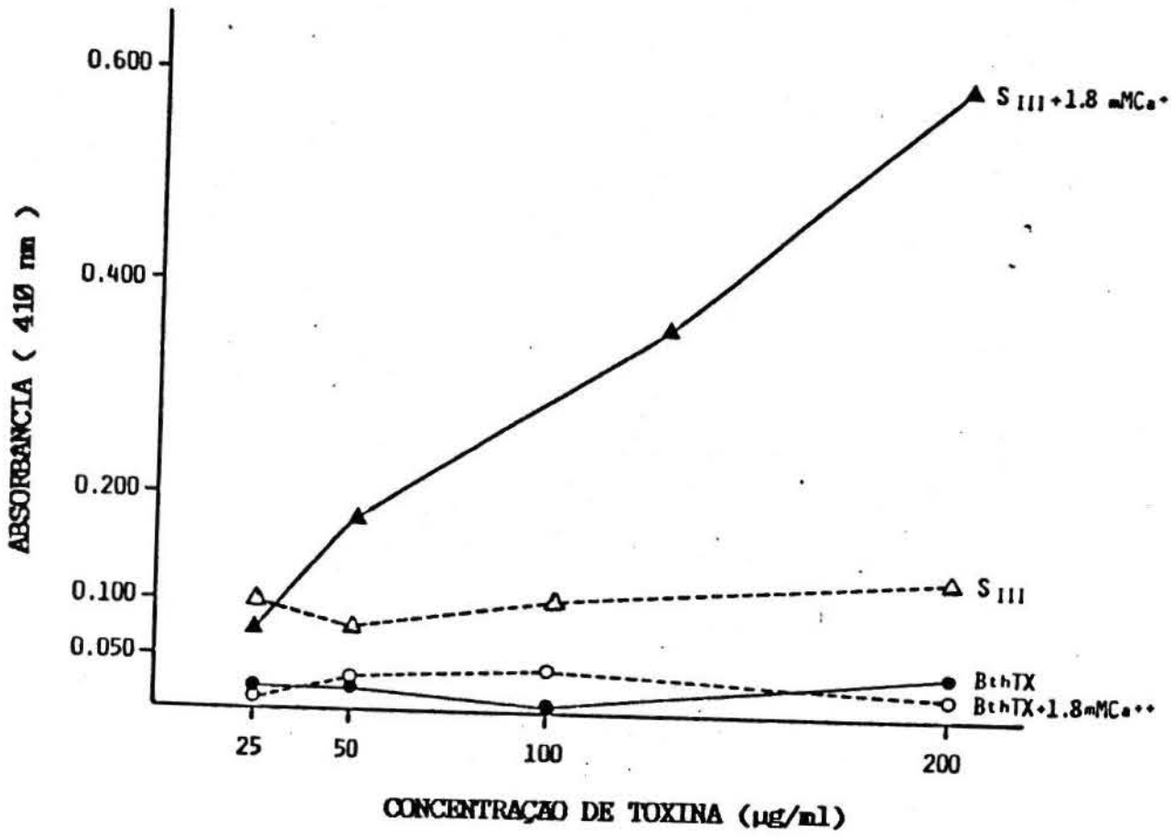


FIG. 6 - ATIVIDADE HEMOLITICA DA FRAÇÃO SIII E DO SIII SPV (BthTX). Incubação da fração SIII com hemácias humanas em ausência (Δ —— Δ) e em presença de Ca^{2+} (▲ —— ▲). Incubação da BthTX em ausência (●——●) e presença de Ca^{2+} (o——o). Notar que a BthTX é destituída de atividade hemolítica mesmo em presença de 1,8mM Ca^{2+}; até a dose de 200µg/ml.

5.2. ENSAIOS BIOLOGICOS

5.2.1. EFEITOS DA BthTX SOBRE A PREPARAÇÃO NERVO FRENICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO, EM CONDIÇOES NORMAIS DE CALCIO EXTERNO ($[Ca^{2+}]$ = 1,8mM)

5.2.1.1. REGISTRO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR

Em 6 experiências, a BthTX na concentração de 10µg/ml determinou bloqueio total e irreversível das respostas musculares ao estímulo direto (não ilustrado na figura apresentada) e indireto, após 30 minutos de incubação (Figura 7). Em 10 outros experimentos observou-se, no mesmo intervalo de tempo, bloqueio nunca inferior a 50%. O bloqueio não foi revertido por lavagens prolongadas (2h) ou por neostigmine (1µg/ml). O tempo médio para um bloqueio de 50% em resposta a estímulos indiretos, foi de 49,5 ± 6,8 minutos (19 experimentos) e a estímulos diretos foi de 136,8 ± 22 (6 experimentos). A pré-incubação com BthTX não altera a resposta característica de estímulos de freqüência tetanizante. Não há facilitação pós-tetânica.

Usando-se doses iguais ou superiores a 10µg/ml da toxina observou-se além do bloqueio da transmissão neuromuscular, contratura (que é dose dependente) e fibrilação (visível ao microscópio com aumento de 80 x) (Figura 7). A fibrilação foi suprimida pelo tratamento prévio da preparação com d-Tc - 10µg/ml. Persistindo, no entanto, o

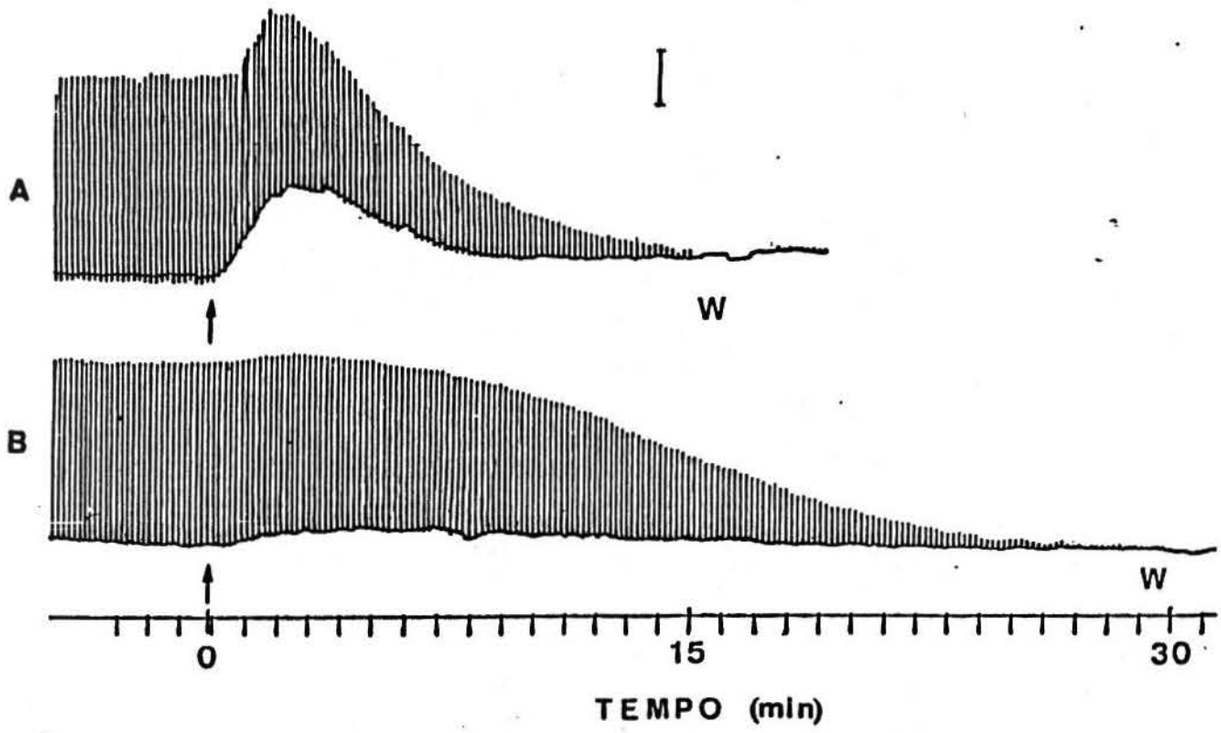


FIG. 7 - REGISTRO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR DA PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO EM RESPOSTA A ESTÍMULO ELÉTRICO (PULSOS SUPRA-MAXIMAIS DE Ø,2mseg E Ø,1Hz).

A seta indica o tempo de adição da BthTX - em A: 2Øµg/ml; em B: 1Øµg/ml. Em relação a B, o tempo médio para bloqueio de 5Ø% das respostas a estímulo indireto foi (49,5 ± 6,8min. EPm) em 19 experimentos; a estímulo direto foi (136,8 ± 22 min EPm) em 6 experimentos. Notar a contratura e o tempo necessário para o bloqueio entre A e B (dose-dependentes). O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (2g).

efeito bloqueador da BthTX sobre as respostas à estimulação direta do músculo.

5.2.1.2. MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO

Foram feitas 35 medidas do potencial de repouso em sete experiências realizadas. Este parâmetro foi medido antes e após a incubação da preparação com a BthTX (10µg/ml) durante 120 minutos. Comparando os valores antes da adição da BthTX com aqueles após a sua adição, foi evidenciada uma significante despolarização ($p < 0,05$) (Tabela I). Comparando o potencial de repouso após a adição da BthTX (situação de controle, -80mV) com o término do experimento (120 minutos depois), o grau de despolarização chega a atingir -33mV, correspondendo a 53% ($p < 0,05$, $n=35$) (Figura 8-A e Tabela I).

5.2.1.3. REGISTRO DO POTENCIAL DE AÇÃO COMPOSTO DO MUSCULO

Em quatro preparações sob estimulação indireta observou-se uma completa inibição irreversível da amplitude no potencial de ação composto do músculo com doses equivalentes de BthTX (10µg/ml); 38,3 ± 8,2% do bloqueio depois de 30 minutos e 79,3 ± 3% depois de 60 minutos (Figura 9).

TABELA I - MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO DA FIBRA MUSCULAR (EM -mV)

EXP. Nº	DOSE (µg/ml)	CONTROLE Tyrode Normal		BthTX Tyrode Normal				
		Ø′	30′	Ø′	30′	60′	90′	120′
1	10	80	80		40	40		24
		80	84		56	36		28
		76	88		56	28		24
		84	76		44	32		22
		88	76		40	40		20
2	10	84	88	84	84	20	26	50
		84	86	82	78	24	68	64
		80	84	88	52	60	52	68
		72	84	82	64	52	52	68
		60	84	84	54	62	40	28
							28	20
3	10	78	76	76	68	20	68	56
		82	80	68	60	68	60	44
		82	86	80	78	40	28	52
		80	88	84	64	40	48	36
		70	88	80	68	60	56	40
4	10	80	74	88	64	40	32	20
		92	84	84	40	56	40	40
		82	92	64	76	60	60	32
		92	84	80	56	48	48	32
		90	88	84	78	48	42	60
5	10	78	68	76	40	40	40	30
		68	72	80	40	40	16	28
		76	82	84	42	36	36	16
		80	80	82	56	42	24	20
		68	80	80	42	36	24	24
6	10	80	80	88	48	60	60	28
		64	84	68	90	80	40	20
		84	80	89	80	44	40	40
		80	80	80	58	68	68	30
		80	70	84	56	64	84	40
7	10	70	80	80	64	68	20	8
		60	88	60	70	20	40	68
		60	80	78	44	30	52	20
		88	80	64	60	44	16	24
		86	84	80	58	40	14	12
MÉDIA ± DESVIO PADRÃO		80	81,6	79	60	45	42	33
		7,2	5,5	7,4	14,4	15,3	17,9	15,8

Em cada experiência, o potencial de membrana da fibra muscular de diafragma isolado de camundongo foi registrado na região da placa terminal, nos períodos indicados.

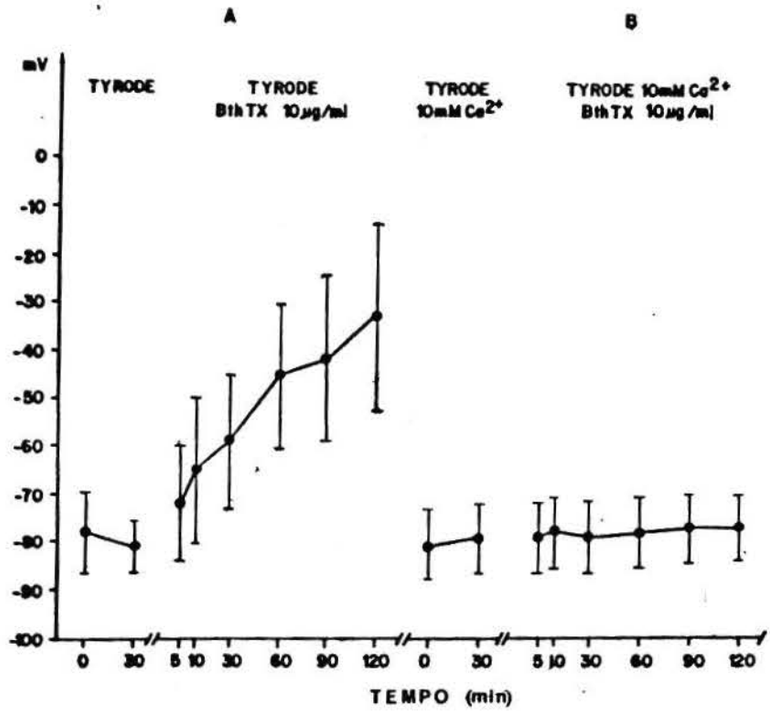


FIG. 8 - REPRESENTAÇÃO GRAFICA DO EFEITO DA BthTX SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DAS FIBRAS MUSCULARES DE DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO. A) Notar a significante despolarização presente após 120min. da BthTX 10µg/ml (n=7); B) Notar a inibição desse efeito pelo Ca^{2+} 10mM, no mesmo intervalo de tempo (n=5).

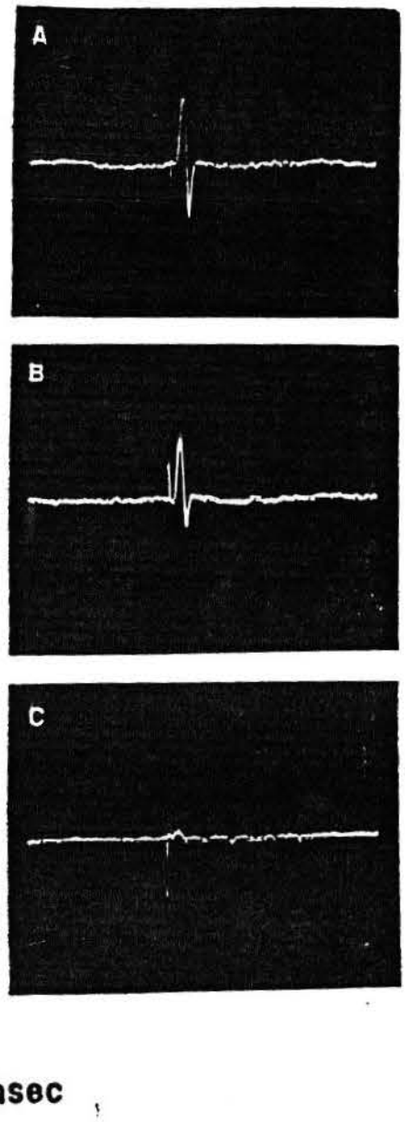


FIG. 9 - POTENCIAL DE AÇÃO COMPOSTO DO MÚSCULO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO REGISTRADO ANTES E APÓS ADIÇÃO DE 10µg/ml DA BthTX.

A) registro controle; B) após 30 minutos de contacto; C) após 60 minutos. Notar a diminuição da amplitude do potencial que evolui para bloqueio da transmissão neuromuscular.

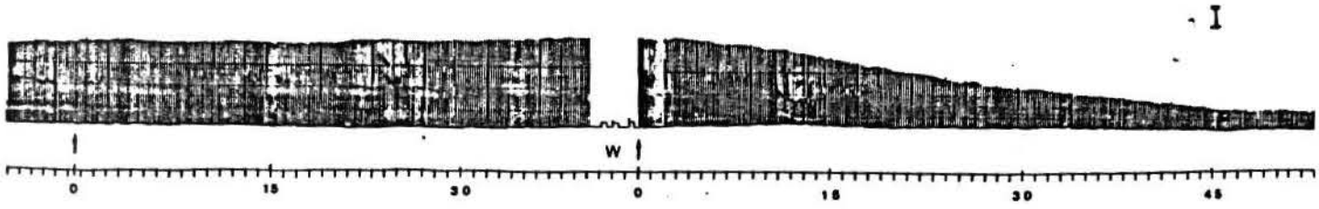
5.2.2. EFEITOS DA BthTX SOBRE A PREPARAÇÃO NERVO FRENICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS, EM PRESENÇA DE ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE CALCIO EXTERNO ([Ca^{2+}] = 10mM)

5.2.2.1. REGISTRO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR

A pré-incubação do diafragma de camundongo com solução de Tyrode contendo Ca^{2+} 10mM, durante 20 minutos, protegeu a preparação do bloqueio característico pela BthTX (40 minutos de contato). A solução de Tyrode contendo Ca^{2+} 10mM foi removida através de repetidas lavagens com solução de Tyrode normal. Repetindo-se a adição da toxina ao banho (10µg/ml) observa-se o aparecimento do bloqueio na amplitude das contrações, nas três experiências realizadas (Figura 10). Elevando-se porém a dose da BthTX para 30 ou 60µg/ml, observam-se resultados distintos daqueles descritos para a dose de 10µg/ml. Assim, a presença no banho de Ca^{2+} não impede de modo completo o efeito bloqueador da BthTX, e ainda a simples substituição do Tyrode Ca^{2+} 10mM pelo Tyrode normal determina o aparecimento imediato de contratura seguido de bloqueio total em 42 ± 6 minutos (Figura 11).

5.2.2.2. MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO

Procedimento semelhante foi usado pré-tratando a preparação com Tyrode contendo Ca^{2+} 10mM durante cerca de 45 minutos, seguido da adição da BthTX (n = 5). Após 60 minutos de observação, este tratamento mostrou uma inibição da



TEMPO (min)

FIG. 10 - REGISTRO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR DA PREPARAÇÃO NERVO FRENICO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO ESTIMULADA COM PULSOS SUPRA-MAXIMAIS 0,2mseg E 0,1Hz. Na presente experiência, a preparação foi banhada com Tyrode $CaCl_2$ 10mM (antes de W) e com Tyrode normal após lavagem (W). As setas indicam a adição da BthTX ao banho, na concentração final de 10µg/ml. A barra vertical representa a tensão de 2g.

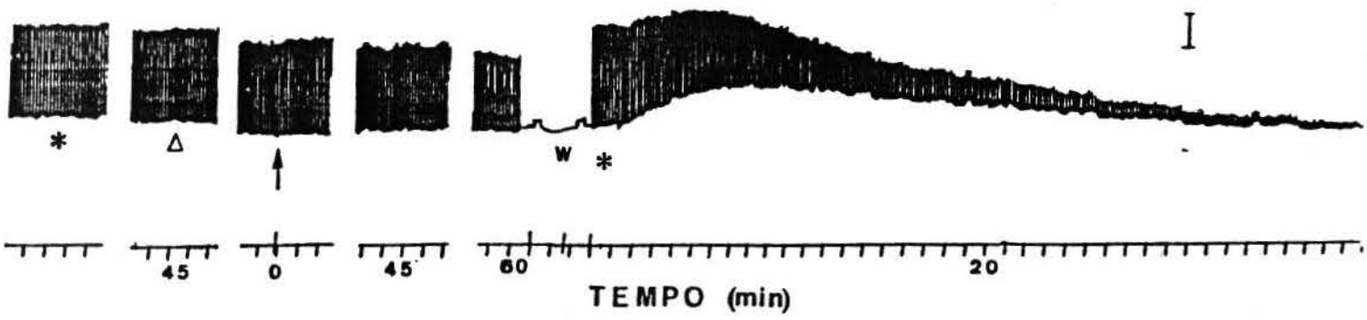


FIG. 11 - REGISTRO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR NA PREPARAÇÃO NERVO FRENICO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO ESTIMULADA INDIRETAMENTE COM PULSOS SUPRA MAXIMAIS DE 0,05Hz E 0,2mseg. Na presente experiência a preparação foi banhada com Tyrode normal (controle), indicado com o símbolo *, e Tyrode com Ca^{2+} 10mM após 45 minutos de observação, indicado pelo símbolo Δ . A seta mostra o ponto de adição da BthTX (60µg/ml). Em W, 60min. após a adição da BthTX, a preparação foi lavada com Tyrode normal (3x). Notar o efeito contraturante marcante imediato à W e o tempo necessário para o bloqueio (40 minutos, n=3). A barra vertical representa tensão de 2g.

despolarização produzida pela BthTX. Essa proteção dada pela alta concentração de cálcio mostrou que o potencial de repouso flutuou em torno do valor controle durante os 120 minutos de observação (n = 25 medidas) (Tabela II e Figura 8-B). Porém, depois de lavar sucessivamente com solução de Tyrode normal, uma nova adição de BthTX determinou o aparecimento do efeito despolarizante, ($p < 0,05$, n=3), não mostrado na figura.

5.2.3. EFEITOS DA BthTX SOBRE A PREPARAÇÃO NERVO FRENICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS, INCUBADOS COM d-Tc (10µg/ml) OU COM TTX (1µg/ml)

5.2.3.1. MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO DA FIBRA MUSCULAR

A incubação dos diafragmas durante 20 minutos com d-Tc (10µg/ml) ou com TTX (1µg/ml) antes da adição da BthTX nas doses de 10 e 20µg/ml (n=6), não altera a capacidade despolarizante desta toxina (Tabela III). Ou seja, os valores dos potenciais de repouso passaram de -81,3mV para -39mV em um período de 120 minutos, a exemplo do que ocorre em músculos não tratados (Tabela I). Aumentando-se a concentração de BthTX para 20µg/ml, obtem-se um nível de despolarização ainda maior no mesmo período de tempo (Tabela III). É importante salientar que os valores dos desvios das médias são cada vez maiores ao longo do período de incubação, à medida em que se intensifica o efeito despolarizante. É uma característica da BthTX induzir a despolarização das fibras

TABELA II - MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO DA FIBRA MUSCULAR (EM -mV)

EXP. Nº	DOSE (µg/ml)	CONTROLE Tyrode (Ca^{2+} 1Ø mM)		BthTX Tyrode (Ca^{2+} 1Ø mM)				
		Ø′	3Ø′	Ø′	3Ø′	6Ø′	9Ø′	12Ø′
1	1Ø	84	84	88	78	76	78	72
		8Ø	86	8Ø	82	8Ø	78	8Ø
		84	84	8Ø	84	8Ø	8Ø	78
		84	84	8Ø	8Ø	8Ø	7Ø	74
		82	82	8Ø	8Ø	8Ø	72	74
2	1Ø	82	8Ø	8Ø	84	8Ø	84	8Ø
		78	72	82	84	8Ø	84	8Ø
		84	78	78	78	82	8Ø	8Ø
		8Ø	78	78	68	72	76	78
		82	8Ø	78	64	68	7Ø	68
3	1Ø	96	86	88	8Ø	8Ø	8Ø	86
		86	82	86	84	8Ø	8Ø	82
		76	8Ø	86	86	84	8Ø	8Ø
		88	8Ø	82	86	82	82	8Ø
		88	8Ø	84	86	78	82	8Ø
4	1Ø	76	76	68	8Ø	8Ø	6Ø	68
		78	68	72	8Ø	8Ø	76	68
		72	8Ø	84	7Ø	7Ø	8Ø	84
		74	76	8Ø	76	82	7Ø	8Ø
		68	78	74	72	84	7Ø	8Ø
5	1Ø	88	84	72	84	8Ø	78	72
		84	84	74	72	6Ø	7Ø	72
		7Ø	72	68	78	76	8Ø	8Ø
		8Ø	64	8Ø	72	76	8Ø	74
		8Ø	8Ø	8Ø	8Ø	7Ø	8Ø	74
MÉDIA ± DESVIO PADRÃO		81	79	79	79	78	78	77
		6,2	5,4	5,5	6,Ø	5,6	5,6	5,Ø

Em cada experiência determinou-se o potencial de membrana do músculo diafragma isolado de camundongo na região das placas terminais, nos períodos indicados. Os dados correspondem a média ± desvio padrão dos valores dos potenciais de membrana em cinco experimentos com a dose de 1Øµg/ml, banhado com Ca^{2+} 1ØmM - condição de controle - e Ca^{2+} 1ØmM + BthTX, onde o potencial de repouso flutua em torno dos valores controle.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

TABELA III - EFEITO DESPOLARIZANTE DA BthTX EM PREPARAÇÕES CURARIZADAS

EXP. Nº	CONTROLE Tyrode Normal		INCUBAÇÃO dTc 10µg/ml	BthTX + dTc 10µg/ml				
	Ø′	30′	20′	Ø′	30′	60′	90′	120′
1	80	80	82	80	68	68	80	40
	88	70	86	72	72	68	48	60
	68	88	64	80	76	64	64	56
	82	82	86	64	80	80	80	70
	80	80	88	88	74	74	76	68
2	82	98	80	90	80	48	60	34
	72	80	84	72	60	70	34	34
	86	92	80	80	60	80	40	44
	96	82	88	82	52	40	60	52
	86	78	80	70	64	40	52	30
3	84	86	76	94	80	76	54	12
	78	80	84	84	44	58	36	18
	74	74	88	80	90	80	32	20
	80	82	88	84	84	80	32	24
	84	84	80	90	70	64	40	18
4	88	78	88	70	70	70	52	40
	76	80	72	82	68	80	40	34
	82	78	80	78	76	82	72	52
	80	78	90	84	84	74	72	44
	80	78	84	80	68	76	72	30
MÉD.±	81.3	81.4	82.9	80.2	69	68	54.8	39
SD	6.2	6.1	6.5	7.6	12.3	13	16.6	16.7

EXP. Nº	CONTROLE Tyrode Normal		INCUBAÇÃO dTc 10µg/ml	BthTX + dTc 20µg/ml				
	Ø′	30′	20′	Ø′	30′	60′	90′	120′
1	96	78	88	80	76	64	46	4
	88	76	88	80	70	64	18	2
	88	88	72	80	72	62	34	4
	90	90	92	80	82	60	28	2
	84	86	82	72	78	68	42	2
2	80	80	80	78	70	48	20	34
	80	80	76	80	78	36	16	48
	68	80	80	94	76	30	76	36
	78	74	84	82	60	40	16	40
	68	74	84	80	68	68	80	76
MÉD.±	82	80.6	82.6	80.6	73	54	37.6	24.6
SD	9.1	5.6	5.9	5.4	6.3	14.2	23.8	25.9

Em cada experiência determinou-se o potencial de membrana (-mV) do músculo diafragma isolado de camundongo na região da placa terminal, nos períodos indicados. Os dados correspondem a média ± desvio padrão dos valores dos potenciais de membrana em quatro experimentos com a dose de 10µg/ml e dois experimentos com 20µg/ml.

de modo irregular. Assim, fibras vizinhas podem exibir níveis normais de polaridade, além disso, em algumas fibras, a simples introdução da micropipeta pode desencadear o processo de despolarização. O tratamento feito com a TTX 1µg/ml seguiu o mesmo protocolo do experimento com a d-Tc e os resultados obtidos, não mostrados aqui, foram semelhantes.

5.2.4. EFEITO DA BthTX SOBRE A PREPARAÇÃO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO

5.2.4.1. AMPLITUDE DAS RESPOSTAS MUSCULARES `A BthTX e Ach

Com o objetivo de relacionar as ações farmacológicas da Bothropstoxina com as das Cardiotoxinas, foram realizadas experiências em músculo biventer cervicis de pintainho por se tratar de preparação de escolha para o estudo de substâncias que exibem atividade despolarizante, GINSBORG e WARRINER (1960) e GINSBORG (1960).

A Figura 12-A mostra uma experiência típica em que a BthTX (50µg/ml) determinou uma contratura com amplitude máxima de 15mm, atingidos após 23 minutos da adição da toxina ao banho - tempo de contratura máxima (TCM). Em seis (6) experiências realizadas, este efeito mostrou-se constante, tendo como valores médios 44,8 ± 15,6 minutos para o TCM e 31,8 ± 14,8 milímetros para a amplitude máxima de contratura (Tabela IV).

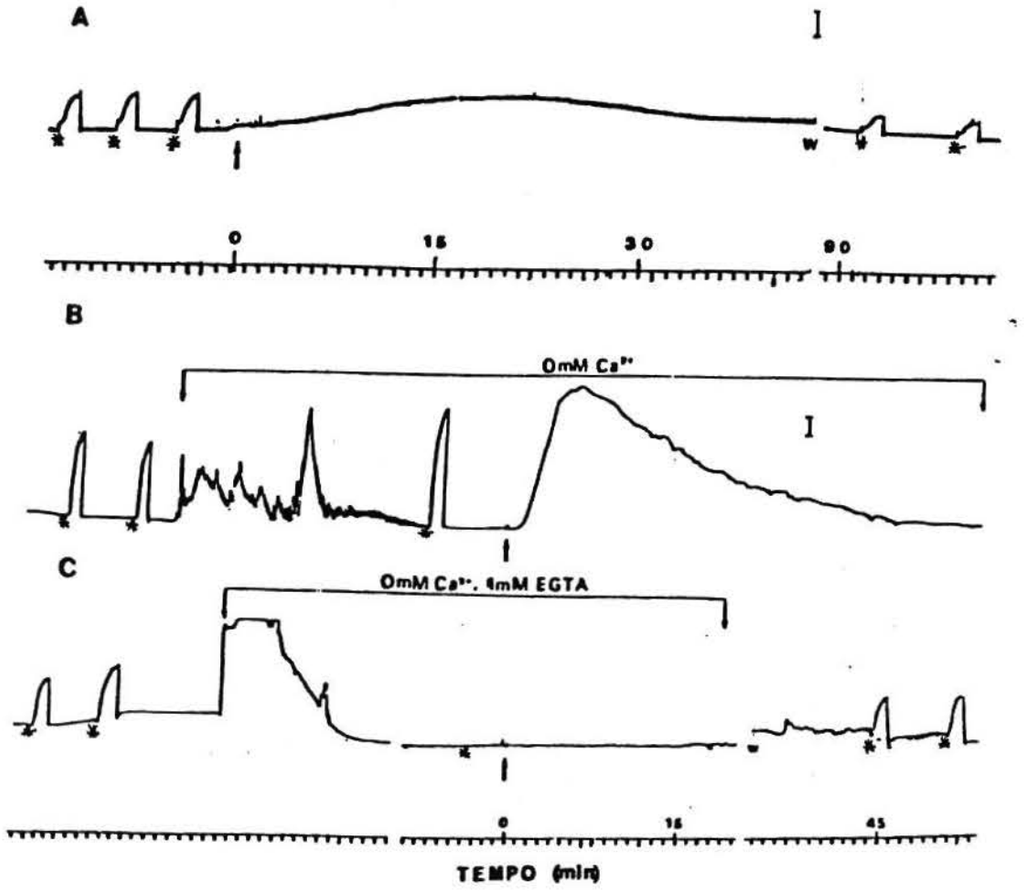


FIG. 12 - CONTRATURA DO MUSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO INDUZIDA PELA BthTX. No tempo indicado pela seta (Ø') a BthTX foi adicionada (50µg/ml). Observam-se respostas do músculo a 10µg/ml de Ach (*) antes e após a BthTX. Em A) Krebs normal, em B) Krebs sem cálcio, em C) Krebs com EGTA 1mM. Em W lavagem da preparação 3 a 4 vezes. Notar a redução do TCM em B e a ausência de efeito da BthTX em C. A barra vertical indica tensão de Ø,5g.

As respostas do músculo à Ach, após a contratura induzida pela BthTX, mostraram-se diminuidas em 6 experiências na ordem de 59%; mantidas em duas; ausentes em uma.

5.2.4.2. EFEITO DO KREBS MODIFICADO SOBRE A ATIVIDADE DA BthTX

Incubando-se a preparação durante 30 minutos com Krebs sem cálcio antes da adição da BthTX, obteve-se uma redução no TCM da ordem de 88% quando comparada com o mesmo parâmetro em Krebs normal (Figura 12-B) ou seja, o valor de TCM (tempo de contratura máxima) passa de 44,8 minutos (Krebs normal) para 5,5 minutos (Krebs sem Ca^{2+}) como pode ser observado também na Tabela IV.

A Figura 12-C mostra ainda que a incubação do músculo com Krebs sem cálcio acrescido de EGTA 1mM, inibe a capacidade contraturante da BthTX.

5.2.4.3. EFEITO DA d-Tc (10µg/ml) SOBRE A CAPACIDADE CONTRATURANTE DA BthTX

Em 4 experiências, a d-tubocurarina (d-Tc) na dose de 10µg/ml não interferiu com o efeito contraturante da BthTX (Figura 13).

TABELA IV - EFEITO DA VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DO Ca^{2+} SOBRE A CONTRATURA DO MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO, INDUZIDA PELA BthTX (50µg/ml).

MODIFICAÇÃO NA SOLUÇÃO DE KREBS	Nº DE EXP	TEMPO DE CONTRATURA MAXIMA (TCM)		AMPLITUDE MAXIMA DE CONTRATURA	
		EM MINUTOS	REDUÇÃO PERCENTUAL	EM MILIMETROS	AUMENTO PERCENTUAL
CONTROLE (0,28g/l)	6	44.8 ± 15.6		31.8 ± 14.8	
[0] Ca^{2+}	4	5.5 ± 0.96	88%	47.7 ± 16.5	50%
[0] Ca^{2+} + EGTA 1mM	2	-----	-----	-----	-----

TCM - Tempo necessário para que a contratura atinja sua amplitude máxima

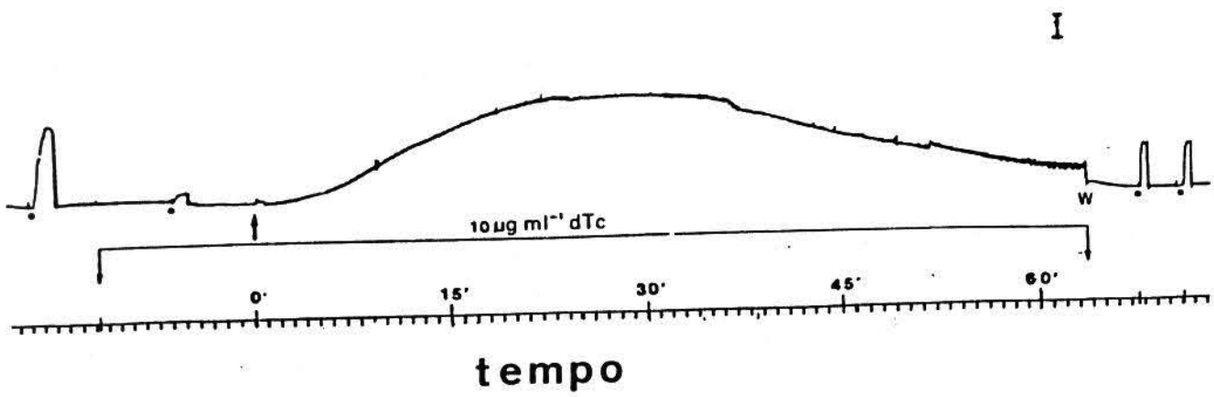


FIG. 13 - REGISTRO DA CONTRATURA MUSCULAR DO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO INDUZIDA PELA BthTX EM PRESENÇA DE d-Tc (10µg/ml). Notar a persistência do efeito contraturante típico da BthTX (50µg/ml) (seta) e o bloqueio parcial das respostas do músculo à Ach (10µg/ml). A barra vertical representa uma tensão de 0,5g.

5.2.4.4. MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO DA FIBRA MUSCULAR

A Tabela V mostra as medidas do potencial de repouso de membrana do músculo biventer cervicis (n = 2). Nota-se que a BthTX induz uma visível despolarização na dose de 30µg/ml em 90 minutos de observação. Nesta preparação, em nossas condições experimentais, foi possível identificar uma correlação direta entre o efeito contraturante e o despolarizante (Figura 14). Observa-se ainda que a persistência da despolarização coincide com o relaxamento muscular e a volta da preparação a uma tensão próxima a uma situação de controle.

TABELA V - MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO DAS FIBRAS DO MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO (EM -mV).

	CONTROLE Krebs normal		Krebs + BthTX (30µg/ml)									
n	5′	10′	0′	5′	10′	15′	20′	30′	45′	60′	75′	90′
1	40	32	40	28	36	30	40	28	14	20	12	16
	40	44	40	36	30	28	30	12	20	18	24	20
	46	44	38	26	28	12	22	18	22	16	20	14
	48	32	46	40	32	24	36	22	16	24	16	24
	44	34	30	36	40	34	28	24	26	16	14	18
2	46	40	40	44	44	20	24	24	22	14	20	16
	48	42	44	36	28	20	28	20	36	12	20	14
	40	36	44	28	14	16	12	16	40	16	10	16
	40	46	30	30	14	20	14	20	20	16	12	12
	44	42	32	46	20	28	28	32	20	20	20	20
Méd.	43,6	39,2	38,4	35,0	28,6	23,2	26,2	21,6	23,6	17,2	16,8	17,0
Pme	1,0	1,6	1,8	2,2	3,2	0,9	2,7	1,8	2,6	1,0	1,4	1,1

O Potencial de Repouso médio (controle) é de -43,6mV (em músculo b. cervicis de pintainho), enquanto que o de mamífero (em músculo diafragma de camundongo) é -80mV. Notar a despolarização à partir dos 60 minutos após a BthTX (n = 2).

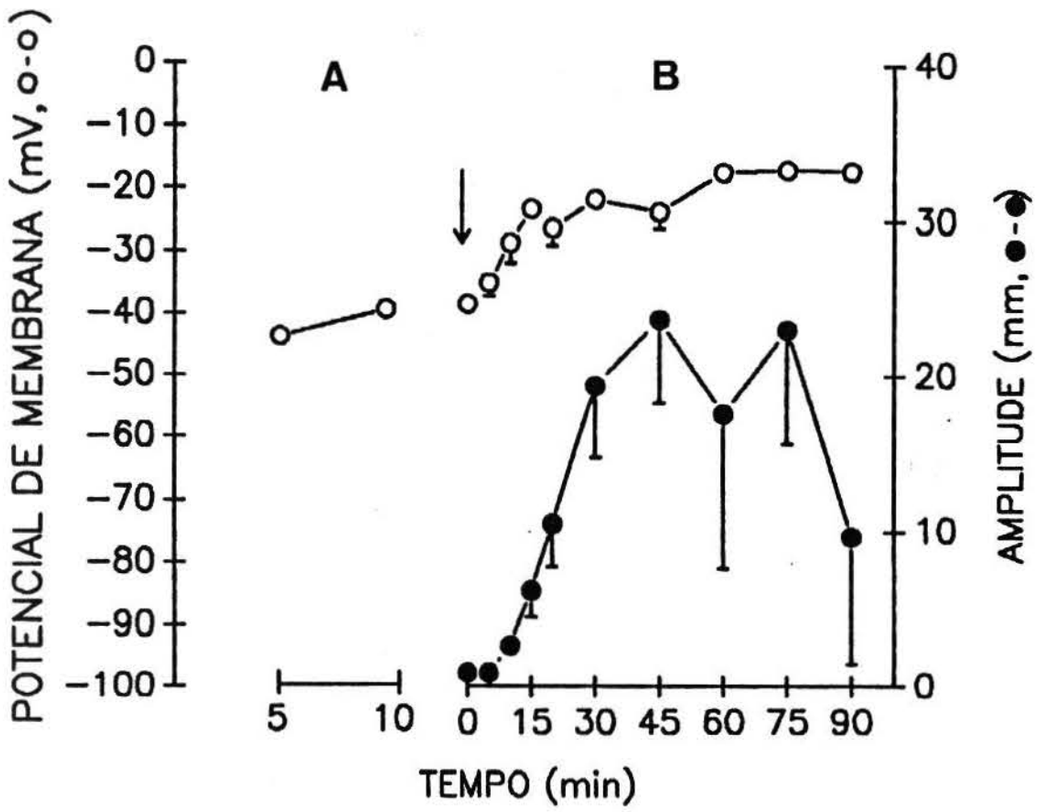


FIG. 14 - MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO E DA CONTRATURA EM PREPARAÇÃO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO.

A) Controle da medida do potencial de membrana (o—o) média + Epm (n = 2); B) correlação entre o potencial de membrana e a amplitude da contratura (●—●) induzida pela BthTX (30µg/ml) durante 90 minutos de observação (n variando de 3 a 6). A seta indica a adição da BthTX.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a Bothropstoxina (BthTX) isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* despolariza a membrana da fibra muscular ao mesmo tempo em que evoca contratura e bloqueio, sugerindo desta forma uma correlação entre sua ação despolarizante em membranas e seus efeitos musculares. O aparecimento desses efeitos em preparações curarizadas bem como o bloqueio incompleto da resposta à acetilcolina (preparação biventer cervicis) sugerem a não participação de receptores colinérgicos. Mais ainda, o fato de a TTX não impedir os efeitos da BthTX descarta a ativação de canais de sódio como provável mecanismo de ação desta toxina.

Despolarização resistente à tetrodotoxina foi descrita pela primeira vez por EARL e EXCELL (1972) com cardiotoxina (CTX) de *N. nivea* e por MADEDDU e col., (1985) com alphalatrotoxina. CHANG (1979), baseado em experimentos usando músculos tratados com glicerol, e HARVEY e col. (1982), utilizando preparação isolada muscular cuja membrana havia sido removida, deduziram que a CTX age em membranas celulares.

A contratura e despolarização induzidas pela BthTX foram completamente inibidas pelo aumento da concentração de Ca^{2+} de 1,8 para 10mM como descrito para CTX (TAZZIEF-DEPIERRE e col., 1969; EARL e EXCELL, 1971; CHANG e col., 1972; LIN SHIAU e col., 1976). Para a CTX este resultado foi atribuido à possibilidade de que ela atue sobre os sítios de ligação do cálcio na membrana (HARVEY, 1985). Além disso, a contratura e o bloqueio evocados por altas doses (30-60µg) de BthTX, foram inibidos pelo aumento da concentração externa de Ca^{2+} (10mM). Entretanto, os efeitos característicos da toxina manifestaram-se quando o excesso de Ca^{2+} foi removido por repetidas lavagens com solução de Tyrode normal. Este resultado sugere que Ca^{2+} 10mM, embora capaz de inibir as respostas à BthTX, não impediu sua ligação a sítios específicos na membrana, o que possibilitou o aparecimento ulterior dos efeitos característicos da toxina.

O aumento da amplitude da contratura induzida pela BthTX em preparações de pintainho banhadas com solução de Krebs isenta de Ca^{2+} (0mM) ou a inibição de seu efeito por EGTA ou Ca^{2+} (10mM) (em preparações de camundongo) lembram os efeitos da CTX em músculo biventer cervicis (LIN SHIAU e col., 1976).

Embora o significado destes resultados ainda não esteja esclarecido, poderíamos sugerir que a BthTX possua uma ação direta sobre a membrana da fibra muscular, à semelhança da CTX. Porque o cálcio tem um papel importante em manter a

integridade funcional de membranas biológicas e porque o cálcio é o gatilho para contrações musculares, é atrativo supor que a BthTX, como as cardiotoxinas, interferiria de algum modo com a ligação do cálcio às membranas. (HARVEY, 1985).

Consideramos relevante que a BthTX seja a primeira proteína homogênea obtida de uma espécie de *Bothrops* com características de cardiotoxina. Ainda que semelhante a muitas toxinas de venenos de cobras ativas na membrana, a BthTX possui propriedades bioquímicas de fosfolipase A_2, isto é, similaridade em peso molecular e composição de aminoácidos. Entretanto, a toxina não mostra nenhuma atividade fosfolipásica (HOMSI-BRANDEBURGO e col., 1988; GUTIERREZ e LOMONTE, 1989), e também não tem a atividade hemolítica observada no Pool IV (RODRIGUES-SIMIONI e col., 1983).

O conceito de toxinas membrano-ativas originalmente considerado como característica de veneno de Elapidae pode precisar ser revisto em vista da presença de toxinas similares em venenos de certas espécies de crotalinae como *B. jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI e col., 1983), veneno de *Crotalus scutulatus* (BIEBER e col., 1979) e *B. nummifer* (GUTIERREZ, 1989).

7. RESUMO

A peçonha de *B. jararacussu* tem sido objeto de estudo desde o início do século. Recentemente foi realizado um estudo sistemático do veneno total e de suas frações. Neste estudo foi identificado, através de cromatografia por gel filtração, o pico de maior massa (o pool IV ou SIII) como o responsável pela atividade do veneno bruto na junção neuromuscular.

O presente trabalho refere-se aos efeitos da fração purificada, oriunda da recromatografia do pico principal SIII, isenta de atividades fosfolipásica e hemolítica, sobre a junção neuromuscular. A fração purificada foi chamada de Bothropstoxina (BthTX). Exibe um peso molecular de 13.000.

A BthTX foi estudada em duas preparações distintas: de camundongo (frênico diafragma) e de pintainho (biventer cervicis).

8. CONCLUSÕES

A partir das experiências realizadas conclui-se que:

1) Os efeitos da BthTX registrados sobre a junção neuromuscular são contratura, bloqueio, despolarização e abolição do potencial de ação composto.

2) Em ave, há uma correlação positiva entre o fenômeno de despolarização e contratura.

3) A atividade bloqueadora da junção neuromuscular não envolve a participação do receptor nicotínico nem a ativação de canal de Na^+.

4) O bloqueio das respostas musculares se deve provavelmente ao fenômeno de despolarização persistente.

5) O aumento na concentração do cálcio externo (Tyrode e Krebs Ca^{2+} 10mM) inibe a atividade biológica da BthTX, quando em dose igual a 10µg/ml. Entretanto, após a retirada do excesso de Ca^{2+}, a adição de nova dose da toxina promove o efeito característico. Em concentrações superiores (30 a 60µg/ml), a inibição do efeito é parcial, e após a lavagem da preparação instalam-se, de modo imediato, contratura e bloqueio irreversíveis, sugerindo que a toxina se fixe à membrana.

6) A elevada concentração de Ca^{2+} (10mM) inibe os efeitos da BthTX. Sua ausência (Ca^{2+} 0mM) determina a exacerbação dos mesmos. EGTA adicionada a solução sem Ca^{2+} abole completamente os efeitos da BthTX. Resultados semelhantes obtidos com a CTX levaram à sugestão de que a toxina atue sobre os sítios de ligação de Ca^{2+} na membrana.

7) As semelhanças observadas entre a BthTX e as CTXs justificam a inclusão da BthTX no grupo de toxinas ativas em membranas, até agora características da família Elapidae.

9. ABSTRACT

The effects of Bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom on the mouse and chick muscle preparations.

Bothropstoxin on the mouse preparations inhibited muscle twitch tension, evoked either directly or indirectly through the motor nerve and abolished the compound action potential of the muscle with a similar time course of action. The toxin evoked membrane depolarization and that effect was inhibited in the presence of 10mM Ca^{2+}.

On chick muscle, the toxin induced a contracture that reached the maximum amplitude in 44.8 ± 15.6 min (n = 6) and was not blocked by d-Tc nor TTX. The time course of the maximum amplitude was shorted in Krebs solutions Ca^{2+} free (5.5 ± 1.0 min, n = 4). The contracture induced by toxin was completely inhibited in Krebs Ca^{2+} free plus 1mM EGTA.

As it lacks PLA_2, protease and hemolytic activity, it may belong to the class of cardiotoxins.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ø1 - ALBUQUERQUE, E.X., ELDEFRAWI, A.T., ELDEFRAWI, M.E. - The use of snake toxins for the study of the acetilcholine receptor and its ion-condutance modulator. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Chen-Yuan Lee, vol. 52, pp. 377. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1979.

Ø2 - BELLUOMINI, H.E. - Extraction and quantities of venom obtained from some brazilian snakes. In: Bücherl, W. Buckley, E.E., Deulofeu, V. (eds), Venomous Animals and their Venom, Academic Press, New York, vol. 1, p. 97, 1967.

Ø3 - BIEBER, A.L. - Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Chen-Yuan Lee, vol. 52, p. 295. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1979.

Ø4 - BÜLBRING, E. - Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Brit. J. Pharmacol., 1: 38-61, 1946.

Ø5 - CHANG, C.C., CHANG, S.T., LEE, C.Y., WEI, J.W. - Role of cardiotoxin and phospholipase A in the blockade of nerve

conduction and depolarization of skeletal muscle induced by cobra venom. Brit. J. Pharmacol., 44:752-764, 1972.

Ø6 - CHANG, C.C. - The action of snake venoms on nerve and muscle. In: Snake Venoms, Vol. 1Ø, pp. 311-376, Lee, C.Y. (ed.): Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1979.

Ø7 - CHANGEUX, J.P., KASAI, M., LEE, C.Y. - Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 67: 1241, 197Ø.

Ø8 - CONDREA, E., DE VRIES, A., MAGER, J. - Hemolysis and asplitting of human erythrocyte phospholipids by snake venoms. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 84: 6Ø, 1964.

Ø9 - CONDREA, E. - Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haematoxins. Experientia (Bassel), 3Ø: 121, 1974.

1Ø - EARL, J.E., EXCELL, B.J. - The action of a depolarizing fraction from *Naja nivea* venom on frog skeletal muscle. J. Physiol., 214: 27-28, 1971.

11 - EARL, J.E., EXCELL, B.J. - The effects of toxic components of *Naja-nivea* (Cape cobra) venon on neuromuscular transmission and muscle membrane permeability. Comp. Biochem. Physiol., 41A: 597-615, 1972.

12 - FATT, P., KATZ, B. - Spontaneous subthreshold activity at motor nerve-ending. J. Physiol., 15Ø: 7Ø7-717, 1952.

13 - FOHLMAN, J., EAKER, D. - Isolation and characterization of a lethal miotoxic phospholipase A from the venom of the common sea snake *Enhydrina schistosa* causing myoglobinuria in mice. Toxicon, 15: 385, 1977.

14 - GANS, C. - Biology of the Reptilia. London, Academic Press, 1978.

15 - GINSBORG, B.L. - Spontaneous activity in muscle fibers of the chick. J. Physiol., 15Ø: 7Ø7-717, 196Ø.

16 - GINSBORG, B.L., WARRINER, J. - The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. Brit. J. Pharmacol., 15: 41Ø, 196Ø.

17 - GONÇALVES, J.M. - Purification and properties of crotamine. In: Venoms. Buckley, E.E., Porges, N.N., nº 44, p. 261. Am. Ass. Adv. Sci., Washington, D.C., 1956.

18 - 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, 1984.

19 - GUTIERREZ, J.M., LOMONTE, B. - Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. Mem. Inst. Butantan, 51(4):221-223, 1989.

20 - HARRIS, J.B. - Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. In: Progress in Medicinal Chemistry. Ellis, G.P., West, G.B., vol. 21, p. 64. Elsevier Science Publishers, B.V., 1984.

21 - HARVEY, A.L., MARSHALL, R.J., KARLSSON, E. - Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations. Toxicon, vol. 20, pp. 379-396, 1982.

22 - HARVEY, A.L. - Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanisms of action. J Toxicol. - Toxin Reviews, 4(1), 41-69, 1985.

23 - HOJE, A.R., ROMANO, S.A. - Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Mem. Inst. Butantã, 32:109-127, 1972.

24 - 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, in press, 1988.

25 - KOCHVA, E. - The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. Toxicon, 25: 65, 1987.

26 - LEE, C.Y., HO, C.L. - The pharmacology of phospholipase A_2 isolated from snake venoms, with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In:

Advances in Pharmacology and Therapeutics II. Biochemical and Immunological Pharmacology. Yoshida, H., Hagihara, J., Ebashi, S., vol. 4, p. 37, Oxford: Pergamon Press.

27 LIN SHIAU, S.Y., HUANG, N.C. AND LEE, C.Y. - Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. J. Pharmac. Exp. Ther,. 196(3), 758-77Ø, 1976.

28 - MADEDDU, L., MELDOLESI, J., SHEER, H., WANKE, E. - Ion transport activated by alpha-latrotoxin and congener toxins at the presynaptic membrane. Proceedings of the Brit. J. Pharmacol., 86: 564, 1985.

29 - MELLO LEITÃO, A.C. - Animais peçonhentos. Serviço de Informação Agrícola, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1948.

3Ø - NASTUK, W.L., HODGKIN, A.L. - The electrical activity of single muscle fibers. J. Cell. Comp. Physiol., 35: 39-73, 195Ø.

31 - QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H., SIMIONI, L.R., FRANCESCHI, J.P. - Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops Jararacussu* snake venom. Toxicon, 22: 339, 1984.

32 - RODRIGUES-SIMIONI, L., BORGESE, N., CECCARELLI, B. - The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components

on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience, 10(2): 475-489, 1983.

33 - ROSENBERG, P. - The use of snake venoms as pharmacological tools in studying nerve activity. In: Neuropoisons: Their Pathophysiological Actions. Simpson, L.L., vol. 1, p. 111, New York. Plenum, 1971.

34 - ROSENFELD, G. - Simptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: Venomous animals and their venoms. Bucherl, W., Buckley, E., Deulofev, V., vol. 2, p. 345. New York, Academic, 1971.

35 - RUSSELL, F.E. - The clinical problem of Crotalid snake venom poisoning. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Chen-Yuan Lee, vol. 52, p. 978. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979.

36 - RUSSELL, F.E. - Toxinology in the 1980s: A new era for an ancient science - Newsletter, International Society on Toxinology - Toxicon, 1987.

37 - SILVA JUNIOR, M. - O Ofidismo no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Ministério da Saúde, pp. 224-227, 1956.

38 - STRYDON, O.J. - The Evolution of Toxins Found in Snake Venons. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Chen-Yuan Lee, vol. 52, chap. 7. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979.

39 - TAZIEFF-DEPIERRE, F., CZAJKA, M., LOWAGIE, C. - Action pharmacologique de fractions pures de venin de Naja nigricollis et libérations de calcium dans les muscles striés. C.R. Acad. Sci. [D] (Paris), 268, 2511-2514, 1969.

40 - UNDERWOOD, G. - Classification and distribuition of venomous snakes in the world. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Chen-Yuan Lee, vol. 52, pp. 15. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1979.

41 - VIDAL, J.C., STOPANI, A.O. - Isolation and purification of two phospholipases A from Bothrops venoms. Archs. Biochem. Biophys., 145: 543, 1971.

42 - VITAL BRAZIL - Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras de cobras. Rev. Med. de São Paulo, 6:265, 1903.

43 - VITAL BRAZIL e RANGEL PESTANA - Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. Revista Médica de São Paulo, nos 19, 21 e 22. 1909.

44 - VITAL BRAZIL - La defense contre l'ophidisme, 2nd. ed., Pocai & Weiss, São Paulo, p. 48, 1911.

45 - VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of crystaline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. Mem. Inst. Butantan, 33:(3) pp. 981-992, 1966.

46 - VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: Farmacodinâmica. 6a. ed., Corbet, C.E., pp. 1044-1074, Guanabara Koogan, RJ, 1982.