

X JOSÉ CARLOS COGO



ESTUDO DA FRAÇÃO FOSFOLIPÁSICA A₂ ISOLADA DO VENENO DE *Bothrops insularis* NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

X
Orientadora: Profa Dra Léa Rodrigues Simioni - Faculdade de Ciências Médicas
Co-Orientadora: Profa Dra Maria Alice Cruz-Höfling - Depto Histologia e
Embriologia - I.B. - UNICAMP X

Este exemplar corresponde à redação final
da tese elaborada por (o) candidato a)
José Carlos Cogo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

20/04/95

Campinas, 1995

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to the supervisor or a committee member.

JOSÉ CARLOS COGO

**ESTUDO DA FRAÇÃO FOSFOLIPÁSICA A₂
ISOLADA DO VENENO DE *Bothrops insularis* NA
JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
como parte dos requisitos para obtenção do Título
de Doutor em Ciências Biológicas, na área de
Fisiologia.

Campinas, 1995

Dedico este trabalho aos meus pais pelo
constante apoio que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS:

- À Dra Léa Rodrigues Simioni e à Dra Maria Alice Cruz-Hofling, pela amizade, pelo profissionalismo e pelos ensinamentos que adquiri durante esses anos de convivência.

- À Dra Júlia Prado Franceschi pela amizade e pelo estímulo constante que muito contribuiu para o meu aprimoramento.

- Ao Dr. Marcos Dias Fontana pela amizade, pela disponibilidade e indispensável ajuda durante todos esses anos. Muito obrigado.

- Ao Dr. Gilberto de Nucci pela amizade, pelas valiosas sugestões na revisão da tese e também pelo constante apoio.

- Ao Dr. Alexandre Pinto Corrado pela colaboração científica e pela amizade.

- Ao Dr. José Roberto Giglio por ter colocado à minha disposição as facilidades do laboratório de Bioquímica F.M.- USP-RP.

- Aos docentes do Depto de Fisiologia I.B. - UNICAMP.

- Ao Prof. Stephen Hyslop pela amizade e pela paciência na ajuda das traduções para o Inglês.

- Ao Mestre Biólogo José Luiz Donato pela colaboração no fracionamento do veneno e pelos ensinamentos de técnicas em Bioquímica.

- Ao Biólogo Gildo B. Leite, o meu sincero agradecimento pela sua disponibilidade de tempo, pela paciência, pelas horas agradáveis que passamos no laboratório e acima de tudo pela amizade.

- Ao Luiz Henrique A. Pedrosa e à Odete de Araújo B. da Cunha, técnicos do Lab. de Bioquímica, F.M. - USP - RP, pela ajuda no fracionamento.

- Às técnicas Adriane Cristina S. Sprogis, Maria Aurora Souza da Silva, Antonia Maria F. Lima e Silva Helena Moda pela valiosa colaboração na parte técnica de ultramicrotomia e serviços fotográficos.

- Ao João Roberto Bauer pela paciência .

- Às secretárias: Gislaine, Rita, Dora e Solange pela convivência gostosa durante todos esses anos.

- A todos os funcionários do Depto de Farmacologia pelo convívio alegre e descontraído.

- À FAPESP e FAEP pela concessão das bolsas de estudo.

-A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Cogo, Jose Carlos

C659e Estudo da fraccao fosfolipaseica A2 isolada do veneno de *Bothrops insularis* na juncao neuromuscular / Jose Carlos Cogo. - -
Campinas, SP : Is.n.1, 1995.

Orientadores : Lea Rodrigues Simioni, Maria Alice Cruz-Hofling.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Bothrops insularis*. 2. Fosfolipase A2. 3. Juncao neuromuscular. 4. Musculos - Histopatologia. 5. Ultraestura (Biologia). I. Simioni, Lea Rodrigues. II. Hofling, Maria Alice da Cruz. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Titulo.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	4
OBJETIVO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1 - Animais.....	23
2 - Veneno.....	23
3 - Fracionamento do veneno.....	23
3.1 Fracionamento em gel Sephadex G-75.....	23
3.2 Fracionamento em gel Sephadex G-150.....	23
3.3 Cromatografia de troca iônica.....	24
4 - Estudo Bioquímico.....	25
4.1 Determinação da concentração proteica.....	25
4.2 Atividade fosfolipásica.....	25
4.3 Atividade esterásica.....	25
4.4 Atividade coagulante sobre plasma.....	26
4.5 Atividade caseinolítica.....	26
4.6 Eletroforese.....	27
5 - Análise farmacológica.....	28
5.1 Preparação nervo frênico músculo diafragma isolado de camundongo.....	28
5.2 Preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	29
5.3 Dosagem de Creatino Quinase.....	29
5.4 Antagonismo pelo soro anti-botrópico.....	30
6 - Estudos Eletrofisiológicos.....	30
6.1 Registro do potencial de repouso e dos potenciais em miniatura da placa terminal.....	30
7 - Análise morfológica.....	31
7.1 Músculos <i>biventer cervicis</i> de pintainhos incubados.....	31
7.2 Músculos <i>pectoralis</i> de pintainho injetados.....	32
8 - Análise Estatística.....	34

RESULTADOS.....	35
1 - Fracionamento em gel Sephadex G-75	36
2 - Eletroforese.....	36
3 - Cromatografia em gel Sephadex G-150.....	36
4 - Atividade coagulante sobre plasma.....	41
5 - Cromatografia de troca iônica.....	41
6 - Preparação nervo frênico músculo diafragma isolado de camundongo.....	41
7 - Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	48
8 - Antagonismo pela temperatura e pelo Sr^{+2}	53
9 - Liberação de CQ pelo músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	57
10 - Capacidade do soro anti-botrópico em impedir a liberação de CQ em preparação incubada com a fração fosfolipásica.....	57
11- Medida do potencial de repousado músculo diafragma isolado de camundongo.....	61
12 - Registro dos potenciais em miniatura da placa terminal.....	61
13 - Morfologia dos músculos <i>biventer cervicis</i> de pintainhos incubados (microscopia fotônica).....	66
14 - Observações clínicas dos animais injetados com o veneno total e fração fosfolipásica.....	69
15 - Morfologia dos músculo injetados com veneno total e fração fosfolipásica do veneno de <i>B. insularis</i> : Microscopia fotônica.....	71
16 - Morfologia dos músculos injetados com veneno total e fração fosfolipásica do veneno de <i>B. insularis</i> : Microscopia eletrônica.....	73
DISCUSSÃO.....	100
ABSTRACT.....	110
REFERÊNCIAS.....	113

RESUMO

Duas frações com atividade fosfolipásica (PLA₂) foram isoladas do veneno total de *Bothrops insularis* através de 2 processos de fracionamento: gel de Sephadex G-75 em tampão formato de amônio 50 mM, pH 3,5 e gel de Sephadex G-150 em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,2 seguido por cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex em tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 8,0.

A fração isolada em pH ácido mostrou-se menos efetiva que a fração obtida em pH neutro. Esta última reproduziu todos os efeitos farmacológicos observados com o veneno total. Estes foram associados apenas à atividade PLA₂, pois a fração é desprovida de atividades esterásica, coagulante e caseinolítica.

Utilizando técnicas de eletrofisiologia, miografia, determinação dos níveis de creatino quinase (CQ) e estudos das alterações morfológicas (músculos incubados com a fração PLA₂ ou injetados com o veneno e fração PLA₂), e comparando nossos resultados com aqueles existentes na literatura, chegamos às seguintes conclusões:

1) As alterações miográficas induzidas pela fração PLA₂ isolada em pH neutro, caracterizam-se pela facilitação da neurotransmissão (aumento da amplitude de contração muscular e aumento da frequência dos potenciais em miniatura da placa terminal) seguida por bloqueio das contrações musculares. O bloqueio induzido por esta fração, mostrou-se dose-tempo dependente e irreversível após a lavagem da preparação.

A PLA₂ isolada em pH ácido promoveu a facilitação da neurotransmissão mas não promoveu o bloqueio das contrações musculares.

2) Os efeitos da redução da temperatura de incubação e da substituição de Ca²⁺ por Sr²⁺ no meio nutritivo, inibindo o efeito bloqueador da fração PLA₂, sugere a existência de uma relação entre as atividades enzimática e farmacológica.

3) A PLA₂ foi capaz de liberar CQ dos músculos *biventer cervicis* incubados, em consonância com os efeitos observados diretamente nos músculos incubados tanto em microscopia óptica como nos músculos injetados, analisados com microscopia eletrônica.

4) O soro anti-botrópico (comercial) neutralizou apenas parcialmente a liberação de CQ e bloqueio das contrações musculares. A existência de componentes específicos, que não se encontram nos venenos botrópicos utilizados na imunização, põe novamente em destaque a alta especialização alcançada pela *Bothrops insularis*.

5) As alterações ultraestruturais induzidas pelo veneno bruto atingem a junção neuromuscular, os axônios mielínicos e as fibras musculares. Incluem também alterações vasculares e vasculotóxicas com consequente efeitos hemorrágicos.

6) As alterações ultraestruturais induzidas pela fração PLA₂ são mais brandas. Atingem tanto a porção pré-sináptica, como a porção do músculo. No músculo afetam principalmente o retículo sarcoplasmático (distúrbio iônico provável), o túbulo T (em menor grau), e a organização miofibrilar. Células musculares mionecróticas são em menor número do que as afetadas pelo veneno bruto. Por outro lado, os efeitos hemorrágicos parecem ser mais proeminentes.

INTRODUÇÃO

Fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas encontradas em todas as células animais, tanto no meio intra como no extracelular. No extracelular são encontradas no fluido sinovial e em exsudatos inflamatórios (GLASER et al, 1993).

No meio intracelular, as PLA₂s encontram-se no citosol sendo necessário a presença de Ca²⁺ para que atinjam a sua atividade máxima. São enzimas essenciais para a biossíntese e liberação de glicerídeos, ácidos fosfatídicos, ácidos graxos e ácido araquidônico. Aumentam os níveis de eicosanóides (tromboxanos, prostaglandinas e leucotriênos) e do fator de agregação plaquetária (ROSENBERG, 1986; MANJUNATHA et al., 1989). Atuam através da hidrólise de fosfolípidios de membrana hidrolisando a posição ester C2 (sn-2) (HANAHAN, 1971).

As PLA₂s são encontradas também como constituintes dos venenos de serpentes e em algumas espécies de artrópodos e aracnídeos (KINI & IWANAGA, 1986a).

De acordo com a literatura da década de 50 (LEE & HO, 1984), as PLA₂s seriam os únicos componentes responsáveis pela toxicidade dos venenos. Entretanto, esta idéia mudou à medida em que foram isoladas, purificadas e classificadas em diferentes grupos. Verificou-se que as PLA₂s não podiam ser identificadas genericamente como tóxicas, pois algumas delas eram mesmo atóxicas (LEE & HO, 1984).

Atualmente, sabe-se que essas enzimas participam na gênese de numerosos efeitos observados no envenenamento ofídico como, por exemplo, as alterações que se verificam na coagulação, no sistema cardiovascular, em nervos e músculos.

As serpentes pertencentes às Famílias *Elapidae* (cobras corais); *Hydrophidae* (serpentes marinhas); *Viperidae* (víperas) e *Crotalidae* (jararacas e cascavéis) possuem uma ou mais PLA₂s na composição de seus venenos. Por exemplo, o veneno da serpente *Bothrops jararacussu* possui 4 diferentes PLA₂s (BRANDEBURGO et al., 1988).

Levando-se em consideração a diversidade de efeitos das várias toxinas em diferentes preparações de nervos e músculos, (HARRIS, 1984) classificou-as em 4

grandes grupos, sendo que as PLA₂s encontram-se representadas principalmente nos grupos 2 e 3.

Grupo 1: neurotoxinas pós-sinápticas: são aquelas que se ligam aos receptores nicotínicos localizados na região pós-sináptica evitando o acoplamento da Acetilcolina (Ach) ao seu receptor. São chamadas também de toxinas curarimiméticas por bloquearem a transmissão do impulso nervoso a nível da junção neuromuscular. Esse bloqueio não está associado com a despolarização ou redução da excitabilidade da fibra muscular (HARRIS, 1984).

As toxinas curarimiméticas podem ser divididas em dois grupos: aquelas que possuem cadeia longa como a α -Bungarotoxina (α -Btx) da *Bungarus multicinctus* e aquelas de cadeia curta como a α -neurotoxina da *Naja naja atra*, *Naja naja siamensis*, *Naja mossambica* e a erabutoxina b da *Laticauda semifasciata* (BRADLEY et al, 1990).

No veneno de serpentes foram descritas cerca de 60 neurotoxinas pós-sinápticas. São encontradas principalmente nos venenos das serpentes pertencentes às Famílias *Hydrophidae* e *Elapidae* (PLA₂ AI, III e IV da *Laticauda semifasciata* HARVEY & RODGER, 1978; HARVEY & TAMIYA, 1978, 1980; Toxina α da *Naja nigricolis* WAHLSTROM, 1971; α -BTX da *Bungarus multicinctus* CHANG & LEE, 1963).

Grupo 2: neurotoxinas pré-sinápticas: São aquelas que inibem ou potencializam a transmissão atuando a nível do terminal nervoso. Várias toxinas que possuem ação pré-sináptica têm sido identificadas nos venenos das serpentes das Famílias *Elapidae* (Notexin e Notechis II-5 da *Notechis scutatus* HALPERT & EAKER, 1975; HALPERT et al., 1976; Taipotoxin da *Oxyuranus scutellatus* FOHLMAN et al., 1976; β -bungarotoxina (β -BTX) da *Bungarus multicinctus* CHANG & LEE 1963; Dendrotoxina da *Dendroaspis angusticeps* e Toxina I da *Dendroaspis polylepis* HARVEY & KARLSSON, 1984; da Família *Viperidae* (Caudoxina da *Bitis caudalis* LEE et al., 1982; HO et al., 1986b) e da Família *Crotalidae* (Mojave-toxina da *Crotalus scutulatus scutulatus* HO & LEE, 1981;

Crotamina e Crotoxina (CTx) da *Crotalus durissus terrificus* SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938/39; HARRIS, 1984; HO et al., 1986b). Mais recentemente, ROWAN et al., (1989) isolaram do veneno de *Pseudechis australis*, várias PLA₂ (Pa10A e a Pa11) que possuem ação pré sináptica

Com exceção da Notexina e da Notexina II-5, todas as neurotoxinas pré-sinápticas são complexos formados de 2 ou 4 sub-unidades. Por exemplo, a β -BTx é composta por 2 sub-unidades: A e B. A sub-unidade A é um peptídeo básico de 120 aminoácidos (a.a.) ligados por 6 pontes dissulfídicas e possui atividade PLA₂. A sub-unidade B é um polipeptídeo ácido com 60 a.a. (HABERMANN & BREITHAUPT, 1978; HAWGOOD, 1983; HARRIS, 1984).

No veneno das serpentes do gênero *Crotalus* (*Crotalus durissus terrificus* - a cascavel) a PLA₂ é o princípio ativo da CTx, que é o componente responsável pelo "fascies miastênico" do indivíduo picado pela cascavel (VITAL BRAZIL et al., 1966; VITAL BRAZIL & EXCELL, 1971; PELLEGRINI et al., 1978; CHANG & TSENG, 1978; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979). A CTx é formada por duas sub-unidades diferentes: um componente básico (CTx B), com atividade PLA₂ que possui baixa toxicidade e um componente ácido (Crotapotina) que não tem atividade tóxica nem enzimática (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971). Estas sub-unidades se combinam para reconstituir um complexo com as propriedades da toxina nativa (RÜBSAMEN et al., 1971). A CTx B é um peptídeo básico de 140 a.a. com 8 pontes dissulfídicas e a segunda sub-unidade, Crotapotina, é um polipeptídeo de 88 a.a. (VITAL BRAZIL, 1972; BREITHAUPT et al., 1974; HAWGOOD & SMITH, 1977; BON et al., 1979; HAWGOOD & SANTANA DE SÁ, 1979; HAWGOOD, 1983).

Nos dois exemplos acima, a cadeia com atividade PLA₂ tem sua atividade tóxica aumentada, várias vezes, quando ocorre a sua combinação com a sub-unidade ácida.

Uma maneira precisa de avaliar a integridade da transmissão neuromuscular é a pesquisa do conteúdo quântico através da medida da frequência dos potenciais em miniatura da placa terminal (p.m.p.t.) e a amplitude dos potenciais de placa terminal

(p.p.t.) (EXCELL, 1979; HARRIS, 1984). Essa técnica permite o estudo quantitativo da liberação do neurotransmissor a partir do quociente entre o quadrado da amplitude média dos p.m.p.ts. e sua variância para o cálculo do conteúdo quântico. O p.m.p.t. resulta da interação entre um quanta de Ach liberado com receptores colinérgicos da região da placa motora (EXCELL, 1970; HAWGOOD & SANTANA-DE-SÁ, 1979; HAWGOOD, 1989; HARRIS, 1984). A amplitude dos p.m.p.t. varia segundo uma curva de distribuição normal. Quando a amplitude varia entre 0,2 a 1,0 mV, os biopotenciais são chamados "p.m.p.t. clássicos". Uma população menor forma os chamados "p.m.p.t. gigantes" (definidos como 3 vezes a amplitude do controle) e os sub-p.m.p.t. (abaixo de 0,2 mV).

Um dos maiores obstáculos para avaliar o mecanismo pela qual as neurotoxinas agem é a dificuldade em determinar o seu sítio de ação. As PLA₂s após caírem na corrente sanguínea, entram em contato com o tecido ou órgão efector. Isso implica na existência de um sítio específico de ligação (receptor). Este é reconhecido por grupos específicos localizados na superfície das PLA₂s. A afinidade da enzima pelo tecido, complementada pela hidrofobicidade, carga e conformação, é que determina a sua interação com a membrana (KINI & IWANAGA, 1986a, 1986b; DREYER, 1990; STRONG, 1990). No caso da atividade neurotóxica, os receptores presentes na região da junção neuromuscular reconheceriam a sequência de a.a. localizados nos resíduos 80 - 110 da PLA₂ (KINI & IWANAGA, 1986a, 1986b).

Após a ligação com o tecido ou órgão efector, as PLA₂s poderiam atuar na membrana plasmática, nas proximidades dos canais de K⁺ voltagem-dependente (SIMPSON, et al., 1993).

O estudo da dendrotoxina, β BTx, CTx e da Taipotoxina em nervo terminal usando a técnica de registro subendotelial (DREYER & PENNER, 1987) mostrou que todas essas toxinas agem aumentando o influxo de Ca²⁺ para dentro do terminal nervoso. O efeito pode ser explicado como uma inibição seletiva da corrente dos canais lentos de K⁺, o que justifica o efeito facilitador exibido por essas toxinas na liberação do neurotransmissor. O bloqueio dos canais lentos de K⁺ por sua vez

promove um influxo de Ca^{2+} para o interior nos canais de cinética rápida, através de uma ativação prolongada desses canais. A corrente de K^+ através de canais de cinética rápida não é afetada por essas toxinas. (DREYER & PENNER, 1987).

SU & CHANG (1984) dizem que o efeito pré-sináptico da CTx é devido à sua ação enzimática que hidroliza os fosfolípidios de membrana resultando em um desarranjo na sua estrutura, interrompendo assim o processo de exocitose das vesículas contendo o neurotransmissor.

A porcentagem de hidrólise de fosfolípidios de membrana varia entre as PLA₂s de órgão para órgão e de espécie para espécie animal. Assim, as características do bloqueio apresentado pela CTx, Taipotoxina e β -BTx são semelhantes, mas são espécie dependentes. Taipotoxina é 3 vezes mais potente do que a β -BTx e 5 vezes mais potente do que a Ctx em bloquear a transmissão neuromuscular em preparações isoladas de nervo frênico músculo diafragma isolado de camundongo, mas é 30 e 100 vezes menos potente, respectivamente, em bloquear as respostas do músculo *biventer cervicis* de pintainho. Comparado com o diafragma de camundongo, o diafragma de rato é cerca de 10 vezes mais resistente à CTx e a Taipotoxina, mas é mais sensível à β -BTx (KINI & IWANAGA, 1986a, 1989).

Uma outra possibilidade é que as PLA₂s sofram endocitose e, após serem internalizadas, ajam em um ou mais tipos de membranas intercelulares (CHANG, 1985; SIMPSON, 1993). Neste sentido, STRONG et al., (1977) e ESQUERDA et al., (1982) trabalharam com toxinas marcadas com iodo radioativo para verificar a sua internalização. No entanto, nenhum dos grupos tiveram evidências morfológicas definitivas de uma possível internalização. SIMPSON et al. (1993), estudando a notexina, CTx e β BTx, verificaram que estas toxinas não são internalizadas para exercerem a sua ação. Ao contrário, elas se ligam à membrana e promovem um rearranjo molecular. Na etapa final, a toxina age clivando os fosfolípidios da membrana axoplasmática e produz o bloqueio da exocitose das vesículas de acetilcolina no terminal nervoso.

ROSENBERG (1986, 1990) afirma que há duas etapas evidentes da ação das PLA₂ na junção neuromuscular: 1) a ligação e 2) a ação propriamente dita. Não se sabe se existem ainda outras etapas entre essas duas. Muitos trabalhos referem que as PLA₂s atuam no interior das células, mas existem várias razões para que não seja assim. O fato dos antivenenos reduzirem a associação toxina-célula e a neutralização dos efeitos das PLA₂s pelo estrôncio ainda na primeira etapa (ligação com o sítio) são fortes indicações de que a ligação ocorre na superfície celular. Além disso, o fato de uma PLA₂ agir externamente e ser mais tarde internalizada, faz com que seja difícil distinguir aquela que age na superfície externa daquela que é internalizada para agir.

A crotoxina também possui uma ação miotóxica (BREITHAUPT, 1976; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; KOUYOUMDJIAN et al., 1986).

Nos primeiros 30 minutos após a injeção de CTx em músculo sóleo e diafragma, as alterações nas junções neuromusculares são mínimas. As alterações limitam-se ao entumescimento das mitocôndrias localizadas nos terminais nervosos e dilatação do retículo sarcoplasmático. Em um estágio mais avançado (90 minutos) as cristas mitocondriais apresentavam-se rompidas, vacuolizadas e de diâmetro menor que as do controle. Grande incidência de identações tipo Ω foram encontrados no axolema, associada com a redução do número de vesículas sinápticas, sendo observado em alguns terminais, a total ausência destas (GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD, 1984; GOPALAKRISHNAKOSE et al., 1984).

Na fase onde já havia completo bloqueio da transmissão, a região da membrana pós-sináptica estava intacta. O aumento das identações Ω e redução das vesículas foram iguais às relatadas para outras PLA₂s. A necrose apareceu na fase crônica da intoxicação. O colapso da bainha de mielina, o completo desaparecimento do axolema, a presença de fibras necróticas e áreas eletrodensas na região pós-sináptica, bem como a desorganização das miofibrilas foram algumas das alterações encontradas. Desde que as mitocôndrias são estoques intracelulares de Ca²⁺ e sua degeneração causa consequente liberação deste íon, deduz-se que esse aumento citosólico de Ca²⁺ poderia ser o responsável pelo bloqueio na transmissão induzida pela crotoxina e também

desempenhar um papel importante na necrose observada. Em geral, as alterações no músculo sóleo foram de menor intensidade quando comparadas com aquelas observadas no diafragma de rato (GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD, 1984).

O aumento da liberação do neurotransmissor representa um outro efeito pré-sináptico que as neurotoxinas podem apresentar. São poucos os venenos de serpentes que são capazes de promover esse efeito. Como exemplo, citamos a Dendrotoxina e a Toxina I que diminuem inicialmente a liberação espontânea do neurotransmissor para, em seguida, retornar aos valores controles. Após 1 a 2 horas de incubação, a frequência dos p.m.p.t. aumenta cerca de 5 vezes. Durante o período de supressão, ocorre o aparecimento de p.m.p.t. gigante o que origina um ligeiro aumento no cálculo da amplitude dos mesmos, mas isto é um fenômeno transitório (HARRIS, 1984). Até agora, não há explicação definitiva para esse fenômeno, mas há a sugestão de que a toxina promove a fusão das vesículas sinápticas, o que explicaria o aparecimento dos p.m.p.t. gigantes e o aumento do conteúdo quântico.

Grupo 3: Miotoxinas: são PLA₂s que podem possuir ou não ação pré-sináptica mas que também agem diretamente sobre o músculo causando lesões nas fibras musculares.

Em algumas toxinas deste grupo, primeiramente é observado ação neutóxica pré-sináptica seguida então pela ação miotóxica (HARRIS et al., 1975; HARRIS & MACDONNEL, 1981; HARRIS & MALTIN, 1982; HAWGOOD, 1982; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984), enquanto que em outras toxinas, a ação pré-juncional está ausente exibindo ação somente a nível da membrana pós-juncional e músculos (MEBS & SAMEJIMA, 1980).

Utilizando-se baixas concentrações do veneno, pode-se detectar a presença das neurotoxinas, e em altas concentrações a presença das miotoxinas. Um exemplo é o veneno da *Naja naja kaouthia* e *Notechis scutatus* (notexin- PLA₂), que são primariamente neurotóxicas mas em altas concentrações são também miotóxicas (HARVEY et al., 1994).

KINI & IWANAGA (1986a, 1986b) dizem que as PLA₂s neurotóxicas que são também miotóxicas possuem sítios catiônicos distintos disponíveis os quais interagem com a membrana citoplasmática. A perda da integridade física da membrana é geralmente resultante da hidrólise de sua fração lipídica.

ZAN et al. (1983) verificaram que as PLA₂ básica da *Naja nigricollis* e a PLA₂ ácida da *Naja naja atra* exercem importante ação em lipoproteínas, sendo que a ação da primeira é mais acentuada em HDL (high density lipoprotein) seguida pela VLDL (very low density lipoprotein), enquanto a segunda possui ação maior em HDL. A fragmentação da membrana celular, do retículo sarcoplasmático e mitocôndria (organelas que estocam o cálcio) pode causar o aumento da concentração citosólica de cálcio [Ca²⁺]_i com conseqüente hipercontração das miofibrilas. (HARRIS, 1984).

A miotoxina da *Bothrops asper* (miotoxina I), por exemplo, afeta primeiramente a membrana celular. A seguir outras membranas celulares são afetadas como a membrana do retículo sarcoplasmático. Desde que o retículo sarcoplasmático é uma estrutura onde o Ca²⁺ intracelular é estocado, a sua lesão certamente determina a liberação do Ca²⁺ armazenado levando a célula a morte. Essa miotoxina inibe a atividade Ca²⁺ATPase do retículo sarcoplasmático devido a sua interação com a PLA₂. O influxo de Ca²⁺ não se dá através de canais voltagem-dependentes, mas sim, como resultado da degeneração da membrana plasmática. (GUTIÉRREZ, et al., 1984a,b; 1987; 1990).

Grande número de miotoxinas tem sido isoladas dos venenos de serpentes, entretanto nem todas possuem atividade PLA₂. Por exemplo, a miotoxina da *Bothrops nummifer* não possui atividade PLA₂ e promove mionecrose, hemorragia e aumento sérico da enzima intramuscular creatino quinase (CQ). Esses efeitos são semelhantes aos da miotoxina I da *Bothrops asper*, que possui atividade PLA₂. Esse veneno possui, além da miotoxina I, outras miotoxinas: as miotoxinas II e III. A primeira é desprovida de atividade coagulante e PLA₂ enquanto que a segunda é uma PLA₂ básica, embora ambas promovam mionecrose e aumento sérico de CQ. O fato de certas miotoxinas induzirem os efeitos hemorrágicos e mionecróticos na ausência de

Ca²⁺, indica que a atividade enzimática não está envolvida nos danos observados (GUTIÉRREZ et al., 1986a, 1986b; LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989; GUTIÉRREZ et al., 1990; BUTRÓN et al., 1993).

MOURA-DA-SILVA et al. (1991) estudando a atividade PLA₂ de 9 *Bothrops* brasileiras verificaram a presença de quantidades significativas de proteínas básicas com atividade PLA₂ e/ou miotóxica nos venenos de *B. jararacussu*, *B. moogeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*. Proteínas semelhantes foram detectadas em concentrações mínimas no veneno de *B. jararaca*, sendo indetectáveis em *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara* e *B. erythromelas*.

A determinação do nível sérico de CQ, citada inicialmente para a avaliação da lesão muscular em pacientes portadores de distrofia muscular progressiva (EBASHI, 1959), vem sendo atualmente utilizada como medida da injúria muscular causada por venenos ofídicos (*B. newwiedii* MEBS et al., 1983; *B. insularis*, COGO et al., 1993; *B. jararacussu* MEBS et al., 1983; MELO & SUAREZ KURTZ, 1985; 1987b; 1988; *B. jararaca* MEBS et al., 1983; MELO & SUAREZ KURTZ, 1987a; 1987b; 1988; COGO et al., 1993; *B. asper* MEBS et al., 1983; GUTIÉRREZ et al., 1980; 1981; 1984a; 1984b; 1989; MORENO & GUTIÉRREZ, 1988; CHAVES et al., 1989; 1992; LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989; ARROYO & GUTIÉRREZ, 1981; *B. atrox* MEBS et al., 1983; *B. picadoi*, MEBS et al., 1983, *B. nummifer* GUTIÉRREZ et al., 1989) os quais determinaram um aumento da liberação de CQ em níveis variáveis.

Por outro lado, HOMMA & TU (1971), observaram alterações histológicas em músculos de camundongos tratados com 37 diferentes tipos de venenos ofídicos inclusive alguns botrópicos. A associação dos 2 parâmetros: alterações nos níveis séricos de CQ e presença de lesões musculares tem sido proposta para avaliar a potência de venenos e de suas frações em produzirem lesões locais em indivíduos picados (MEBS et al., 1983).

OWNBY et al. (1982) quantificaram a mionecrose e a liberação de CQ promovida pelo veneno da *Crotalus viridis viridis*. O número de células necróticas foram contadas e o índice de necrose foi obtido através da fórmula: nº de células

necróticas/n^o total de células. A miotoxina desse veneno causa inicialmente vacúolos que leva a célula à morte. Aparentemente não afeta nervos, vasos ou tecido conjuntivo.

Estudando a distribuição da densidade de cargas dos resíduos das miotoxinas, KINI & IWANAGA (1986b) verificaram a presença de uma região catiônica responsável pela propriedade miotóxica. A β -BTx que é uma neurotoxina pré-sináptica não possui essa região enquanto que a Taipotoxina, que também é uma neurotoxina pré-sináptica e que possui certa atividade miotóxica, apresentou somente alguns cátions da região mionecrótica sendo esta região localizada somente na sub-unidade α . Por sua vez, a CTx, que possui também um certo efeito miotóxico, não apresenta esse sítio miotóxico, mas apresenta uma outra região com sequência catiônica que poderia explicar a sua natureza miotóxica. Essa região localiza-se no lado externo da molécula e é a responsável pela interação com a membrana. Essa região está ausente em PLA₂ não miotóxicas com atividade neurotóxica. Entretanto, existem outros fatores envolvendo a miotoxicidade (KINI & IWANAGA, 1986b).

Uma outra hipótese propõe a internalização da toxina pelo processo de endocitose. Uma vez no citosol, a toxina desencadeia um processo autolítico que promove o aumento do $[Ca^{2+}]_i$ (HARRIS, 1984).

Grupo 4: Citotoxinas: também descritas na literatura como cardiotoxinas e cobraminas. O termo cardiotoxina é dado ao grupo de toxinas que despolariza rapidamente o músculo cardíaco (LEE et al., 1966). São desprovidas de atividade enzimática e são encontradas nos venenos das serpentes da Família *Elapidae*. São importantes constituintes dos venenos das serpentes do gênero *Naja nigricollis* e *Naja naja siamensis* (LEE & HO, 1977; VITAL BRASIL, 1982; HARVEY et al., 1982; MEBS, 1986). Essas toxinas causam despolarização persistente da membrana celular e promovem a contração do músculo cardíaco. A propriedade lítica verificada nestas toxinas não está relacionada com a capacidade de promover despolarização e contração (HIDER & KHADER, 1982).

Ao contrário do que acontece com as PLA₂ onde o Ca^{2+} é um co-fator essencial para a atividade enzimática, as ações das cardiotoxinas podem ser inibidas

com altas concentrações de Ca^{2+} no meio nutritivo (HARVEY et al., 1982) e ter seu efeito potenciado na sua ausência (LIN et al., 1976).

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, (Família *Crotalidae* - compreendem as várias espécies de jararacas) tem como característica a produção de efeitos locais como dor, edema, hemorragia e necrose. Além disso, atuando sistemicamente, pode tornar o sangue incoagulável, promover hipotensão, ou, em acidentes graves (serpentes de grande porte), causar a morte por choque ou por insuficiência renal aguda (VITAL BRAZIL, 1982; RIBEIRO & JORGE, 1990).

Estudos realizados com várias espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. erythromelas*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. castelnaudi* e *B. leucurus*) mostraram a capacidade desses venenos em promover hemorragia, necrose, coagulação sanguínea, edema e liberação de CQ do músculo em diversos graus de intensidade (FERREIRA et al., 1992; SANCHES et al., 1992). São portanto classificadas no grupo das miotoxinas. FERREIRA et al. (1992) mostraram ainda a capacidade do soro anti-*B. jararaca* em neutralizar, em diferentes graus, a atividade PLA_2 bem como os efeitos farmacológicos desses venenos.

Outros autores também estudaram o veneno bothrópico enfocando as alterações morfológicas (*B. insularis* SELISTRE et al., 1990; COGO, et al., 1993; *B. jararacussu* QUEIROZ, et al., 1984; *B. asper* ARROYO & GUTIÉRREZ 1981; GUTIÉRREZ, et al., 1980; 1981; 1984a; 1984b; 1986; 1987; MORENO & GUTIÉRREZ, 1988; CHAVES et al., 1989; LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989; *B. alternatus* MOURA-DA-SILVA, et al., 1991; *B. nummifer*, GUTIÉRREZ, et al., 1989; *B. jararaca* AMORIM et al., 1951; VILLAROEL et al., 1978/79; QUEIROZ et al., 1985; COGO et al., 1993) e também verificaram que o veneno bothrópico causa hemorragia, trombos vasculares, alterações na estrutura da membrana celular, lesões delta, vacuolização das fibras musculares bem como condensação miofibrilar que se evidenciam através do intenso efeito local observado no envenenamento.

Até a presente data, o que se sabe sobre as PLA₂s presentes no veneno das serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, é que elas são em parte as responsáveis pelos efeitos locais verificados no acidente. A atividade PLA₂ foi detectada nos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops atrox* por VIDAL & STOPPANI (1971) e VIDAL et al. em 1972. Recentemente outras PLA₂ foram isoladas de venenos botrópicos como a da *Bothrops asper* (ALAGON et al., 1980; GUTIERREZ, et al., 1984a), *Bothrops alternatus* (NISENBON et al., 1986), *Bothropos jararacussu* (BRANDEBURGO et al., 1988) e *Bothrops insularis* (SELISTRE et al., 1990), mas de forma geral, os estudos foram direcionados no sentido de avaliar a participação destas PLA₂s nos efeitos hemorrágico e mionecrótico.

A PLA₂ presente no veneno de *Bothrops asper*, por exemplo, causa extensa mionecrose 1 hora após a injeção no músculo gastrocnêmio de rato (ARROYO & GUTIERREZ, 1981). A mionecrose foi acompanhada de edema e hemorragia verificando-se também alterações no retículo sarcoplasmático, o qual mostrou-se dilatado. Estudos morfológicos a nível da microscopia eletrônica revelaram uma degeneração que se inicia com a perda das bandas A, H, I e M e que finalmente atinge a banda Z (ARROYO & GUTIERREZ, 1981).

Entretando, tendo em vista a ausência de manifestações clínicas, diversos autores afirmam que os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* não possuem atividade farmacológica importante sobre a junção neuromuscular (VITAL BRAZIL, 1982; SANCHES et al., 1992; HARVEY et al., 1994). Sendo assim, a literatura apresenta poucos trabalhos sobre a ação de venenos botrópicos sobre esta estrutura, com exceção dos estudos realizados com as frações obtidas dos venenos das *Bothrops moojeni* (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1990); *Bothrops lanceolatus* (LOBO-ARAÚJO et al., 1990a) e *Bothrops jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI, et al., 1983) e com o veneno total de *B. insularis* (COGO et al., 1990a, 1990b, 1993), sendo as duas últimas, as mais ativas.

RODRIGUES-SIMIONI et al. (1983), utilizando coluna gel Sephadex G-75 seguida de cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25, isolaram do veneno

de *Bothrops jararacussu* um componente (pool IV) com baixa atividade PLA₂. Esta fração causou contratura e bloqueio das contrações musculares em preparações neuromusculares (*cutaneous pectoralis*) de rã, (nervo frênico músculo diafragma) de camundongo estimulados diretamente ou indiretamente. A medida do potencial de repouso (preparação músculo diafragma isolado de camundongo) revelou um efeito despolarizante. Todos os efeitos farmacológicos ou seja, contratura, bloqueio e despolarização foram completamente inibidos em presença de 10 mM Ca²⁺ (HELUANI et al., 1992).

Por outro lado, as informações existentes a respeito da farmacologia do veneno de *B. insularis*, se limitavam ao estudo sobre a atividade coagulante e fibrinolítica (MEBS, 1970). Mais recentemente SELISTRE & GIGLIO (1987) isolaram uma enzima semelhante à trombina e também frações responsáveis pelas atividades hemorrágica, mionecrótica e edematogênica (SELISTRE et al., 1990). Vários peptídeos potenciadores de bradicinina foram também detectados neste veneno (CINTRA et al., 1984). Estudos "in vitro" usando-se o veneno de *B. insularis* (LOBO-ARAÚJO et al., 1990b) mostraram que o mesmo possui alta atividade caseinolítica, fosfolipásica, esterásica e coagulante sobre o plasma e baixa atividade hemorrágica e hemolítica. A observação de que a administração do veneno bruto em pintainhos, determinava perda do reflexo postural e o aparecimento de "head drop" ou seja, sintomas semelhantes aos do envenenamento pelo curare (COGO et al., 1993), sugeriu a presença de ação neurotóxica importante neste veneno. De fato, utilizando técnicas miográficas (preparações nervo frênico músculo diafragma isolado de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho) e eletrofisiológicas (medida do potencial de repouso e de p.m.p.t.), estes autores verificaram que o veneno de *B. insularis* possui ação tanto pré-(facilitadora da transmissão) como pós-(despolarização, contratura e bloqueio da transmissão neuromuscular) juncionais, sendo mais potente nas preparações neuromusculares de aves quando comparada com as preparações musculares de mamíferos.

O efeito pré-sináptico traduziu-se pelo aumento inicial da amplitude das contrações musculares (10% em diafragma isolado de camundongo) seguido por bloqueio irreversível. Entretanto, a d-Tubocurarina (4 µg/ml) impediu o efeito facilitador do veneno, observando-se apenas bloqueio, sem aumento inicial da amplitude das contrações. Corroborando esta observação, técnicas eletrofisiológicas revelaram que o veneno total é capaz de induzir aumento na frequência (400%) dos potenciais em miniatura da placa terminal que se inicia de 5 a 15 minutos após a adição do veneno (COGO, et al., 1993).

A ação pós-sináptica do veneno caracterizou-se pela redução do potencial de membrana em diafragma isolado de camundongo, pelo aparecimento de fibras necróticas e aumento na liberação de CQ em músculo isolado de *biventer cervicis* de pintainho (COGO et al., 1993). Esses resultados sugeriram que este veneno exibe atividade inicialmente neurotóxica seguida por uma ação lesiva direta do tecido (mionecrose).

As alterações histopatológicas foram observadas tanto em músculo *pectoralis* "in vivo", como em preparações isoladas de músculo *biventer cervicis* de pintainho incubadas com o veneno (CRUZ-HOFLING et al., 1990a, 1990b, 1993; COGO, et al., 1993). Estes autores verificaram ação lesiva direta no tecido muscular, detectada através do desarranjo das miofibrilas e necrose do tecido. A estriação transversal, típica dos músculos esqueléticos, tornou-se imperceptível e com aparência amorfa. Infiltrados inflamatórios extensos com presença de células linfocitárias, plasmocitárias, neutrófilos polimorfos e hemorragia foram observados (CRUZ-HOFLING et al., 1990a; COGO et al., 1993). Essa degeneração, determinou um aumento dose-dependente nos níveis de liberação de CQ em preparações *biventer cervicis* de aves "in vitro" (COGO et al., 1993).

Estes resultados sugeriram um efeito a nível pré-sináptico que seria possivelmente mediado pela presença de uma PLA₂ capaz de agir no terminal nervoso motor sináptico além de desempenhar um efeito direto no músculo esquelético.

RUSSELL, (1977) diz que os venenos e particularmente suas frações, devido às suas diversidade de efeitos, constituem importantes instrumentos no estudo de fenômenos biológicos, tais como os mecanismos de transporte na membrana celular, condução nervosa, transmissão neuromuscular e em muitos outros fenômenos a serem descobertos, pois ainda existe um grande potencial a ser explorado neste sentido.

De acordo com essa idéia, resolvemos aprofundar os estudos sobre a ação do veneno de *B. insularis* observando as alterações ultraestruturais e correlacionando-as com os efeitos farmacológicos já estudados com o veneno bruto, bem como realizando o fracionamento e a caracterização biológica da fração responsável pelo efeito neurotóxico.

OBJETIVO

Nosso objetivo foi o de demonstrar que os efeitos pré-sináptico e mionecrótico observados com o veneno total de *Bothrops insularis*, envolvem a participação da fração PLA₂ presente no veneno. Para tal, utilizamos técnicas de eletrofisiologia, miografia, determinação dos níveis de creatino quinase, bem como estudo morfológico ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

1) **ANIMAIS:** Pintainhos da linhagem HY-LINE W36 (4 - 8 dias) fornecidos pela Granja Ito S/A (Campinas) e camundongos (*Mus musculus* variedade *Albinus*, Swiss) fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, com peso variável de 18 a 30 g foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*.

2) **VENENO:** O veneno da serpente *B. insularis* foi gentilmente cedido pelo Instituto Butantan de São Paulo. Após a coleta, o veneno foi dessecado à vácuo e conservado em dessecador à 4°C.

3) FRACIONAMENTO DO VENENO

3.1) **FRACIONAMENTO EM GEL SEPHADEX G-75:** Cerca de 70 mg do veneno de *B. insularis* foram inicialmente dissolvidos em 2,0 ml de tampão formato de amônio 50 mM, pH 3,5 mantido em banho de gelo. Em seguida, o veneno foi centrifugado (SORVALL SUPERSPEED RC 2B) a 10.000 rpm durante 10 minutos (12.000 x g) e o sobrenadante aplicado em coluna (100 x 1,8 cm) de gel Sephadex G-75, previamente equilibrada com o mesmo tampão. O material foi eluído à 4°C. Foram coletadas frações de 1,3 ml num fluxo de 12 ml/h utilizando-se coletor de frações LKB BROMMA 2070 ULTRORAC II (sensibilidade 0,1).

A concentração proteica das amostras foi estimada pela leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro KONTRON-UVIKON-810 usando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. As amostras foram submetidas aos ensaios enzimáticos e biológicos e, a seguir, agrupadas em frações de acordo com as atividades. As amostras foram liofilizadas.

3.2) **FRACIONAMENTO EM GEL SEPHADEX G-150:** O veneno de *B. insularis* (200 mg) foi dissolvido em 2,0 ml de tampão fosfato salina (PBS) 0,15M ,

pH 7,2 mantido sempre em banho de gelo. Após a centrifugação do veneno durante 10 minutos a 10.000 rpm (12.000 x g) em centrífuga Sorvall Superspeed RC 2B, 0,01 ml do sobrenadante foi diluído em 1 ml em PBS para a determinação da concentração proteica em Espectrofotômetro BECKMAN ACTA III a 280 nm.

O material restante foi aplicado em coluna (90 x 2 cm) de gel Sephadex G-150, previamente equilibrada com o mesmo tampão. O material foi eluído em câmara fria à 4°C. Foram coletadas amostras de 5 ml/tubo num fluxo de 24 ml/hora utilizando-se coletor de frações LKB BROMMA 2070 ULTRORAC II (sensibilidade 0,1).

A concentração proteica das amostras foi estimada pela leitura da absorbância a 280 nm em Espectrofotômetro BECKMAN ACTA III usando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. As amostras foram submetidas aos ensaios enzimáticos e, a seguir, agrupadas de acordo com as atividades nelas contidas. A diálise das frações foi realizada contra água destilada (3,5 litros) durante 16 horas à 4°C em saco de diálise da Sigma 250-9U.

Após a diálise, as frações foram congeladas (gelo seco + álcool) e liofilizadas. A concentração proteica das frações foi estimada como descrito acima.

3.3) CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (FRACIONAMENTO EM GEL SEPHADEX G-150 - pH 8,0): O "pool" (item 2) que continha a atividade PLA₂ (50 mg) foi solubilizado em 2,5 ml de tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 8,0 e centrifugado a 10.000 rpm (12.000 x g) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 0,01 ml do sobrenadante foi diluído 100 vezes para um volume de 1,0 ml e submetido a leitura em 280 nm de absorbância para a determinação da concentração proteica. O sobrenadante foi aplicado em coluna DEAE Sephadex (1,5 x 20 cm) previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio, pH 8,0. Após eluição inicial com o mesmo tampão, seguiu-se um gradiente linear de 0,01 a 1,0 M dissolvido no mesmo tampão. Amostras de 3,0 ml por tubo foram coletadas sob fluxo de 20 ml/h a 4°C.

A diálise da fração principal foi realizada contra água destilada (3,5 litros) durante 16 horas à 4°C em saco de diálise da Sigma 250-9U.

A absorbância das amostras foi determinada a 280 nm.

4) ESTUDO BIOQUÍMICO

4.1) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA: A dosagem de proteína foi feita utilizando-se o método do microbiureto conforme descrito por ITZHAKI & GILL (1964). Procedeu-se à dosagem a partir de solução contendo de 0,1 a 2,0 mg da fração dissolvida em 2,0 ml obtida na troca iônica.

4.2) ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA: Avaliou-se a atividade PLA₂ através do método descrito por LOBO-ARAÚJO & RADVANYI (1987). A composição do meio de reação foi: lecitina de ovo 3,5 mM como substrato, solubilizada em colato de sódio 4,0 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM e vermelho de fenol 0,055 mM. A absorbância desta solução foi ajustada para 1,8 a 558 nm pela adição de NaOH 0,1 M.

Iniciou-se a reação adicionando-se 10 µl de uma solução do veneno total, ou das frações obtidas em ambos fracionamentos, a 1,0 ml do meio de reação. A variação da absorbância foi determinada após 15 minutos em mesmo comprimento de onda.

A atividade enzimática foi expressa como sendo a diminuição da absorbância por minuto por micrograma de proteína. Esta atividade foi convertida em micromoles de ácidos graxos liberados por minuto por miligrama de proteína, medindo-se a diminuição da absorbância de 1,0 ml do meio de reação produzida por quantidades conhecidas de ácido.

4.3) ATIVIDADE ESTERÁSICA: A atividade esterásica foi avaliada como descrito por HUMMEL (1959), utilizando o TAME (éster metil de p-toluenosulfonil-L-arginina) como substrato.

O ensaio com o veneno total ou com as frações obtidas em ambos fracionamentos foi iniciado com a adição de 10 µl das soluções e 1,0 ml de meio de reação contendo: TAME 1,0 M, tampão TRIS-HCl 50 mM pH 8,8 e CaCl₂ 10 mM. A variação da absorbância foi determinada a 247 nm durante 5 minutos de reação enzimática à temperatura ambiente.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como 1 µmol de TAME hidrolisado por minuto por ml. A atividade específica é expressa em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína.

4.4) ATIVIDADE COAGULANTE SOBRE PLASMA: A atividade coagulante foi determinada aplicando-se 10 µl das amostras obtidas no fracionamento em gel Sephadex G-150 (pH 8,0) em 1,0 ml de plasma humano citratado (0,38 % de citrato de sódio - plasma submetido à atividade quelante do citrato de sódio, sem Ca²⁺) e em plasma citratado mais 2,0 mM de Ca²⁺ (com CaCl₂).

O tempo necessário para o início da formação da rede de fibrina foi cronometrado a 37°C.

Para tempos maiores que 6 minutos o plasma foi considerado incoagulável.

4.5) ATIVIDADE CASEINOLÍTICA: A atividade caseinolítica foi determinada segundo o método descrito por KUNITZ (1947), com algumas modificações sugeridas por MANDELBAUM et. al. (1982). A reação foi efetuada em meio de reação contendo TRIS-HCl 0,1 M, caseína 1%, CaCl₂ 4,0 mM e NaCl 100 mM. Para a dosagem da atividade caseinolítica, amostras (10 µl) do fracionamento em gel Sephadex G-75 (pH 3,5) foram adicionadas a 1,0 ml de meio de reação. Após 30 minutos a 37°C, foram adicionados 1,5 de ácido tricloroacético 5% e a mistura foi mantida à 4°C durante 1 hora. A seguir, o material foi centrifugado (12.000 x g) por 5 minutos e a concentração dos peptídeos resultantes da digestão enzimática e solúveis em ácido tricloroacético, foi determinada pelo método de HARTREE (1972).

Uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que produz um aumento de diferença óptica de 1,0 por minuto e por ml a 650 nm. A atividade específica é expressa como unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína.

4.6) ELETROFORESE: A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida-SDS (dodecil sulfato de sódio), segundo o método de HAMES & RICKWOOD (1982), utilizando-se sistema descontínuo dissociante em placa vertical.

O gel de resolução, com gradiente de concentração de poliacrilamida de 10 a 20%, foi preparado sob 1,5 cm de gel de empacotamento (3,75% de acrilamida).

O veneno total e as frações, diluídos em tampão dissociante TRIS-HCl 63 mM pH 6,8 contendo 5% de 2B-mercaptoetanol, 2% de SDS, 10% desacarose e 0,001% de azul de bromofenol, foram fervidas durante 4 min. Aliquotas de 30 μ l foram aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi conduzida em temperatura ambiente com voltagem fixada em 100 V (40 - 25 mA), até o azul de bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel (aproximadamente 4 horas).

Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado com solução de metanol 50% e ácido acético 10%. Seguiu-se a coloração com solução de Azul Brillante de Coomassie R 0,025% em ácido acético 10%. O excesso de corante foi eliminado utilizando-se a mesma solução de fixação do gel. Após a coloração, o gel foi seco segundo a técnica de JUANG et al. (1984) e fotografado.

Para a estimativa do peso molecular utilizou-se amostras contendo proteínas de pesos moleculares conhecidos (Kit-Pharmacia-LKB), calculado segundo o método de SVASTI e PANIJPAN (1977).

5) ANÁLISE FARMACOLÓGICA

5.1) PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO MÚSCULO DIAFRAGMA

ISOLADO DE CAMUNDONGO: Camundongos com peso de aproximadamente 22 g foram anestesiados com hidrato cloral a 10% (0,3 ml/100g) e sacrificados pela secção dos vasos do pescoço. Após retirada, a preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946) para ratos. A técnica consiste em dissecar a pele a nível do tórax e cuidadosamente isolar o diafragma junto com o nervo frênico, tomando-se cuidado para não lesar nem o músculo nem o nervo. Após o isolamento da preparação, que deverá levar o menor tempo possível e não superior a 10 minutos, a mesma foi montada em suporte adequado que foi colocado dentro da cuba com solução de Tyrode, cuja composição em mM foi: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1, pH 7,0. A cuba com 3 ml de capacidade foi mantida à temperatura constante de 37°C e arejada com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂, pH 7,4). Foi feito o registro da força de contração muscular em resposta a estímulos supra-maximais (Fisiógrafo GOULD RS3400), usando-se transdutor isométrico BG 25 GM KULITE. O músculo submetido à tensão constante de 2 g/cm foi estimulado indiretamente através de seu nervo motor usando-se eletrodo bipolar com pulsos máximos de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. O músculo também foi estimulado diretamente com pulsos máximos de 0,05 Hz de frequência e 2 ms de duração. Neste caso a preparação foi tratada com d-Tubocurarina (dTc) (3 µg/ml) para bloquear as respostas à estimulação indireta.

Todas as preparações foram submetidas a um período de estabilização não inferior a 20 minutos previamente à adição da fração PLA₂ (20 e 40 µg/ml) obtida em pH 8,0 ou da fração obtida em pH 3,5 (40 µg/ml).

Algumas preparações incubadas com a fração PLA₂ (40 µg/ml) foram submetidas à estimulação indireta em meio nutritivo onde o Ca²⁺ foi substituído pelo Sr²⁺ (4 mM).

5.2) PREPARAÇÃO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO: A preparação foi isolada e montada de acordo com o método descrito por GINSBORG e WARRINER (1960). O músculo foi suspenso em 4 ml de solução de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,99 e glicose 11,65; pH 7,4 e mantido à temperatura de 37°C, arejado com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂).

O músculo foi submetido a uma tensão constante de 0,5 g e estimulado através de eletrodos bipolares posicionados na região de transição entre o tendão e o músculo de modo a processar uma estimulação de campo. Usou-se estimulador GRASS S4 para submeter a preparação a estímulos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 msec de duração. As contrações musculares em resposta a estímulos supramaximais foram registradas em fisiógrafo GOULD RS 3400 através de transdutor isométrico BG-25 GM KULITE da Semiconductor Products Inc. durante 120 minutos. Concentrações de 80 µg/ml do veneno total ou 5, 20 e 40 µg/ml da fração PLA₂ obtida em pH 8,0 ou 40 µg/ml da fração obtida em pH 3,5 foram adicionadas ao banho para verificação de seus efeitos.

Em alguns experimentos, a preparação foi mantida a baixa temperatura (19 - 24 °C) durante o tempo de incubação com a fração PLA₂ (20 µg/ml).

Nos experimentos controle a preparação foi incubada com 0,2 ml de solução de Krebs.

5.3) DOSAGEM DE CREATINO QUINASE (CQ): Devido à ação miotóxica da PLA₂ e consequente degeneração da membrana celular (SELISTRE et al, 1990) e o fato da enzima CQ ser utilizada como parâmetro na avaliação de lesões musculares, mediu-se os níveis de liberação desta enzima "*in vitro*". Durante as experiências realizadas com o músculo *biventer cervicis* de pitainho para o registro das contrações musculares (item 5.2), alíquotas de 0,2 ml foram retiradas do banho durante o período de repouso (estabilização da preparação) e após a adição do veneno total (80 µg/ml) ou da fração PLA₂ obtida no fracionamento em pH 8,0 (nas doses de

5, 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$) em períodos correspondentes a 40, 80 e 120 minutos de incubação para cada dose. Para o grupo controle, amostras de 0,2 ml foram retiradas do banho nos tempos acima indicados, sem a adição do veneno ou da fração PLA_2 (completando-se no entanto o volume da cuba com a solução de Krebs). Na dosagem de CQ foi utilizado Kit Sigma Diagnostics 520-C onde uma Unidade Internacional (UI) corresponde à formação de creatina (μmol) por minuto dentro das condições estipuladas pelo kit.

5.4) ANTAGONISMO PELO SORO ANTI-BOTRÓPICO: A fração PLA_2 (pH 8,0) (160 μg) foi incubada durante 30 minutos à 37°C com 0,06 ml do soro anti-botrópico (AB) (1 ml neutraliza 5 mg) proveniente do Instituto Butantan (Lote 8808158). Após a incubação, a mistura foi adicionada ao banho (4 ml) contendo o músculo *biventer cervicis*.

Nos tempos 40, 80 e 120 minutos foram colhidas amostras (0,2 ml) para dosagem da CQ liberada.

Com o objetivo de verificar a capacidade liberadora de CQ do soro anti-botrópico, adicionou-se 0,1 ml de soro (préviamente incubado durante 30 minutos à 37°C) ao banho e amostras foram retiradas nas condições acima citadas.

Para a obtenção do controle, seguiu-se o mesmo procedimento, utilizando-se apenas solução nutritiva.

Em todas as condições, o volume retirado da cuba era repostado com solução de Krebs.

6) ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS

6.1) REGISTRO DO POTENCIAL DE REPOUSO (PR) E DOS POTENCIAIS EM MINIATURA DA PLACA TERMINAL (p.m.p.t.): Inicialmente a preparação diafragma isolado de camundongo foi distendida em câmara

de lucite com capacidade de 3 ml à temperatura ambiente. Em seguida foi imersa em solução de Tyrode com a composição semelhante ao descrito no item 1 e arejada constantemente pelo borbulhamento de carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂, pH 7,4). Microeletrodos preenchidos com KCl 3M (resistência 10 a 20 MΩ) foram introduzidos intracelularmente tanto para a medida do PR das fibras musculares como para o registro dos p.m.p.ts., os quais foram registrados em osciloscópio Tektronix e fotografados (câmara polaroide) ou registrados em papel no fisiógrafo GOULD RS3400. O PR foi registrado em osciloscópio Tektronix cuja medida foi avaliada tanto na região das placas terminais como aleatoriamente em regiões distantes destas. O registro foi feito aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição de 40 µg/ml da fração PLA₂ obtida em pH 3,5 e 20 ou 40 µg/ml da obtida em pH 8,0. Registrou-se o potencial de repouso após a lavagem da preparação.

Para o registro dos p.m.p.ts. adicionou-se 40 µg/ml da fração PLA₂ obtida em pH 8,0.

Nos experimentos controle adicionou-se 0,2 ml de solução de Krebs e a leitura foi feita nos mesmos tempos sem a adição da fração estudada.

7) ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para a análise morfológica, foram realizados estudos "*in vitro*" com a preparação *biventer cervicis* incubadas com a fração PLA₂ do veneno de *B. insularis* e estudos "*in vivo*" em músculo *pectoralis* de pintainhos, tanto sob a ação do veneno bruto como com a fração com atividade PLA₂.

7.1) MÚSCULOS *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHOS INCUBADOS:

MICROSCOPIA FOTÔNICA: Os estudos "*in vitro*" foram realizados em músculo incubado ou com a fração PLA₂ ou com a fração + soro AB. O tempo de

incubação foi de 120 minutos, utilizando-se doses de 20 ou 40 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ ($n=3$ para cada dose) da fração com atividade PLA_2 obtida do fracionamento em pH 8,0. Após o tempo de incubação, procedeu-se à fixação dos mesmos seguindo-se o procedimento de rotina para estudo das alterações morfológicas (desidratação e inclusão em parafina) Secções de 7 μm foram obtidas em micrótomo, montadas e coradas com Hematoxilina Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson (T.M.).

7.2) MÚSCULOS *PECTORALIS* DE PINTAINHOS INJETADOS:

MICROSCOPIA FOTÔNICA: Pintainhos de 4 - 8 dias foram injetados no músculo *pectoralis* esquerdo com a fração PLA_2 obtida em pH 8,0. Foram utilizadas as doses de 20 e 40 $\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$ ($n= 3$ para cada dose). Os animais foram sacrificados 3 horas após a injeção da fração. Imediatamente depois do sacrificio dos animais, procedeu-se à dissecação do músculo e a sua fixação em Bouin durante 24 a 48 horas. A fixação foi seguida pelo procedimento de rotina para a confecção das lâminas histológicas (desidratação e inclusão em parafina). Secções de 7 μm foram obtidas em micrótomo, montadas e coradas com Hematoxilina Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson (T.M.).

Animais injetados no músculo peitoral esquerdo com 0,1 ml de solução de Krebs ($n= 3$) e sacrificados 3 horas após a injeção constituíram o grupo controle.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA: Foram utilizados 12 pintainhos (5 - 7 dias) os quais foram separados em 4 grupos de 3 animais cada um. Todos animais foram injetados no músculo *pectoralis* esquerdo. A injeção do veneno total de *B. insularis* e fração PLA_2 foi feita com cuidado para que o bisel da agulha atingisse o interior do músculo e não o ultrapassasse.

Para o veneno bruto, foram utilizadas doses de 0,4, 20 e 80 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ ($n=3$ para cada dose). O sacrificio dos animais foi realizado 3 horas após a administração do veneno.

Para a fração PLA₂, foram utilizados 4 grupos de 2 animais cada, utilizando-se doses de 10 e 40 µg/0,1 ml, os quais foram sacrificados após 3 ou 24 horas (n=2) para cada dose.

Animais injetados no músculo *pectoralis* esquerdo com 0,1 ml de solução de Krebs (grupo de 3 animais) e sacrificados 3 horas após a injeção constituíram o grupo controle.

Animais tratados com veneno bruto e controle, anestesiados em câmara de éter (éter sulfúrico), foram colocados em decúbito dorsal para a dissecação do músculo. Imediatamente após a exposição do músculo, foi injetado localmente fixador de Karnovsky (paraformaldeído 1%; glutaraldeído 3% e tampão cacodilato de sódio 0,07 M; pH 7,3 - 7,4), preparado antes do uso. Removeu-se em seguida a solução fixadora e fragmentos do tecido foram imersos em nova solução do mesmo fixador. Os animais injetados com a fração PLA₂, após anestesia inalatória com éter, foram perfundidos intracardiacamente com 100 ml de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Esta técnica de fixação consiste na substituição do sangue do animal pela solução fixadora introduzida diretamente no ventrículo esquerdo do animal. Após secção do átrio direito, o fixador injetado substitui o sangue da circulação. Após a fixação por perfusão (\pm 15 minutos), procedeu-se à fixação por imersão (3 horas no mínimo) dos fragmentos do músculo em fixador de Karnovsky.

A seguir, foram lavados no mesmo tampão acrescido de 5% de sacarose à 4°C, 2 vezes por 5 minutos cada, tendo sido pós-fixados em OsO₄ 1% durante 90 minutos. Decorrido este tempo, os fragmentos de músculo foram lavados em tampão por 15 minutos. Os fragmentos de tecido permaneceram em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% durante a noite. No dia seguinte após lavagem em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,3) mais 5% de sacarose a 4°C por 15 minutos, procedeu-se à desidratação do material em álcoois a 50; 70; 90; 95 e 100% sendo que neste último, os fragmentos foram submetidos a 3 trocas da solução 20 minutos cada.

Após a desidratação, o material foi embebido em resina Araldite ou mistura de resina Epon-Araldite, segundo técnica do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia (UNICAMP).

No dia seguinte, fragmentos de músculo foram incluídos em resina Epon-Araldite ou Araldite pura por 72 horas em estufa à 70°C. Cortes de 1 µm de espessura foram obtidos com navalhas de vidro e corados com azul de toluidina para exame em microscopia óptica. Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo SUPERNOVA LKB usando-se navalha de diamante, os quais foram contrastados com citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico Zeiss EM9S2 operando em 60 KV. O material foi fotografado e analisado.

Foram feitas observações dos sinais clínicos dos animais e observações macroscópicas da região muscular injetada após a inoculação do veneno ou da fração PLA2.

8) ANÁLISE ESTATÍSTICA

De todos os dados obtidos foram calculados a média e o erro padrão da média (E.P.M.). A significância da diferença entre os dados dos grupos controle e tratados com o veneno ou com a fração PLA2, foi determinada com o teste t-Student para dados pareados e não pareados. Foram considerados estatisticamente significantes valores com $p < 0,05$.

RESULTADOS

1) FRACIONAMENTO EM GEL SEPHADEX G-75: A FIGURA 1 mostra o perfil cromatográfico obtido no fracionamento em gel Sephadex G-75 utilizando-se o tampão Formato de amônio 50 mM, pH 3,5. Obteve-se 3 picos principais de proteínas. Estes picos foram divididos em "Pools" de acordo com a atividade enzimática apresentada: Pool I (tubos 47 a 73); Pool II (74-79), Pool III (tubos 80-96), Pool IV (tubos 97-120) e Pool V (tubos 145-180).

Em nossas condições experimentais, a atividade caseinolítica esteve presente no Pool I e II, enquanto a atividade fosfolipásica esteve presente na Pool IV na porção descendente do Pool II (FIGURA 1). A fração PLA₂ apresentou atividade aproximadamente 12 vezes maior do que a do veneno total. O rendimento proteico obtido foi de 6%, com uma recuperação de 74,7% da atividade enzimática.

A atividade esterásica esteve presente principalmente no Pool III do cromatograma (FIGURA 2).

2) ELETROFORESE: A análise eletroforética em Gel de poliacrilamida-SDS (12%) do veneno total e dos Pools I, II, III e do Pool IV com atividade fosfolipásica obtida em pH 3,5, está representada na FIGURA 3.

O peso molecular dos polipeptídios presentes no Pool IV (com atividade fosfolipásica) foi estimado em 14.560 a 17.750. Quatro cadeias polipeptídicas puderam ser identificadas neste Pool.

3) CROMATOGRAFIA EM GEL SEPHADEX G-150: A FIGURA 4 mostra o perfil cromatográfico obtido no fracionamento em gel Sephadex G-150 utilizando-se o tampão PBS 0,15M, pH 7,2. Obtiveram-se 3 Picos principais de proteínas. Estes picos foram divididos de acordo com a concentração proteica apresentada: Pico Ia (tubos 33 a 39); Pico Ib (tubos 42 a 48); Pico II (tubos 52 a 63) e Pico III (tubos 76 a 84).

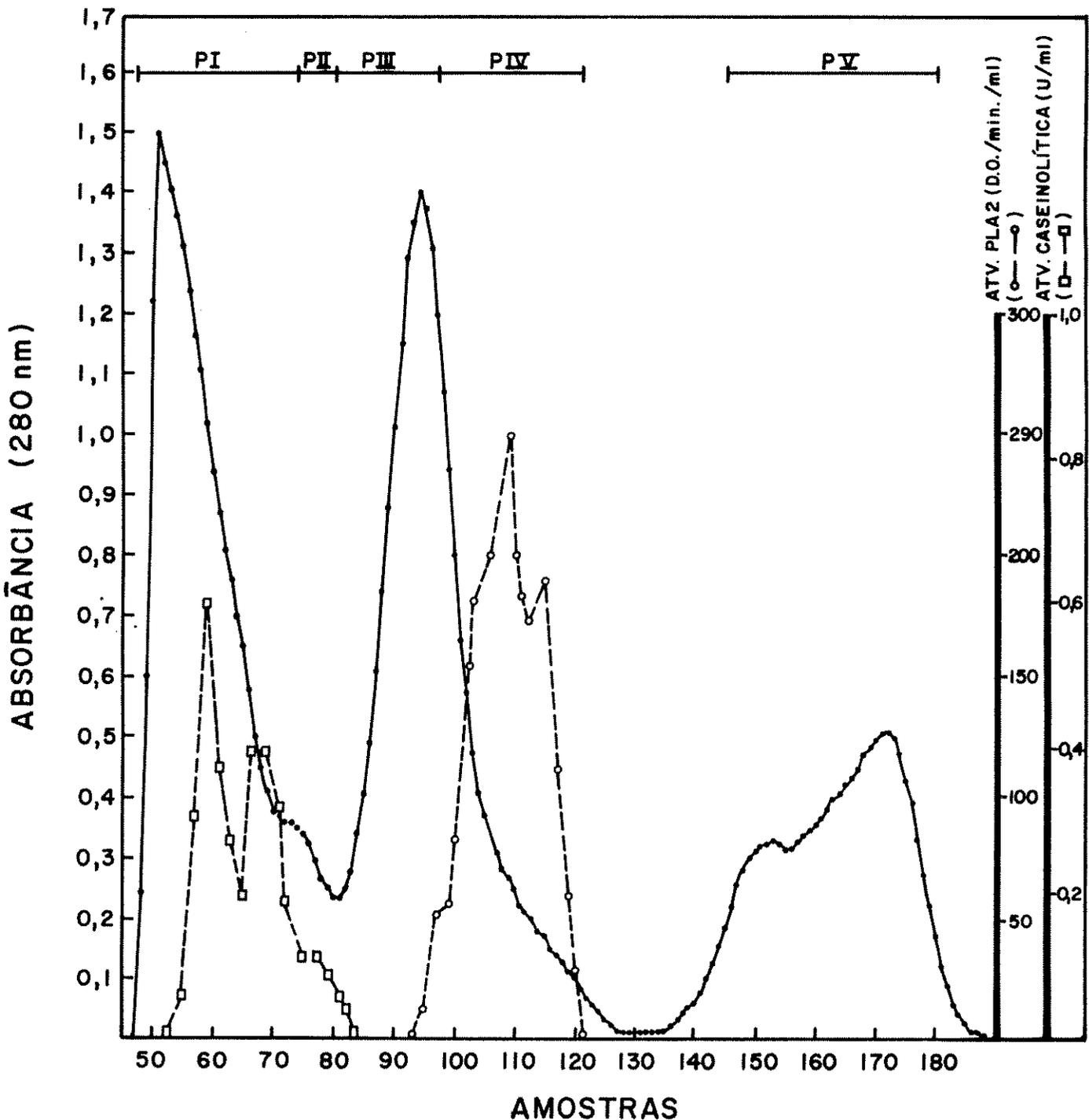


FIGURA 1) PERFIL CROMATOGRÁFICO DO VENENO TOTAL DE *B. insularis* (70 mg) SUBMETIDO A FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-75 EQUILIBRADO COM TAMPÃO FORMATO DE AMÔNIO 50 mM, pH 3,5: a atividade caseinolítica esteve presente no pool I e II enquanto a atividade fosfolipásica esteve presente no pool IV.

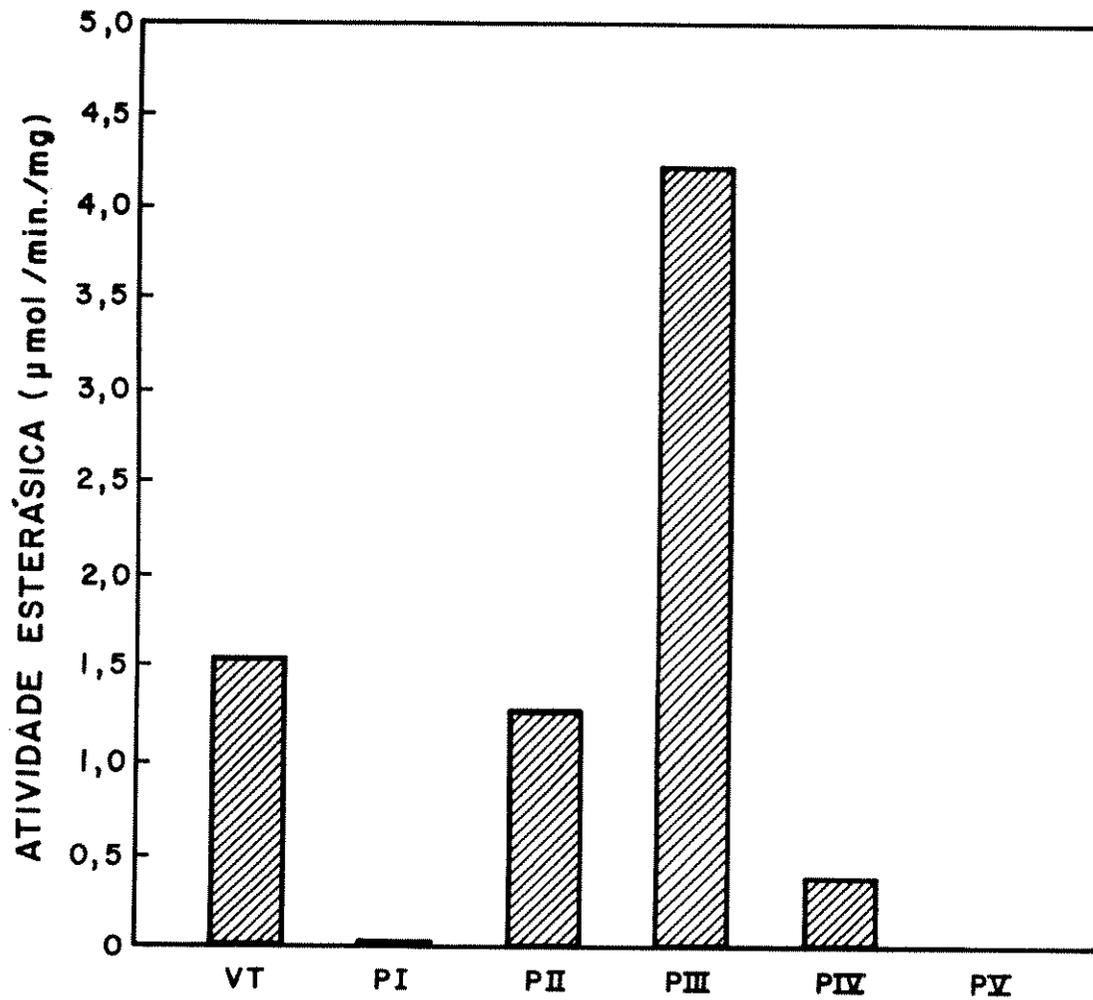


FIGURA 2) ATIVIDADE ESTERÁSICA : do veneno e dos polls I, II, III e IV obtidos no fracionamento em gel Sephadex G-75 equilibrado com tampão formato de amônio 50 mM, pH 3,5.

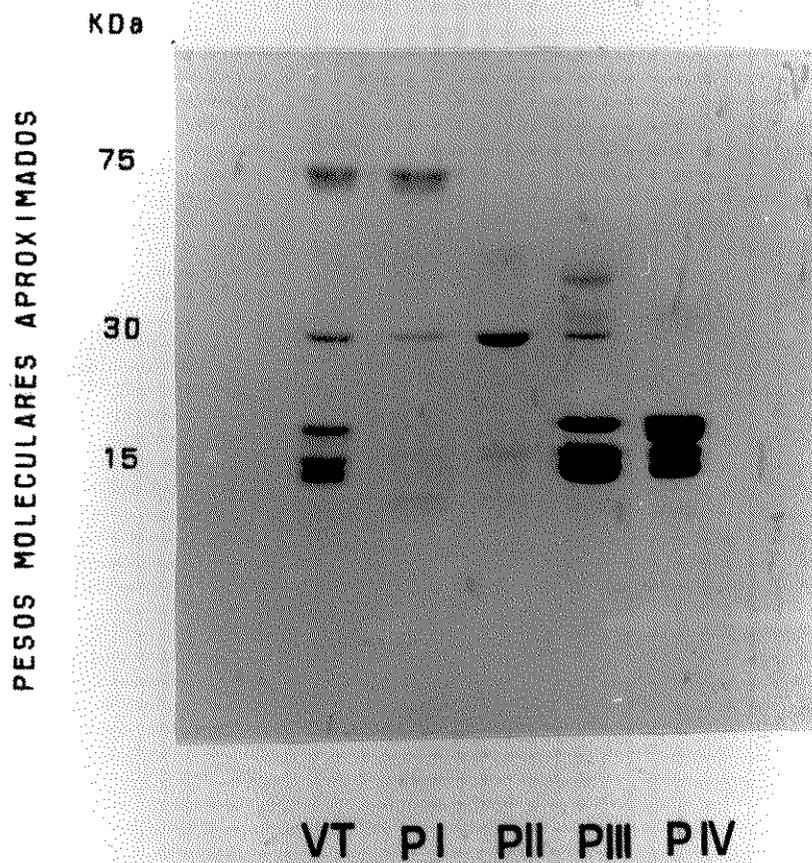


FIGURA 3) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS: do veneno total (VT) e dos pools I, II, III e IV tratados com mercaptoetanol (5%).

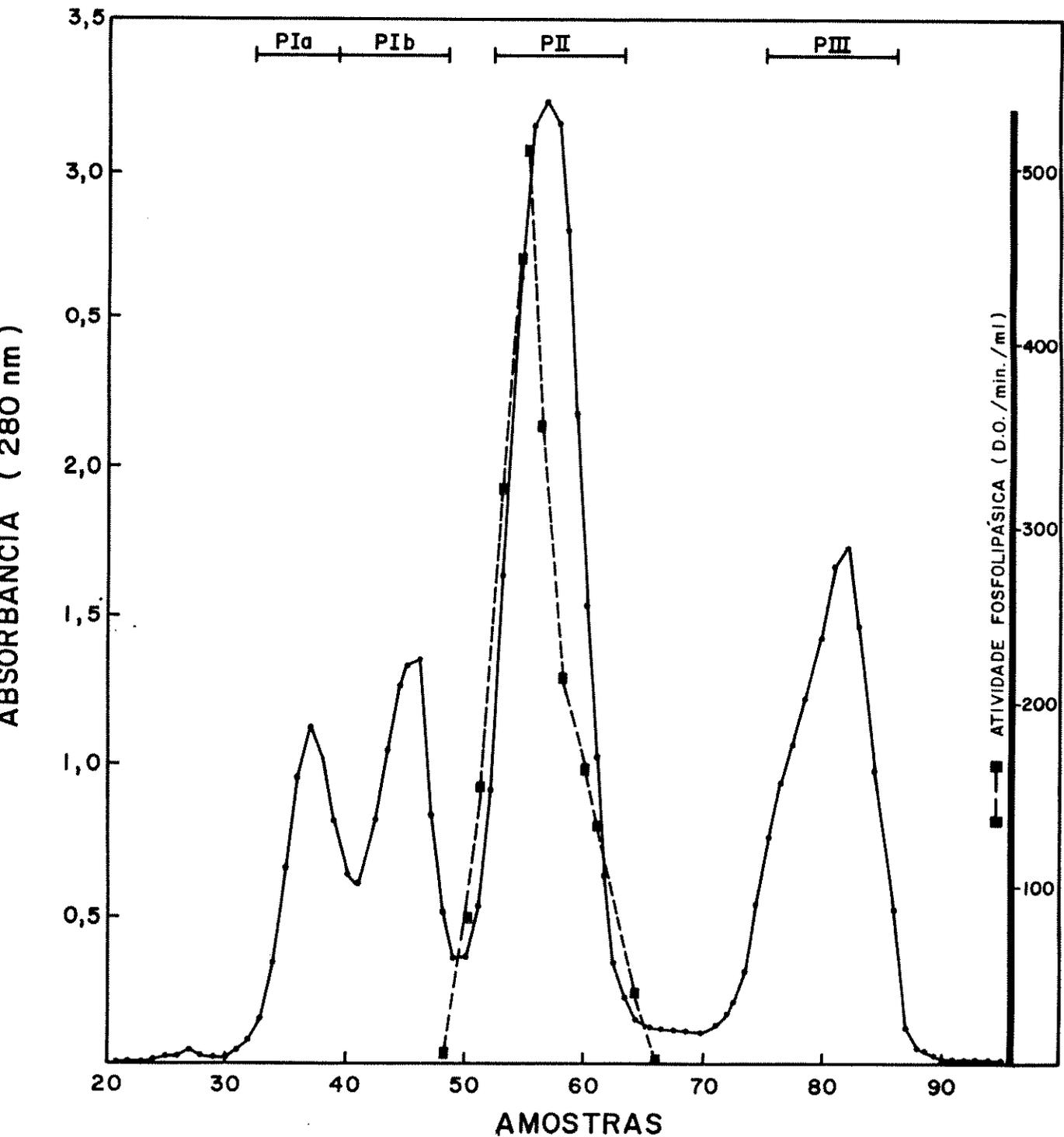


FIGURA 4) PERFIL CROMATOGRÁFICO DO VENENO TOTAL DE *B. insularis* (200 mg) SUBMETIDO A FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-150 EQUILIBRADO COM TAMPÃO PBS 0,1 M, pH 7,2: a atividade fosfolipásica foi localizada no Pico II.

O Pico II apresentou atividade PLA₂ (FIGURA 4) bem como atividade esterásica (FIGURA 5). A atividade esterásica esteve presente também no Pico Ia e Ib (FIGURA 5).

4) ATIVIDADE COAGULANTE SOBRE PLASMA: Em nossas condições experimentais, a atividade coagulante sobre o plasma humano citratado esteve presente nos Picos Ia e Ib da cromatografia em gel Sephadex G-150, pH 7,2.

O Pico Ia induziu a formação da rede de fibrina aos 17 e 33 segundos em plasma com ou sem Ca²⁺ respectivamente, enquanto o Pico Ib levou em média 9 e 13 segundos para o início de formação da rede de fibrina em plasma com a sem Ca²⁺ respectivamente (n=2 cada tempo).

Quando testada a atividade do Pico II, verificou-se que houve a formação da rede de fibrina somente 7 e 10 minutos após a sua adição ao plasma humano com e sem Ca²⁺ respectivamente (FIGURA 6).

O Pico III não apresentou atividade coagulante.

5) CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA: Após a cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex em tampão Bicarbonato de amônio pH 8,0, obtivemos 4 Frações (I, II, III e IV) (FIGURA 7).

A atividade PLA₂ esteve presente na Fração II e na Fração IV (FIGURA 8) enquanto que a atividade esterásica concentrava-se na Fração III (FIGURA 9). Verificamos portanto que a cromatografia de troca iônica foi eficiente em determinar a separação das duas atividades fosfolipase e esterásica.

A fração PLA₂ exibiu rendimento proteico de 12% e recuperação de 33% da atividade enzimática contida em 200 mg de veneno.

6) PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO MÚSCULO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: A FIGURA 10 ilustra o efeito da Fração PLA₂, (pH 8,0), sobre as respostas do diafragma à estimulação elétrica direta e indireta.

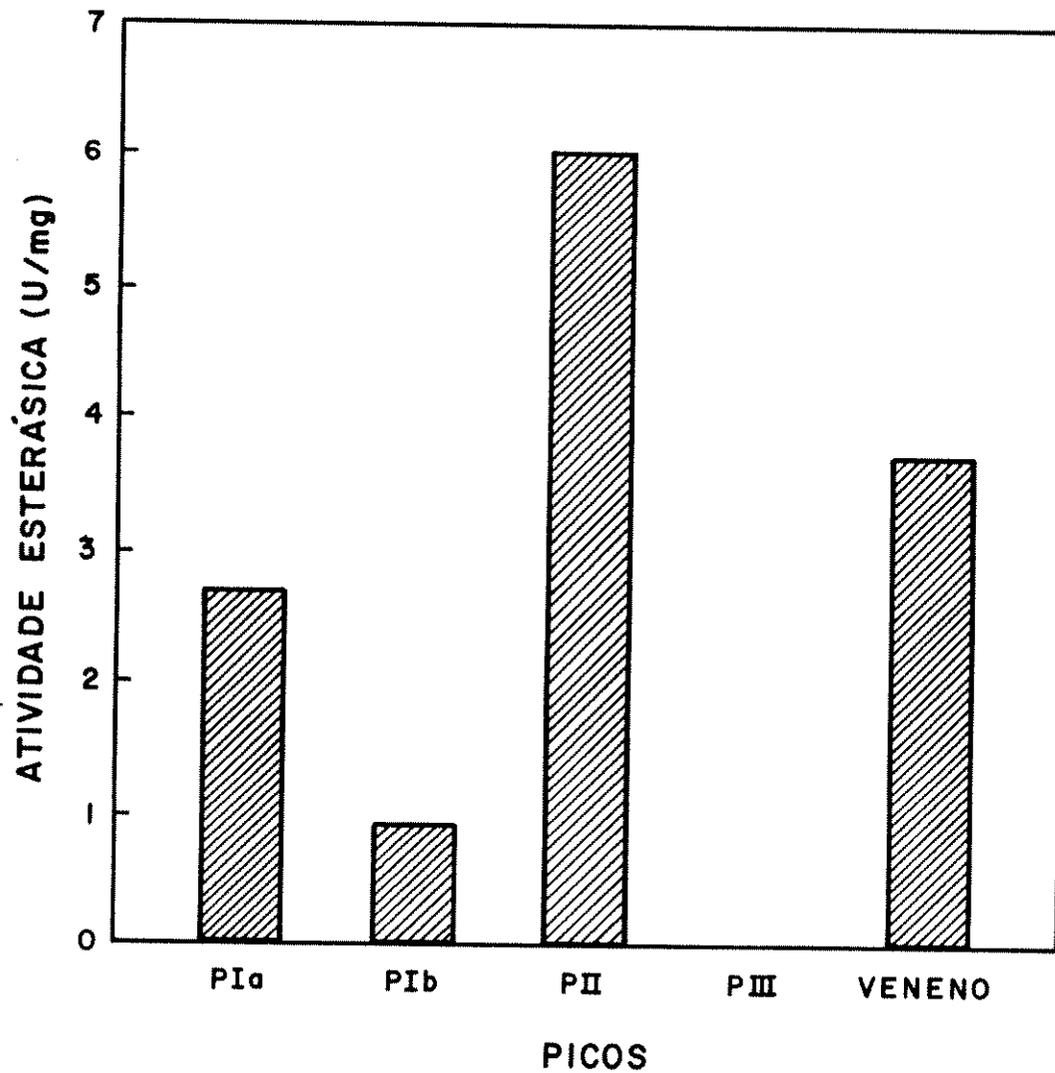


FIGURA 5) ATIVIDADE ESTERÁSICA: do veneno total e dos picos obtidos no fracionamento em gel Sephadex G-150 equilibrado com tampão PBS 0,1M, pH 7,2.

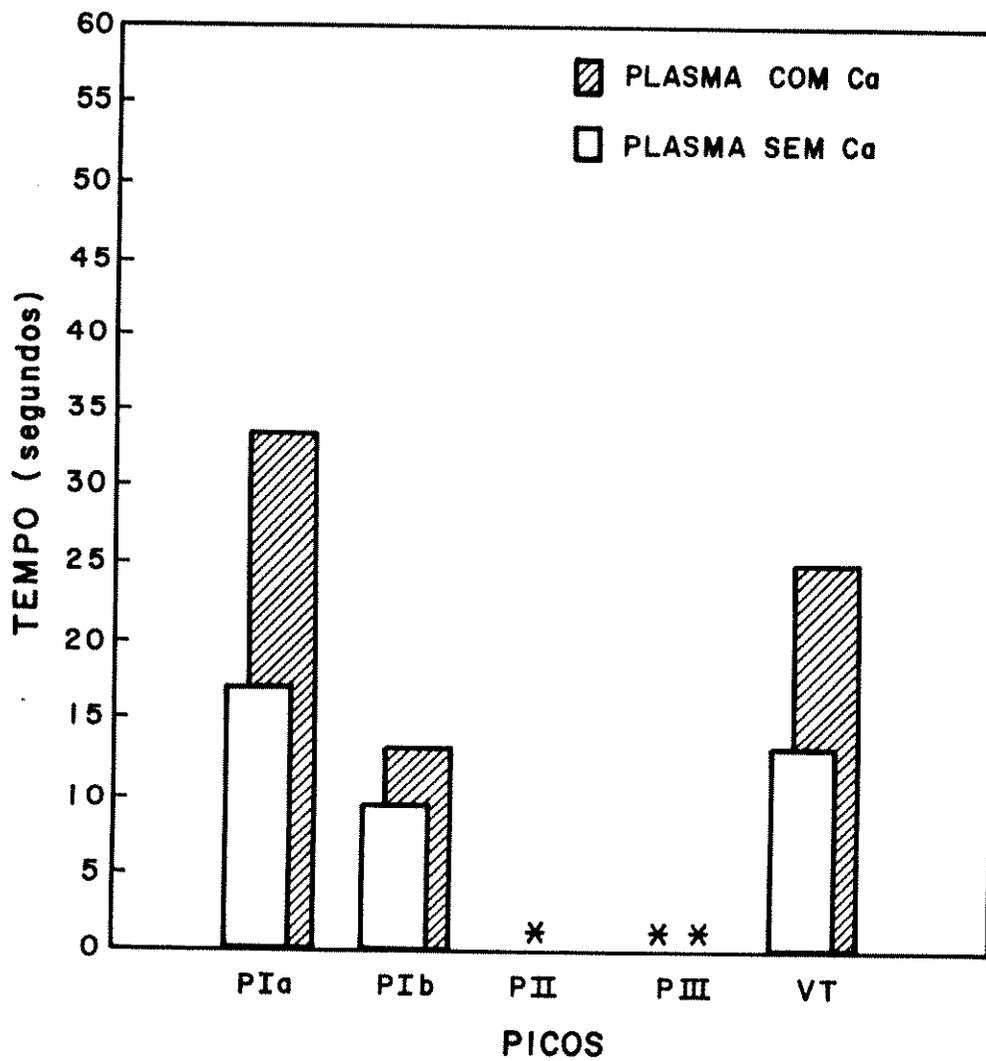


FIGURA 6) ATIVIDADE COAGULANTE: do veneno total e dos picos obtidos no fracionamento em gel Sephadex G-150 equilibrado com tampão PBS 0,1M, pH 7,2.

* tempo de coagulação acima de 1 minuto

** não ocorreu a formação de coágulo.

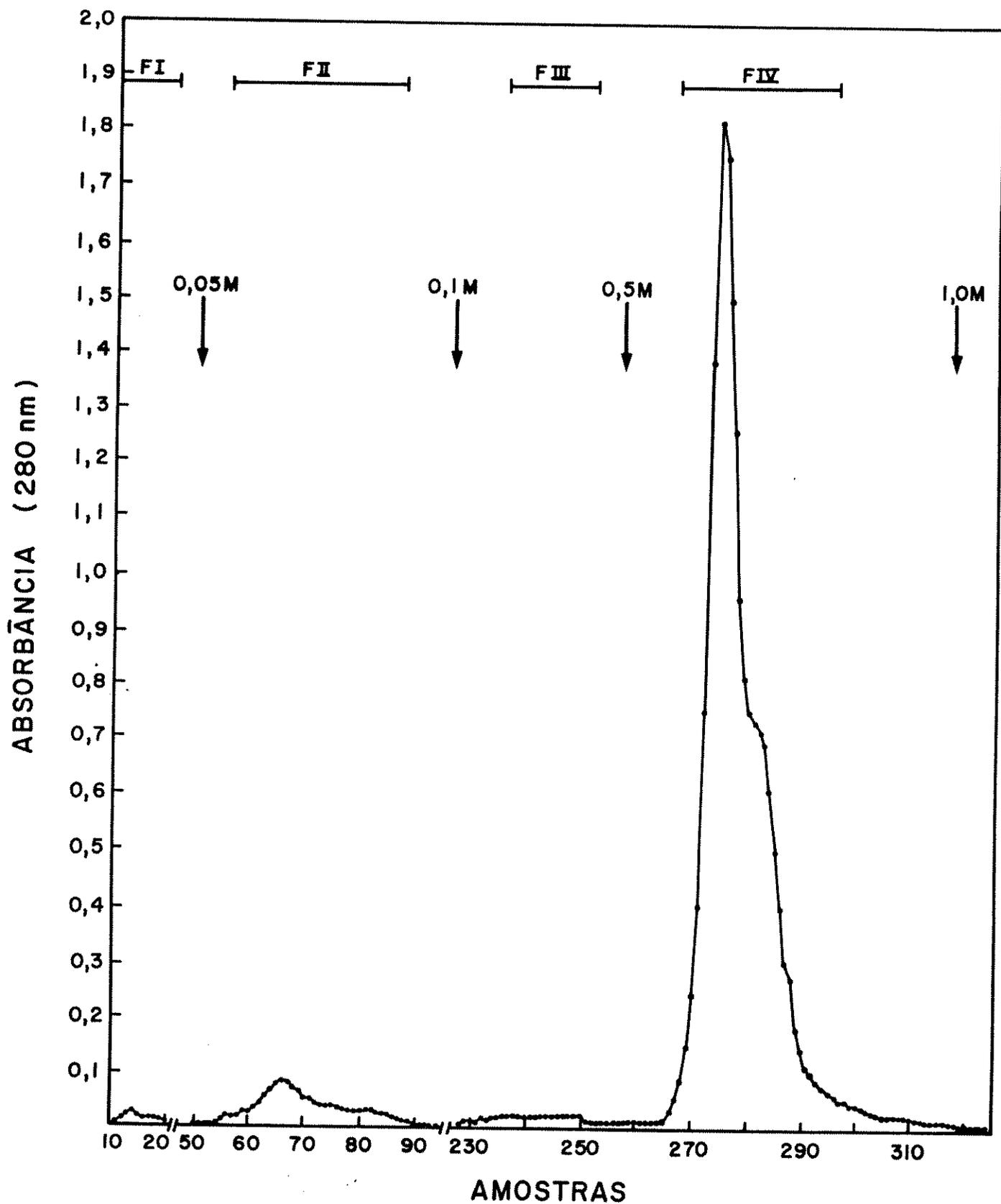


FIGURA 7) PERFIL CROMATOGRÁFICO DO PICO II (50 mg) OBTIDO NO FRACIONAMENTO EM GEL DEPIADEM C 650 (TESTE 1000)

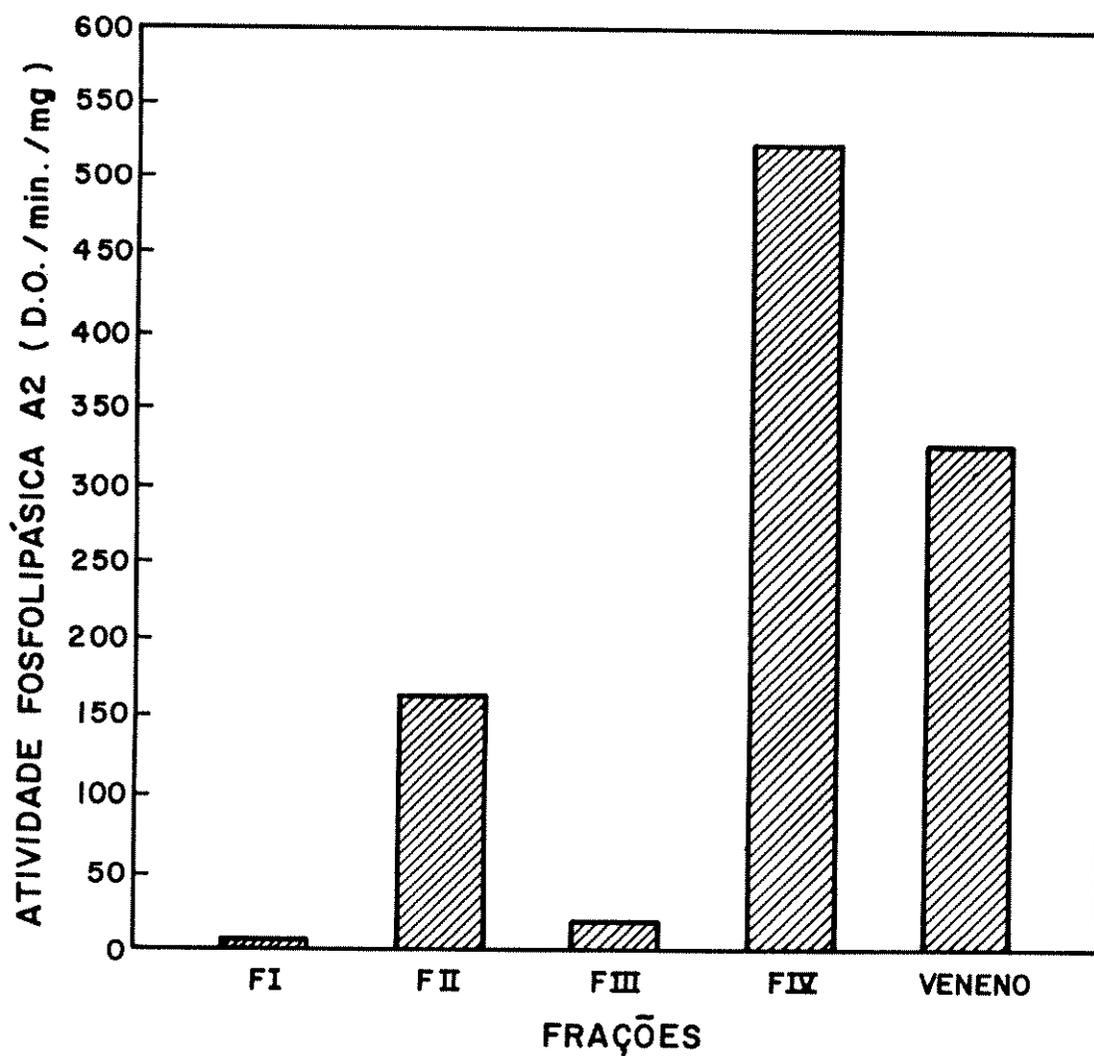


FIGURA 8) ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA: do veneno total e das frações obtidas a partir da cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 8,0. A atividade PLA₂ encontra-se principalmente na fração IV.

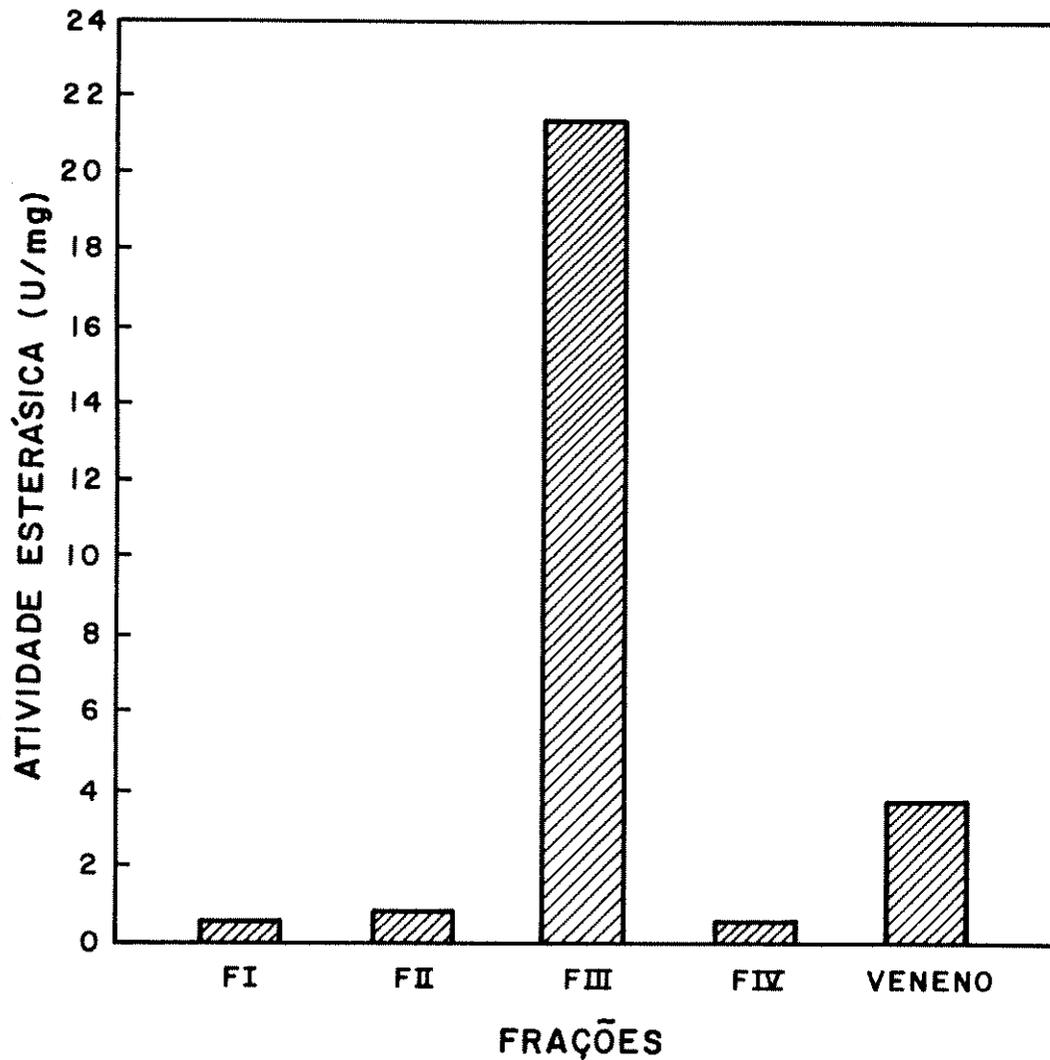


FIGURA 9) ATIVIDADE ESTERÁSICA: do veneno total e das frações obtidas a partir da cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 8,0. A atividade esterásica encontra-se na Fração III.

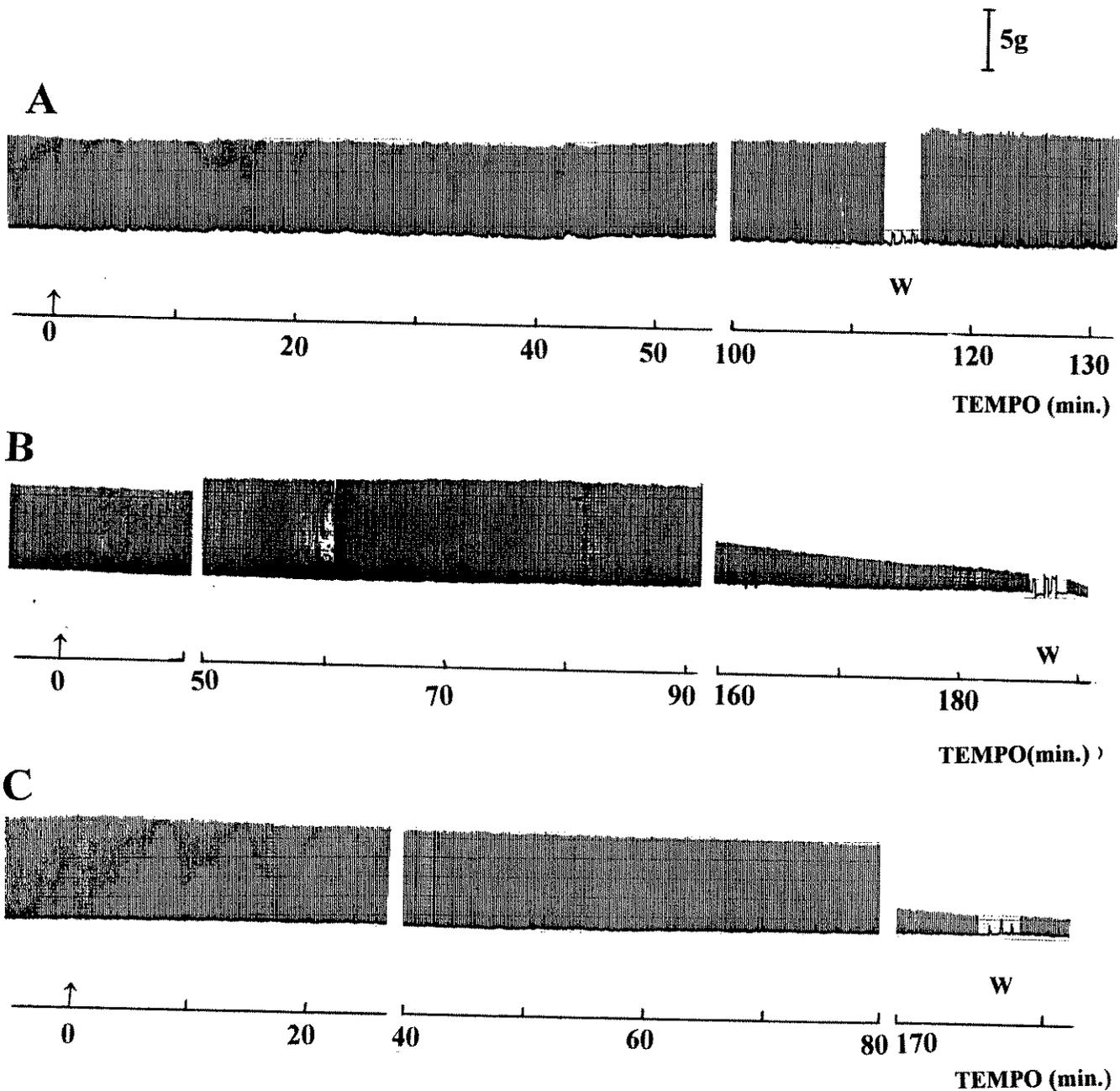


FIGURA 10) PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO MÚSCULO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: A - registro controle (Krebs); B - Fração PLA₂ (pH 8,0; 20 μg/ml), estimulação indireta. Verifica-se o aumento da amplitude de contração muscular seguido de bloqueio. C - Fração PLA₂ (pH 8,0; 20 μg/ml); estimulação direta sem prévia adição de dTc. Observa-se o bloqueio sem o inicial aumento da amplitude das contrações musculares. No tempo zero (0), Krebs (A) ou PLA₂ (B e C) foram adicionados ao banho. W - lavagem da preparação.

A Fração PLA₂ (20 µg/ml; n= 4), promoveu aumento da amplitude das contrações musculares entre 60 e 90 minutos, seguido de bloqueio da ordem de 26% em aproximadamente 180 minutos de registro. Em apenas 1 experimento observou-se bloqueio de 80% aos 180 minutos (FIGURA 10B).

Quando o músculo foi estimulado diretamente (sem o prévio tratamento com d-Tubocurarina - dTc), verificou-se bloqueio o qual atingiu $76 \pm 7\%$ aos 180 minutos de exposição (n= 3; FIGURA 10C). Nesse caso, não foi observado o característico aumento inicial das contrações musculares registrado em preparações estimuladas indiretamente (FIGURA 10B)

Estes efeitos não foram reversíveis após a lavagem da preparação.

A estimulação direta parece determinar o aparecimento do bloqueio mais precocemente, provavelmente pela ausência do efeito facilitador inicial característico dessa PLA₂ sobre a preparação neuromuscular de camundongo (FIGURA 11). Quando, sob a estimulação indireta (40 µg/ml PLA₂; pH 8,0; n=3), a facilitação inicial foi menos evidente (FIGURA 12A). Somente em 1 preparação observou-se o aumento que atingiu 8% aos 30 minutos de exposição.

A estimulação direta também levou o músculo a bloqueio de 85% em 180 minutos (n= 3), sem o prévio tratamento da preparação com dTc. Entretanto, o mesmo nível de bloqueio foi observado nos músculos previamente tratados com dTc (3 µg/ml; n=3) (FIGURA 12B e C e 13).

Todos estes efeitos não foram reversíveis com a lavagem da preparação.

A fração PLA₂ (40 µg/ml) obtida em pH 3,5 não promoveu bloqueio das contrações musculares na preparação nervo frênico músculo diafragma isolado de camundongo.

7) PREPARAÇÃO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO:

Nesta preparação, o efeito contraturante do veneno total de *B. insularis* (80 µg/ml; n= 5) foi particularmente evidenciado, assim como o bloqueio das contrações musculares não reversível após várias lavagens (FIGURA 14A).

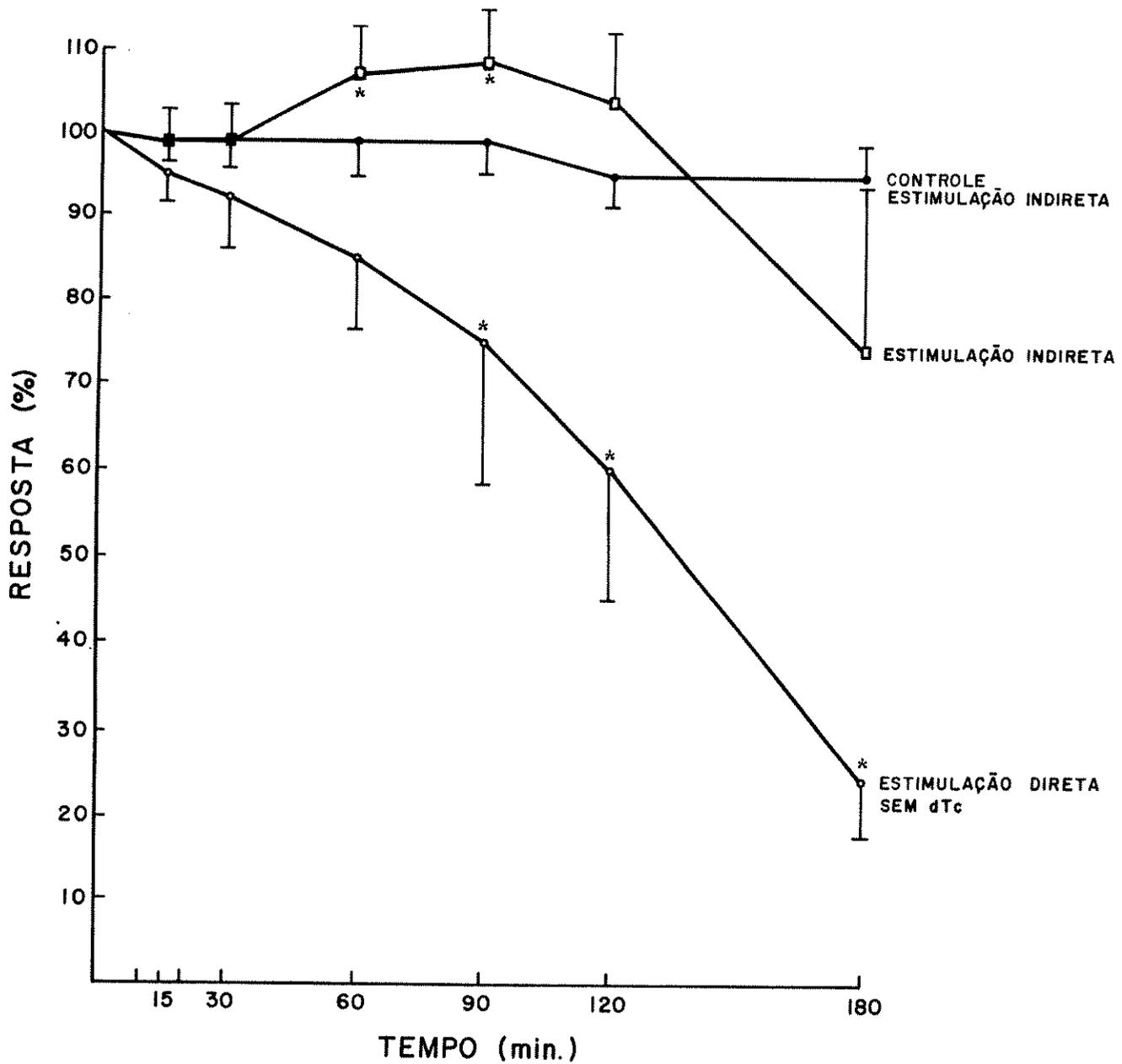


FIGURA 11) CURVA DOSE-EFEITO DA FRAÇÃO PLA_2 (pH 8,0; 20 $\mu\text{g/ml}$) SOBRE AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS DO NERVO FRÊNICO MÚSCULO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: o músculo foi estimulado indireta ou diretamente. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 3 a 4 experimentos. * $p < 0,05$.

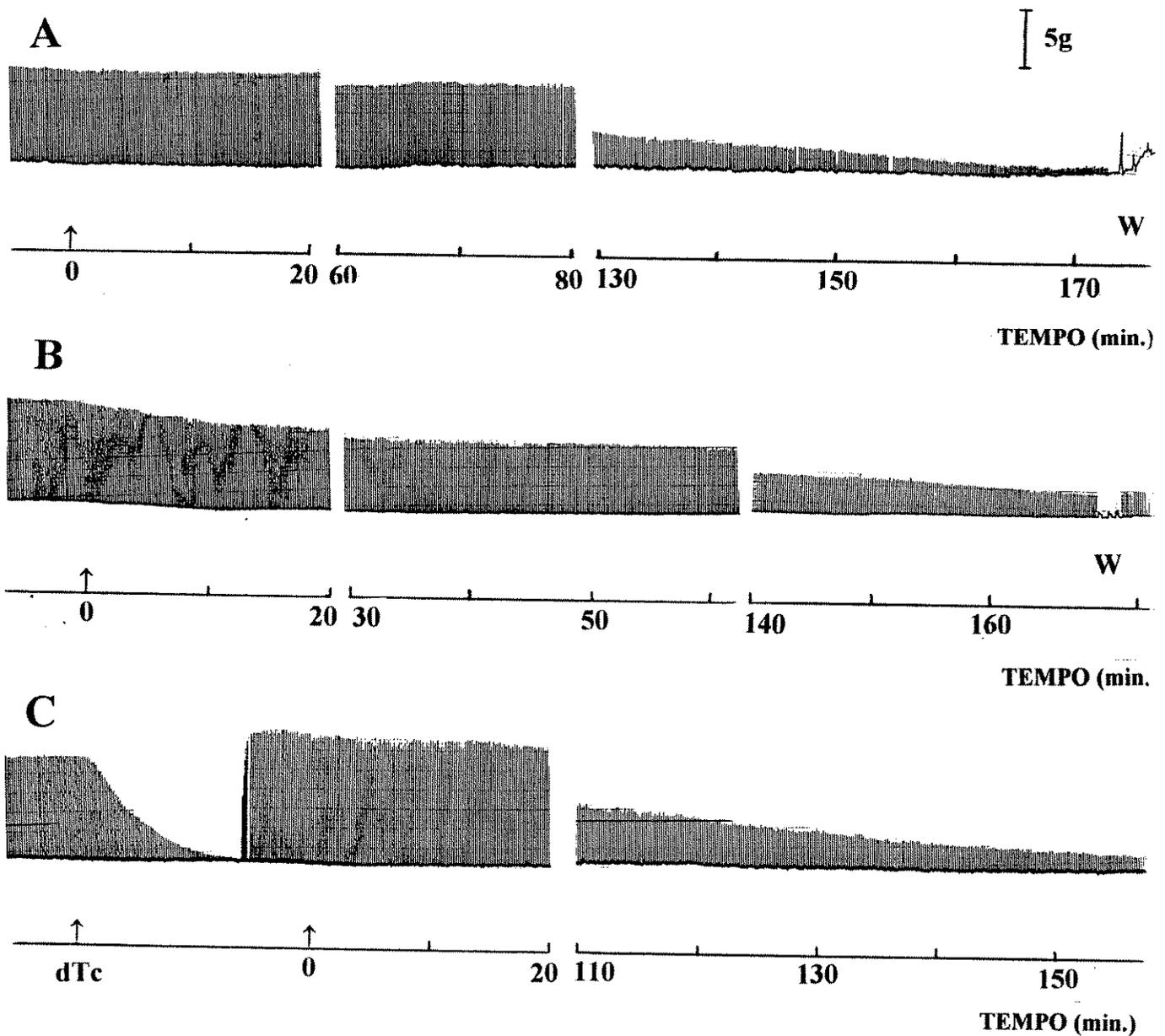


FIGURA 12) EFEITOS DA ADIÇÃO DE 40 $\mu\text{g/ml}$ DA FRAÇÃO PLA_2 (pH 8,0) SOBRE A PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO MÚSCULO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: A - músculo estimulado indiretamente. B - músculo estimulado diretamente sem prévia adição de dTc. C - músculo estimulado diretamente com prévia adição de dTc (3 $\mu\text{g/ml}$). No tempo zero (0), PLA_2 foi adicionada ao banho. W - lavagem da preparação.

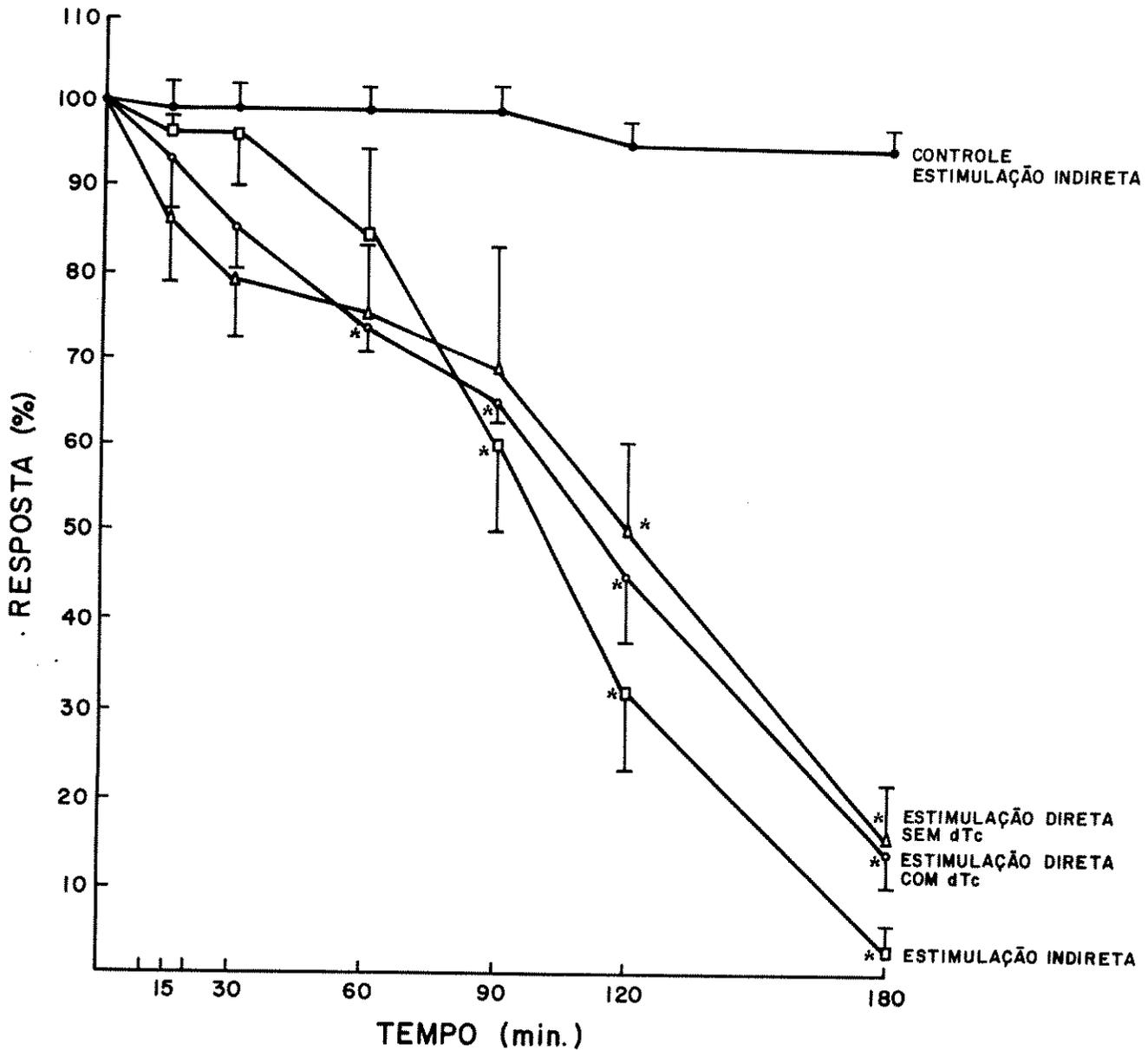


FIGURA 13) CURVA MOSTRANDO OS EFEITOS DA PLA_2 (pH 8,0; 40 $\mu\text{g/ml}$) SOBRE AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS DA PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO MÚSCULO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: o músculo foi estimulado indiretamente ou diretamente. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 3 a 4 experimentos. * $p < 0,05$.

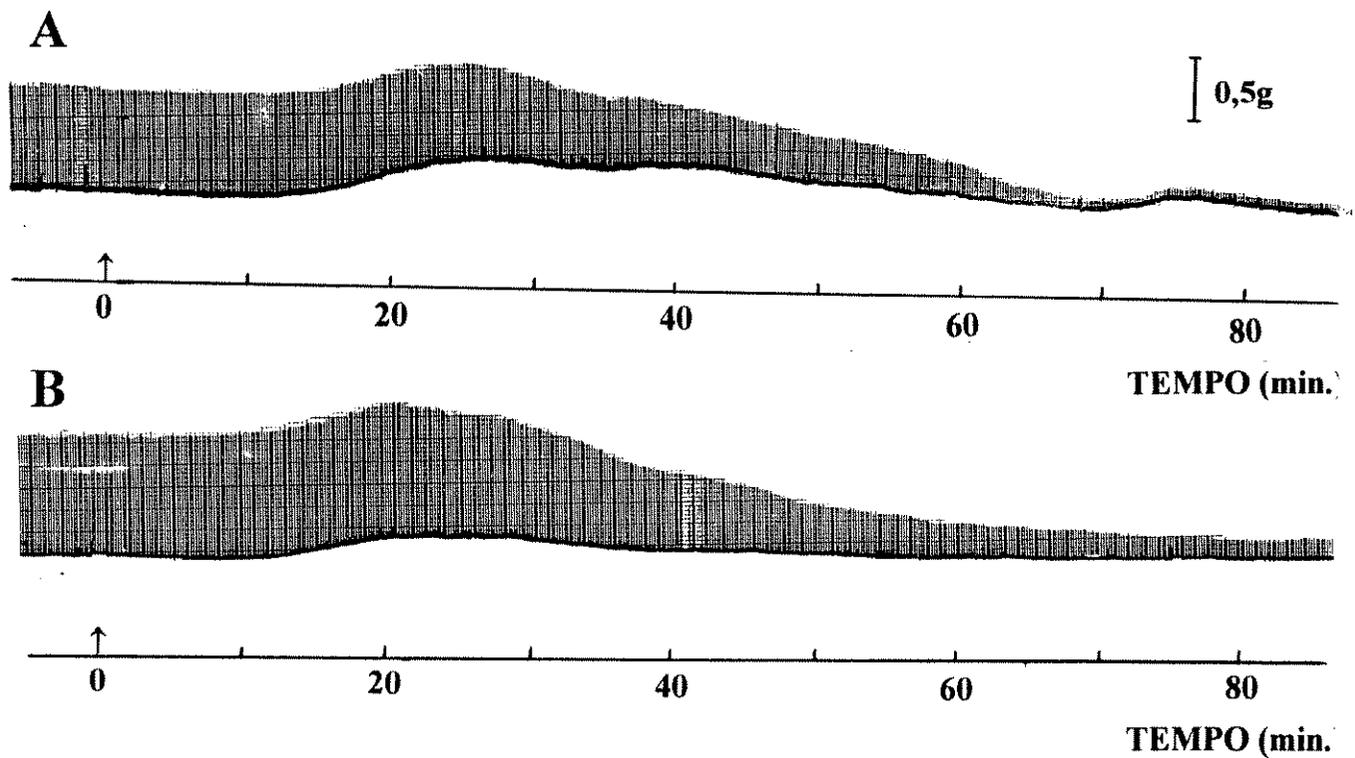


FIGURA 14) PREPARAÇÃO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO:
A - veneno total de *B. insularis* (80 μ g/ml). **B** - Fração PLA₂ obtida em pH 8,0 (40 μ g/ml). No tempo zero (0), o veneno (**A**) ou PLA₂ (**B**) foram adicionados ao banho.

O efeito da fração PLA₂ obtida no fracionamento em pH 8,0 sobre a preparação de aves foi semelhante ao observado com o veneno total (FIGURA 14B). Em algumas preparações (4 na dose de 20 µg/ml e 2 na dose de 40 µg/ml), ocorreu inicialmente (nos primeiros 15-30 minutos) aumento da amplitude das contrações musculares da ordem de 12%, mas em todas as preparações, após este período de tempo, iniciou-se um lento e progressivo bloqueio. Este efeito mostrou-se dose e tempo-dependente para as doses de 5 (n=5); 20 (n=9) e 40 (n=4) µg/ml (FIGURA 15).

À semelhança do que ocorre com o veneno total, observou-se efeito contraturante na maioria das doses empregadas. Essa contratura atingiu o seu máximo em 30 minutos aproximadamente.

Quando testada a fração PLA₂ obtida em pH 3,5 (40 µg/ml; n= 3-4), verificou-se que a mesma induziu aumento na amplitude das contrações musculares da ordem de 12%. Esse efeito foi observado logo após a sua adição ao banho onde o músculo estava mergulhado. O aumento da amplitude teve duração de aproximadamente 20 minutos, voltando espontânea e progressivamente para a amplitude observada nos controle (FIGURA 16).

Em todos os experimentos realizados o efeito bloqueador persistiu após a lavagem da preparação.

Nos experimentos controles (n= 16), os níveis basais mantiveram-se estáveis mesmo após 120 minutos de observação e, após a lavagem da preparação, a amplitude das respostas musculares permaneceu sem alteração passível de ser registrada.

8) ANTAGONISMO PELA TEMPERATURA E PELO Sr²⁺: A FIGURA 17 mostra que a diminuição da temperatura (aproximadamente 20°C) inibiu o bloqueio e contratura produzidos pela fração PLA₂ (20 µg/ml) na preparação *biventer cervicis* de pintainho.

A substituição do Ca²⁺ pelo Sr²⁺ (4 mM) foi capaz de retardar de modo marcante (início de bloqueio somente após 120 minutos) os efeitos da fração PLA₂

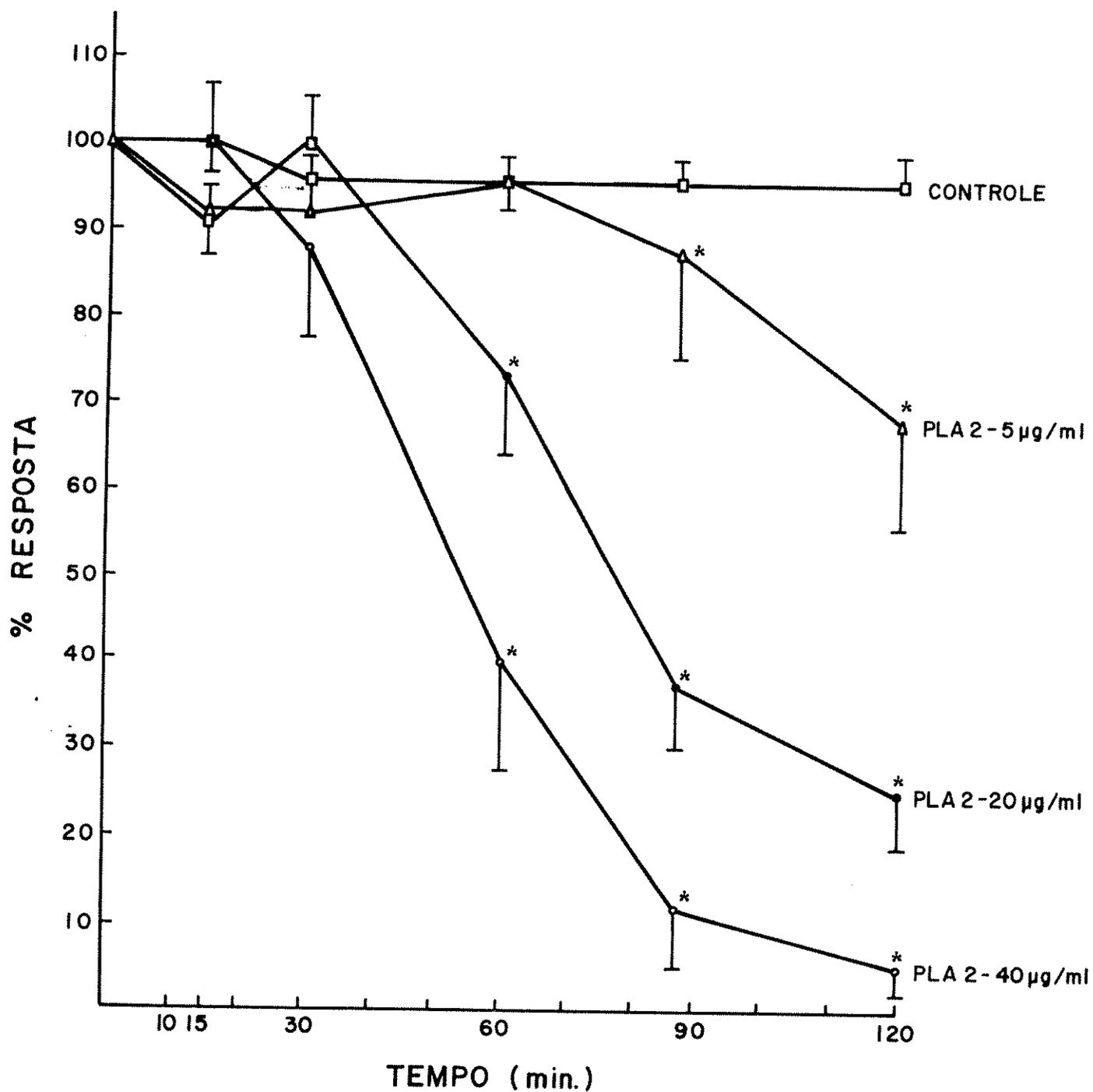


FIGURA 15) CURVA DOSE-EFEITO DA FRAÇÃO PLA₂ OBTIDA EM pH 8,0 SOBRE O MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO: cada ponto representa a média \pm erro padrão de 4 a 5 experimentos. * $p < 0,05$.

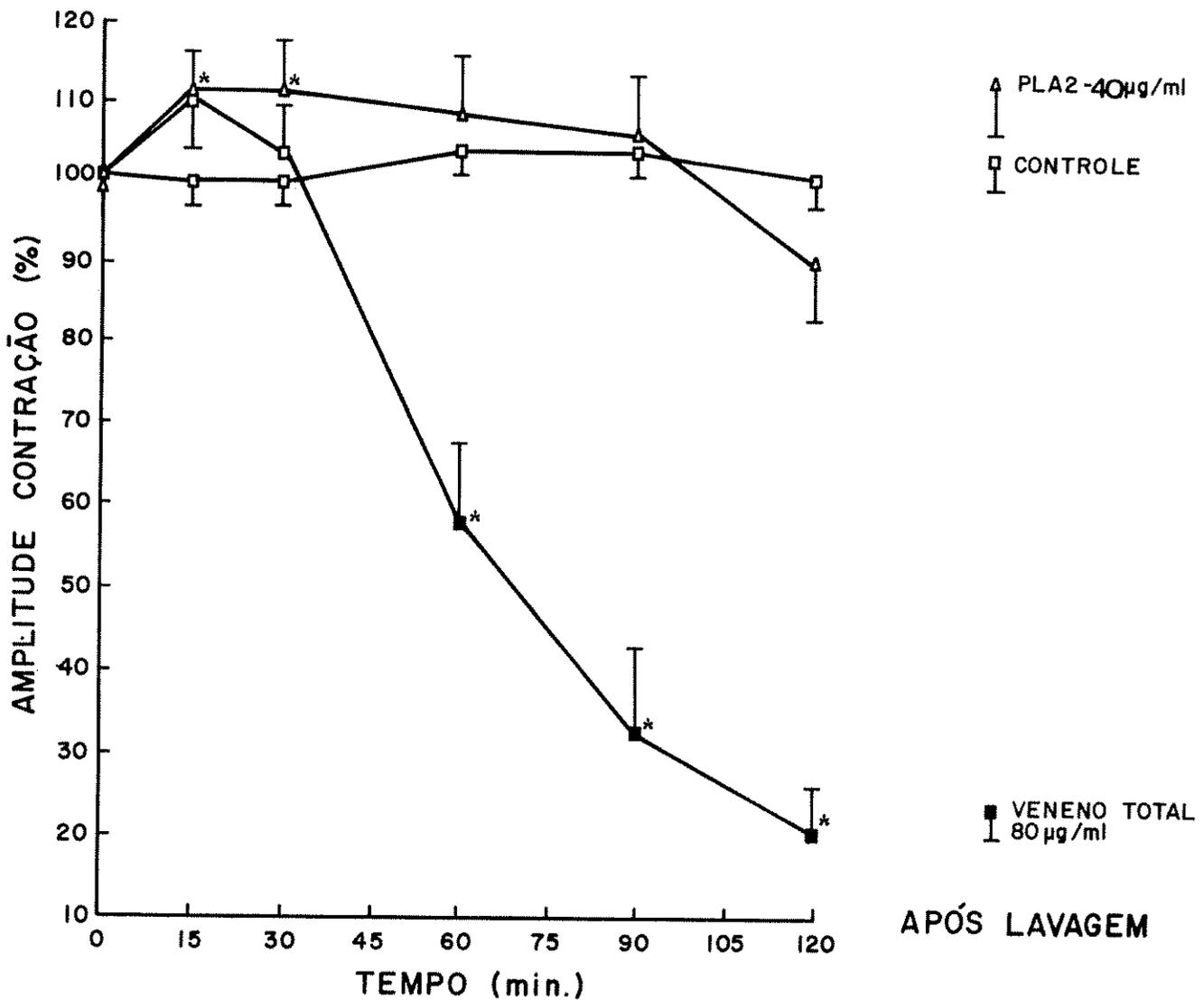


FIGURA 16) CURVA DOSE-EFEITO DO VENENO TOTAL (80 µg/ml) E DA FRAÇÃO PLA₂ (pH 3,5; 40 µg/ml) SOBRE AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS DO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO: observar o aumento da amplitude de contração do músculo após a adição do veneno total antecedendo o bloqueio. A fração PLA₂ também promoveu um aumento na amplitude das contrações musculares sem entretanto promover bloqueio. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 a 11 experimentos. *p<0,05.

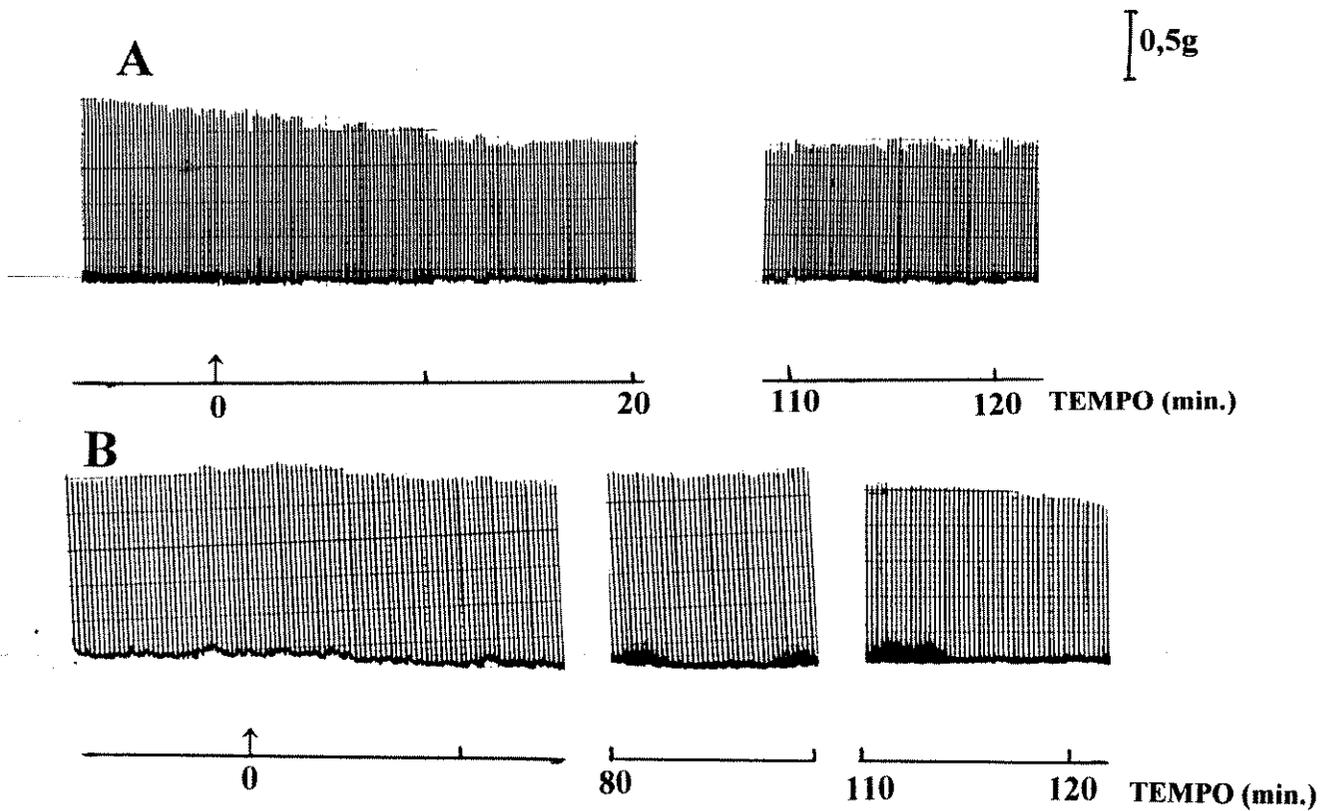


FIGURA 17) ANTAGONISMO PELA TEMPERATURA E PELO Sr^{2+} : **A** - preparação *biventer cervicis* de pintainho. A temperatura inibiu o bloqueio promovido pela PLA_2 (20 $\mu g/ml$; pH 8,0). **B** - preparação nervo frênico músculo diafragma isolado de camundongo. O Sr^{2+} retardou os efeitos produzidos pela PLA_2 (40 $\mu g/ml$; pH 8,0). No tempo zero (0), PLA_2 foi adicionada ao banho.

(40 $\mu\text{g/ml}$). na preparação nervo frênico músculo diafragma isolado de camundongo (FIGURA 17).

9) LIBERAÇÃO DE CQ PELO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO: A fração PLA_2 (pH 8,0) (5 $\mu\text{g/ml}$ n= 5; 20 $\mu\text{g/ml}$ n= 5 e 40 $\mu\text{g/ml}$ n= 4) foi capaz de induzir liberação de CQ de maneira dose-dependente (FIGURA 18).

A liberação promovida por 40 $\mu\text{g/ml}$ da fração, foi cerca de 3 vezes maior do que a induzida pela mesma concentração do veneno total (80 $\mu\text{g/ml}$; n= 4), em todos os tempos considerados. Mesmo reduzindo-se a concentração da fração PLA_2 para 20 $\mu\text{g/ml}$, observou-se uma liberação de CQ maior do que aquela promovida pelo veneno total com o dobro da dose (80 $\mu\text{g/ml}$ n=4) (FIGURA 18).

Em nossas condições experimentais, observamos que mesmo nos experimentos controles houve certo grau de liberação de CQ porém sempre sensivelmente inferior às preparações tratadas a partir da dose ou do tempo empregados.

10) CAPACIDADE DO SORO ANTI-BOTRÓPICO EM IMPEDIR A LIBERAÇÃO DE CQ EM PREPARAÇÃO INCUBADA COM FRAÇÃO PLA_2 (pH 8,0): A incubação prévia da fração PLA_2 com o soro anti-botrópico a 37°C, reduziu de modo significativo a sua capacidade liberadora de CQ (FIGURA 19). O soro anti-botrópico impediu a liberação de CQ em aproximadamente 70% (n=5) quando utilizamos a dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ da fração PLA_2 . Como mostra a FIGURA 19, o próprio soro induz liberação de CQ (n= 4), fato que evidencia ainda mais sua capacidade neutralizante.

O mesmo efeito neutralizante do soro anti-botrópico foi analisado, utilizando-se como parâmetro o registro miográfico. A FIGURA 20 mostra a proteção do soro sobre o efeito bloqueador das contrações musculares (de 60%) induzido pela fração PLA_2 (20 $\mu\text{g/ml}$).

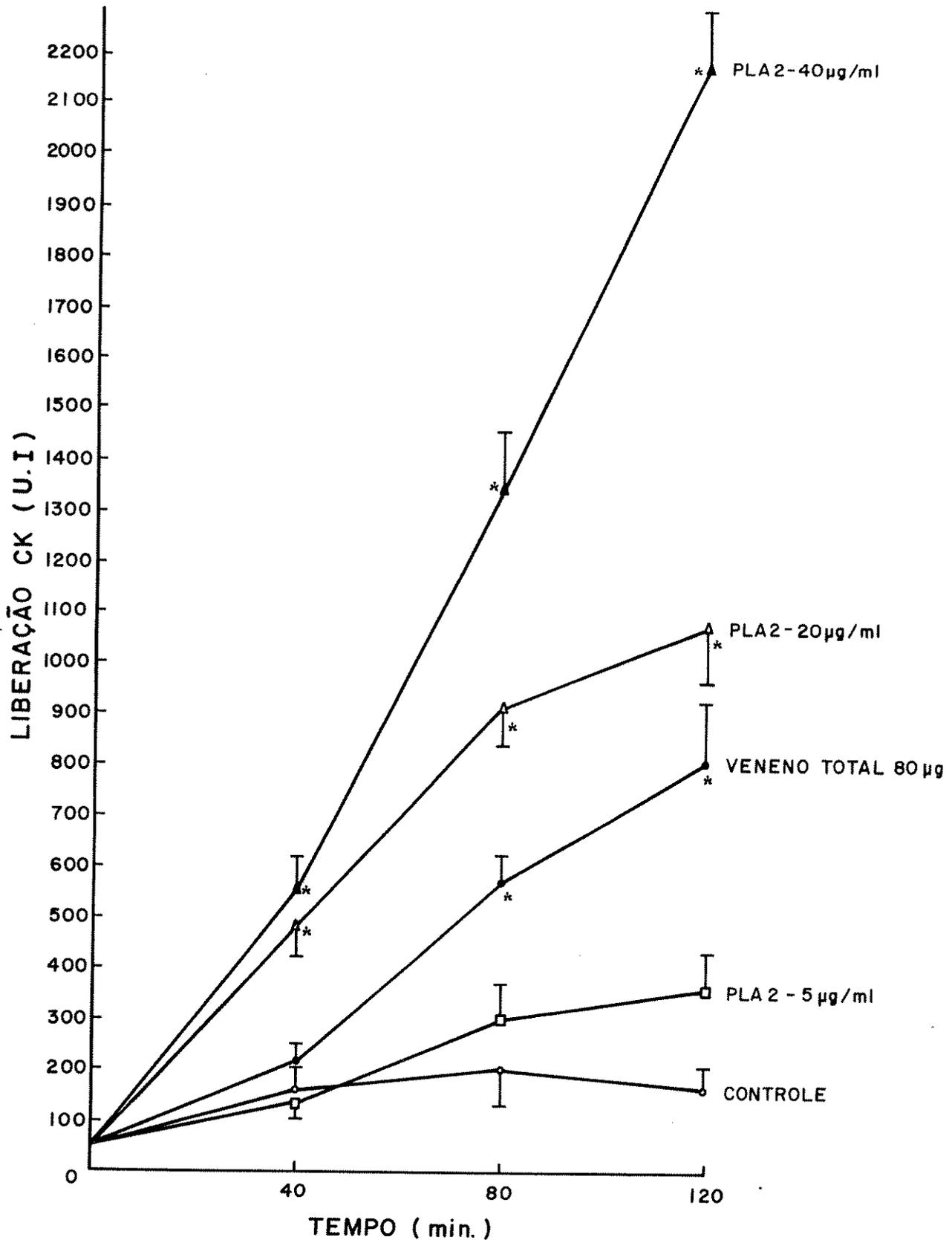


FIGURA 18) CURVA DOSE EFEITO DA LIBERAÇÃO DE CQ PROMOVIDA PELO VENENO TOTAL E PELA FRAÇÃO PLA₂ OBTIDAS EM pH 8,0: preparação *biventer cervicis* de pintainho. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 4 a 5 experimentos. * $p < 0,05$.

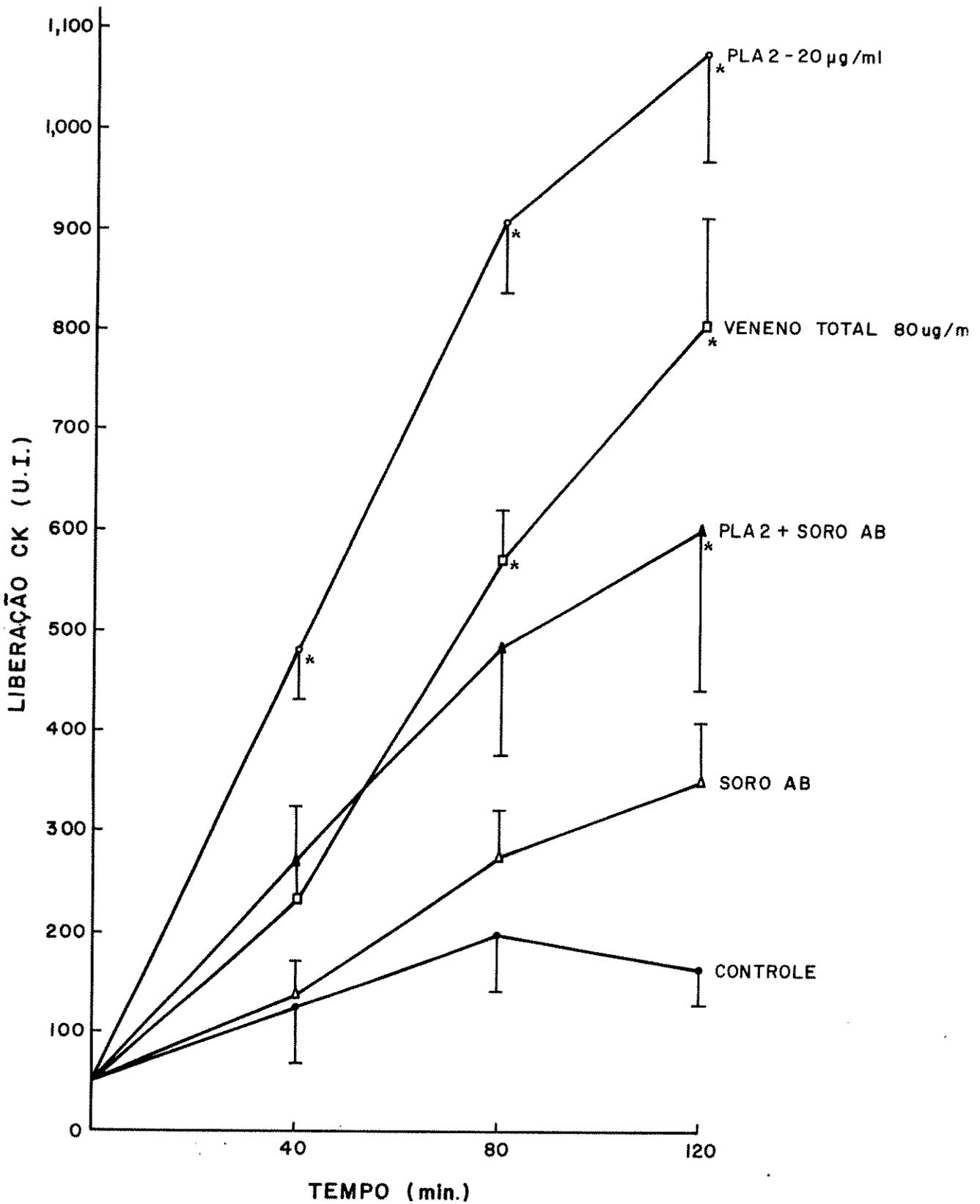


FIGURA 19) CURVA DOSE-EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CQ PELO SORO ANTI-BOTHÓPICO (AB) PROMOVIDO PELA PLA₂ (pH 8,0): preparação *biventer cervicis* de pintainho. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 a 5 experimentos. * p<0,05.

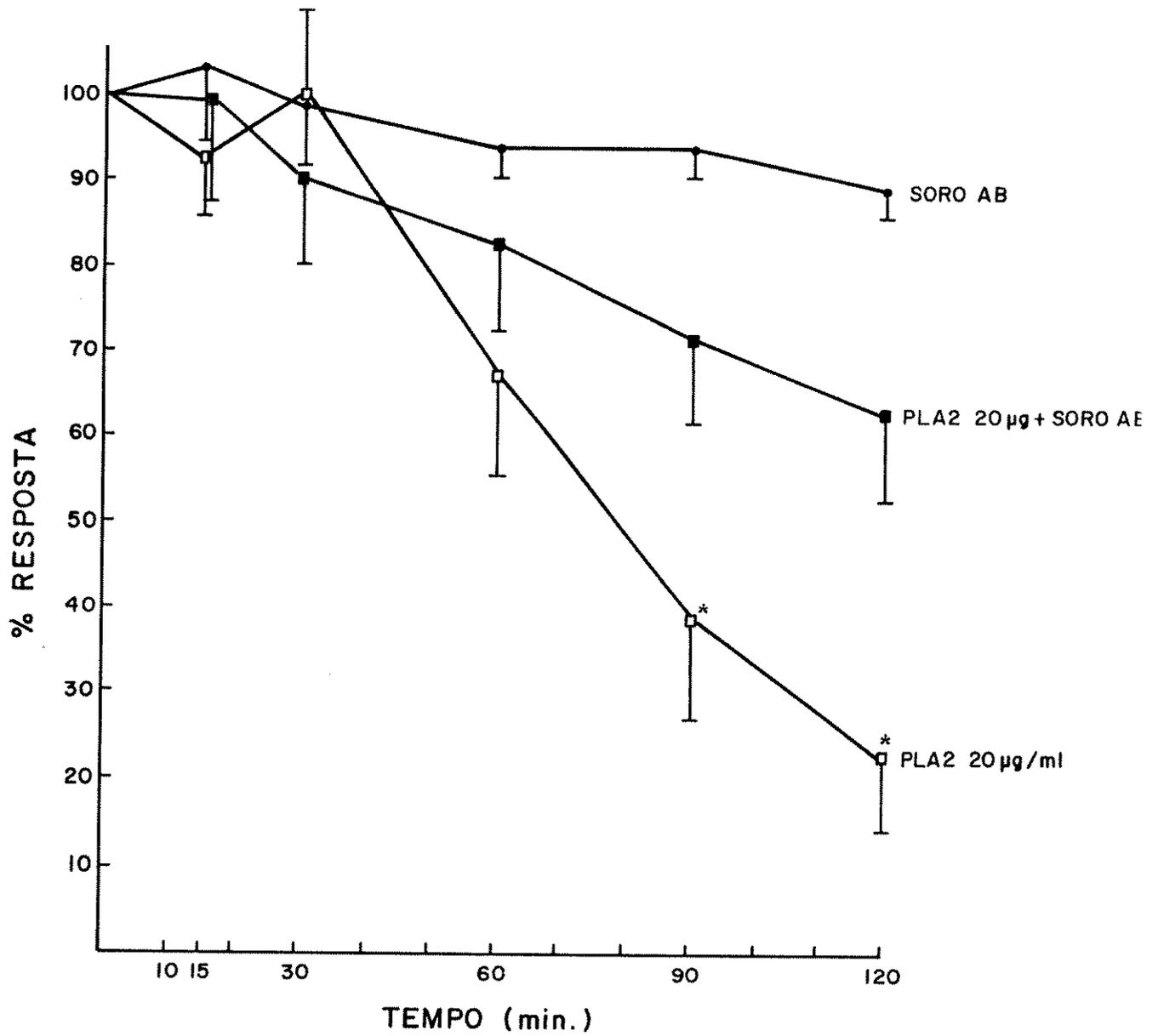


FIGURA 20) CURVA DO EFEITO DA FRAÇÃO PLA₂ OBTIDA EM pH 8,0 EM PREPARAÇÃO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO: a PLA₂ (pH 8,0) foi previamente incubada com soro AB durante 30 minutos. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 a 7 experimentos. * p<0,05.

11) MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO (PR) DO MÚSCULO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: A fração PLA₂ obtida no fracionamento em gel Sephadex G-75 utilizando tampão Formato de amônio 50mM, pH 3,5, adicionada ao banho, induziu queda de apenas 13% no potencial de repouso 15 minutos após a sua adição (40 µg/ml; n= 5).

A fibra permaneceu despolarizada aproximadamente 60 minutos, repolarizando-se aos 90 minutos. Após a lavagem, verificou-se nova despolarização da fibra muscular da ordem de 12% (-69 mV) (FIGURA 21). A medida do PR nessas preparações era de fácil obtenção.

A fração PLA₂ obtida em pH 8,0, na dose de 20 µg/ml (n= 4) induziu despolarização que atingiu cerca de 20% aos 120 minutos em relação aos valores controles. No entanto, com o dobro da dose (40 µg/ml; n= 4), o efeito despolarizante esteve presente de modo mais acentuado, com início após 30 minutos da adição da fração. Aos 120 minutos a despolarização foi de 80% (FIGURA 22).

Após 60 minutos de incubação, a preparação tornou-se de difícil manipulação para a medida do PR com o aparecimento de fibrilação que se intensificou até aos 90 minutos aproximadamente, desaparecendo em seguida. A partir deste período de tempo, não se observava p.m.p.t. e o PR oscilava em torno de -30 mV.

12) REGISTRO DOS POTENCIAIS EM MINIATURA DA PLACA TERMINAL: As FIGURAS 23 e 24 mostram os efeitos da fração PLA₂ (pH 8,0; 40 µg/ml; n =4) sobre o registro dos p.m.p.t. em preparação isolada diafragma de camundongo.

Verificamos que nos primeiros 30 minutos, não havia mudança na frequência ou amplitude dos p.m.p.t. No entanto, após este período de tempo, iniciava-se aumento da frequência dos p.m.p.t. no período de 30 a 60 minutos após a adição da fração PLA₂. Esse aumento foi mais intenso no período de 60 a 90 minutos (FIGURA 23).

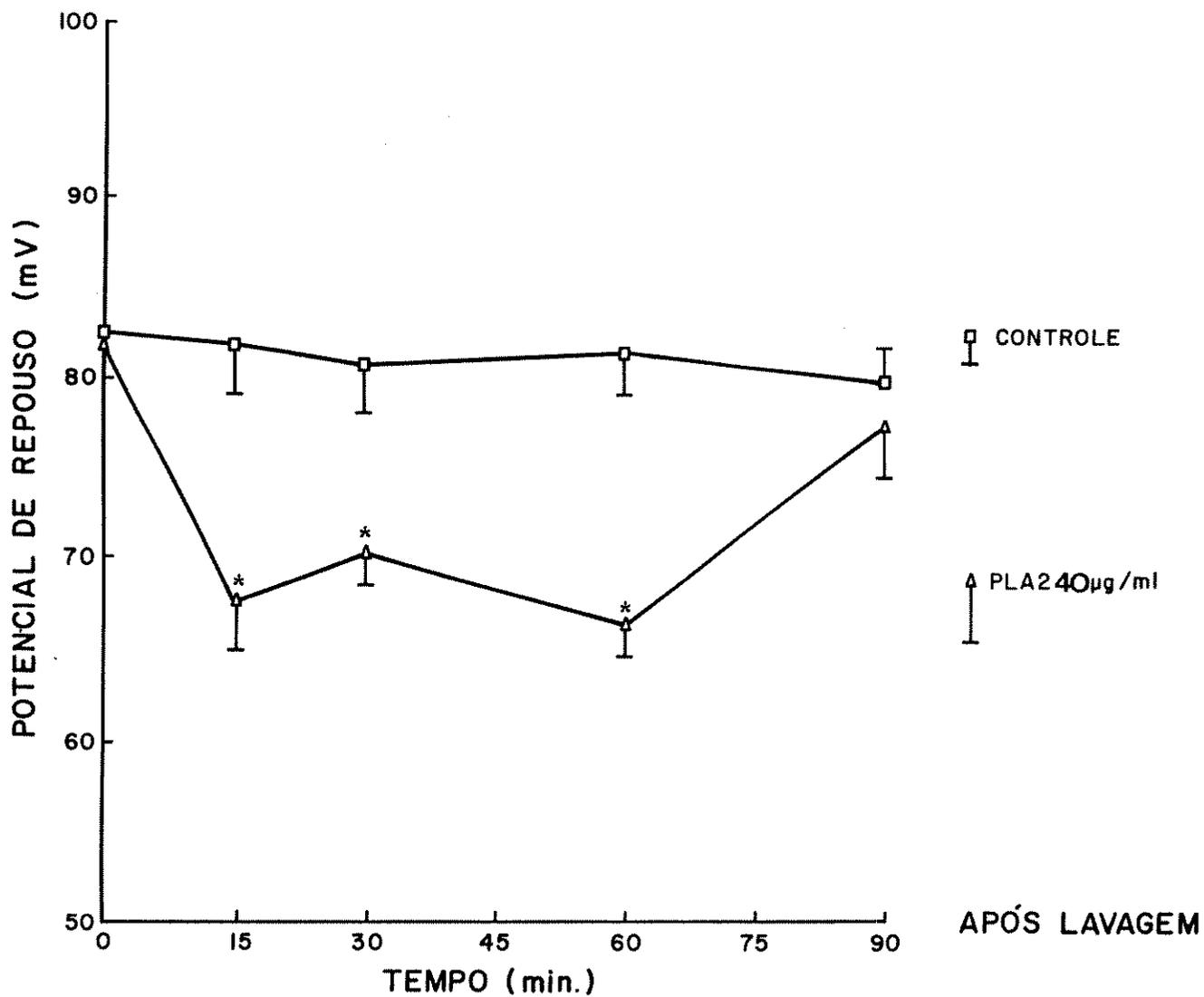


FIGURA 21) CURVA REPRESENTATIVA DA MÉDIA DO POTENCIAL DE REPOUSO DA PREPARAÇÃO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: observar a despolarização persistente da fibra muscular durante aproximadamente 60 minutos voltando a valores controles aos 90 minutos após a adição da fração PLA₂ (40 µg/ml) obtida em pH 3,5. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 5 experimentos. * p<0,05.

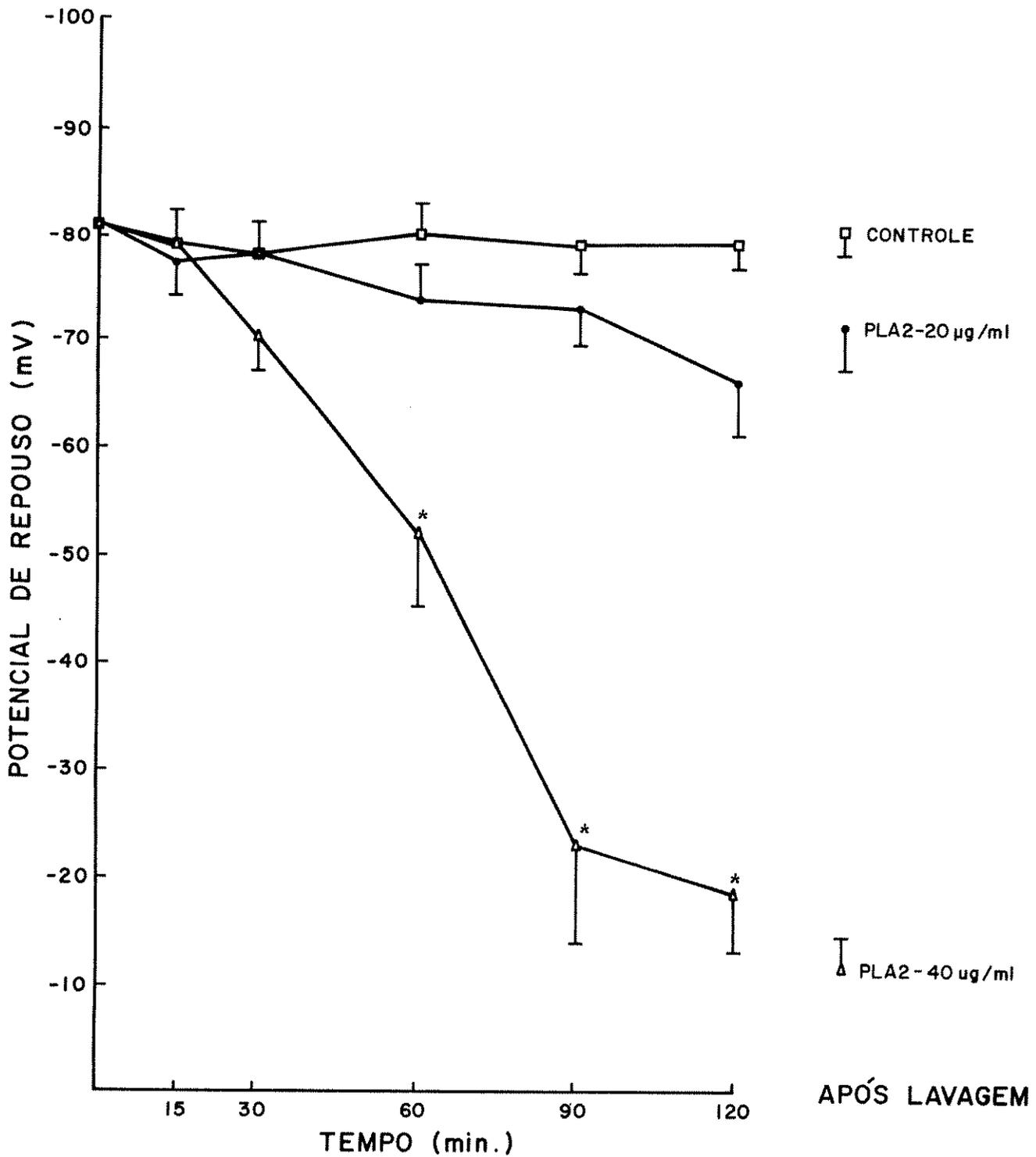


FIGURA 22) CURVA REPRESENTATIVA DA MEDIDA DO POTENCIAL DE REPOUSO DA PREPARAÇÃO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO: após a adição da fração PLA₂ (20 ou 40 µg/ml) obtida em pH 8,0 observou-se uma despolarização da fibra muscular dose-tempo dependente. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 experimentos. * p<0,05.

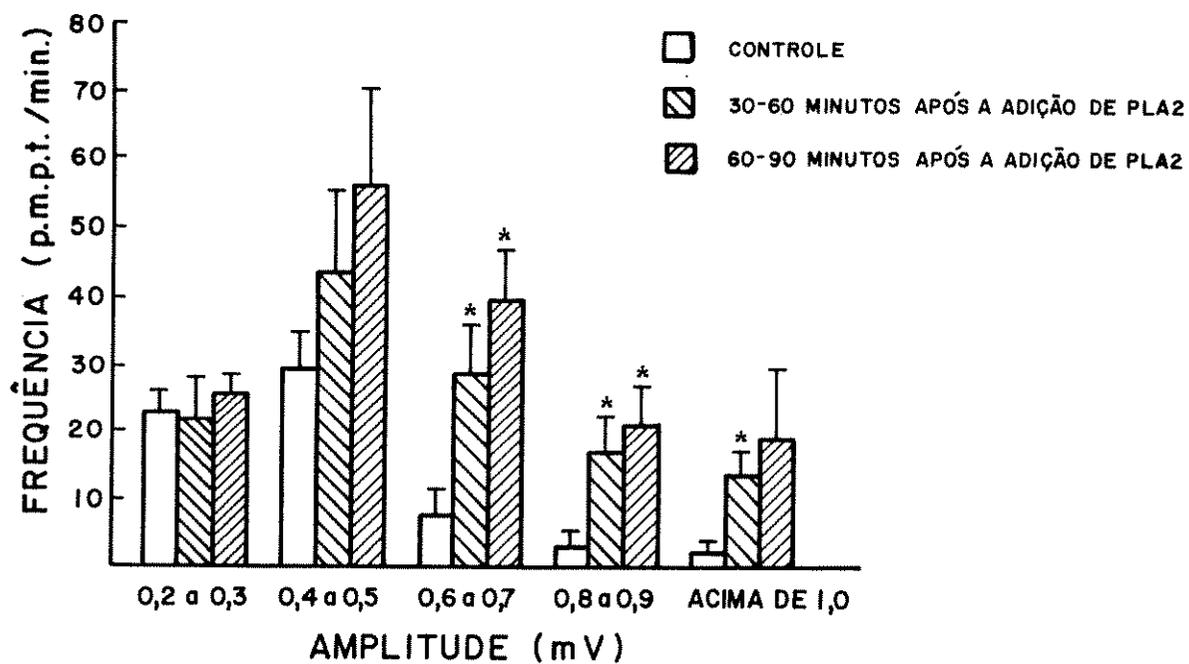


FIGURA 23) EFEITOS DA PLA₂ (pH 8,0; 40 µg/ml) SOBRE OS p.m.p.t.: preparação diafragma isolado de camundongo. Verifica-se um aumento na frequência e na amplitude dos biopotenciais. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 experimentos. * p < 0,05.

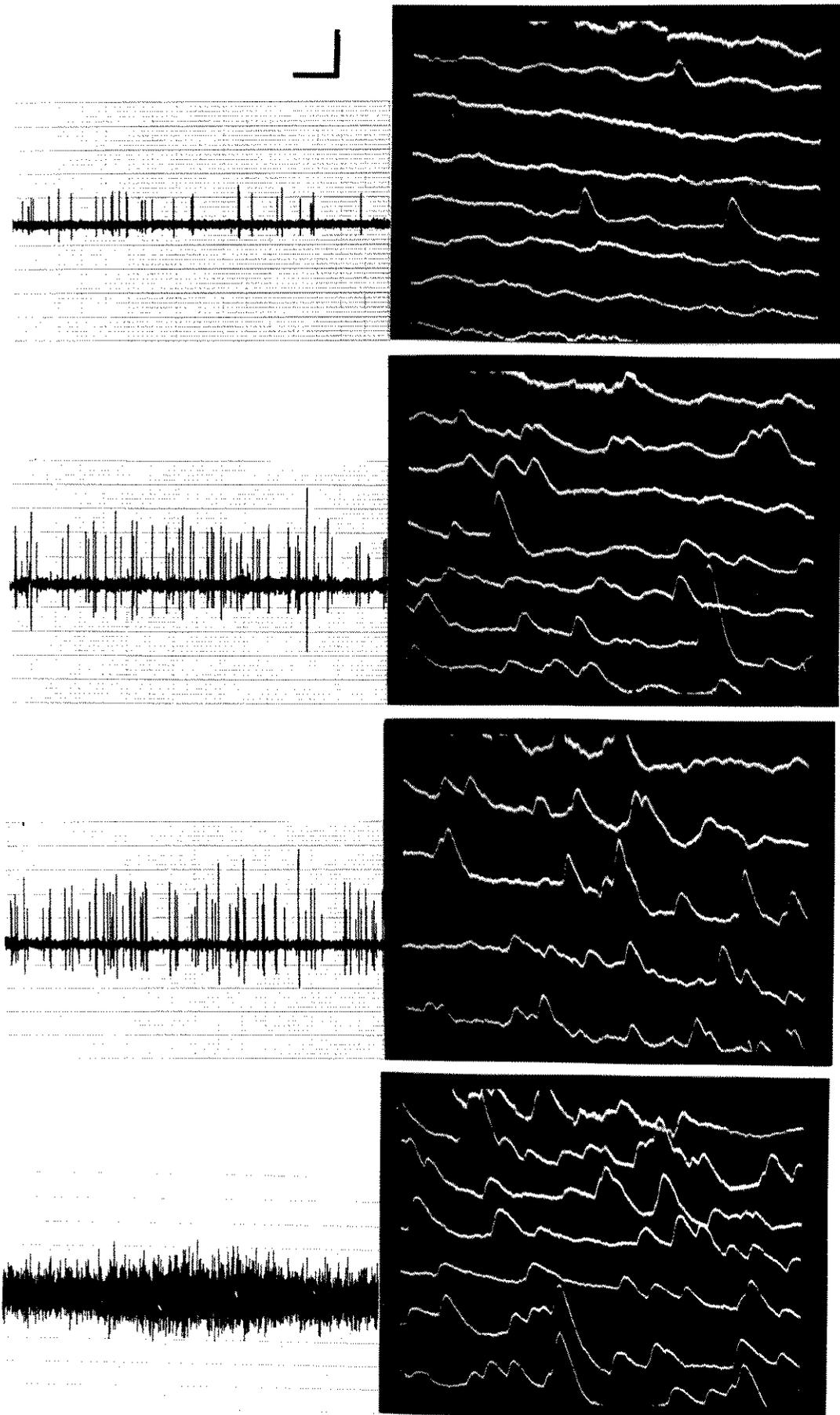


FIGURA 24) REGISTRO DOS P.M.P.T.: preparação diafragma isolado de camundongo. **A** - controle. **B** - 60; **C** e **D** - 90 minutos após a adição da fração PLA_2 (pH 8.0). Em **D** o registro de uma placa com alta frequência e amplitude das

Observamos também aumento da amplitude dos p.m.p.t., sendo mais acentuado no período de 60 a 90 minutos de exposição (FIGURA 23).

13) MORFOLOGIA DOS MÚSCULOS *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHOS INCUBADOS (MICROSCOPIA FOTÔNICA):

13.1) Músculos incubados com solução de Krebs (Controle) e Músculos incubados com soro AB:

Nos músculos incubados com solução de Krebs, as fibras musculares mostravam-se íntegras. As estriações das fibras esqueléticas eram perfeitamente visíveis, os núcleos periféricos apresentavam cromatina descondensada e por vezes nucléolo visível (FIGURA 25 A). Nos músculos incubados com solução de Krebs + soro AB, as fibras mostravam contornos angulosos normais tanto nas secções transversais como nas longitudinais (FIGURA 25B). Nestes, cerca de 1% das fibras apresentavam aspecto eosinófilo, aumento do volume e perfis arredondados em cortes transversais, o que não constitui anormalidade estrutural.

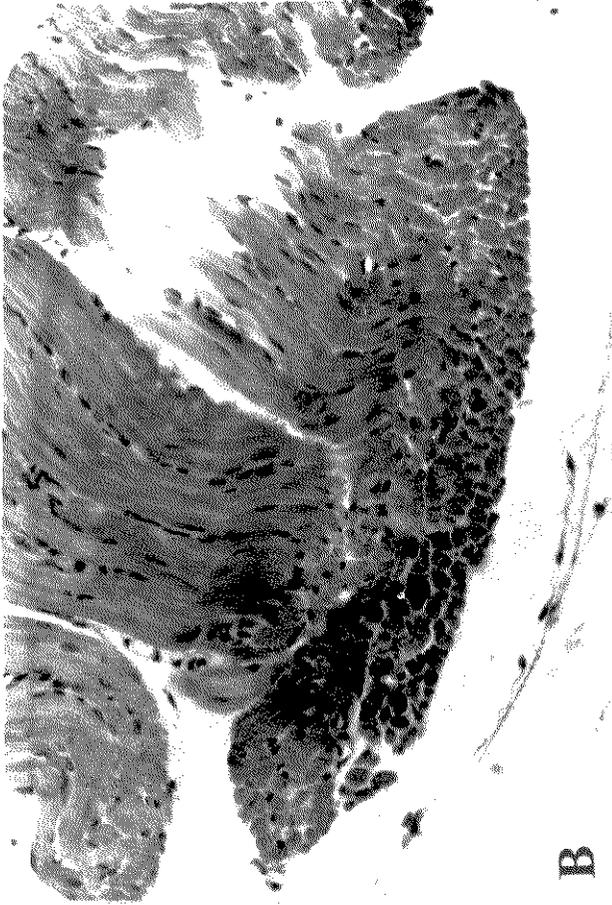
13.2) Músculos incubados com 20 µg/ml da fração PLA₂ :

Muitas fibras musculares em cortes longitudinais estavam totalmente dissolvidas, apresentando interrupções e adquirindo aparência hialina, com perda total das estriações. O aspecto amorfo e desorganizado das fibras musculares traduz severa mionecrose (FIGURAS 25C e D). O músculo como um todo mostrava padrão tecidual descontínuo com aumento do espaço extracelular, devido talvez à perda de porções celulares. Uma população de células do tecido conjuntivo, à semelhança de infiltrado inflamatório, foi frequentemente observada nesta dose (FIGURAS 25C e D).

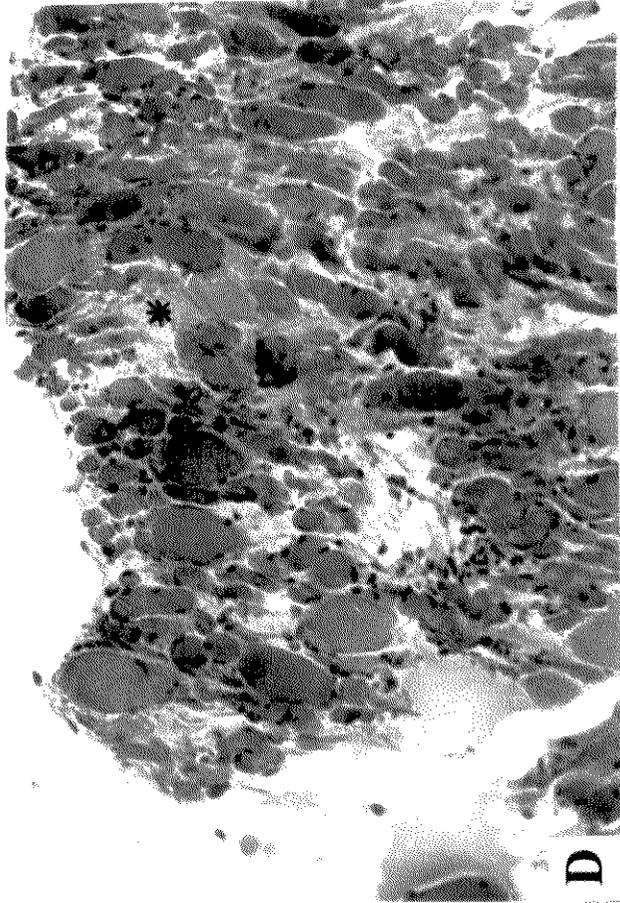
13.3) Músculos incubados com 20 µg/ml da fração PLA₂ + soro AB:

Os músculos incubados com esta mistura mostraram fibras íntegras, tanto em cortes longitudinais (FIGURA 26A) como em cortes transversais (FIGURA 26 B). Algumas fibras mostraram certo grau de ondulações (indicando contração) e diâmetro

FIGURA 25) SECÇÕES HISTOLÓGICAS DO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* INCUBADO DURANTE 120 MINUTOS: A - músculo controle (solução de Krebs), B - músculo incubado com soro AB: secção longitudinal mostrando aspecto normal das fibras musculares esqueléticas em ambos os casos. C - músculo incubado com fração PLA₂ (20 µg/ml; pH 8,0) mostrando as fibras dissolvidas e desorganizadas. Notar células tipo infiltrado inflamatório (seta). D - secção transversal das fibras com diâmetros bastante diferentes. Notar dissolução de algumas fibras (asterisco). A - 340 X (T.M.); B - 125X (H.E.); C - 256X (H.E.); D - 256X (H.E.) .



B



D

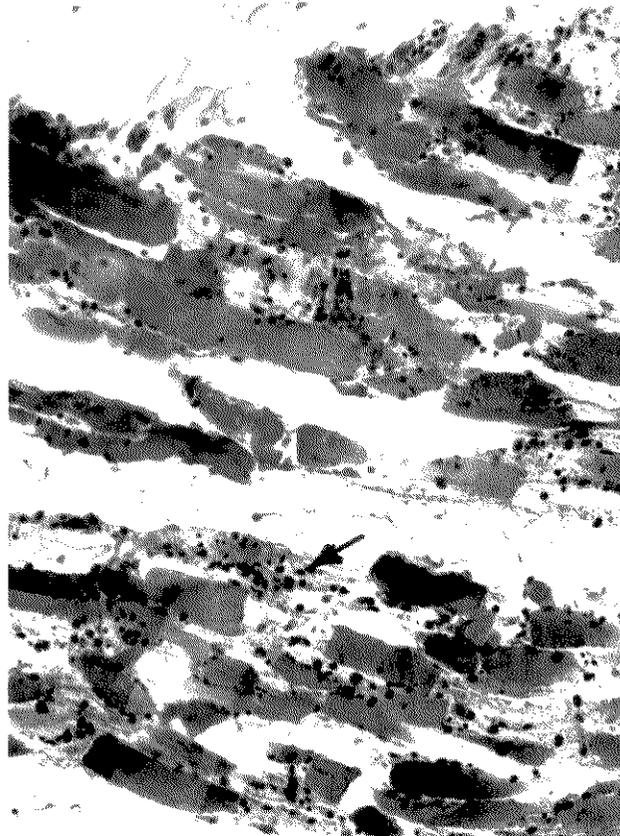
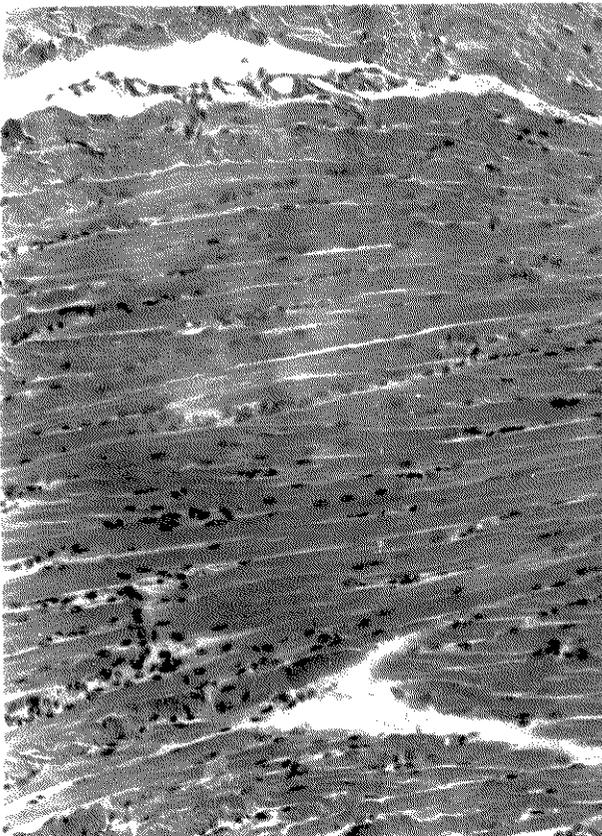
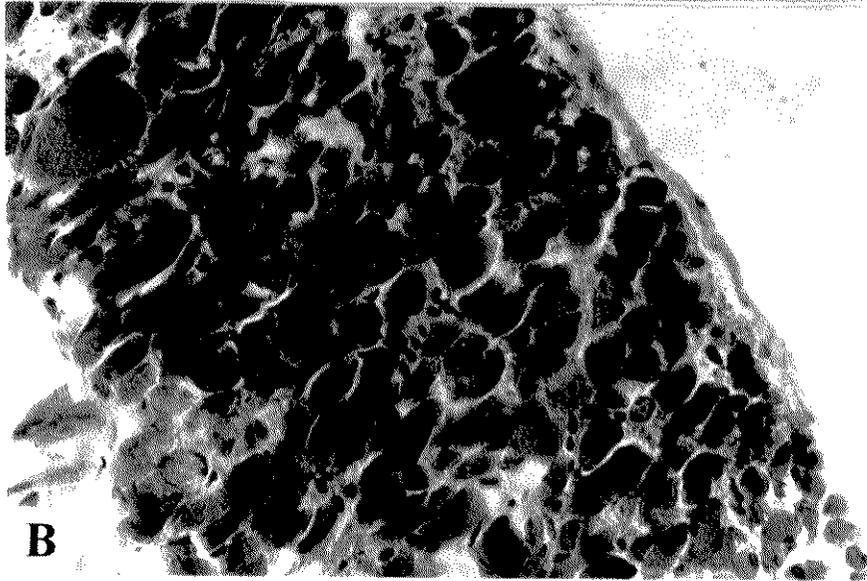


FIGURA 26) EFEITOS DA FRAÇÃO PLA₂ (pH8,0; 20 µg/ml) + SORO AB NO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* INCUBADOS: **A** - secção longitudinal: aspecto normal das fibras, algumas apresentam um certo grau de contração evidenciado pela ondulação do trajeto (seta). **B** - secção transversal: fibras aparentemente normais. Algumas apresentavam diâmetro bastante aumentado. **A** - 340X (H.E.); **B** - 670X (H.E.).



variável. Raras apresentavam-se entumescidas. O efeito mionecrótico induzido por 20 µg/ml da fração PLA₂, foi inibido pelo tratamento da preparação com a mistura soro AB e fração PLA₂. Neste caso, verificou-se a presença de inúmeros vasos arteriais e venosos ocluídos por eritrócitos.

13.4) Músculos incubados com 40 µg/ml da fração PLA₂:

Com essa dose, as alterações mionecróticas mostraram-se bem mais expressivas quando comparadas com aquelas induzidas por 20 µg/ml. Em alguns casos, pareceu haver dissolução por completo da fibra muscular, e no local permaneceu uma fina substância granular (FIGURA 27A). Em corte transversal, o diâmetro das fibras era bastante heterogêneo, algumas poucas mostravam perda de porções celulares (FIGURA 27B). O infiltrado inflamatório estava presente.

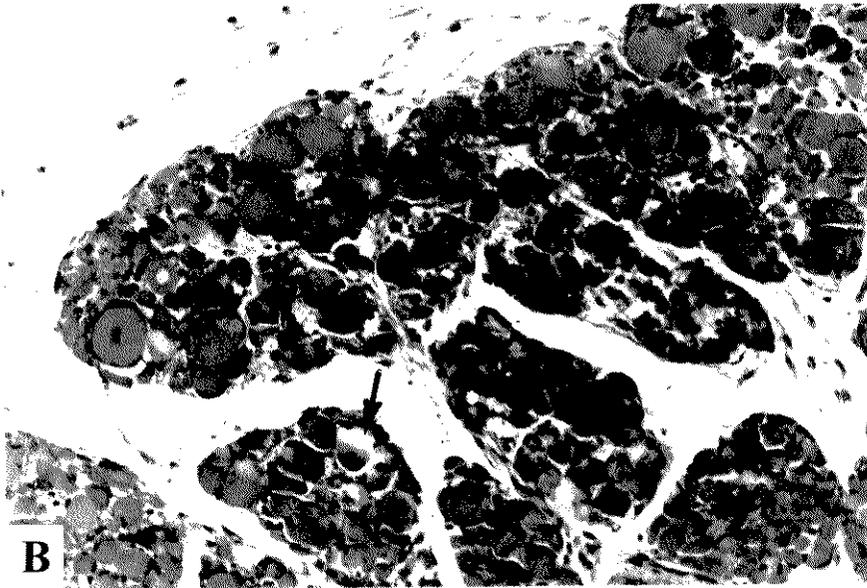
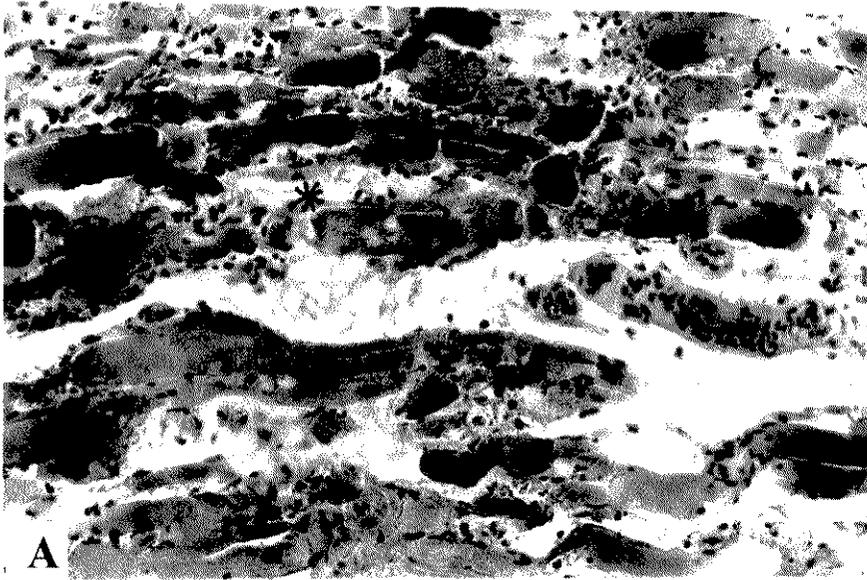
Em nenhuma das doses estudadas observamos hemorragia, pois trata-se de estudos "*in vitro*". As alterações vasculares com trombos e alterações no endotélio vascular mostraram-se pouco evidentes através da microscopia fotônica.

14) OBSERVAÇÕES CLÍNICAS DOS ANIMAIS INJETADOS COM O VENENO TOTAL E FRAÇÃO PLA₂.

Os animais foram injetados com o veneno e observados durante o período de sobrevida para avaliação de seu estado geral. Com a dose de 20 µg (30 minutos) os animais apresentaram, além de edema e hemorragia local em grau acentuado, paralisia flácida dos músculos do pescoço com progressiva perda do tônus muscular geral. Horas após a administração do veneno, os animais recuperaram a postura, voltando a se alimentar. Estes mesmos sintomas foram observados quando foi injetada a fração PLA₂.

A dose de 80 µg mostrou-se letal. Três horas após a injeção de 80 µg do veneno total, os sintomas observados eram semelhantes àqueles obtidos com 20 µg (edema, hemorragia e paralisia flácida) porém de maior intensidade e mais precoces.

FIGURA 27) MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* INCUBADO COM 40 µg/ml DA FRAÇÃO PLA₂ (pH 8,0): **A** - verificar a lise das fibras musculares (asterisco) e o conseqüente desarranjo das mesmas em corte longitudinal. **B** - fibras em processo de dissolução (seta). Observar o diâmetro bastante alterado. **A** - 256X (T.M.); **B** - 256X (H. E.).



Os animais entravam em convulsão, acusavam morte iminente, sendo portanto sacrificados. Estes resultados confirmam as observações de COGO et al, 1993 realizadas com o veneno total.

15) MORFOLOGIA DOS MÚSCULOS INJETADOS COM VENENO TOTAL E FRAÇÃO PLA₂ DO VENENO DE *B. insularis*: MICROSCOPIA FOTÔNICA.

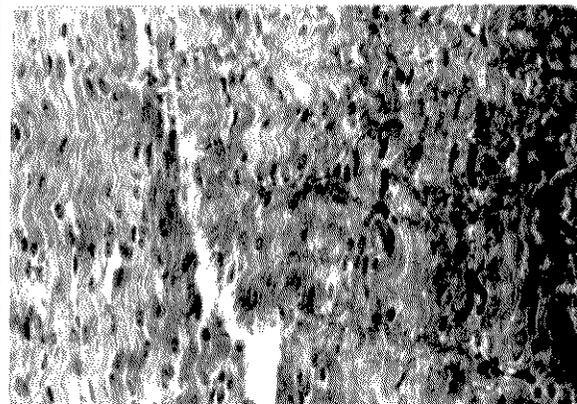
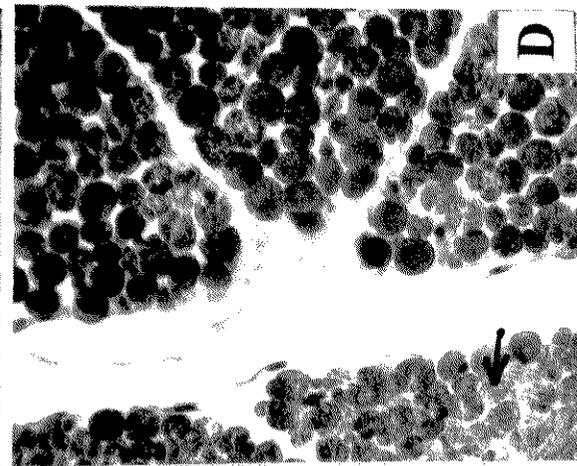
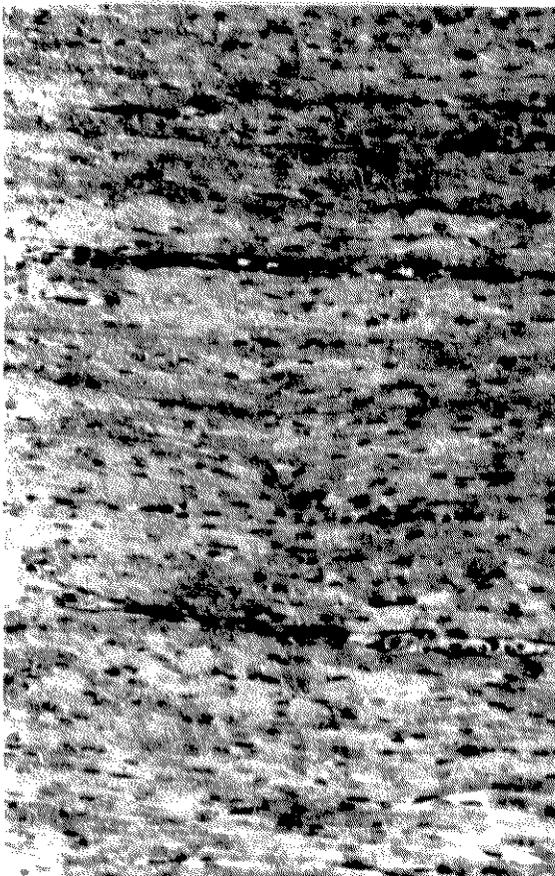
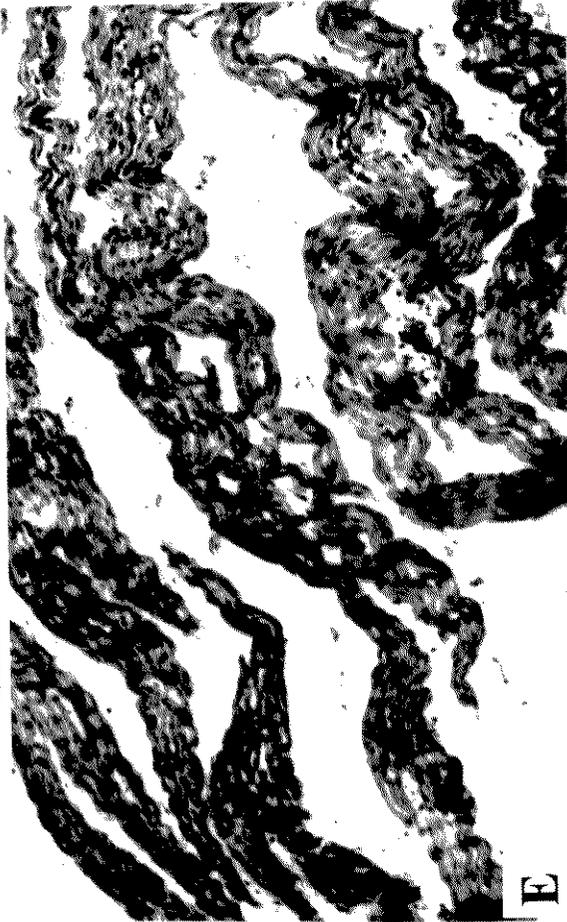
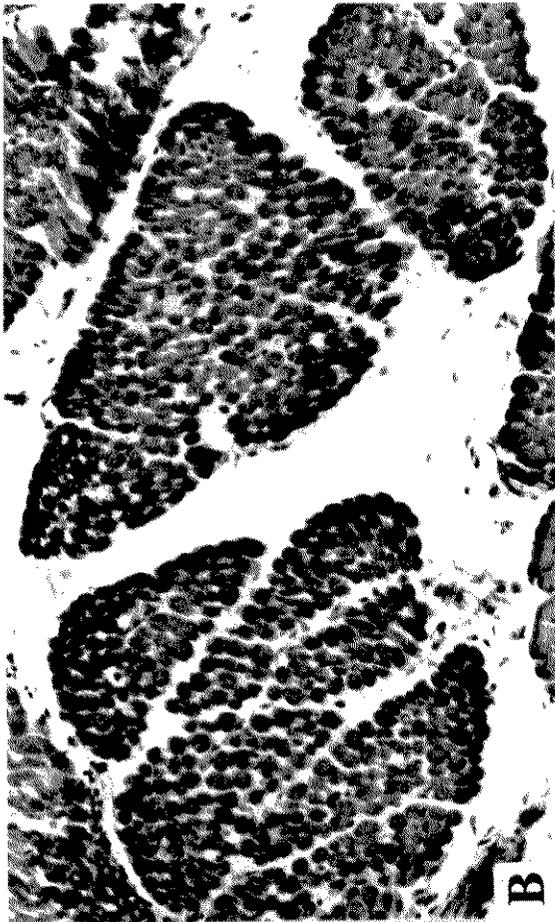
15.1) Músculos injetados com solução de Krebs (3 horas):

O músculo *pectoralis* esquerdo de pintainho injetado com 0,1 ml de solução de Krebs e sacrificado 3 horas após, mostrou estrutura histológica normal, ou seja, as fibras musculares apresentavam seus núcleos alinhados periféricamente e organizavam-se em feixes paralelos envolvidos pelo tecido conjuntivo que forma o endomísio e o perimísio. Os vasos sanguíneos, veias e artérias, apresentavam-se normais na aparência, às vezes livres de células sanguíneas, outras vezes com hemácias em quantidade normal dentro da luz do vaso, a qual mostrava aspecto límpido (não documentado).

15.2) Músculos injetados com 20 µg da fração PLA₂ (3 horas):

As fibras musculares longitudinais apresentavam-se com grandes espaços entre si (FIGURA 28E). Muitas células musculares apresentaram-se normais com estrias transversais e núcleo com cromatina frouxa e nucléolo aparente. Outras mostravam-se compactas, com menor diâmetro, hialinizadas com aspecto amorfo. Não havia entretanto fragmentação ou corrosão lítica da fibra, em si indicando mionecrose (FIGURA 28C). Estas características são confirmadas nos cortes transversais da fibra muscular (FIGURA 28D).

FIGURA 28) ANIMAL INJETADO COM PLA₂ (pH 8,0) E SACRIFICADO 3 HORAS APÓS: **A** - 40 µg/ml: músculo em corte longitudinal mostrando aspecto normal. **B** - corte transversal. **C** - 20 µg/ml: aspecto normal das fibras em corte longitudinal. **D** - fibras musculares com diâmetro normal, algumas com aspecto amorfo (seta). **E** - observa-se grande espaços com fibras esgarçadas, sem mionecrose evidente. **A** - 512X (T.M.); **B** - 166X (T.M.); **C** - 512X (T.M.); **D** - 256X (T.M.); **E** - 160X (T.M.).



15.3) Músculos injetados com 40 µg da fração PLA₂ (3 horas):

Não pareceu haver diferença na estrutura muscular com a dose de 40 µg, quando comparada à de 20 µg. Não havia mionecrose aparente. Os núcleos de muitas fibras estavam picnóticos (FIGURAS 28A e B).

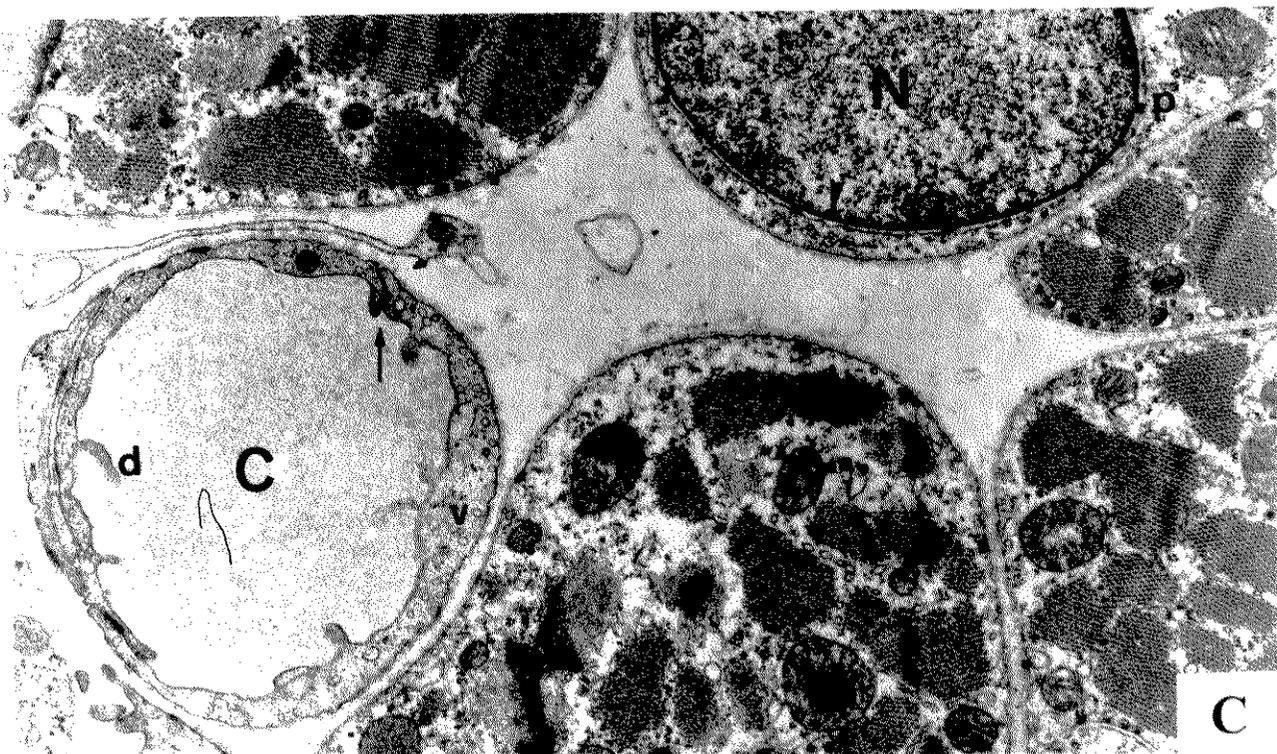
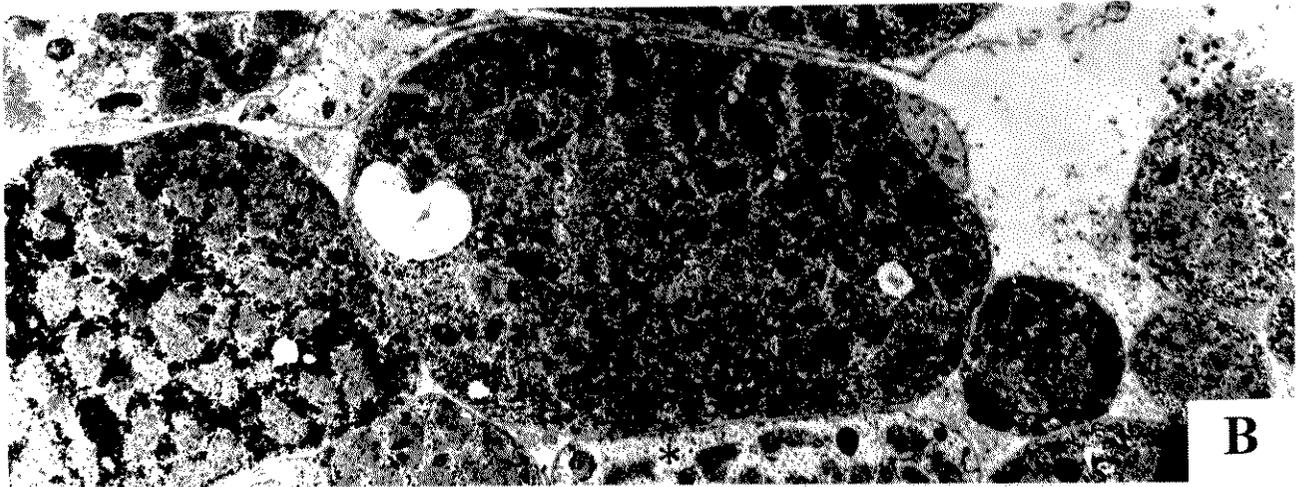
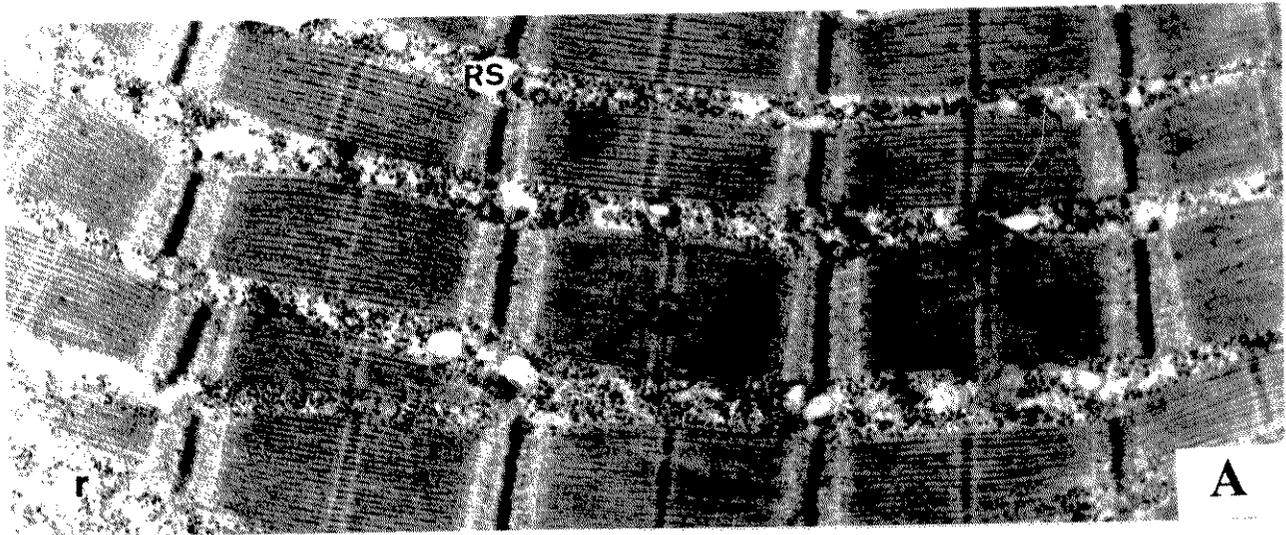
16) MORFOLOGIA DOS MÚSCULOS INJETADOS COM VENENO TOTAL E FRAÇÃO PLA₂ DO VENENO DE *B. insularis*: MICROSCOPIA ELETRÔNICA.

Os fragmentos do músculo corados com azul de toluidina foram observados em microscopia óptica para avaliação do material e seleção para a confecção de cortes finos. As secções de músculo que apresentavam feixes nervosos, eram selecionados para cortes ultrafinos, uma vez que eram sugestivos de apresentarem junções musculares, para observação ao microscópio eletrônico. Caso não apresentassem as condições acima citadas, eram realizados novos cortes e submetidos a nova avaliação.

16.1) Animais controle:

Os pintainhos de 5 dias foram injetados com solução de Krebs e sacrificados após 3 horas. Em corte longitudinal, as células musculares mostravam os sarcômeros compreendidos entre as linhas Z, bem como as bandas A, I, H e linha M, com aparência normal (FIGURA 29A). Uma característica do músculo de pintainhos jovens é que as células musculares apresentavam sarcoplasma mais abundante entre as miofibrilas onde grandes quantidades de ribossomas tinham aí sua localização (FIGURAS 29B e C). O núcleo encontrava-se na periferia da célula, geralmente oval com eucromatina e nucléolo nem sempre visível. Por outro lado, a lâmina nuclear estava bastante evidente estando só interrompida na região dos poros nucleares. Uma parte das fibras musculares de pintainhos de 5 dias de vida apresentaram volumosa quantidade de glicogênio. Entre as miofibrilas, no sarcoplasma estavam presentes as mitocôndrias que em cortes transversais das fibras musculares, mostraram-se

FIGURA 29) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM SOLUÇÃO DE KREBS COMO CONTROLE: animal sacrificado 3 horas após. **A** - fibras musculares em secção longitudinal com a organização dos sarcômeros (S) e das linhas Z e do retículo sarcoplasmático (RS) normais na aparência. (r) ribossomas. **B** - corte transversal. Fibras musculares com depósitos variáveis de glicogênio localizados no sarcoplasma interfibrilar. Parte de fibras sem glicogênio aparecem na parte inferior da foto (*). **C** - Parte de cinco fibras musculares sendo que uma mostra o núcleo periférico (N) e evidente lâmina nuclear (cabeça de seta) só interrompida na região dos poros (p). Notar capilar (C) onde as células endoteliais aparecem normais com complexos juncionais (seta) e projeções digitiformes em direção ao lumen vazio (d). (v) vesículas de pinocitose; (m) mitocôndrias. **A** - X22182; **B** - X6600; **C** - X17280.



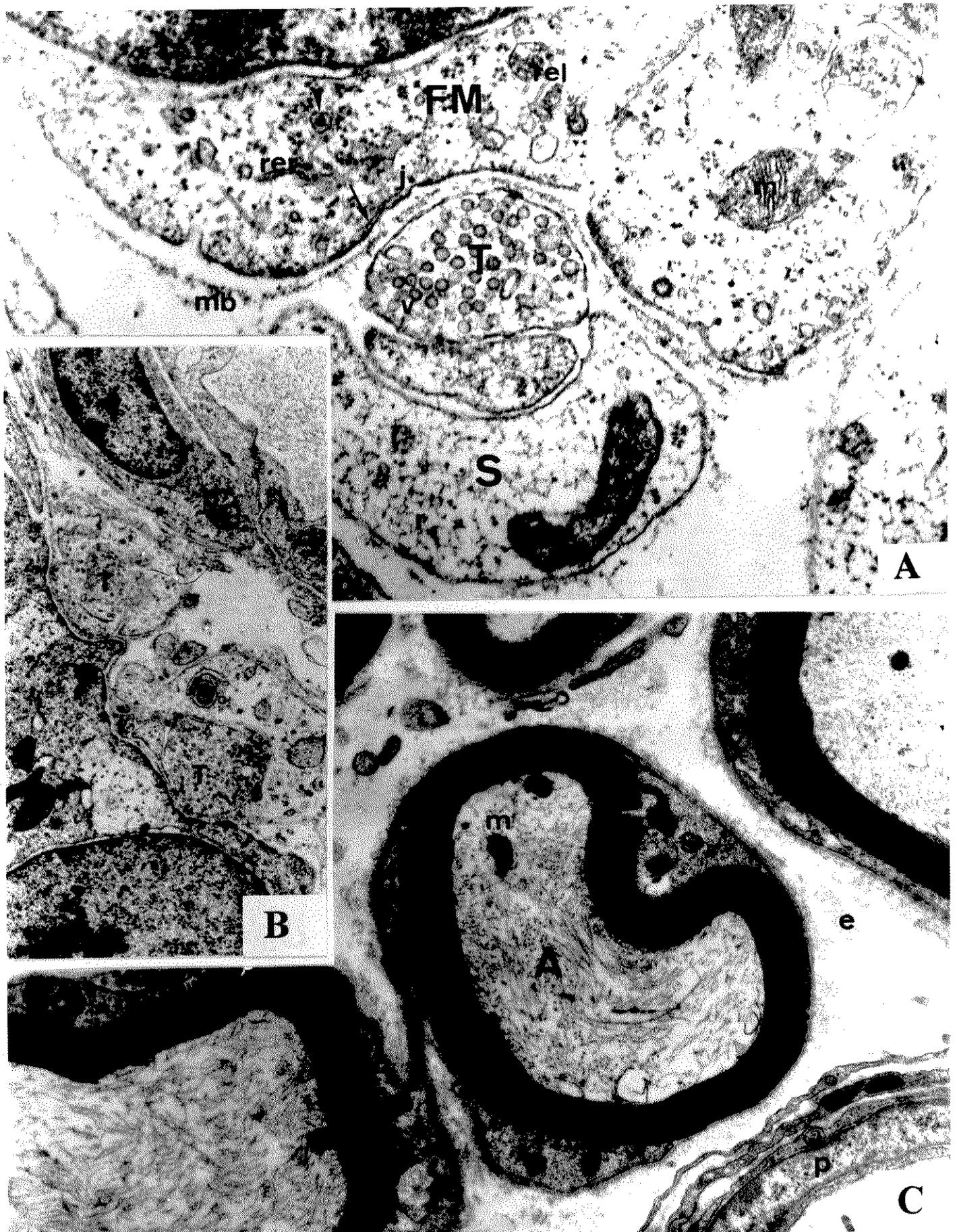
arredondadas. Regiões de sarcoplasma indiferenciado foram observadas entre as miofibrilas. Ao redor de cada célula muscular observou-se a lâmina basal (FIGURA 29C).

Os capilares apresentaram-se com células endoteliais pavimentosas ligadas umas às outras por complexos juncionais. O aspecto dessas células era normal com vesículas de pinocitose, raras mitocôndrias e projeções digitiformes em direção à luz. Geralmente os capilares apresentavam lúmen livre de hemácias. (FIGURA 29C).

A junção neuromuscular era morfológicamente pouco desenvolvida, o que tornou difícil sua identificação. Era caracterizada pela ausência de dobras juncionais do sarcolema, existindo um esboço de invaginação, que entretanto não chegava a formar as dobras comumente encontradas em junções neuromusculares de mamíferos. Entretanto, o sarcolema na região pós-sináptica onde localizavam-se os receptores colinérgicos estava espesso. O sarcoplasma da célula muscular na região pós-sináptica, apresentava o núcleo da placa ("*sole plate nucleus*") que se caracteriza por apresentar cromatina descondensada e/ou em pequenos grumos junto à membrana nuclear, mitocôndrias alongadas com grânulos densos de cálcio, retículo sarcoplasmático rugoso tubular e retículo sarcoplasmático liso túbulo-vesicular. Ribossomas livres e/ou polirribossomas estavam também presentes além de microtúbulos e vesículas com núcleo denso. O terminal nervoso nos animais controle, mostrava em secção transversal, forma arredondada ou alongada. O axoplasma apresentou-se eletrólucido com grande quantidade de vesículas sinápticas, raras vesículas com núcleo denso, e pequena quantidade de mitocôndrias. Vacúolos com dimensões maiores que as vesículas sinápticas também foram observados (FIGURAS 30 A e B).

Na fenda sináptica entre o terminal nervoso e o sarcolema espessado, encontrava-se a lâmina basal, que por projeção, envolvia também a célula de Schwann, estando ausente contudo entre o terminal e a célula de Schwann. Esta caracterizava-se pela presença de retículo endoplasmático rugoso, com ausência de conteúdo nas suas

FIGURA 30) MÚSCULO PECTORALIS DE PINTAINHO INJETADO COM SOLUÇÃO DE KREBS COMO CONTROLE: animal sacrificado 3 horas após. **A** - junção neuromuscular com seus 3 elementos básicos: terminal nervoso (T); a célula de Schwann (S) e a região pós-sináptica representada pela fibra muscular (FM). (j) esboço de dobras juncionais; (seta) espessamento da membrana pós sináptica; (mb) lâmina basal; (m) mitocôndrias, (rer) retículo endoplasmático rugoso; (rel) retículo endoplasmático liso; (cabeça de seta) vesículas com núcleo denso; (v) vesículas sinápticas; (r) ribossomas. **B** - complexo neuromuscular apresentando 2 terminais nervosos (T) de forma arredondada ("*en grape*") cobertos pela célula de Schwann. Notar quantidade de vesículas sinápticas no terminal e o espessamento da membrana pós-sináptica na região juncional. **C** - fascículo nervoso mostrando axônios mielínicos íntegros (A) no que diz respeito às mitocôndrias (m), neurofilamentos, microtúbulos, bainha de mielina e célula de Schwann (S). (p) perineuro; (e) endoneuro com fibras colágenas. **A** - X47300; **B** - X12690; **C** - X17212.



cisternas, pelas mitocôndrias alongadas e pelos ribossomas livres, muitos deles sob a forma de polirribossomas.

Entre as fibras musculares, havia fascículos de axônios mielínicos do nervo frênico, envolvidos pelo perineuro e grupos de axônios amielínicos, ambos envolvidos pela célula de Schwann. A aparência morfológica dos axônios mielínicos era normal, isto é, a bainha de mielina apresentava-se íntegra envolvendo o axoplasma com neurofilamentos, microtúbulos e mitocôndrias. Cada axônio mielínico estava envolvido por uma faixa delgada de citoplasma da célula de Schwann, a qual também apresentava-se morfológicamente normal, assim como o perineuro e o endoneuro (FIGURA 30C).

16.2) Animais injetados com 0,4 µg do veneno total de *B. insularis* (3 horas):

As alterações morfológicas observadas 3 horas após a administração intramuscular do veneno de *B. insularis* (0,4 µg), caracterizaram-se pela perda do bandejamento das fibras causadas pela desorganização das miofibrilas (FIGURA 31A). Entretanto, fibras musculares normais também eram frequentes (FIGURA 31B). Observavam-se ainda, vasos sanguíneos com trombos oclusivos e discreta hemorragia. Estão também representadas nas FIGURAS 32A e 33A, as alterações musculares mais representativas deste estágio, as quais podem ser resumidas em regiões de hipercontração e dessarajo do padrão de organização normal das miofibrilas causando o desaparecimento do sarcômero. As alterações manifestaram-se ainda na morfologia do núcleo e no aspecto vacuolar do retículo sarcoplasmático.

As anormalidades morfológicas mais evidentes neste estágio, diziam respeito primeiro às observadas nas junções neuromusculares e em segundo nas fibras musculares. Regiões do músculo peitoral com morfologia aparentemente normal eram porem observadas próximo às regiões alteradas.

Nas junções neuromusculares, as alterações mais evidentes referiam-se às mitocôndrias que sofreram entumescimento e/ou desaparecimento das cristas e

FIGURA 31) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 0,4 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A - fibras musculares em corte longitudinal: à esquerda fibra necrótica com miofibrilas distribuídas aleatoriamente, sarcolema e membrana basal indistintos, o retículo sarcoplasmático (RS) forma vacúolos os quais podem possuir restos de membrana enroladas ou conteúdo eletrondensos (setas). À direita e acima, fibra muscular exibindo aspecto quase normal, caracterizada pela presença de sarcômeros quase normais. (mb) lâmina basal. **B** - detalhe de 2 fibras musculares em corte transversal com núcleo próximo à periferia e com morfologia aparentemente normal. (L) limite entre as duas fibras. **A** - X19872; **B** - X31218.**

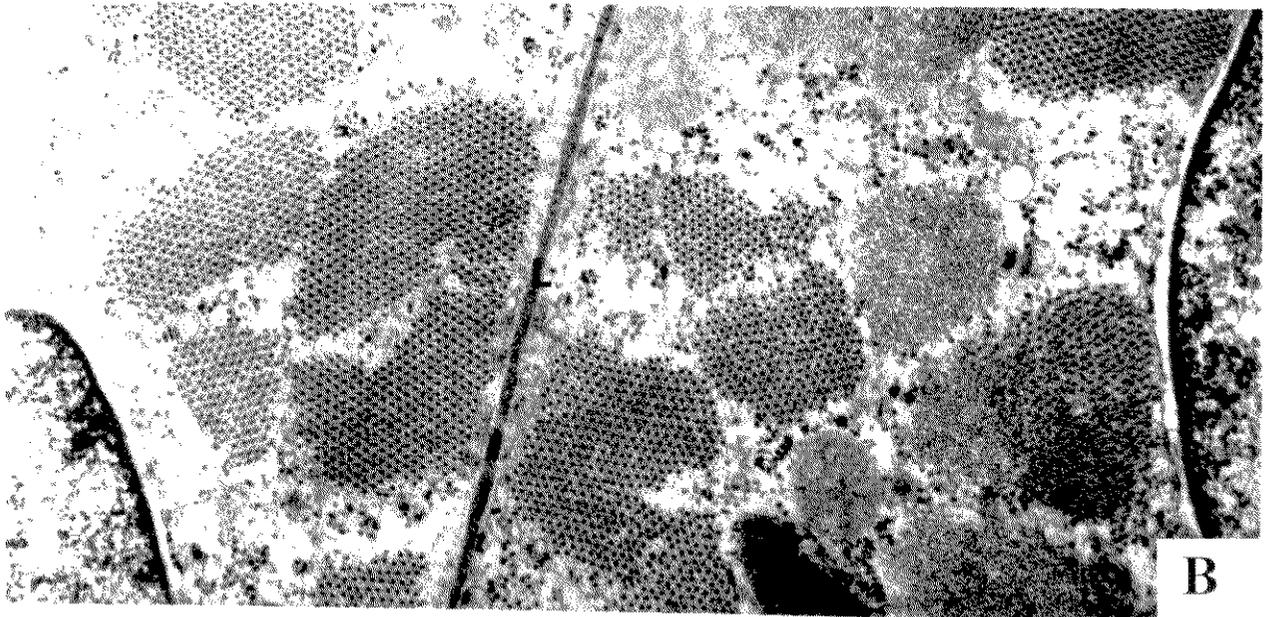
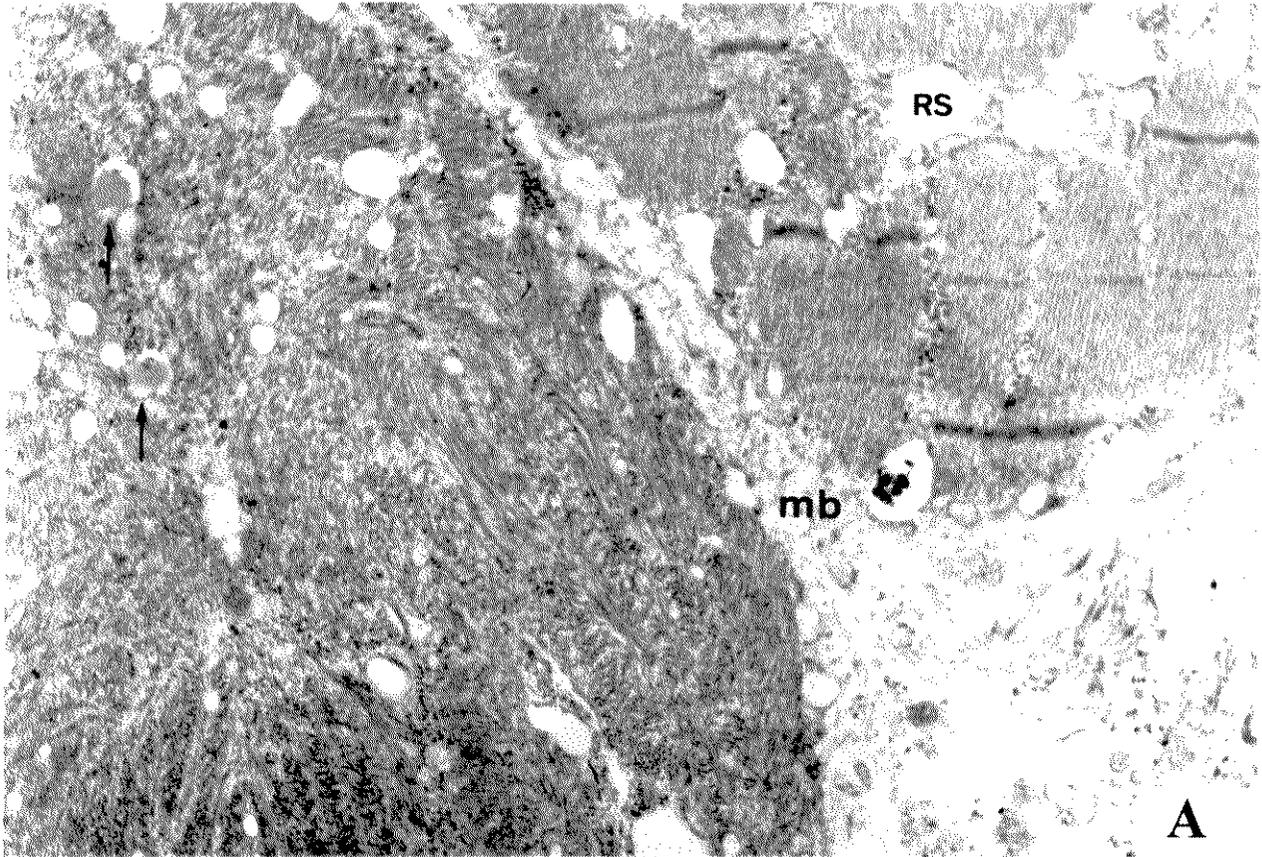
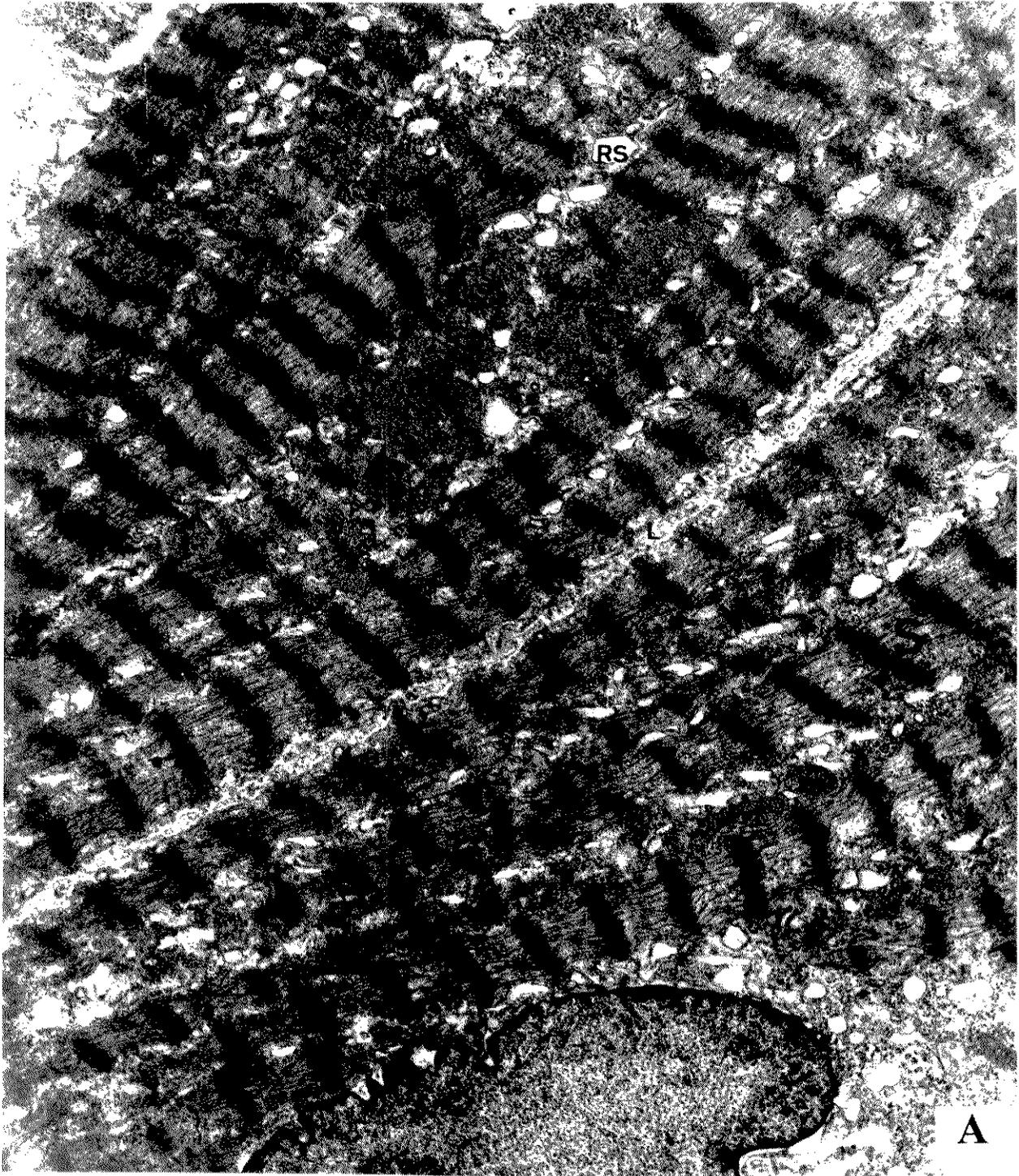


FIGURA 32) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 0,4 μ G DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A** - fibras musculares com hipercontração: alteração do sarcômero (S). Retículo sarcoplasmático (RS) hipertrofiado, indentações do contorno nuclear (seta) e condensamento da eucromatina. (m) mitocôndrias; (L) limite entre 2 fibras musculares; (Z) linha Z. **A** - X17280.





A

FIGURA 33) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 0,4 μ g DO VENENO TOTAL: 3 horas. A - estágio mais avançado em relação ao observado na FIGURA 32. Observar lise do sarcolema da fibra muscular (seta), núcleo (N) com cromatina condensada e padrão alterado; indefinição da membrana nuclear, dos poros e da lâmina nuclear. Notar vacúolos do retículo sarcoplasmático e miofibrilas em total desarranjo. No canto superior esquerdo direito, vestígios da linha Z do sarcômero. A - X17280.

rompimento da membrana. Além disso, pôde-se verificar desaparecimento de trechos da própria membrana do terminal nervoso ou seja, do axolema (FIGURA 34A) e condensação e compactação do terminal nervoso e vesícula sinápticas, respectivamente (FIGURA 34B).

A célula de Schwann mostrou-se com citoplasma mais condensado devido aparentemente à maior quantidade de ribossomas. Em algumas junções, processos delgados da célula de Schwann se sobrepunham como lâminas sobre os terminais ou se fragmentavam (FIGURAS 34A e B).

O sarcoplasma sub-sináptico aparentemente não apresentava alterações em relação ao controle pelo menos nas junções observadas. Entretanto, embora aparecessem regiões densas do sarcoplasma na fenda sináptica, estavam pouco evidentes as pequenas invaginações dos esboços de dobras juncionais vistos no controle (FIGURAS 34A e B).

16.3) Animais injetados com 20 µg do veneno total de B. insularis (3 horas):

Três horas após a administração do veneno de *B. insularis* na dose de 20 µg observaram-se alterações ultraestruturais qualitativamente similares às observadas com a dose menor, porém quantitativamente mais significativas. Estas alterações como já mencionadas, eram representadas por mionecrose em vários graus de comprometimento da fibra muscular, anormalidades morfológicas dos componentes da junção neuromuscular e alterações vasculares importantes.

Extensa reação inflamatória, extravasamento das hemáceas (algumas semi-hemolisadas) através do rompimento das células endoteliais dos vasos além de trombos oclusivos foram observados (FIGURA 35A e B).

A mionecrose adquiriu características importantes como o aparecimento de regiões periféricas da fibra onde estavam ausentes as miofibrilas e com rompimento do sarcolema e fragmentação da lâmina basal. Nesses locais encontramos regiões com aspecto granular com vários graus de textura. Os grânulos podiam estar "soltos" ou

FIGURA 34) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 0,4 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. A - complexo juncional ("*en grappe*") onde aparecem 4 terminações nervosas, duas delas de tamanho reduzido (1, 2, 3 e 4). Notar: interrupção da membrana do terminal (seta), identações no axolema (cabeça de seta); interposição da célula de Schwann na fenda sináptica junto às identações (cabeça de seta) e englobando o terminal 2. (m) mitocôndrias arrebentadas; (v) vesículas com núcleo denso; (p) axônio pré-terminal dando origem ao terminal nervoso; (S) célula de Schwann com seu núcleo e seus processos superpostos. B - terminal eletrondenso necrótico fragmentado. (m) mitocôndrias arrebentadas; (v) vacúolos. A - X18426; B - X12589.

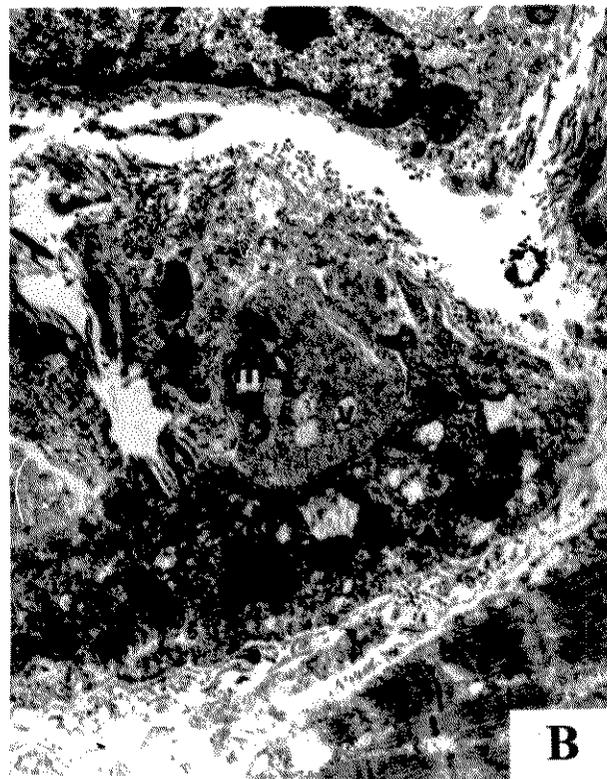
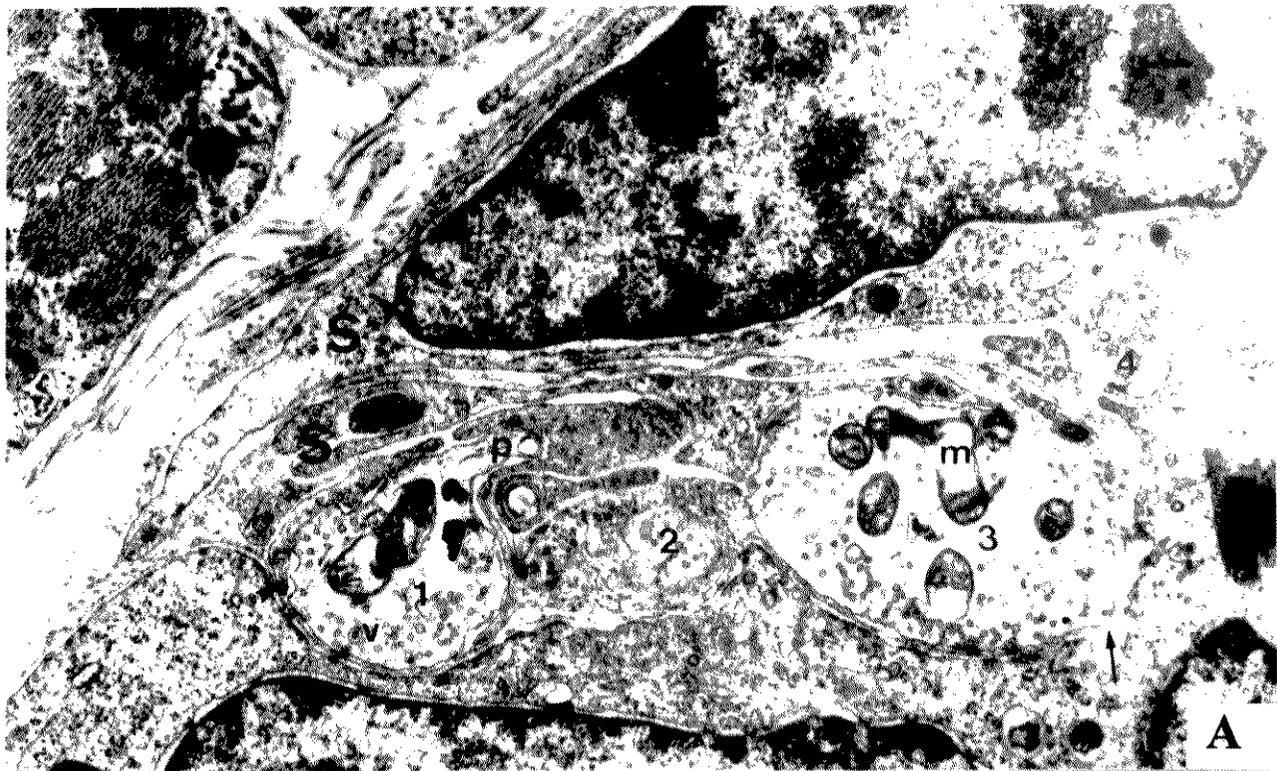
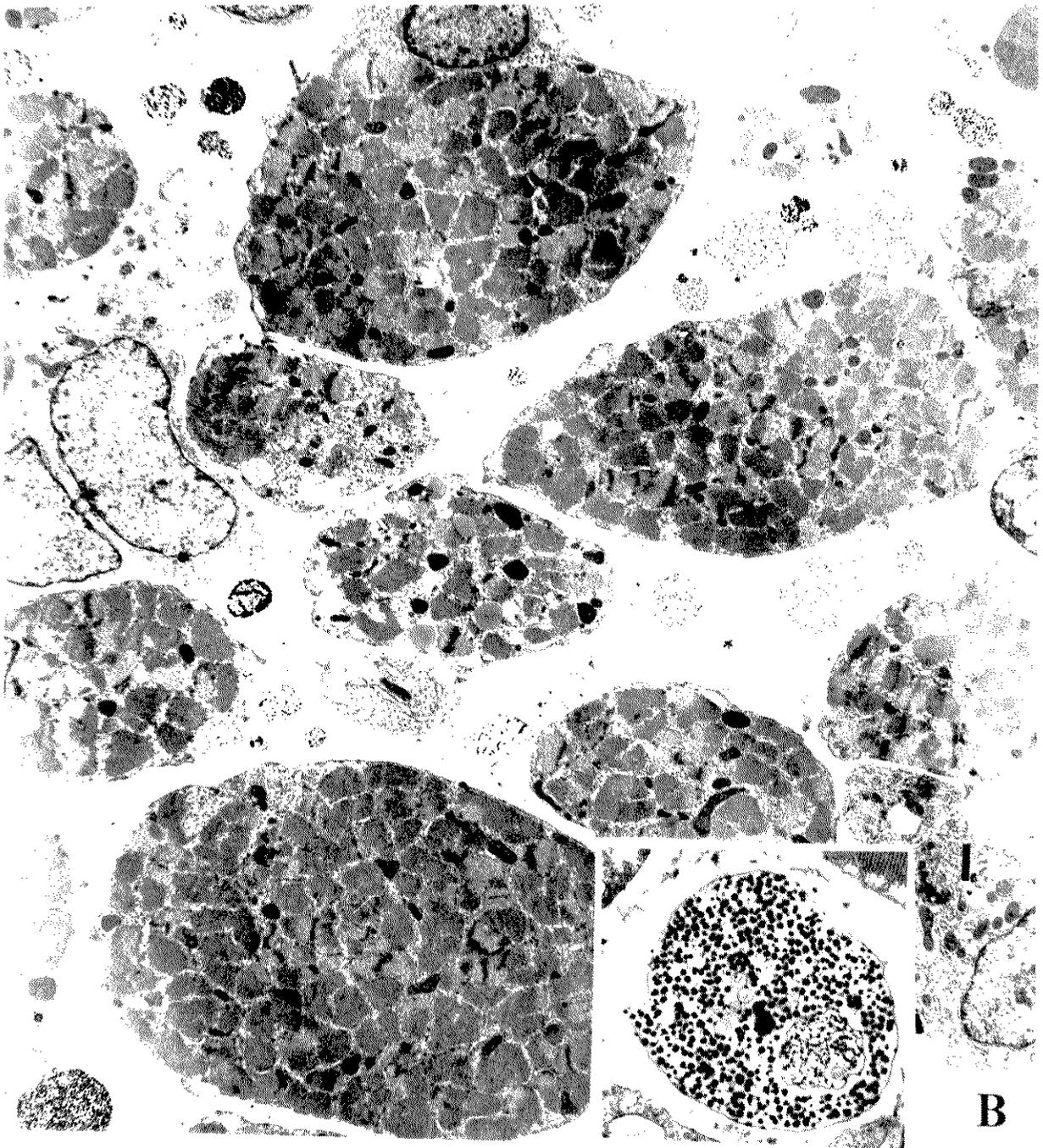


FIGURA 35) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 20 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A - porções do músculo mostrando algumas fibras musculares de diferentes tamanhos com porções sem miofibrilas, embora o sarcolema permaneça. No centro da foto um capilar com uma hemácia com restos de fibrina preenchendo a luz. As células endoteliais inchadas e eletróluscentes mostram ruptura e fragmentação no citoplasma (setas), fora do local da junção. Os processos digitiformes estão ausentes. (N) núcleo da célula endotelial. **B** - vista geral de algumas células musculares tendo entre elas células inflamatórias com material semi digerido (I) e inúmeros corpos granulares entre as fibrilas ou dentro da fibra. No detalhe: um desses corpos extracelulares em maior aumento e com depósito de glicogênio no interior. **A** - X6600; **B** - X5940.**



ligados uns aos outros por filamentos formando pequenos cordões. Os grânulos podiam aparecer envolvidos por membrana na extremidade da fibra muscular, e com este aspecto, também podiam ser encontrados nos espaços interfibrilares, portanto com localização extracelular (FIGURA 36A).

A necrose vascular apresentava-se por alterações das células endoteliais cujo citoplasma apresentava regiões entumescidas e eletrônicas, vacúolos heterogêneos e corpos multivesiculares. Regiões das células endoteliais que eram rompidas e por onde extravasavam hemácias por estrangulamento, nem sempre correspondiam às zonas juncionais das células endoteliais o que caracterizava hemorragia "*per rhexis*" (FIGURAS 36B e C). Alterações mais severas se caracterizaram pelo aparecimento de estruturas fibrosas grosseiras, que são restos de fibrina, no interior dos vasos.

16.4) Animais injetados com 80 µg do veneno total de *B. insularis* (3 horas):

Os animais que foram injetados com 80 µg do veneno de *B. insularis* não sobreviveram além de 3 horas. Neste tempo, as alterações observadas com a dose de 20 µg estavam presentes de forma aguda. Havia desarranjo das miofibrilas, com compactação das mesmas, que evidenciavam-se com eletron densidade acentuada sugerindo zonas de hipercontração, caracterizando assim zonas de mionecrose severa (FIGURA 37A). Além disso, algumas fibras mostravam ruptura do sarcolema (FIGURA 37A). A FIGURA 37B, mostra massas densas (que podem ser encontradas também dentro da fibra muscular) e que embora assemelhem à hemácias na textura, o tamanho não fala a favor dessa hipótese. Essas massas eletrônicas foram interpretadas como fibras altamente necrosadas.

Alterações vasculares também estiveram presentes com trombos oclusivos e extravasamento de hemácias "*per diapedesis*" e "*per rhexis*" como também observado para a dose de 20µg (FIGURAS 38A e B).

As fibras nervosas intramusculares sob a ação do veneno, mostraram alterações degenerativas, com formação de corpos vesiculares eletrônicos, desorganização da

FIGURA 36) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 20 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A** - detalhe de grânulos intracitoplasmáticos na periferia da fibra muscular. Esses grânulos podem encontrar-se isolados ou ligados por filamentos, ou encontrar-se extracelularmente (cabeça de seta). (*) local de rompimento da membrana para eliminação dos grânulos. **B** - capilar com trombose cuja luz está ocupada por 2 hemácias e o núcleo de outra que está sendo eliminada por ruptura do endotélio ("*per rhexis*") fora da junção celular (seta). Observar detalhe. A célula endotelial mostra mitocôndrias rompidas, vacúolos e diminuição do número de vesículas de pinocitose. **C** - vaso em secção longitudinal mostrando células sanguíneas vermelhas e brancas na luz. Observar saída de um eritrócito (e) com forma anômala e corpos filamentosos densos degenerativos representando fibrina (*). **A** - X16848; **B** - X6600 - Detalhe X8580; **C** - X5445.

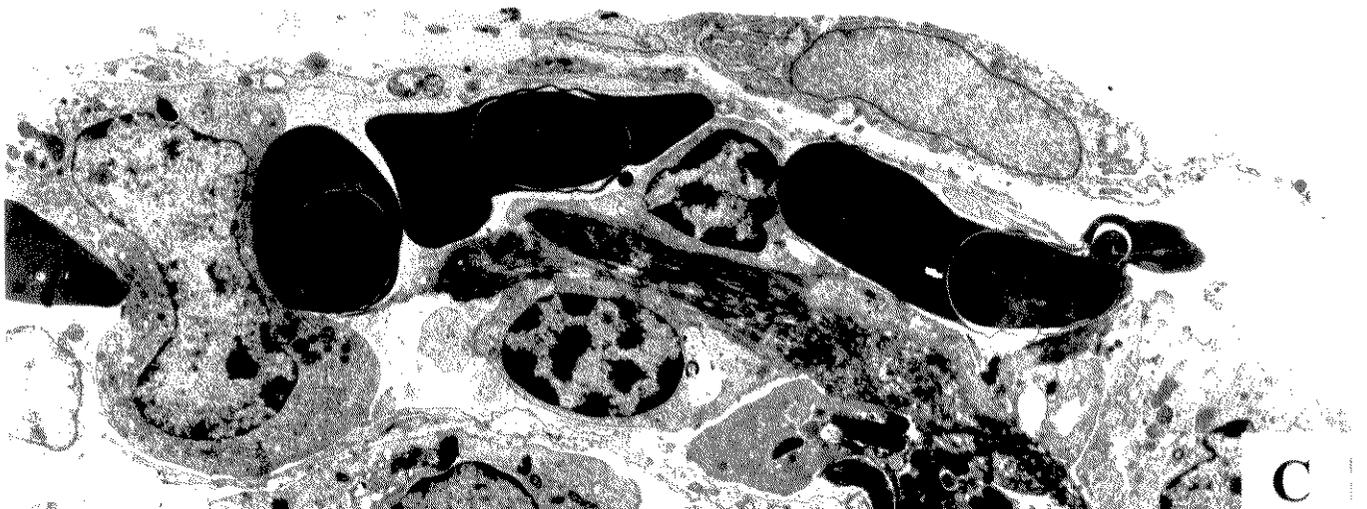
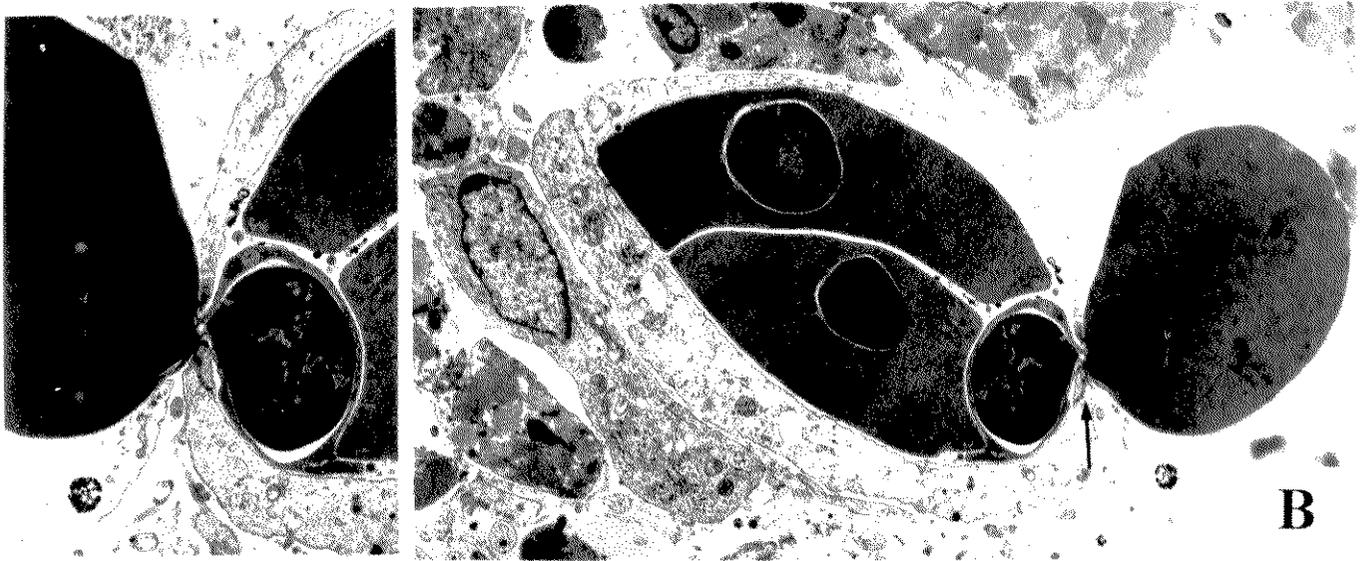
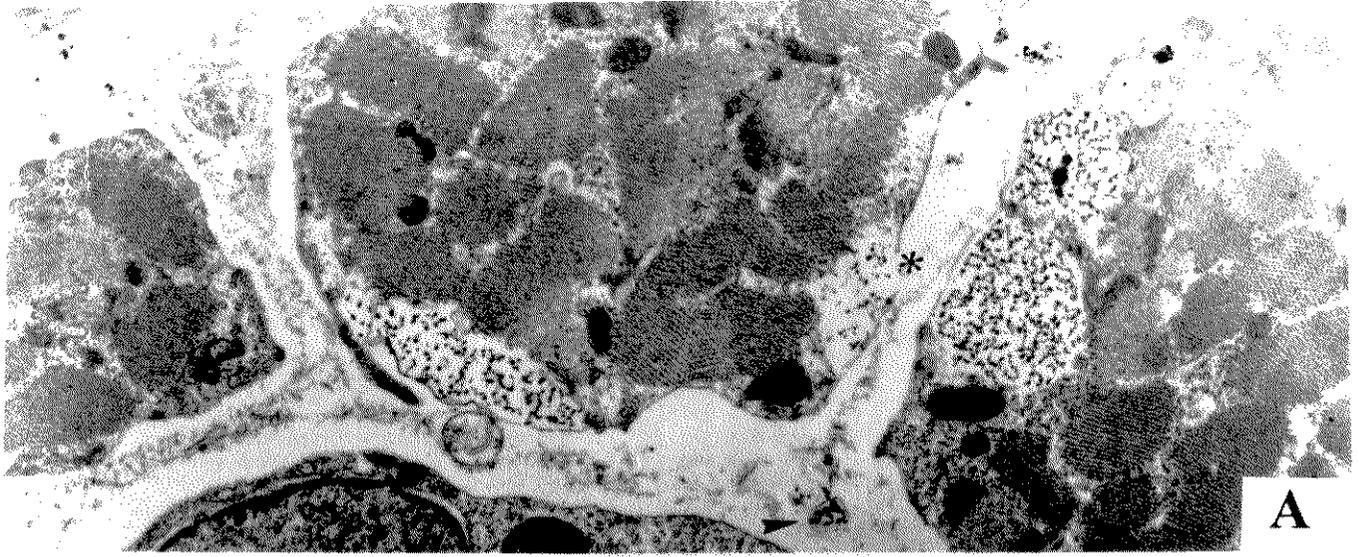


FIGURA 37) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 80 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A** - fibra muscular mionecrótica com condensação e compactação das miofibrilas. Veja detalhe. (m) mitocôndrias. **B** - outro aspecto de alteração muscular observado. Corpos de aparência amorfa localizados extracelularmente que sugerem ser fibras necrosadas. **A** - X6105; **B** - X15984.

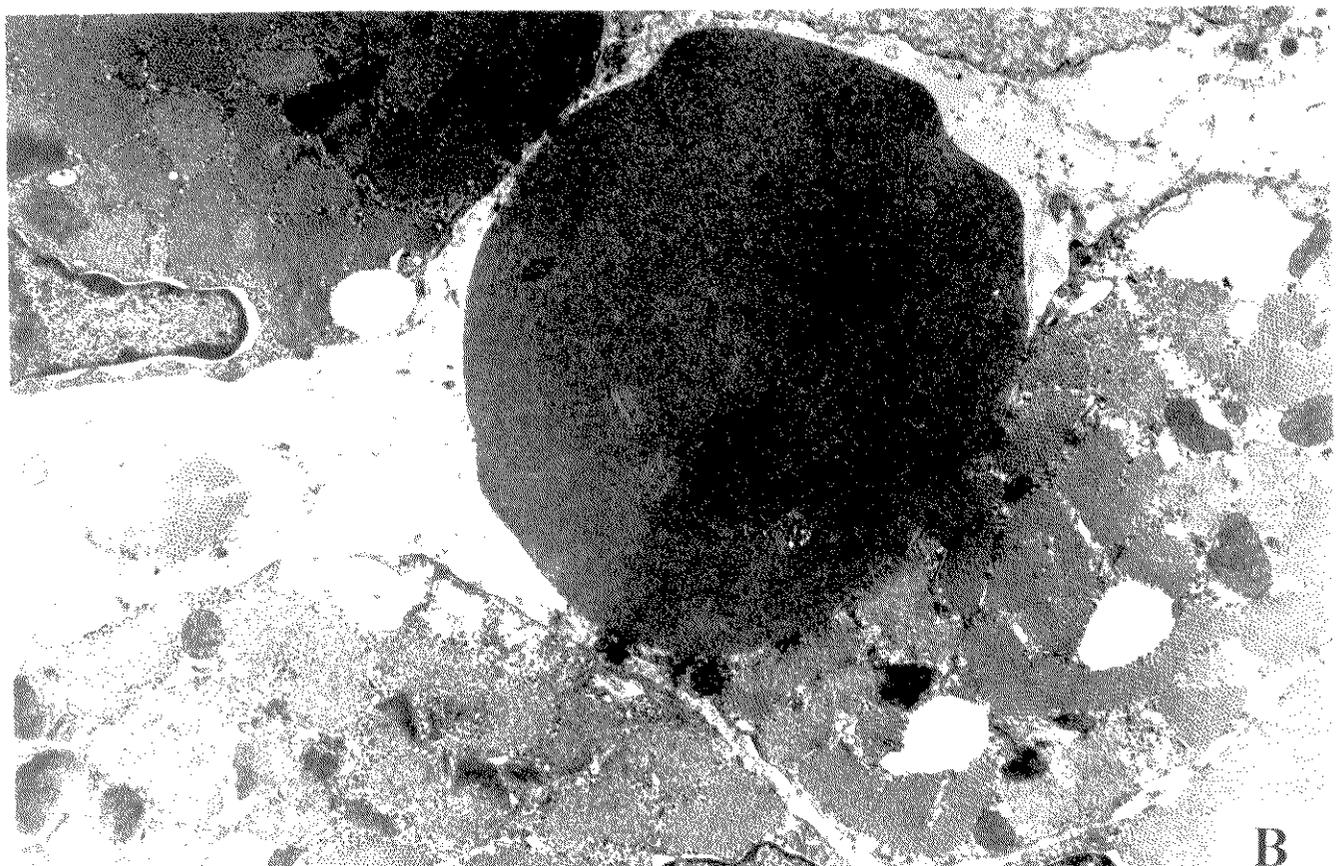
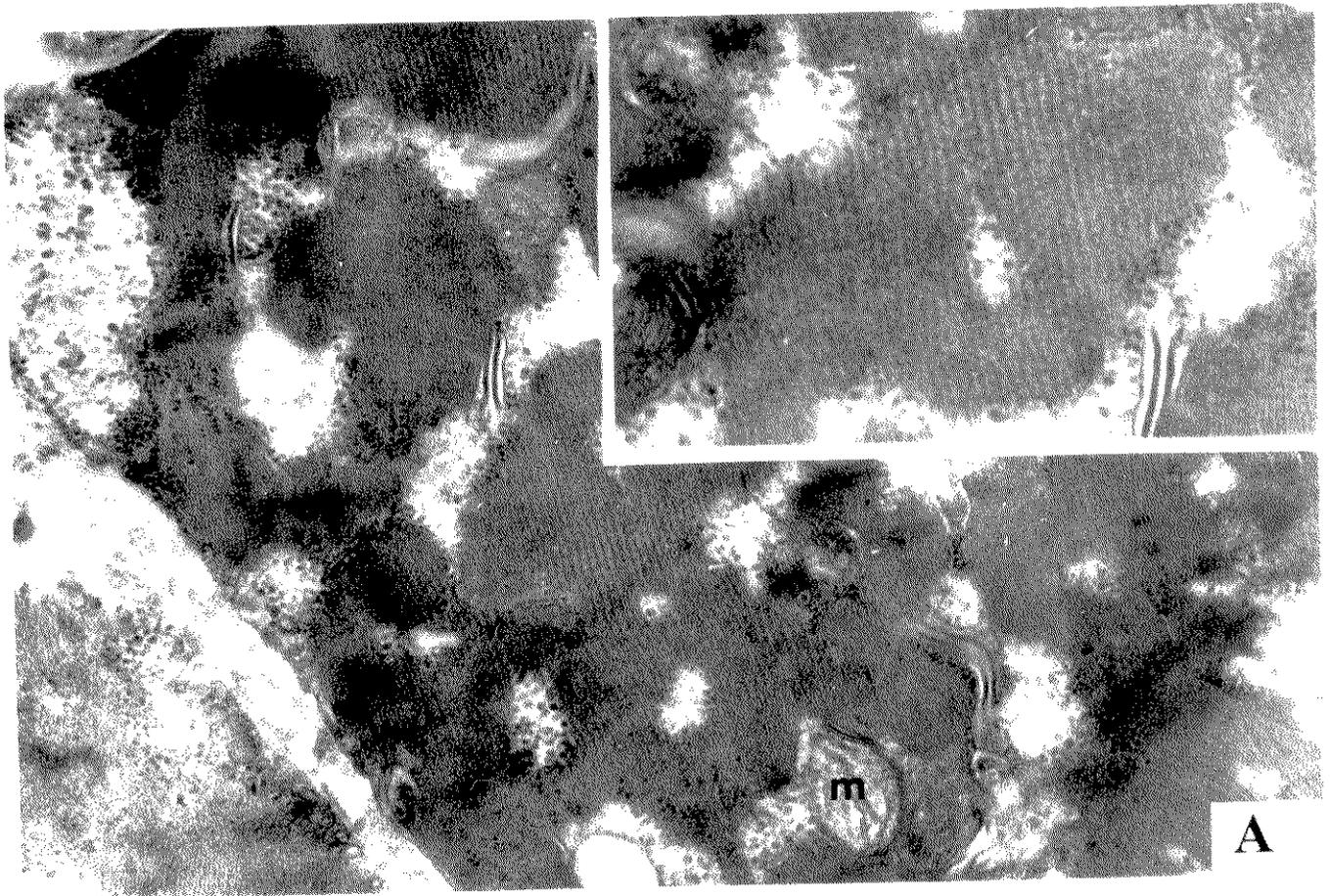
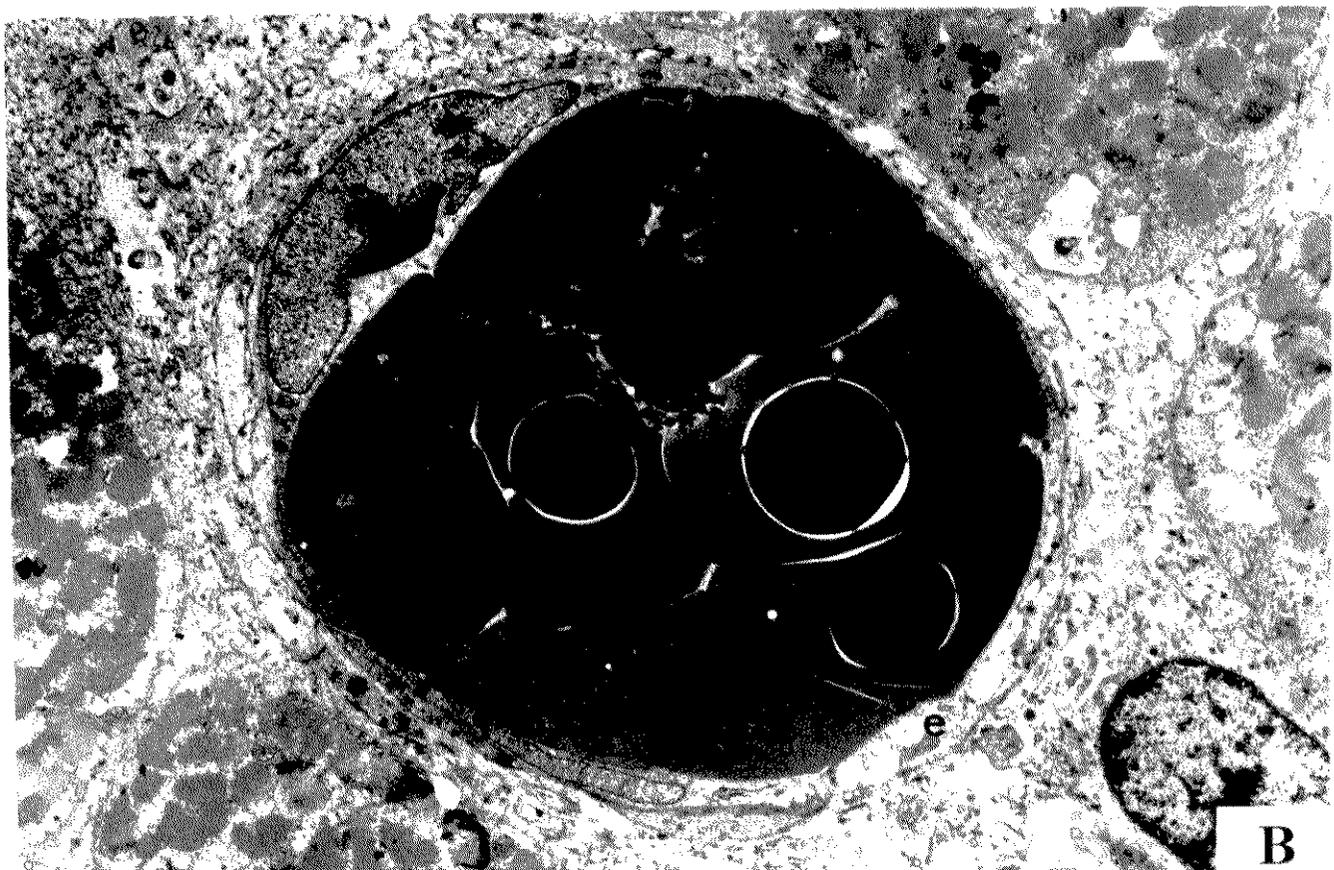
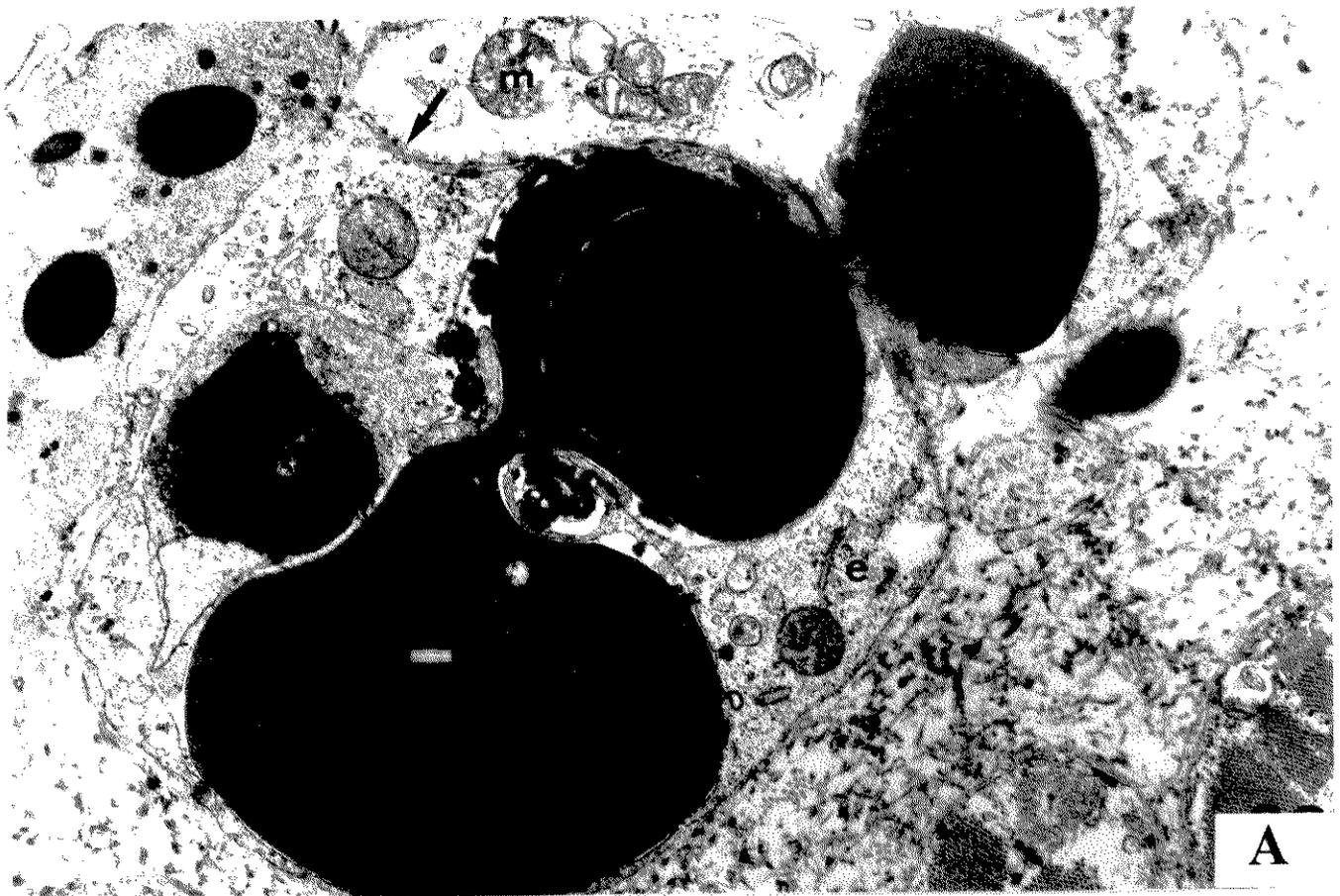


FIGURA 38) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 80 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A** e **B** - dois aspectos de alterações vasculares causadas pelo veneno botrópico. Ambos os capilares estão ocluídos por hemácias (trombose). Em **B**, saída de hemácias "*per hrexis*". As alterações também são observadas na parede endotelial (e) que podem estar espessada (FIGURA **A**) ou adelgada (FIGURA **B**). Observar também fibrina. (seta) junção endotelial; (m) mitocôndrias arrebatadas. **A** - X7620; **B** - X15984.



mielina e aumento da eletrodensidade do axoplasma. O perineuro e o endoneuro desses feixes nervosos mostravam também estarem afetados (FIGURAS 39A e B).

As placas motoras podiam mostrar-se desnervadas, estando a célula de Schwann ocupando a região pré-sináptica (FIGURA 40A). Outros terminais apresentavam-se bastante eletrondensos praticamente ocupados por mitocôndrias inchadas e vesículas sinápticas com membranas mal definidas, também eletrondensas. Estruturas globulares estavam presentes na fenda sináptica, provavelmente referiam-se a porções de processos citoplasmáticos das células de Schwann, interpunham-se entre os terminais e o sarcolema sub-sináptico (FIGURA 40B).

16.5) Animais injetados com 10 µg da fração PLA₂ (3 horas):

Sob a ação da fração PLA₂, as alterações musculares foram mais suaves do que as observadas com o veneno bruto. A maior parte das células apresentava aspecto íntegro (FIGURA 41A). A ação miotóxica da PLA₂ caracterizava-se pela desorganização das miofibrilas e perda da arquitetura do sarcômero em células esparsas, porém com menor severidade do que apresentada sob a ação do veneno bruto. De maneira geral, não houve ruptura do sarcolema, nem perda de porções da célula muscular. Por outro lado, foram observadas fibras com mitocôndrias entumescidas ou com ruptura de cristas. O núcleo da célula muscular apresentava-se com a superfície bastante corrugada a par com dilatação da cisterna perinuclear do retículo sarcoplasmático (FIGURA 41B e 42A). Além disso, as dimensões e a organização espacial dos sarcômeros podiam apresentar-se anormais indicando contratura muscular leve (FIGURA 42A) ou severa, claramente indicando mionecrose (FIGURA 42B).

As junções neuromusculares no músculo “*pectoralis*” de pintainho injetado com a fração PLA₂ na dose de 10 µg, e sacrificado após 3 horas, mostravam-se com ultraestrutura quase normal. Não havia alteração aparente no número, na localização e morfologia das vesículas sinápticas na maioria dos terminais. As alterações observadas referiam-se principalmente às mitocôndrias que, podiam estar inchadas e com as cristas

FIGURA 39) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 80 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A** e **B** - duas micrografias eletrônicas mostrando alterações das fibras nervosas intramusculares. (v) vacúolos intra-axonais; (m) mielina totalmente alterada. (seta) corpos vesiculosos e membranosos intra-axonais; (e) endoneuro; (p) perineuro semi-dissolvido. **A** - X35948; **B** - X15984.

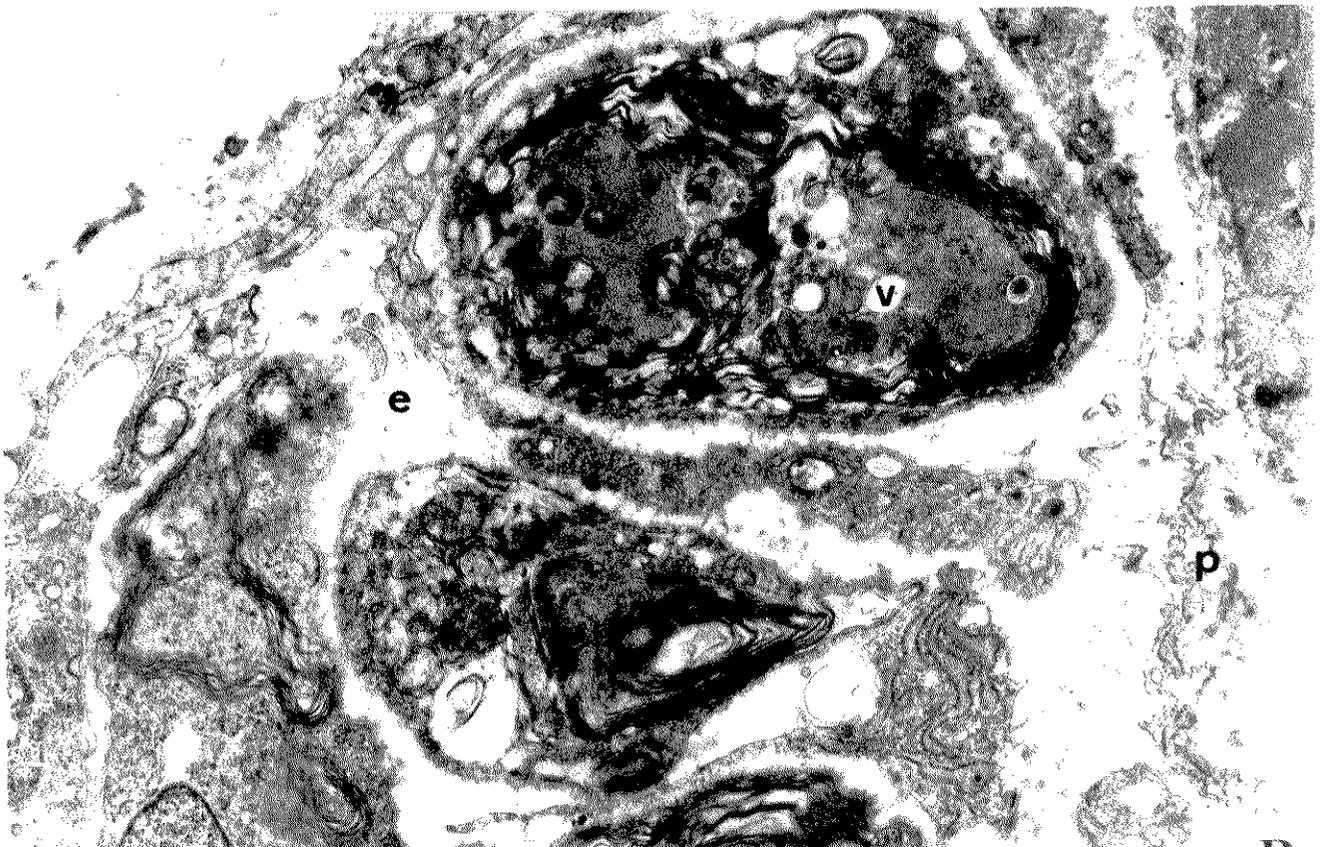
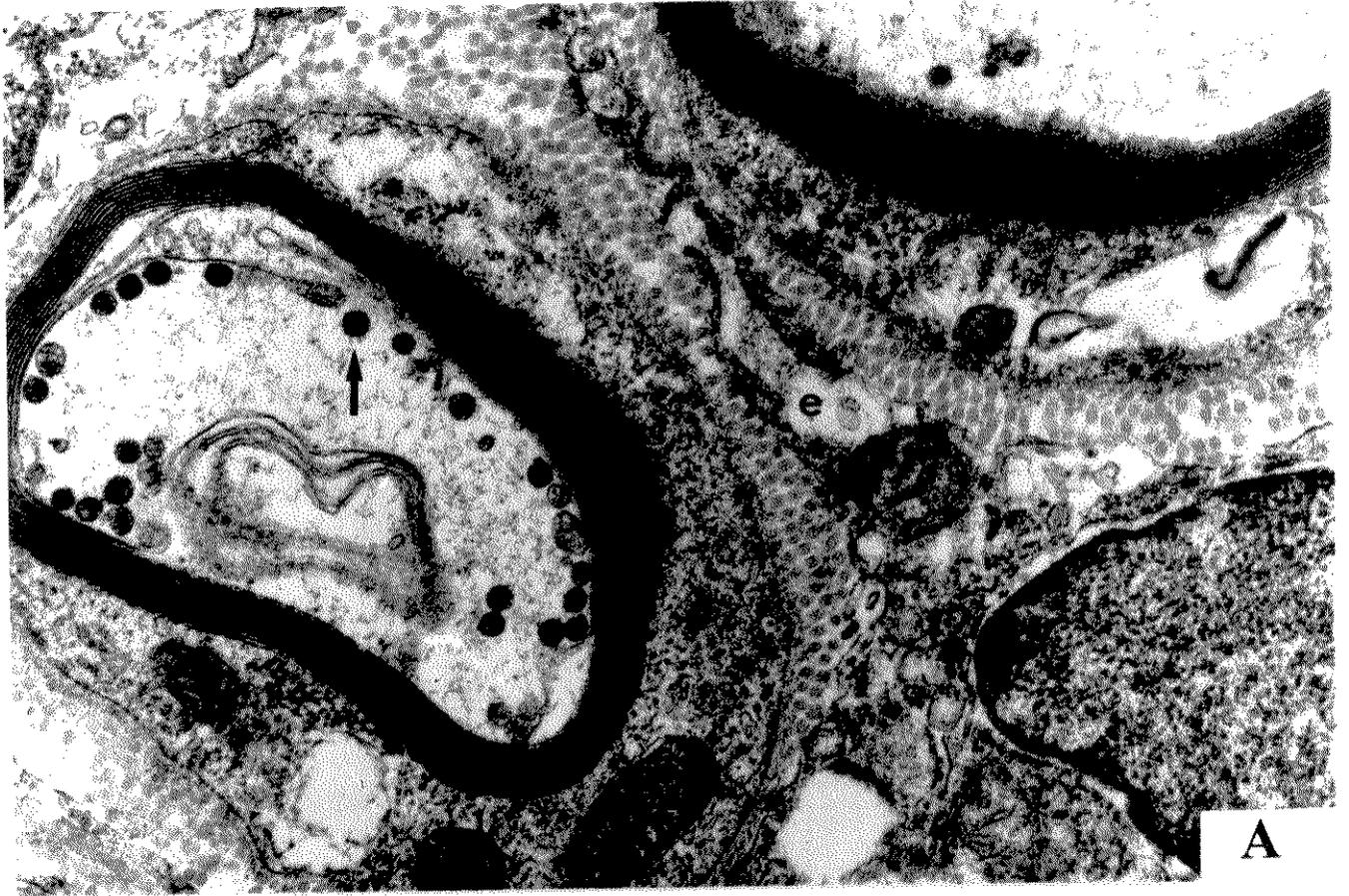
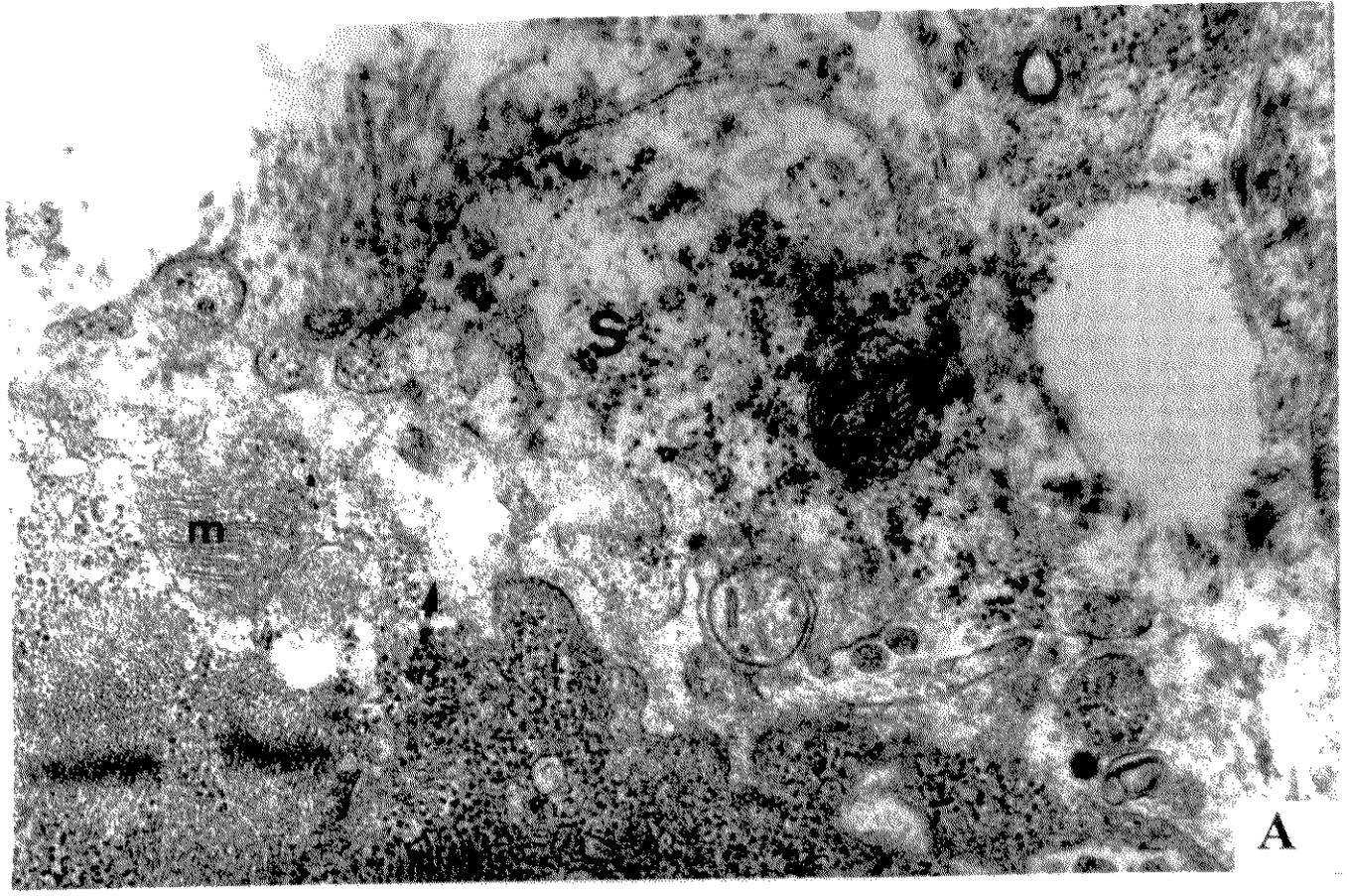
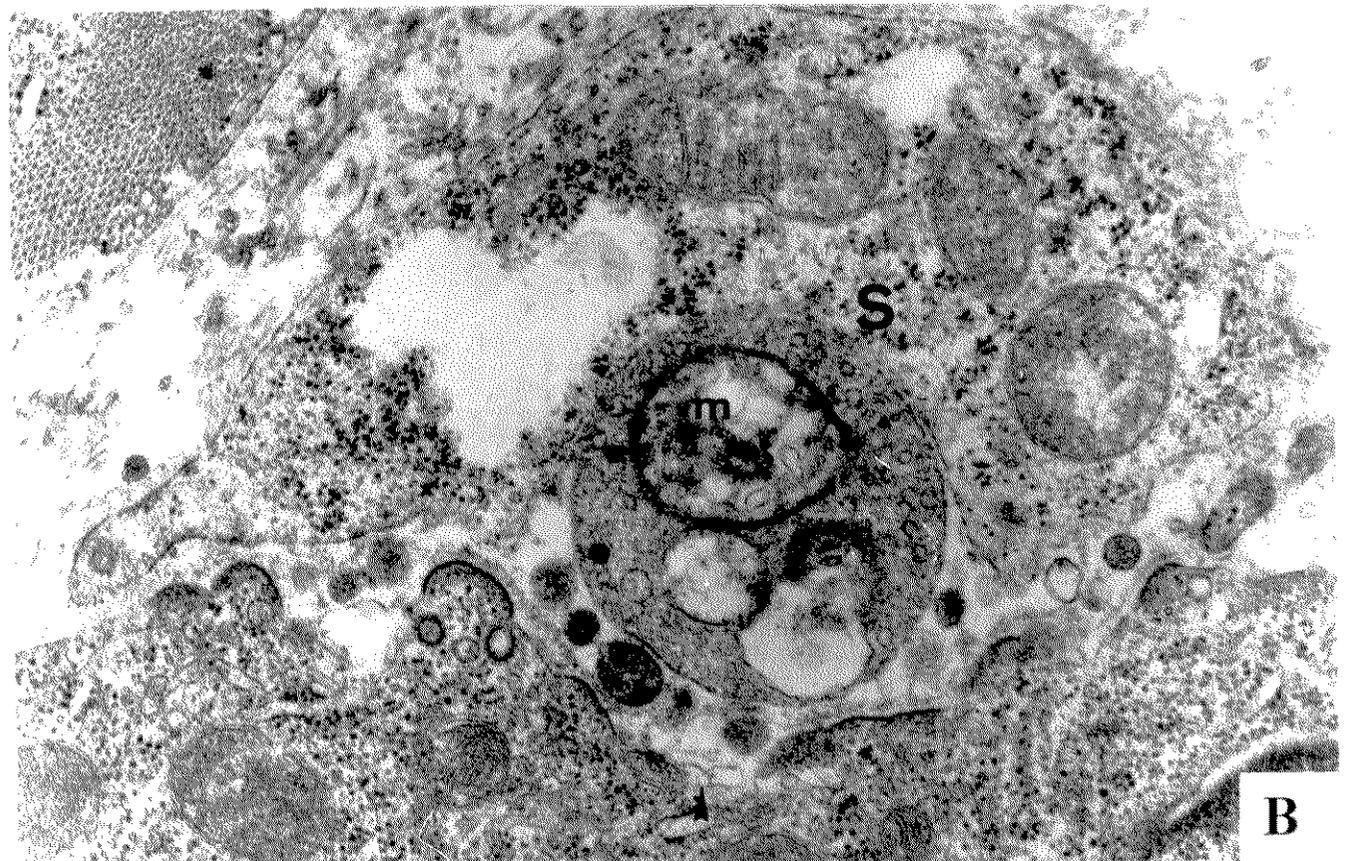


FIGURA 40) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 80 µg DO VENENO TOTAL: 3 horas. **A - junção neuromuscular desnervada. (S) célula de Schwann ocupando o espaço pré-sináptico. (setas) membrana pós-sináptica dissolvida; (m) mitocôndrias entumescidas. **B** - terminal nervoso necrótico ocupado por mitocôndrias (m) e vesículas anormais. (cabeça de seta) interrupção da membrana pós-sináptica. Corpos de origem desconhecida interpostos na fenda sináptica. (S) célula de Schwann. **A** - X48246; **B** - X48246.**



A



B

FIGURA 41) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 10 µg DA FRAÇÃO PLA₂: 3 horas. **A** - fibra muscular com aspecto normal quanto à organização do sarcômero e características do núcleo. As únicas alterações visíveis foram os vacúolos (v) dispersos em algumas fibras. **B** - Aspecto de 3 fibras musculares, sendo que uma delas (M) mostra sarcômero irregulares com perda do bandejamento característico e com as linhas Z mal definidas. (N) núcleo indentado e cisterna perinuclear alargada. **A** - X5280; **B** - X20572.

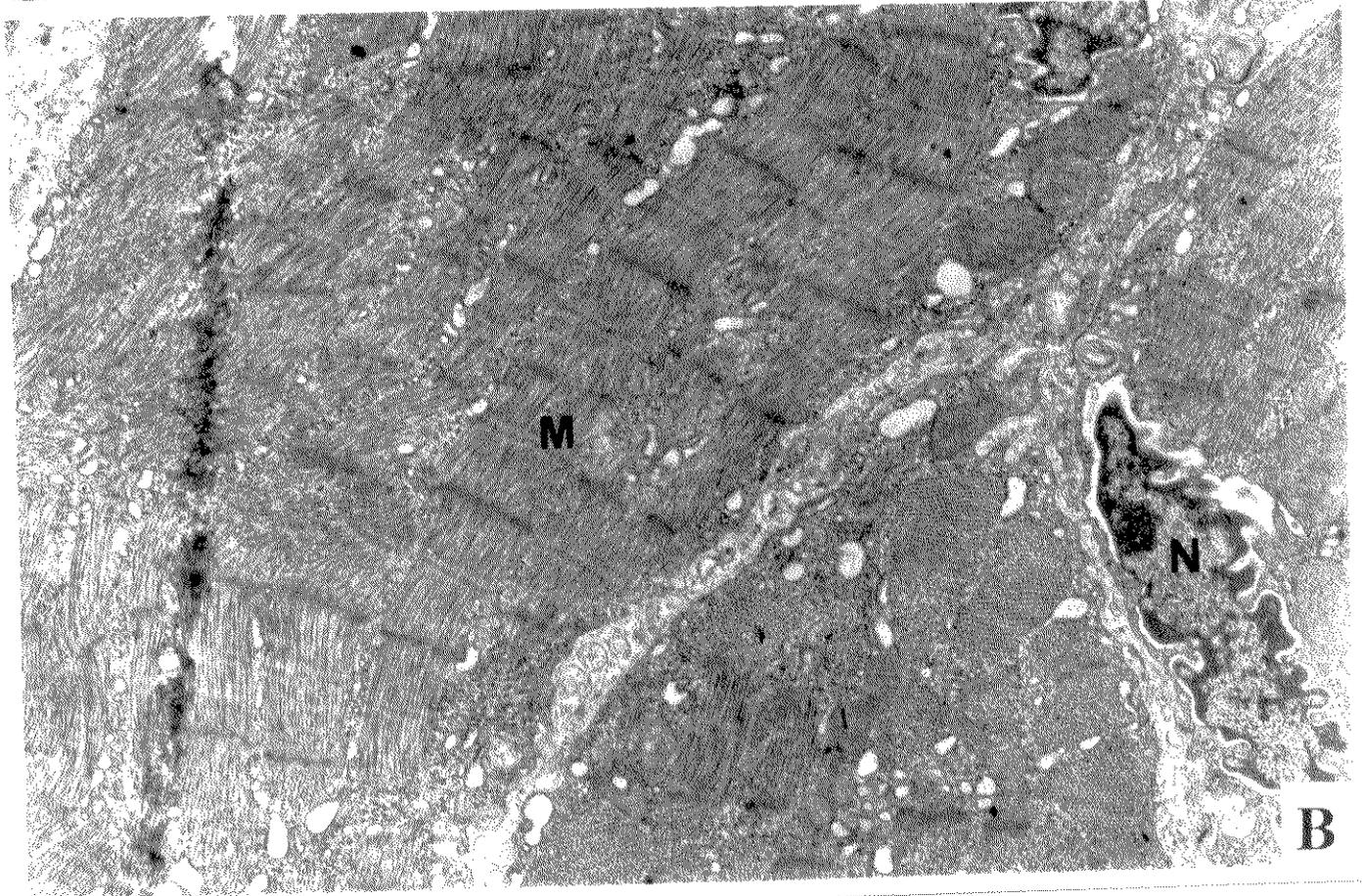
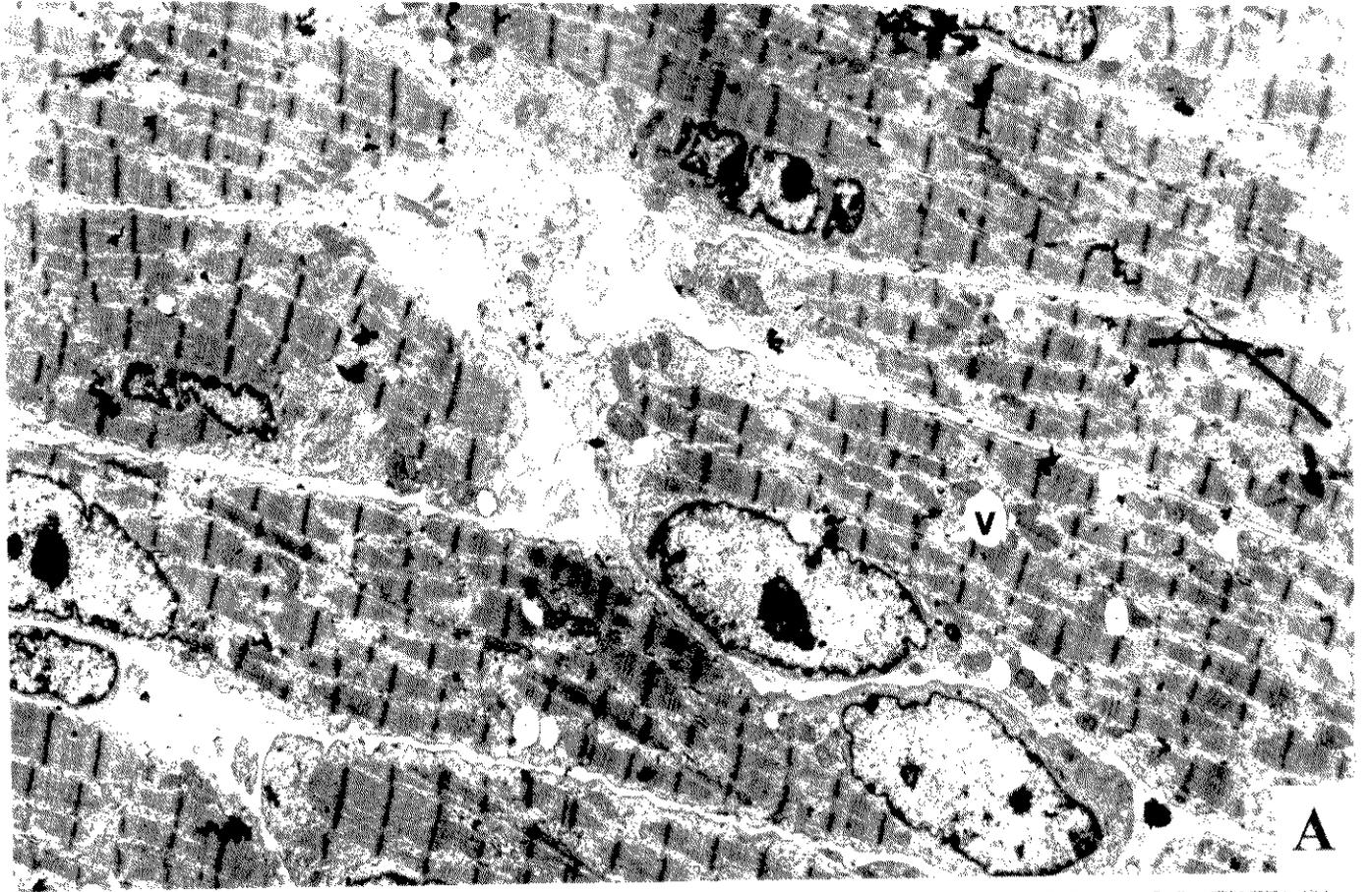
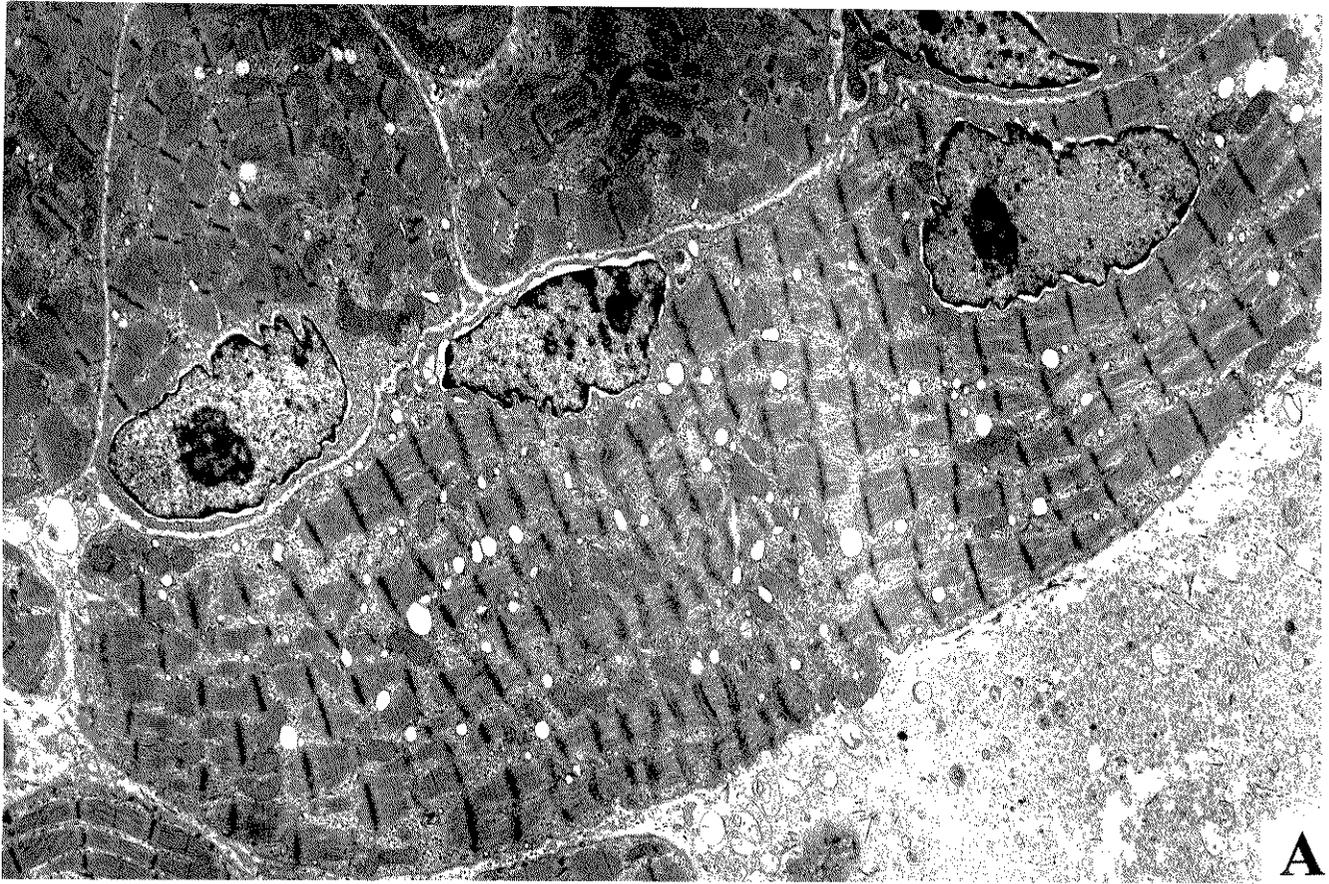
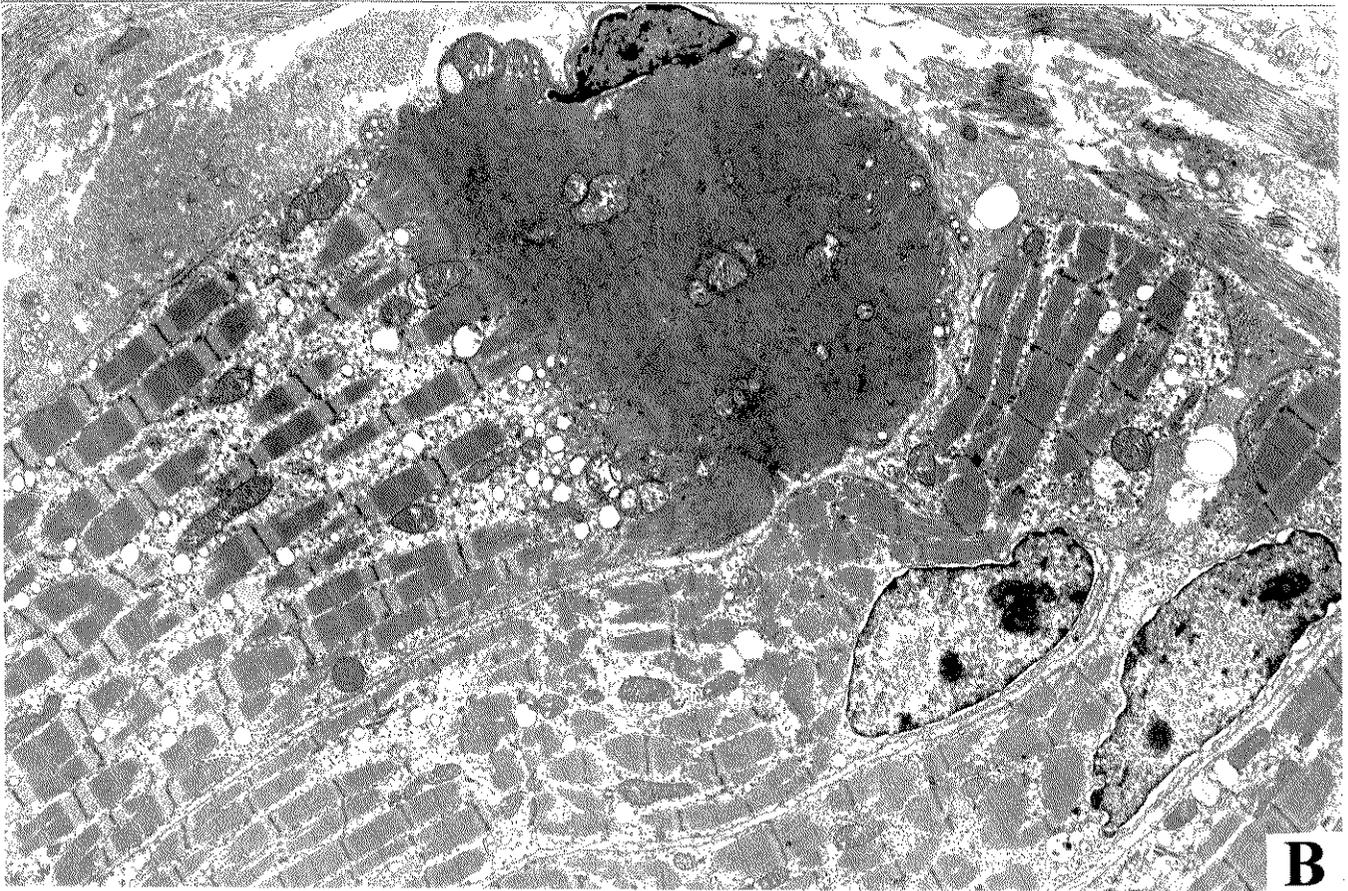


FIGURA 42) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 10 µg DA FRAÇÃO PLA₂: 3 horas. **A** - aspecto de uma fibra muscular onde os sarcômeros apresentam alteração de tamanho e forma, vacúolos dispersos ao longo da fibra e os núcleos apresentam-se com superfície corrugada e com aumento da sisterna perinuclear. **B** - estágio mais avançado de mionecrose na extremidade de uma fibra muscular, enquanto o restante dela apresenta estrutura normal, assim como as fibras vizinhas. **A** - X15120; **B** - X15120.



A



B

rompidas, à presença de pequenos vacúolos ou fragmentação do terminal, cujos fragmentos se localizavam ao longo da fenda sináptica. Quanto à célula de Schwann, sua aparência era normal (FIGURA 43A e B).

16.6) Animais injetados com 10 µg da fração PLA₂ (24 horas):

As alterações sob a ação de 10 µg de PLA₂ após 24 horas foram semelhantes àquelas observadas após 3 horas (não documentada).

16.7) Animais injetados com 40 µg da fração PLA₂ (3 horas):

Não houve alterações expressivas envolvendo as fibras musculares sob esta dose (FIGURAS 44A e B). Entretanto, a ação foi mais expressiva ao nível dos axônios mielínicos intra musculares. Essas alterações caracterizavam-se por afetar a bainha de mielina e o próprio axolema (FIGURAS 45 A, B e C).

Alterações vasculares foram também importantes na dose de 40 µg. Após 3 horas do envenenamento, caracterizavam-se por hemorragia, vasos capilares com fibrina no interior, hemácias hemolisadas e com substância floculenta ou vasos trombóticos. As células endoteliais apresentavam diferentes graus de alterações. Nos locais onde essas alterações eram observadas, as fibras musculares apresentavam-se mais afetadas (FIGURAS 46A e B).

16.8) Animais injetados com 40 µg da fração PLA₂ (24 horas):

O efeito da PLA₂ parece ser tempo-dependente. Alguns focos de mionecrose foram observados onde as células afetadas mostravam desorganização dos miofilamentos, vacúolos provavelmente resultantes da dilatação do RS e mitocôndrias degeneradas (FIGURAS 47 A e B).

As alterações vasculares observadas 24 horas após o envenenamento com PLA₂, caracterizavam-se por injúria dos vasos, principalmente da microcirculação que apresentavam ruptura endotelial e consequente saída de hemácias que caracterizava a hemorragia. Havia também grandes depósitos de fibrina intra e extravasculares.

FIGURA 43) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 10 µg DA FRAÇÃO PLA₂: 3 horas. **A** - micrografia eletrônica de junção neuromuscular mostrando as vesículas sinápticas voltadas para a fenda, e as mitocôndrias na face voltada para a célula de Schwann. Junto à fenda sináptica, o terminal apresenta-se fragmentado. **B** - duas junções neuromusculares mostrando alteração mitocondrial e rarefação do axoplasma. **A** - X33110; **B** - X21600.

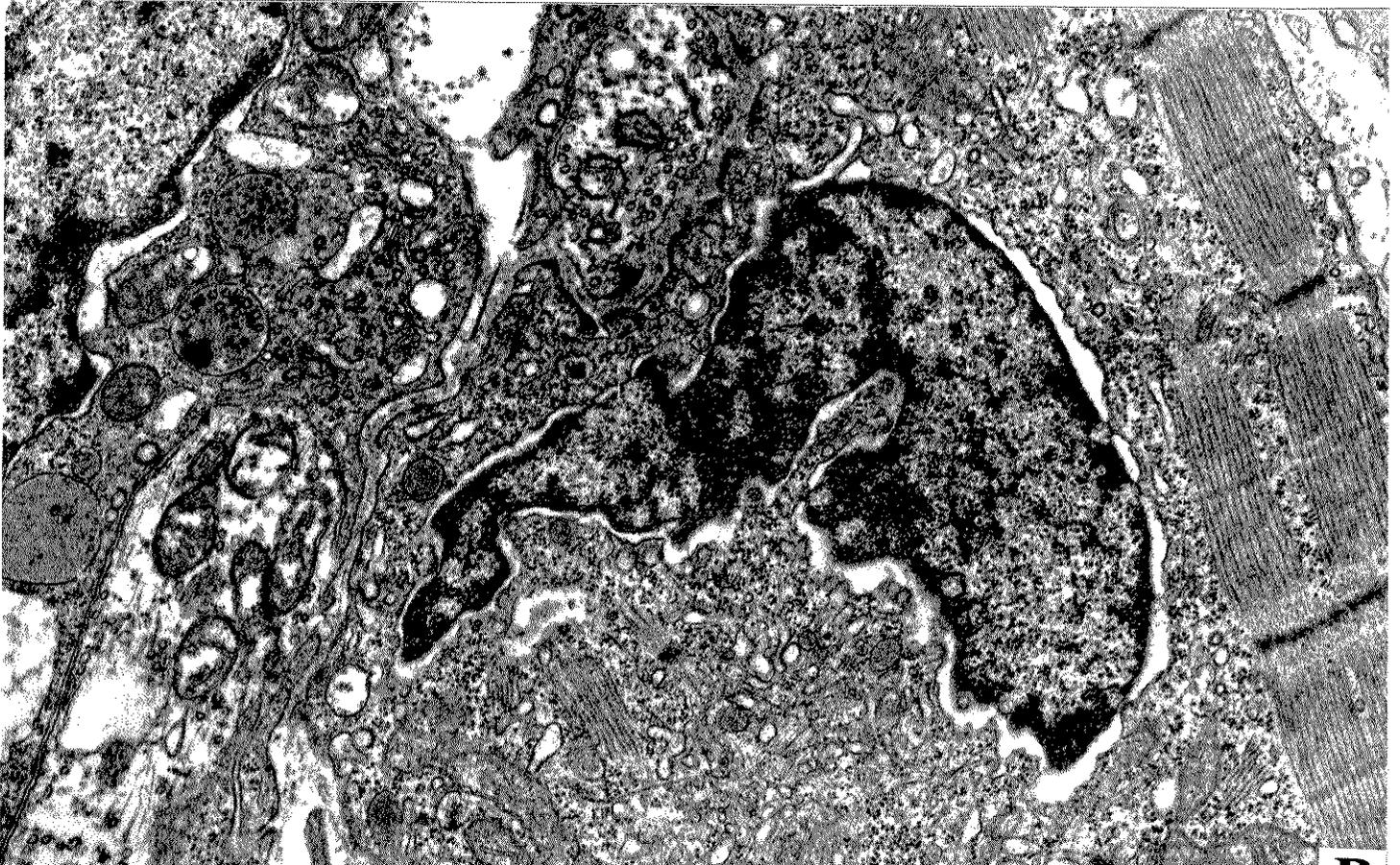
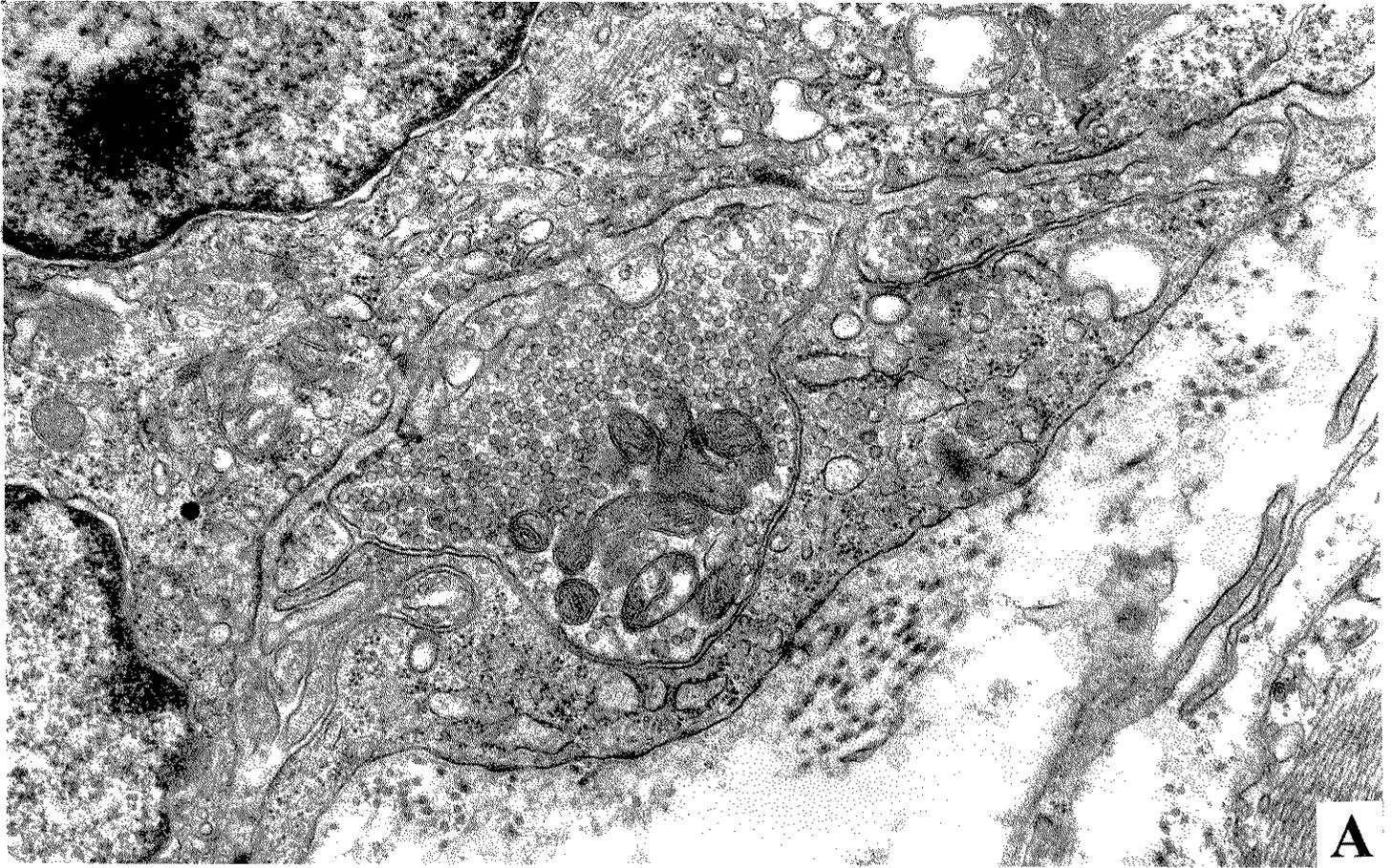
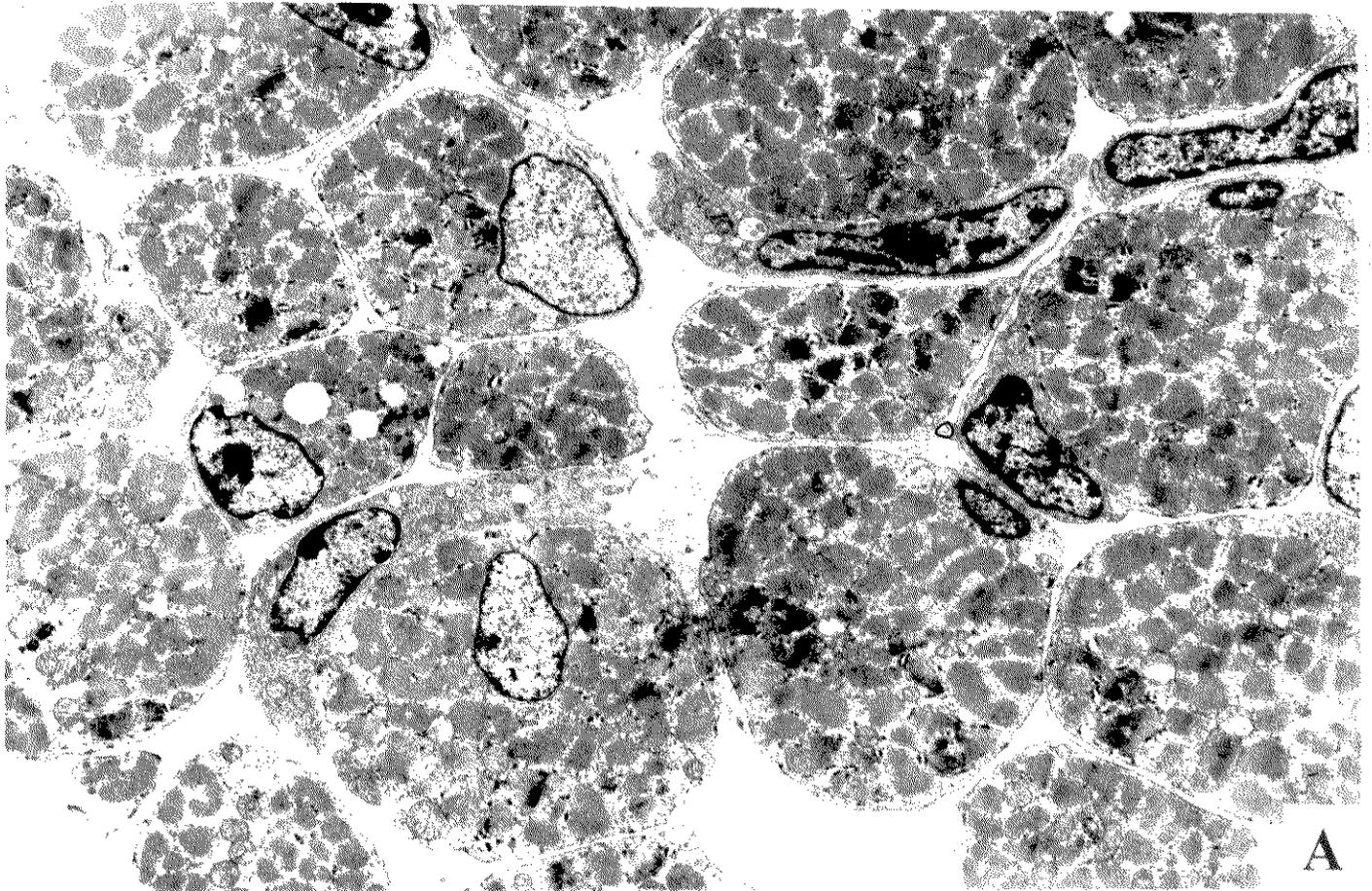
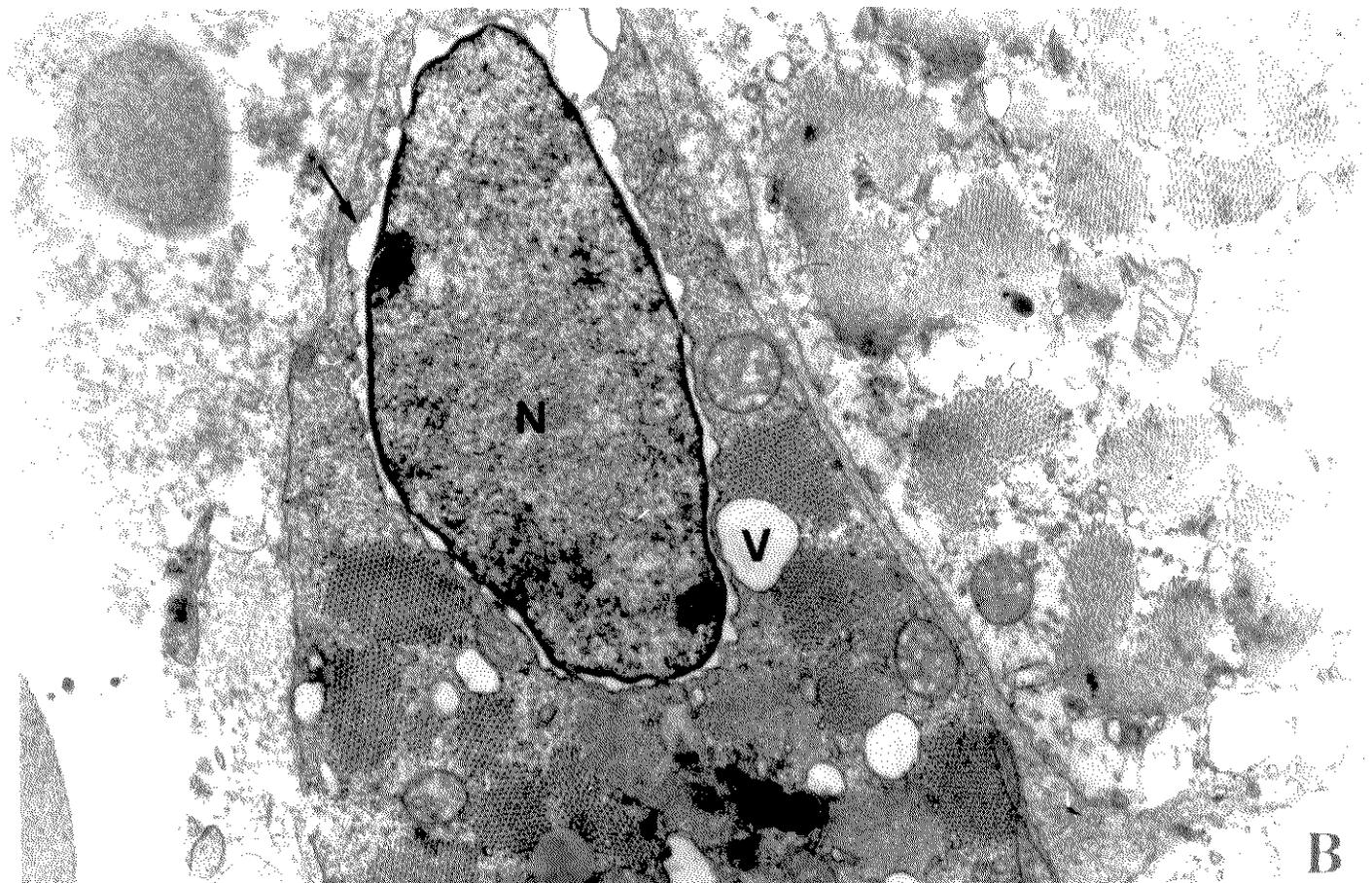


FIGURA 44) MÚSCULO *PECTORALIS* INJETADO COM 40 µg DA FRAÇÃO PLA₂: 3 horas. **A - micrografia eletrônica mostrando aspecto geral das fibras musculares cortadas transversalmente. Observar que o aspecto é normal e não difere do observado com 10 µg. **B** - Detalhe de 2 células musculares apresentando vacúolos (V) e núcleo (N) com cisterna bastante dilatada (seta). **A** - X20279; **B** - X20561.**



A



B

FIGURA 45) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 40 µg DA FRAÇÃO PLA₂: 3 horas. Micrografias eletrônicas mostrando alguns aspectos das alterações dos axônios mielínicos intramusculares. **A** - axônio com bainha de mielina reduzida (cabeça de seta), retração interna do axoplasma (asterisco) com formação de vacúolos periaxonais e intramielínicos. Retículo endoplasmático rugoso (R) da célula de Schwann desenvolvido, (p) perineuro; (h) hemácias extravasculares. **B** - Alterações de fibras nervosas semelhantes às apontadas em **A**; **C** - Axônio mielínico contendo uma população de pequenos vacúolos formados pelo enrolamento da bainha de mielina degenerada e retração do axoplasma. **A** - X7560; **B** - X7560; **C** - X23310.

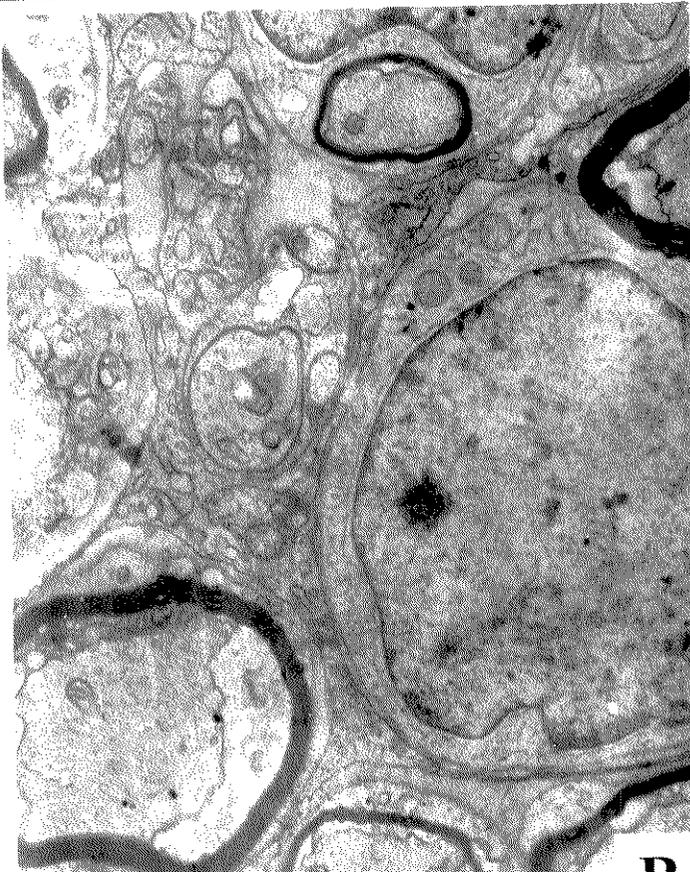


FIGURA 46) MÚSCULO *PECTORALIS* DE PINTAINHO INJETADO COM 40 µg DA FRAÇÃO PLA₂: 3 horas. Dois aspectos da ação vasculotóxica da fração PLA₂. A - ruptura do endotélio com eliminação de fibrina (cabeça de seta); depósito de fibrina (F). B - observar hemácias (H) extravasculares. A - X14256; B - X20272.

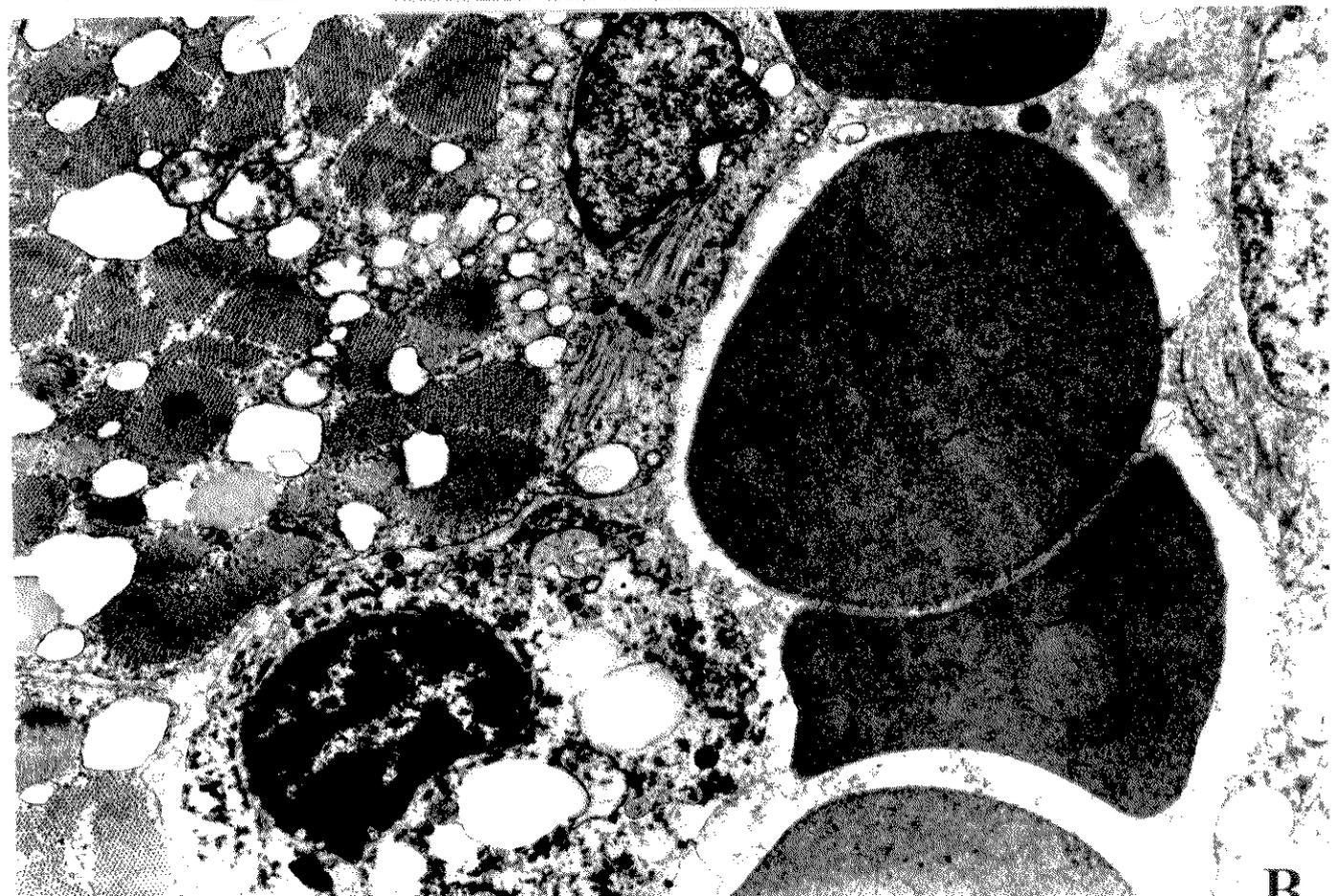
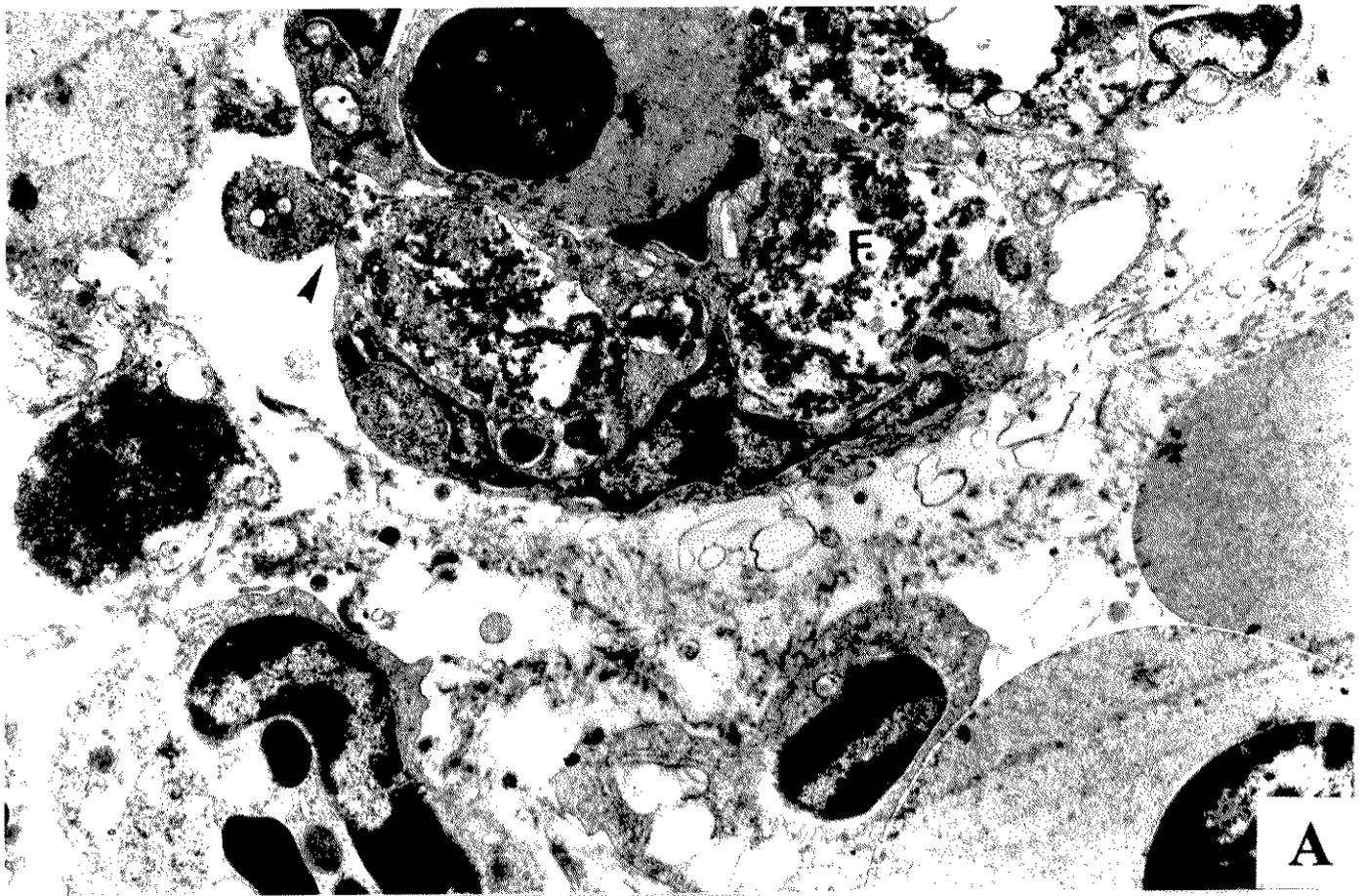
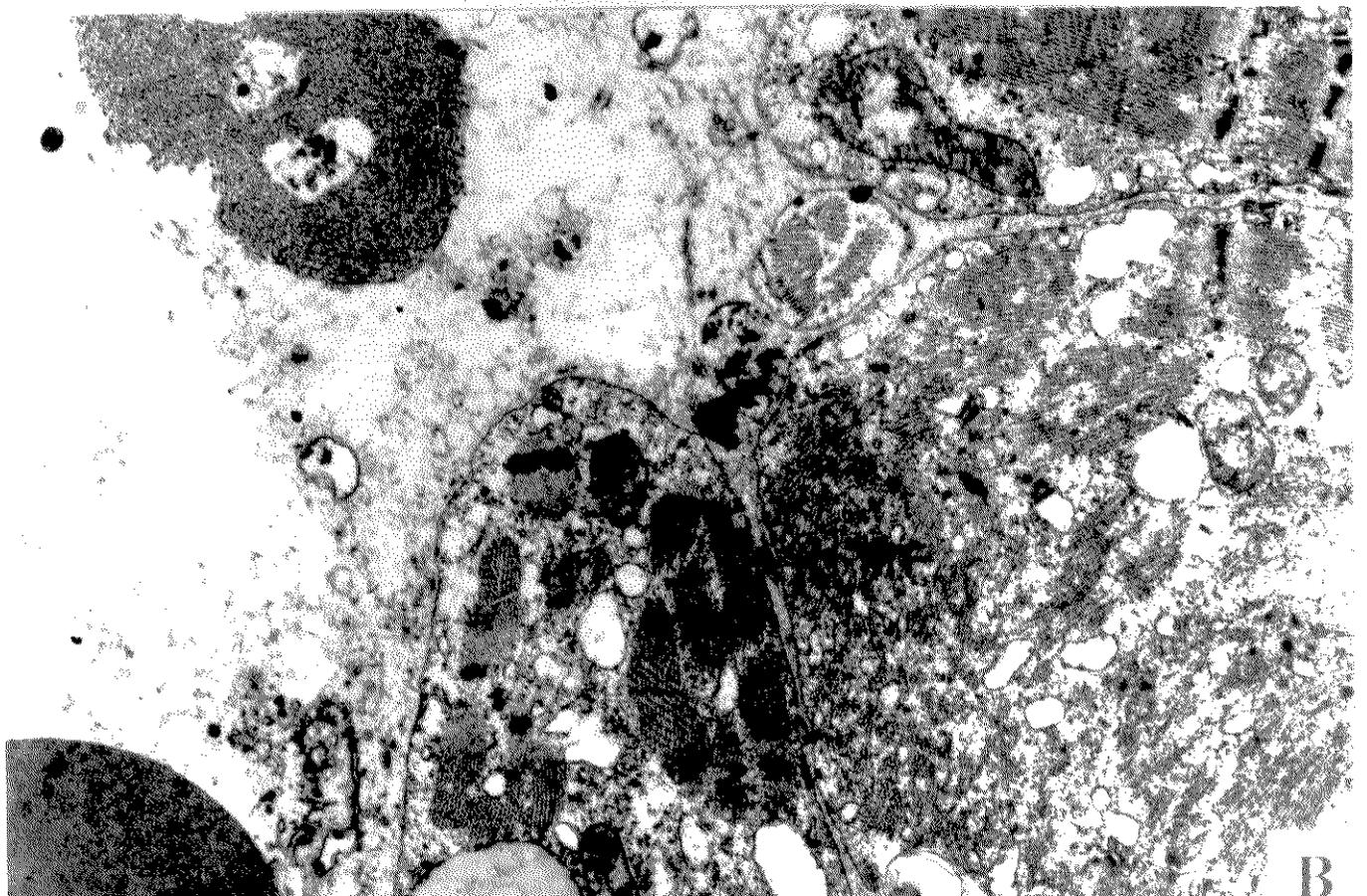
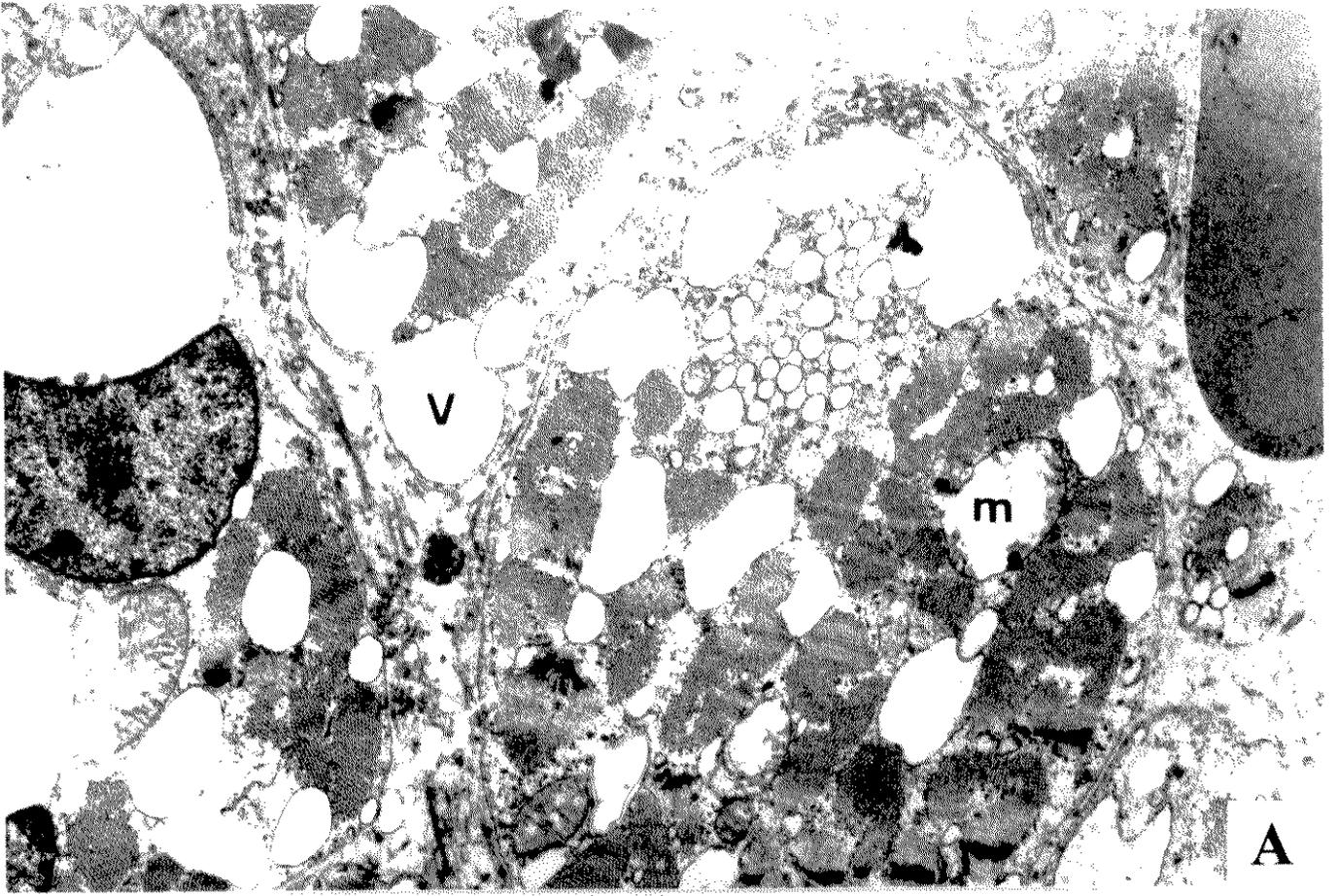


FIGURA 47) MÚSCULO *PECTORALIS* INJETADO COM 40 µg DA FRAÇÃO PLA₂: 24 horas. A e B - Dois aspectos de alterações mionecróticas com formação de inúmeros vacúolos e vesículas entre as miofibrilas (V). Mitocôndrias (m) degeneradas e desorganização dos miofilamentos (MF). No canto superior esquerdo, célula muscular em corte transversal com necrose severa. A - X13392; B - X13824.



Resumindo, as alterações morfológicas induzidas pela fração PLA₂ são menos intensas do que aquelas causadas pelo veneno total. Além disso, elas são qualitativamente um pouco diferentes. Afetam principalmente a fibra por induzir a vacuolização celular, provavelmente em decorrência de distúrbios que afetam primordialmente o retículo sarcoplasmático e secundariamente os túbulos T. Em menor grau, afetam a organização miofibrilar a qual se manifesta por desorganização dos sarcômeros. Esta por sua vez, é bastante afetada pelo veneno bruto, que parece ter ação menor sobre o retículo sarcoplasmático, evidenciável pela menor vacuolização das fibras musculares. Por outro lado, as secções do tecido muscular mostram maior efeito hemorrágico causado pela fração PLA₂ que pelo veneno bruto.

DISCUSSÃO

Para o estudo dos efeitos induzidos pela fração PLA₂ do veneno de *B. insularis* sobre a junção neuromuscular de pintainhos e camundongos, utilizamos 2 fosfolipases: uma isolada em pH neutro e outra isolada em pH ácido. As diferenças observadas foram por nós atribuídas ao pH da solução utilizada durante o fracionamento. Assim, verificamos que a fração PLA₂ isolada em pH neutro era capaz de reproduzir todos os efeitos do veneno total (bloqueio, facilitação e despolarização) enquanto que aquela isolada em pH ácido havia perdido a capacidade de induzir bloqueio das contrações musculares e mantido o efeito facilitador e despolarizante. Para explicar estes resultados formulamos duas hipóteses: 1) a possibilidade de que o efeito facilitador seja causado por uma (ou mais) PLA₂ resistente(s) ao pH ácido e o efeito bloqueador por uma (ou mais) PLA₂ sensível(eis) a este tratamento, sendo a fração uma mistura de várias PLA₂s; ou 2) atribuir os efeitos observados a somente uma PLA₂ que teria sido desnaturada parcialmente pelo tratamento fazendo com que o efeito bloqueador desaparecesse, permanecendo o facilitador e despolarizante.

Outras neurotoxinas e miotoxinas foram isoladas em pH ácido, como por exemplo as miotoxinas da *B. asper*, da *Agkistrodon sp* e *Trimeresurus flavoviridis* que foram isoladas em pH 5,5 e mantiveram a sua atividade mionecrótica inalterada (MEBS & SAMEJIMA, 1986). PLA₂s dos venenos de *Naja naja haje*, *Naja nigricollis* e *Naja nivea* também foram isoladas em pH ácido (5,6) e não sofreram modificação em sua atividade (MEBS, 1986). A PLA₂ do veneno de *B. newwiedi* foi purificada em pH 3,0 e sua atividade foi maior do que a do veneno total (VIDAL et al, 1966). Estes autores admitem que no veneno total existam inibidores da PLA₂ os quais podem ser separados durante o processo de fracionamento. Quando são posteriormente adicionados à PLA₂, esta perde muito a sua atividade.

Outros autores porém, verificaram que o pH exerce influência na atividade farmacológica de certas PLA₂s. Citamos como exemplo duas PLA₂s isoladas do veneno da *Naja nigricollis* (uma ácida e uma básica), onde ambas foram testadas na sua capacidade de hidrolisar fosfolípidios de membrana em diferentes pH (DUPONT,

1977). O autor concluiu que elas exibem uma ótima atividade em pH 8,5 e baixa atividade em pH 7,0.

BHAT & GOWDA (1989) verificaram que a PLA₂ NN-XIII da *Naja naja naja* possui sua atividade ótima à temperatura entre 37 a 45°C e em um pH entre 7,0 a 7,5. Esta PLA₂ tem atividades neurotóxica e miotóxica.

As PLA₂s I (100 µg/ml), III (30 µg/ml) e IV (50µg/ml) da serpente *Laticauda semifasciata*, quando testadas em preparações *biventer cervicis* de pintainho em condições normais, promovem bloqueio total da amplitude de contração muscular aos 40±7, 65±5 e 54±5 minutos, respectivamente. O aumento do Ca²⁺ (para 5mM) e do pH (para 8,2) diminui o tempo de bloqueio da PLA₂ I para 33±7 minutos, mas não altera o tempo de bloqueio para as PLA₂s III e IV (HARVEY & TAMIYA, 1980).

Portanto, esses resultados nos mostram que as PLA₂ em geral, podem ou não ter suas atividades, tanto enzimática como farmacológica, influenciadas pelo pH como no caso da fração PLA₂ da *B. insularis*.

A fração isolada por nós possui atividade PLA₂, sendo desprovida de atividades esterásica e coagulante. Além disso, o fato dos seus efeitos serem inibidos pelo Sr²⁺ e abolidos pela baixa temperatura, sugere a participação da atividade enzimática da PLA₂ nos efeitos observados sobre a junção neuromuscular e músculo.

O Sr²⁺ substitui o Ca²⁺ no metabolismo iônico do nervo e músculo, mas é um pobre ativador da ação catalítica da PLA₂ (HO et al., 1986a). Assim, esses autores verificaram que os efeitos promovido pela Caudotoxina (PLA₂ da *Bitis caudalis*) são significativamente inibidos na presença de Sr²⁺. O tempo de bloqueio é prolongado cerca de 2 vezes em preparações *biventer cervicis* de pintainho e 3 vezes na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo.

SIMPSON et al. (1993), estudando o antagonismo pelo Sr²⁺ da atividade bloqueadora da Notexina, da CTx, da β-BTx, da Taipotoxina e da Textilotoxina em preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo verificaram um retardo no início do bloqueio neuromuscular. Este retardo verificado tanto para a CTx como para a β-Btx, também foi observado com a fração PLA₂ de *B. insularis*.

A atividade bloqueadora muscular (presente na fração obtida em pH 8,0) e avaliada através do bloqueio dose-tempo-dependente reflete um efeito misto: nela se somam a ação pré-sináptica e a ação direta em músculo evidenciada através de contratura e focos de mionecrose. Esta fração induziu bloqueio nas preparações de aves e aumento da amplitude muscular antecedendo o bloqueio parcial nas preparações de mamíferos mostrando que neste pH, tanto a atividade enzimática, como a atividade farmacológica, mantiveram-se estáveis, razão pela qual foi a escolhida para o presente estudo.

Como observado com o veneno total (COGO et al., 1993), as aves foram mais sensíveis a ação da fração PLA₂ do que os mamíferos.

A facilitação das contrações induzida pelas baixas doses de PLA₂, bem como o aumento na frequência dos p.m.p.t., são altamente sugestivos de que esta fração é a principal responsável pela ação pré-sináptica descrita anteriormente para o veneno total (COGO et al., 1993).

Neurotoxinas de ação pré-sináptica com a capacidade de facilitar a neurotransmissão são comuns nos venenos das serpentes das Famílias *Elapidae* e *Crotalidae*. Entre as *Bothrops* entretanto, somente a *B. insularis* e sua fração PLA₂ são capazes de produzir este efeito. Para explicá-lo sugerimos que:

1) a fração PLA₂ poderia estar atuando em canais lentos de K⁺ inibindo-os. O bloqueio dos canais lentos de K⁺ por sua vez, promoveria um influxo de Ca²⁺ para o interior do terminal nervoso através de uma ativação prolongada desses canais. Essa idéia é reforçada pelo fato de experimentos realizados com essa fração, utilizando-se a técnica de "Patch Clamp" em músculo extensor longo dos dedos, terem mostrado que após adição da fração PLA₂, ocorre uma diminuição do tempo de abertura médio dos canais de K⁺ modificando a sua cinética (dados não apresentados). Explica também a dilatação das cisternas terminais do retículo sarcoplasmático, afetando secundariamente os túbulos T, observada através da microscopia eletrônica, como resultante desse distúrbio iônico,

2) poderia estar atuando diretamente em canais de Ca^{2+} no terminal nervoso ou,

3) devido à sua capacidade de lise das membranas, atuar diretamente nas organelas armazenadoras de Ca^{2+} no interior da célula muscular (mitocondrias e/ou retículo sarcoplasmático), ou

4) poderia estar atuando através da ação sinérgica dos três mecanismos acima.

Quanto ao fato de não haver diferença no tempo de bloqueio observado nas preparações de mamífero sob a estimulação direta e indireta, outros autores como GEH et al (1992) também observaram este tipo de resposta. Esses autores estudando quatro PLA_2 s do veneno de *Pseudechis australis*, verificaram que em todas não existe muita diferença no tempo de bloqueio à estimulação direta e indireta. Foi observado aumento inicial da amplitude de contração muscular de 10 a 20% nos 10 a 15 minutos iniciais, o qual evoluiu para bloqueio das respostas musculares logo em seguida. Além disso, o estudo morfológico mostrou fibras hipercontraídas e rompidas. Concluíram que estas PLA_2 s agem predominantemente na fibra muscular. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por nós, com exceção das alterações musculares que são pouco expressivas.

Neste trabalho, uma prevalência da ação pré-sináptica no desenvolvimento do bloqueio é reforçado pelo fato de músculo *biventer cervicis* de pintainho continuar sensível à adição de acetilcolina após o bloqueio das contrações musculares em resposta à estimulação elétrica.

As alterações mionecróticas desencadeadas pela fração PLA_2 nos músculos de ave incubados são aparentemente mais intensas do que as causadas pelo veneno bruto (COGO et al., 1993), embora sejam também dose-tempo-dependentes. Entretanto, essa afirmação necessita de posterior comprovação através de um estudo sistemático quantitativo que permita uma avaliação em profundidade da mionecrose e de estudo com cortes seriados e semi-seriados que possibilitem a confirmação desta hipótese.

Tal fato não ocorre quando a fração PLA_2 é injetada em músculo de ave, ("in vivo") onde as alterações morfológicas induzidas são de menor intensidade do que as

verificadas com o veneno total. Os estudos em microscopia eletrônica comprovam esta diferença. Aparentemente, a fração PLA₂ presente no veneno de *B. insularis*, nas doses utilizadas não lesou de modo marcante a fibra muscular, fato também comprovado por SELISTRE et al., (1990) que observaram alterações morfológicas somente quando doses de 100 µg foram utilizadas.

Por outro lado, quando comparados os efeitos do veneno bruto e da fração PLA₂ sobre a junção neuromuscular, estes são muito mais exuberantes sob a ação do veneno bruto. Estas alterações desorganizavam em diferentes graus o terminal nervoso, incluindo a total desnervação. Os efeitos causados pela PLA₂ (10µg - 3 horas) foram bem mais brandas.

A liberação de CQ, bem como a mionecrose dos músculos incubados, foram abolidas quando o músculo foi tratado com a mistura contendo a fração PLA₂ + soro anti-botrópico, resultados que falam a favor da capacidade neutralizante do soro sobre a fração PLA₂, que se comportaria como um dos principais fatores antigênicos presente no veneno.

MELO & SUAREZ KURTZ (1985; 1987a,b), usando músculo extensor longo dos dedos de ratos, verificaram que a prévia incubação do veneno de *B. jararacussu* ou *B. jararaca* com o soro anti-botrópico polivalente, foi capaz de inibir totalmente a liberação de CQ "in vitro" nesses músculos ao final de 160 minutos. Resultados semelhante foram observados quando usaram o soro de gambá (*Didelphis marsupialis aurita* e *Philander opossum*) (MELO & SUAREZ KURTZ, 1987a,b; 1988). FERREIRA et al., 1992 também verificaram que o soro antagoniza o efeito mionecrótico e conseqüentemente a liberação de CQ induzida por vários venenos bothrópicos injetados em camundongos.

O soro comercial também antagonizou a atividade miotóxica das PLA₂s isoladas dos venenos de *Naja naja haje*, *Naja nigricollis* e *Naja nívea*, indicando significativa proteção dos efeitos mionecróticos (MEBS, 1986).

Em nossos experimentos, o soro anti-botrópico impediu em aproximadamente 70% a liberação de CQ em músculos incubados, e em 60%, o bloqueio neuromuscular

promovido pela fração PLA₂. O antagonismo parcial determinado pelo soro anti-botrópico poderia ser explicado pela não utilização do veneno de *B. insularis* na produção do mesmo.

Assim, o bloqueio neuromuscular residual (na ordem de 40% aproximadamente) e a persistente liberação de CQ (na ordem de 30% aproximadamente) poderia provavelmente ser determinado por fatores específicos desenvolvidos pela *B. insularis*, em virtude de seu isolamento geográfico e necessidade de adaptação.

Além das lesões musculares, foram avaliadas também as alterações ultraestruturais determinadas pelo veneno e pela fração PLA₂ no terminal nervoso, nervos, músculos e microcirculação sanguínea.

O estudo ultraestrutural da junção neuromuscular em músculo da ave, mostrou que esta estrutura é pouco desenvolvida quando comparada com a de mamífero. Entretanto, HIRANO (1967) refere que essas estruturas estudadas em embriões de 20 dias "*in ovo*" são similares àquelas encontradas em aves adultas, resultados estes concordantes com estudos histoquímicos de detecção de colinesterases em termos de desenvolvimento cronológico da morfologia da junção neuromuscular (KIKUSHI & ASHMORE, 1976). Isso pode significar que as estruturas por nós observadas nos pintainhos estavam plenamente desenvolvidas como na ave adulta.

A ausência de dobras na membrana pós-juncional, pode ser explicada pelo fato de que existem em músculo de aves, receptores colinérgicos extrajuncionais, ao longo de toda fibra muscular, fato que confere a estes músculos, a sensibilidade suficiente para exercer a sua função. GOLDER et al (1977) constataram atividade acetilcolinesterásica em vários locais do músculo *pectoralis*, incluindo o envelope nuclear, retículo sarcoplasmático, membrana plasmática e mesmo em sítios extracelulares.

O espessamento do sarcolema junto ao terminal nervoso foi o sinal mais evidente na intimidade entre o botão sináptico e a célula muscular. Esse espessamento também foi observado por HIRANO et al (1967) e KIKUGHI & ASHMORE (1976).

As alterações ultraestruturais de vasos foram traduzidas pela formação de trombos e degeneração das células endoteliais, ocasionando extravasamento de hemácias e outros elementos figurados do sangue, além de presença de depósitos de fibrina na luz e acolados ao revestimento endotelial.

De acordo com OWNBY et al (1983), a hemorragia pode ocorrer através de dois processos: 1) pela passagem da hemácia entre a junção das células endoteliais, classificadas como hemorragia "*per diapedesis*" ou 2) pela degeneração da membrana da célula endotelial e conseqüente extravasamento de hemácias através do endotélio degenerado, classificada como hemorragia "*per rhexis*". Os resultados obtidos sugerem fortemente que a hemorragia causada pelo veneno de *B. insularis* ou pela fração PLA₂ é principalmente "*per rhexis*", ou seja, devido à degeneração da membrana da célula endotelial.

O desarranjo da bainha de mielina, juntamente com as alterações no terminal nervoso, apontam para um fator neurotóxico de ação pré-juncional presente neste veneno. O fato de 1 µg de veneno determinar bloqueio das contrações musculares em apenas 70 minutos, sem correspondente liberação de CQ (COGO et al., 1993; CRUZ-HOFLING et al., 1990a, 1993), corrobora a idéia de que o bloqueio não é diretamente dependente das alterações morfológicas induzidas pelo veneno total.

As alterações estruturais induzidas pelo veneno de *B. insularis* exibem aspectos que lembram as alterações estruturais causadas pelo veneno de *B. jararacussu* (SANTO-NETO, 1987). Assim, ambos os venenos determinam desorganização das miofibrilas, entumescimento das mitocôndrias, do sistema retículo sarcoplasmático e o aparecimento de regiões de hipercontração. Entretanto, o veneno de *B. insularis* determina hemorragia e lesões a nível de vasos e terminal nervoso, estruturas estas que se mostraram resistentes à ação do veneno de *B. jararacussu*.

Já as alterações ultraestruturais induzidas "*in vivo*" pela fração PLA₂, não foram tão intensas quanto as do veneno total de *B. insularis*. O retículo sarcoplasmático mostrou-se dilatado, o que significa que a fração PLA₂ afeta as membranas internas. GUTIÉRREZ et al., (1987) verificaram que a fração PLA₂

miotóxica da *B. asper*, afeta também a membrana do retículo sarcoplasmático assim como a das mitocôndrias. Não se sabe se a miotoxina da *B. asper* atua no RS diretamente ou se este efeito é resultante de uma ação secundária (GUTIÉRREZ, et al., 1987). Estes autores estudando a atividade Ca^{2+} ATPásica do RS, verificaram decréscimo de 50% na sua atividade. Concluíram que a miotoxina atua não só funcionalmente (inibindo a ATPase) mas também na integridade do RS. BRENES et al, 1987 verificaram que o sítio de ligação da miotoxina isolada da *B. asper* é o sarcolema. A observação a nível ultraestrutural mostrou densos depósitos na membrana celular, não havendo entretanto ligação com organelas intracelulares. Desde que o RS e as mitocôndrias são organelas estocadoras de Ca^{2+} e este íon desempenha importante papel na homeostasia celular, a sua degeneração, certamente contribui para os danos celulares observados. Entretanto, na observação ultraestrutural realizada por nós com a fração PLA_2 do veneno de *B. insularis*, não verificamos rompimento da membrana do RS. Nossos resultados sugerem que a atividade da fração PLA_2 em mobilizar o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seja a responsável pela hipertrofia do retículo sarcoplasmático e pela presença de mitocôndrias lesadas no interior do terminal nervoso motor.

A exemplo do que ocorreu com o veneno total de *B. jararacussu*, muitos dos efeitos induzidos pela PLA_2 do veneno de *B. insularis* são também semelhantes aos causados pela miotoxina do veneno de *B. asper* (ARROYO & GUTIÉRREZ, 1981), com a diferença de que este último não afeta nervos e vasos (GUTIÉRREZ et al, 1984b). As alterações observadas em nervos são comparáveis àquelas induzidas pela CTx nos músculos sóleo e diafragma (GOPALAKRISNAKONE & HAWGOOD, 1984). Constituem em rompimento das cristas mitocondriais e retração do axoplasma da mielina.

Nossos resultados sugerem a inclusão da fração com atividade PLA_2 isolada do veneno de *B. insularis* no grupo 2, juntamente com outras neurotoxinas pré-sinápticas. De forma semelhante à CTx, já em pequenas doses, esta fração promove aumento dos p.m.p.t., aumento inicial da amplitude das contrações musculares e em

doses maiores e mais tardiamente a necrose da fibra muscular. É possível que estes efeitos estejam ligados à presença de mais de uma fosfolipase (ou mais de uma isoforma).

Para terminar, a correlação entre o efeito pré-sináptico e a ação enzimática, que demonstramos tanto para o veneno total como para a fração PLA_2 , jamais foi descrita para peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. A possibilidade de que outros venenos botrópicos também possuam estes componentes justifica a continuidade destes estudos.

ABSTRACT

Two fractions with phospholipase A₂ (PLA₂) activity were isolated from the venom of *Bothrops insularis* by gel filtration on Sephadex G-75 equilibrated with 50 mM ammonium formate buffer, pH 3.5 (acidic fraction) and on Sephadex G-150 equilibrated with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 (neutral fraction). The latter fraction was further purified by ion exchange chromatography on a DEAE-Sephadex column equilibrated with 0.1 M ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0.

The PLA₂ fraction obtained by gel filtration at pH 3.5 had a low pharmacological potency while that isolated at neutral pH was able to reproduce all the pharmacological responses caused by the whole venom. These effects were entirely attributable to the PLA₂ action of the fractions and not to the presence of any coagulant, esterolytic or caseinolytic activity.

Based on electrophysiological and myographic studies, together with the measurement of serum creatine kinase (CK) levels and the histological examination of muscles incubated with whole venom and the isolated PLA₂, the following conclusions can be drawn:

1. The PLA₂ fraction obtained at neutral pH induced neuromuscular facilitation, including an increase in the amplitude of muscle contraction and in the frequency of miniature end plate potentials, followed by a dose-dependent and irreversible blockade of the contractions. In contrast, the PLA₂ fraction obtained at acidic pH caused facilitation of neurotransmission but no neuromuscular blockade.

2. The ability of a low incubation temperature and the substitution of Ca²⁺ by Sr²⁺ in the physiological solution to inhibit the neuromuscular blocking effects of the PLA₂ fraction suggests a hitherto undescribed correlation between the enzymatic and pharmacological activities of this and other *Bothrops* venom.

3. The PLA₂ fraction was able to release CK from chick *biventer cervicis* muscles in agreement with the muscle damage observed by the both light and electron microscopy.

4. Commercial anti-bothropic antiserum only partially neutralized the release of CK and the neuromuscular blockade. Such partial neutralization suggests the presence of specific components not present in the venoms of the *Bothrops* species normally used for immunization protocols. This difference also emphasizes the high degree of specialization and speciation attained by *B. insularis* compared to other *Bothrops* species.

5. The ultrastructural changes caused by the whole venom involved the neuromuscular junction, the myelinated axons and the muscle fibers. In addition, there were vascular and vasculotoxic alterations which subsequently lead to hemorrhage.

6. The ultrastructural changes caused by the PLA₂ fraction were less marked than those induced by the whole venom but still involved the presynaptic region and muscle. In the latter, the most important alterations occurred in the sarcoplasmic reticulum (probably via ionic disturbances), the T tubules (to a lesser extent), and the myofibrillar organization. The number of necrosed muscle cells was less than that observed with whole venom. On the other, the degree of hemorrhage appeared to be greater.

REFEÊNCIAS

- ALAGON, A. C.; MOLINAR, R. R.; POSSANI, L. D.; FLETCHER, J. R. P.; CRONAN, J. R. & JULIA, J. Z. Venom from the snake *Bothrops asper*. **GERMAN BIOCHEM. J.** **185**: 695-704, 1980.
- AMORIM, M. F.; MELLO, R. F. & SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico **MEM. INST. BUTANTAN** **23**:63-108, 1951.
- ARROYO, O. & GUTIERREZ, J. M. Estudio ultraestructural de la mionecrosis inducida en raton por el veneno de terciopelo (*Bothrops asper*) de Costa Rica. **TOXICON** **19**:773-782, 1981.
- BHAT M. K. & GOWDA, T. V. Purification and characterization of a myotoxic phospholipase A2 from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **TOXICON** **27**: 861-873, 1989.
- BON, C.; CHANGEUX, J. P.; JENG, T. W. & FRAENKEL-CONRAT, H. Post-synaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **EUR. J. BIOCHEM.** **99**:471-481, 1979.
- BRADLEY, R. J.; EDGE, M. T. & CHAU, W. C. The alfa-neurotoxin erabutoxin b cause fade at the rat end-plate. **EUR. J. PHARMACOL.** **176**:11-21, 1990.
- BRANDEBURGO, M. I. H.; 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.
- BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* PLA2 and crotoxin complex. **TOXICON** **14**:221, 1976
- BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K & HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotapotin and basic crotalus phospholipase A2. **EUR. J. BIOCHEM.** **49**:333, 1974.
- BRENES, F.; GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. **TOXICON** **25**: 574-577, 1987.
- BULBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation on the rat. **BRIT. J. PHARMACOL.** **1**:38, 1946.
- BUTRÓN, E.; GUTIÉRREZ, J. M. & THELESTAM, M. Effects of *Bothrops asper* (Terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A2 on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **TOXICON** **31**: 217-222, 1993.
- CHANG, C. C. Neurotoxins with PLA2 activity in snake venoms. **PROC. NATN. SCI. COUNC. B.** 126-142, 1985.
- CHANG, C. C. & LEE, C. Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. **ARCH. INT. PHARMACODYN THÉR.** **144**:241-257, 1963.

- CHANG, C. C. & TSENG, K. H. Effect of crostamine, a toxin of South American rattlesnake venom on the sodium channel of murine skeletal muscle. **BR. J. PHARMACOL.** **63**:551-559, 1978.
- CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M. & BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **TOXICON** **30**:1099-1109, 1992.
- CHAVES F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. & CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **TOXICON** **27**:1085-1093, 1989.
- CINTRA, A. C. D.; LAURE, O. B.; PRADO-FRANCESCHI, J. & GIGLIO, J. R. Bradykinin potentiating peptides from the venom of *Bothrops insularis*. Isolation and primary structure. **ARQ. BIOL. TECNOL.** **27**:248, 1984.
- COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO A. P. & RODRIGUES SIMIONI, L. Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **TOXICON** **31**:1237-1247, 1993.
- COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J. & RODRIGUES SIMIONI, L. Efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops insularis* na preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo. **MEM. INST. BUTANTAN** **52**:78, 1990a.
- COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. The effects of *B. insularis* venom on isolated nerve muscle preparation **TOXICON** **28**:605, 1990b.
- CRUZ-HOFLING, M. A.; COGO, J. C. & RODRIGUES-SIMIONI, L. Vascular changes induced by *Bothrops insularis* venom. **TOXICON** **31**:97, 1993.
- CRUZ-HOFLING, M. A.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCERSCHI, J. Morphological effects of *B. insularis* venom on chick pectoral muscle. **TOXICON** **28**:605, 1990a.
- CRUZ-HOFLING, M. A.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J. Morphological effects of *B. insularis* venom on chick pectoral muscle. In: **THIRD PAN-AMERICAN SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS**. Oaxtepec, Morelos State - México, 1990b., p.55.
- DREYER, F. Peptide toxins and potassium channels. **REV. PHYSIOL. BIOCHEM. PHARMAC.** **115**:93-136, 1990.
- DREYER, F. & PENNER, R. The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of a mouse motor nerve terminals. **J. PHYSIOL. (Lond.)** **386**:455-463, 1987.
- DUPONT, J. Catalytic properties of two phospholipases A from cobra (*Naja nigricollis*) venom. **TOXICON** **15**:347-354, 1977.

- EBASHI, S.; TOYOKURA, Y.; MOMOI, H. & SUGITA, H. High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. **J. BIOCHEM. (Tokyo)**, **46**:103, 1959.
- ESQUERDA, J. E.; SOLSONA, C. & MARSAL, J. Binding of beta-bungarotoxin to Torpedo electric organ synaptosomes. A high resolution autoradiographic study. **NEUROSCIENCE** **7**:751-758, 1982.
- EXCELL, B. J. Experiments on synaptic transmission using the frog sartorius nerve-muscle preparation. **EXP. IN PHYSIOL. AND BIOCHEM.** **3**:211-232, 1970.
- FERREIRA, L. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. & MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **TOXICON** **30**:1591-1602, 1992.
- FOHLMAN, D.; EAKER, D.; KARLSSON, E. & THESLEFF, S. Taipotoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. **EUR. J. BIOCHEM.** **68**:457, 1976.
- GEH, S.L.; ROWAN, E.G & HARVEY, A.L. Neuromuscular effects of four PLA₂ from the venom of *Pseudechis australis*. The Australian King Brown snake. **TOXICON** **30**:1051-1057, 1992.
- GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. The isolated chick *biventer cervicis* nerve muscle preparation. **BRIT. J. PHARMACOL.**, **15**:410, 1960.
- GLASER, K. B.; MOBILIO, D.; CHANG, J. Y. & SENKO, N. Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. **TIPS** **14**:92-98, 1993.
- GOLDER, T. K.; NIEBERG P. S. & WILSON B. W. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in cultured cells-II Cycloheximide treated embryo muscle **J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.** **25**:376-383, 1977.
- GOPALAKRISHANAKONE, P.; DEMPSTER, D. W.; HAWGOOD, B. J. & ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **TOXICON** **22**:85-98, 1984.
- GOPALAKRISHANAKONE, P. & HAWGOOD, B.J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **TOXICON** **22**:791-804, 1984.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ARCE, V.; BRENES, F. & CHAVES, F. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of snake *Bothrops asper*. **EXPER. MOLEC. PATHOL.** **52**:25-36, 1990.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O. & BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **TOXICON** **18**:603-610, 1980.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O. & PORTILLA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **TOXICON** **19**:493-500, 1981.

- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENÉ, J. A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z. & SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **TOXICON** 27:735-745, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; MATA, E. & CERDAS, L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **TOXICON** 24:223-231, 1986a.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. & CERDAS, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **TOXICON** 24:885-894, 1986b.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. & ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. **TOXICON**, 22: 115-128, 1984a.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, L. & ODELL, G. V. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (fer-de-lance). **TOXICON**, 22:719-731, 1984b.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, A. & CERDAS, L. Effects of a myotoxic Phospholipase A2 isolated from *Bothrops asper* venom on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **TOXICON** 25:1244-1248, 1987.
- HABERMANN E. & BREITHAUP, H. Mini-review. The crotoxin complex: an exemple of biochemical and pharmacological protein complementation. **TOXICON** 16:19-30, 1978.
- 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, 1975.
- HALPERT, J.; EAKER, D. & KARLSSON, E. The role of phospholipase activity in the action of presynaptic neurotoxin from the venom of *Notechis scutatus scutatus* (Australian tiger snake). **FEBS Lett.** 61:72, 1976.
- HAMES, B.L. & RICKWOOD, D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: **GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEIN: A PRATICAL APPROACH.** (Hmes, B.D. and Rickwood, D Eds.) Oxford. IRL Press, England, 1982, p.2-91.
- HANAHAN J.D. Phospholipases In: **THE ENZYMES** (Boyer, P.D. Eds.) Vol. 5, 1971, p. 71-85.
- HARRIS, J. B. Polypeptides from Snake Venoms which act on nerve and muscle. In: **PROGRESS IN MEDICAL CHEMISTRY** (Ed. G.P.Ellis and G.B. West. Elsevier Science Publishers B.V.), 1984, vol. 21, p. 65-109..
- HARRIS, J. B.; JOHNSON, M.A. & KARLSSON, E. Pathological response 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. PHARMAC. PHYSIOL.** 2:383-404, 1975.
- HARRIS, J. B. & MACDONNEL, C. A. Phospholipase A2 activity of notexin and its role in muscle damage. **TOXICON** 19:419-425, 1981.

- HARRIS, J. B. & MALTIN, C. A. Myotoxic activity of crude venom and the principal neurotoxin, taipotoxin of the Australian taipan *Oxyuranus scutellatus*. **BR. J. PHARMACOL.** 76:61-75, 1982.
- HARVEY, A. L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, A.; 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** 32:257-265, 1994.
- HARVEY, A. L. & KARLSSON, E. Polypeptide neurotoxins from mamba venoms that facilitate transmitter release. **TIPS February**:71, 1984.
- 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 preparation. **TOXICON**, 20:379-396, 1982.
- HARVEY, A. L. & RODGER, I. W. Reversibility of neuromuscular blockade by toxins isolated from the venom of the seasnake *Laticauda semifasciata*. **TOXICON** 16:219-225, 1978.
- HARVEY, A. L. & TAMIYA, N. Phospholipase A and neuromuscular blocking activities of components from the venom of the seasnake *Laticauda semifasciata*. In: **INT. CONGR. PHARMAC.** 7th, Paris, 1978, p. 371.
- HARVEY, A. L. & TAMIYA, N. Role of phospholipase A activity in the neuromuscular paralysis produce by some components isolated from the venom of the seasnake *Laticauda semifasciata*. **TOXICON** 18:65-69, 1980.
- HATREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **ANAL. BIOCHEM.** 48:422-427, 1972
- HAWGOOD, B. J. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: **RATTLESNAKE VENOMS.** Their Actions and Treatments, (Tu, A.T., Ed.). New York: Marcel Dekker, 1982, p. 121.
- HAWGOOD, B. J. How similar are the actions of crotoxin and β -Bungarotoxin? **ACTA PHYSIOL. PHARMACOL. LATINOAM.** 39:397-406, 1989.
- HAWGOOD, B. J. & SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. **NEUROSCIENCE** 4:293-303, 1979.
- HAWGOOD, B. J. & SMITH, J. The mode of action at the neuromuscular junction of the Phospholipase A2 crotoxin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. **BR. J. PHARMAC.** 61: 597-606, 1977.
- HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDERBURGO, 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 preparation. **TOXICON** 30:1203-1210, 1992.
- HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **PROC. NATN. ACAD. SCI. USA** 68:1560-1563, 1971.

- HIDER, R. C. & KHADER, F. Biochemical and pharmacological properties of cardiotoxin isolated from cobra venom. **TOXICON** 20: 175-179, 1982.
- HIRANO, H. Ultrastructural study on the morphogenesis of the neuromuscular junction in the skeletal muscle of the chick. **ZEIT. ZELLFORSCH.** 79: 198-208, 1967.
- HO, C. L. & LEE C. Y. Presynaptic actions of mojave toxin isolated from mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom. **TOXICON** 19:889-892, 1981.
- HO, L. C.; KO, J. L. & LEE C.Y. Deferences in pharmacological actions between b-Bungarotoxin and other neurotoxic Phospholipases A2 purified from snake venoms. **PROC. NATL. SCI. COUNC. B. ROC** 10: 196-202, 1986a.
- HO, C. L.; TSAI, I. H. & LEE, C. Y. The role of enzyme activity and charge properties on the presynaptic neurotoxicity and the contrature-inducing activity of snake venom Phospholipase A₂. **TOXICON** 24:337-345, 1986b.
- HOMMA, M. & TU, A.T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **BR. J. EXP. PATH.** 52:538-544,1971.
- HUMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymothypsin and thrombin. **CANAD. J. BIOCHEM.** 37:1393,1959.
- ITZHAKI R. F. & GILL, M. D. A micro-biuret method for estimating proteins. **ANAL. BIOCHEM.** 9:401-410, 1964.
- JUANG, R. H.; CHANG Y. D.; SUNG, H. Y. & SU, J. C. Oven-drying method for polycrylamide gel slab placked in cellophane sandwich. **ANAL. BIOCHEM.** 141:348-350, 1984.
- KIKUSHI, T. & ASHMORE C. R. Developmental aspects of the innervation of skeletal muscle fibers in the chick embryo. **CELL. TISS. RES.** 171:233-251, 1976.
- KINI, R. M. & IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. **TOXICON** 24: 527-541,1986a.
- KINI, R. & IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipase-II; charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **TOXICON** 24: 895-905, 1986b.
- KOUYOUMDJIAN J. A.; HARRIS, B. J. & JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **TOXICON** 24: 575-583, 1986.
- KUNITZ, M. Crystallinesoybean trypsin inhibitor. II general properties. **J. GEN. PHYSIOL.** 30:291, 1947.
- LEE, C. Y.; CHANG, C. C.; CHIU, T. H.; TSENG, T. C.; & LEE, S. Y. Pharmacological properties of cardiotoxin isolated from the venom of *Naja naja atra*. **MEM. INST. BUTANTAN** 33:1009, 1966.
- LEE C. Y. & HO, C. L. Cardiotoxin-like action of a basic phospholipase A isolated from *Naja nigricollis* venom. **TOXICON** 15:355-356, 1977.
- LEE C. Y. & HO, C. L. The pharmacology of phospholipase A2 isolated from snake venoms with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. **ADV. PHARMACOL. THER.** 4:37-52, 1984.

- LEE C. Y.; HO, C. L. & BOTESE, D. P. Site of action of caudoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ from the horned puff adder (*Bitis caudalis*) venom. **TOXICON** 20:637-647, 1982.
- LIN, S. Y.; HUANG, M. C. & LEE, C. Y. Mechanism of action of Cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. **J. PHARMACOL. EXP. THER.** 196:758-770, 1976.
- LOBO-ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J. Efeitos na junção neuromuscular do veneno de *Bothrops lanceolatus*. **MEM. INST. BUTANTAN** 52:77, 1990a.
- LOBO-ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Comparison of the phospholipase A₂, blood-clotting, caseinolytic, estereolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. In: **PAN-AMERICAN SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS.** 3, Oaxtepec, 1990. **TOXICON** 28(6):601, 1990b.
- LOBO-ARAÚJO, A. & RADVANY, F. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. **TOXICON** 25:1181-1188, 1987.
- LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **TOXICON** 27:725-733, 1989.
- MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P. & ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **TOXICON** 20:955-972, 1982.
- MANJUNATHA K. R. & EVANS, J. E. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **TOXICON** 27:613-635, 1989.
- MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **INT. J. BIOCHEM.** 1:335, 1970.
- MEBS, D. Myotoxic activity of phospholipases A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms **TOXICON** 24:1001-1008, 1986.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M. & D SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **TOXICON** 21:393-404, 1983.
- MEBS, D. & SAMEJIMA, J. Purification from Australian elapid venoms, and properties of phospholipase A which cause myoglobinuria in mice **TOXICON** 18: 443-454, 1980.
- MEBS D. & SAMEJIMA, Y. Isolation and characterization of myotoxic phospholipase A₂ from crotalid venoms. **TOXICON**, 24:161-168, 1986.
- MELO, P. A. & SUAREZ KURTZ, G. Effects of polyanions on the stimulation of sarcoplasmic enzyme release induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BRAZ. J. MED. BIOL. RES.** 18:754, 1985.

- MELO, P. A. & SUAREZ KURTZ, G. Inibição pelo soro de marsupiais dos efeitos de venenos botrópicos na liberação de enzimas sarcoplasmática em músculos esqueléticos. **AN. ACAD. BRAS. CI.** 59:137, 1987a.
- MELO, P. A. & SUAREZ KURTZ, G. Interaction of *Bothrops* venom and antivenin in the release of Creatine Kinase from skeletal muscle. **BRAZ. J. MED. BIOL. RES.** 20:821-824, 1987b
- MELO P. A. & SUARES KURTZ G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **TOXICON** 26:87-95, 1988.
- MORENO, E. & GUTIÉRREZ, J. M. Body distribution of *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. **TOXICON** 26:403-409, 1988.
- MOURA DA SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G & THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **TOXICON**, 29:713-723, 1991.
- NISENBON, H. E.; SEKI, C. & VIDAL, J. C. Phospholipases A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **TOXICON** 24:259-272, 1986.
- OWNBY, C. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; GOLBERG, T. R. & ODELL, G. V. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin A from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **TOXICON** 20: 877-885, 1982.
- OWNBY, C. L.; ODELL, G. V.; WOODS W. M.; & GOLBERG, T. R. Ability of antiserum to myotoxin A from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myotoxicity and lethal effects of myotoxin A and homologous crude venom. **TOXICON** 21:35-45, 1983.
- PELEGRINI, A. F.; VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D. & LAURE, C. J. The action of crotamine on skeletal muscle: an electrophysiological study. In: **TOXINS ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL** (Proceedings of the Fifth International Symposium) (P. ROSENBERG Ed.) Pergamon Press, Oxford and New York 1978, p. 375-381.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. & MANDELBAUM, R. F. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **TOXICON** 23:341-345, 1985.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **TOXICON** 22:339-346, 1984.
- RIBEIRO, L. & JORGE, M. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **REV. INST. MED. TROP.** 32:436-442, 1990.

- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESSE, N. & CECCARELLI, B. N. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve muscle preparation. **NEUROSCIENCE** 10:475-489, 1983.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; COGO, J. C.; ASSAKURA, M. T. & MANDELBAUM, F. R. Muscular-blocking activity of *Bothrops moojeni* venom and its active fractions. **MEM. INST. BUTANTAN** 52:77, 1990.
- ROSENBERG, P. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: **NATURAL TOXINS** (Harris, J.B. Ed.) Oxford, Calendom Press., 1986, p. 129-179.
- ROSENBERG, P. Phospholipases. In: **HANDBOOK OF TOXINOLOGY** (Shier, W.T. and Mebs, D. Eds.) New York, Mercel Dekker. 1990, p.67-277.
- ROWAN, E. G.; HARVEY, A. L.; TAKASAKI, C. & TAMIYA, N. Neuromuscular effects of three Phospholipases A₂ from the venom of the Australian king brown snake *Pseudechis australis*. **TOXICON** 27:551-560, 1989.
- RUBSAMEN, K.; BREITHAPUPT, H. & HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. **NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCH. PHARMAKOL.** 270:274, 1971.
- RUSSEL, F. E. The use of venoms and venom fractions in medicine and biology. **TOXICON** 15:267-269, 1977.
- SANCHES, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; COTTA-AGOSTINI, G. & DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. **TOXICON** 30:95-103, 1992.
- SANTO-NETO, H. Aspectos morfológicos das alterações musculares produzidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e seus componentes: Estudos em microscopia óptica e eletrônica. Tese doutorado. USP - SP., 1987:121p.
- SELISTRE, H. S. & GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhõa). **TOXICON** 25:1135-1144, 1987.
- SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P. & GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhõa) snake venom. **TOXICON** 28:261-273, 1990.
- SIMPSON, L.; LAUTENSLAGER, G. T.; KAISER, I. & MIDDLEBROOK, J. L. Identification of the site at which phospholipase A₂ neurotoxins localizate to produce their neuromuscular blocking effects. **TOXICON** 31:13-26, 1993.
- SLOTTA, K. & FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **MEM. INST. BUTANTAN** 12:505, 1938/39.

- STRONG, P. N. Potassium channel toxins. **PHARMAC. THER.** **46**:137-162, 1990.
- STRONG, P. N.; HEUSER, J. E. & KELLY, R. B. Selective enzymatic hydrolysis of nerve terminal phospholipids by beta-bungarotoxin: biochemical and morphological studies. **PROG. CLIN. BIOL. RES** **15**:227-249, 1977
- SU, M. J. & CHANG, C. C. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A₂ activity (β -Bungarotoxin, Taipotoxin, Crotoxin) **TOXICON** **22**: 631-640, 1984.
- SVASTI, J. & PANIJAN B. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, a simple explanation of why it works. **J. CHEM. EDUC.** **54**:560-562, 1977.
- VIDAL, J. C.; BADANO, B. N.; STOPPANI, O. M. & BOVERIS, A. Inhibition of electron transport chain by purified phospholipase A from *Bothrops newiedi* venom. **MEM. INST. BUTANTAN** **33**: 913-920, 1966.
- VIDAL, J. C.; MOLINA, H.; STOPPANI, A. O. M. A general procedure for the isolation and purification of phospholipase A isoenzymes from *Bothrops* venoms. **ACTA PHYSIOL. LATINOAM.** **23**:91-109, 1972.
- VIDAL, J. C.; & STOPPANI, A. O. M. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.** **145**:543-556, 1971.
- VILLARROEL, M. S.; ZELANTE, F.; ROSA, R. R. & FURLANETTO, R. S. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *B. jararaca*. **MEM. INST. BUTANTAN** **42/43**:345-355, 1978/79.
- VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the south American rattlesnake venom. **J. FORMOSIAN. MED. ASSOC.** **71**:394-400, 1972.
- VITAL-BRAZIL, O. Peçonhas. In: **COBERT - FARMACODINÂMICA** (Guanabara Koogan Ed.), 6 ed., Rio de Janeiro, 1982. p. 1044.
- VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American ratlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. PHISYOL.** **212**:34-35, 1971.
- VITAL BRAZIL, O.; FARINA, R.; YOSHIDA, L. & OLIVEIRA, V. A. Pharmacology of crystalline crotoxin. III Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and *Crotalus durissus terrificus* venom. **MEM. INST. BUTANTAN**, **33**:993-1000, 1966.
- WAHLSTROM, A. Purification and characterization of phospholipase A from the venom of *Naja nigricollis*. **TOXICON** **9**:45, 1971.
- ZAN, T. P.; CONDREA, E.; YANG, C. C. & ROSEMBERG, P. Phospholipid hydrolysis in serum lipoproteins by a basic phospholipase A₂ from *Naja naja nigricollis* snake venom and an acid phospholipase A₂ from *Naja naja atra* snake venom. **TOXICON** **21**:481-490, 1983.



José Carlos Gogo