

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA - DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Luis Alberto Ponce Soto

**Estudos Estrutura-Função de neurotoxinas isoladas de veneno
crotálico e botrópico**
Análise comparativa da neurotoxicidade e miotoxicidade

Este exemplar corresponde à redação da
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

LUIS ALBERTO PONCE SOTO

e aprovada pela Comissão Julgadora:

Sergio Marangoni

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular – Área de Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni

Campinas - SP

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP.**

P773e

Ponce-Soto, Luis Alberto

Estudos estrutura-função de neurotoxinas isoladas de veneno crotálico e botrópico: análise comparativa da neurotoxicidade e miotoxicidade / Luis Alberto, Ponce-Soto. - Campinas, SP. [s.n.], 2005.

Orientador: Sérgio Marangoni
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Agentes neurotóxicos. 2. Fosfolipase A₂. 3. Veneno - purificação. 4. Crotoxina. 5. Jararaca (cobra). I. Sérgio Marangoni. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em ingles: Structure-functionn study of neurotoxins purified of crotalic and bothropic venom: Comparative analysis of the neurotoxicity and myotoxicity.

Palavras-chave em inglês: neurotoxic agents, phospholipase A₂, venom – purification, crotoxin, Bothrops.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutorado

Banca examinadora: Sérgio Marangoni, Hiroshi Aoyama, Daniela Diógenes de Carvalho, Albetiza Lobo de Araújo, José Carlos Cogo.

Data da defesa: 30/05/2005.

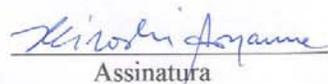
LOCAL E DATA: Campinas, 30 de maio de 2005.

BANCA EXAMINADORA

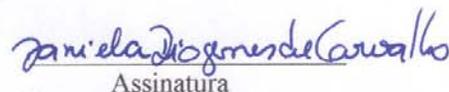
Prof. Dr. Sérgio Marangoni (Orientador)


Assinatura

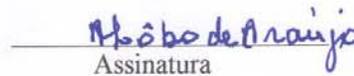
Prof. Dr. Hiroshi Aoyama


Assinatura

Profª. Dra. Daniela Diógenes de Carvalho


Assinatura

Profª. Dra. Albetiza Lobo de Araújo


Assinatura

Dr. José Carlos Cogo


Assinatura

Profª. Dra. Ana Maria Moura da Silva

Assinatura

Profª. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Assinatura

A Deus pelo dom da Vida.

A Gladis, minha esposa e amiga querida cuja fibra, empenho, e principalmente sua espiritualidade foram imprescindíveis em todos os momentos, suportando com paciência nossa separação, esquecendo distância, para que esse empreendimento se tornasse realidade. Te amo.

A meus filhos Emilio e Angélica cuja existência motivaram e incentivaram a realização deste trabalho. Deus os abençoe.

Aos meus pais Emilio e Felicita, minha irmãs Eliana e Diana e meus sobrinhos Diego e Totito, por um ideal.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, Prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (UNICAMP), a quem devo meu início nos caminhos da pesquisa, pela paciência, como meu orientador no mestrado e doutorado, pela confiança e ter me dedicado sua grande amizade.

Ao Prof. Dr. José Maria Gutiérrez, pela críticas e conselhos na preparação desta tese e dos trabalhos, por ter me acolhido no laboratório de sua responsabilidade do Instituto Clodomiro Picado da Universidade de Costa Rica, pelos ensinamentos na nova abordagem das fosfolipasas A_2 miotóxicas de ação local e sistêmica, grande amizade, que com toda sua humildade e aguçada inteligência influenciaram a minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Bruno Lomonte Vigliotti, pela valiosa contribuição nos estudos de citotoxicidade induzida pelas PLA_2 D49 e K49 no Instituto Clodomiro Picado da Universidade de Costa Rica, incentivo constante e sobre tudo pela confiança e amizade. Pela oportunidade de permitir-me compartilhar junto ao Prof. Dr. Irmgard Merfort do Instituto de Biologia Farmacológica, Albert Ludwigs da Universidade de Freiburg, da Alemanha, os estudos da Dra. Vitelbina Nuñez Rangel do Programa de Ofidismo da Faculdade de Medicina, da Universidade de Antioquia em Medellin, da Colômbia do efeito inibitório de fosfolipasas A_2

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela inestimável ajuda na realização desta tese, pelo companheirismo e amizade.

A Prof. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pela valiosa contribuição nos estudos de neuroxicidade, pela sua paciência, apoio moral e incentivo constante dados à minha vida acadêmica e sobre todo pela confiança e sua amizade.

Aos Profs. Drs. Hiroshi Aoyama, Daniela Diógenes de Carvalho, Albetiza Lobo de Araújo e José Carlos Cogo por terem aceitado o convite para participar da minha banca examinadora, e valorizado assim o meu trabalho.

Aos técnicos e amigos meus: Paulo Aparecido Baldasso e Marino Forner, pelo apoio técnico constante, amizade e confiança.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite, pelo suporte técnico nos estudos de neurotoxicidade, bem como todos meus companheiros do laboratório da junção neuromuscular, da farmacologia.

A meus amigos e colegas do Laboratório de Química de Proteínas: José Antonio da Silva, Vera Lúcia, Fabio Henrique, Eduardo Brito dos Santos, Frey Francisco, Daniel Martins (Java), Bruno Meneses, Flavia, Diego, Mirella, Ana Paula, Dulcinéia, Gláucia, Daniela Beghini, Daniela Damico, Adriana.

A todas aquelas pessoas que me apoiaram, opuseram, alentaram, desanimaram, acreditaram e duvidaram da culminação deste trabalho. Porque entendo que todo sucede por algum motivo.

Índice

	Pag.
I Introdução	01
1.1 Ofidismo	01
1.2 Neurotoxinas	03
1.3 Transmissão Neuromuscular	03
1.4 Inibidores da Condução	04
1.5 Inibidores da Transmissão Sináptica	04
1.5.1 Toxinas Pré-sinápticas	04
1.5.1.1 Estrutura Molecular das β -neurotoxinas	08
1.5.2 Toxinas Pós-sinápticas	09
1.6 Neurotoxinas: Ferramentas Moleculares	10
1.7 O veneno Crotálico	11
1.7.1 <i>Crotalus durissus</i>	11
1.8 O veneno Botrópico	15
1.8.1 <i>Bothrops jararacussu</i>	15
1.8.2 <i>Bothrops alternatus</i>	16
1.9 Fosfolipasas A ₂	19
1.10 Função da atividade enzimática nos efeitos farmacológicos das PLA ₂	23
II Objetivos	25
III Matérias e Métodos	26
3.1 Animais	26
3.2 Venenos e Reagentes	26
3.3 Purificação de toxinas a partir do veneno total de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> , <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Bothrops jararacussu</i> , <i>Bothrops alternatus</i>	26
3.3.1 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC	26
3.3.2 Cromatografia de troca iônica em LC	26
3.3.3 Cromatografia de fase reversa em HPLC	27
3.4 Eletroforese em PAGE-SDS	27
3.5 Determinação da atividade PLA ₂	27
3.6 Análise de aminoácidos	28
3.7 Determinação da estrutura primária	28
3.7.1 Redução e Carboximetilação	28
3.7.2 Digestão enzimática e purificação dos fragmentos peptídicos	28
3.7.3 Seqüenciamento N-terminal	29
3.8 Análise por Espectrometria de Massa por Maldi-Tof	29
3.9 Medida da atividade neurotóxica em nervo frênio-diafragama isolado de camundongo	29
3.10 Medida da atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho	30
3.11 Estudo eletrofisiológico	30
3.11.1 Registro de potencial de membrana ou repouso	31
3.12 Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados intramuscular (mitoxicidade local) e intravenosa (miotoxicidade sistêmica) com a PLA ₂ D49 F ₆ de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> e á Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i> (atividade miotóxica)	31
3.13 Determinação da atividade inflamatória da fração Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i>	32
3.14 Determinação do efeito citotóxico em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12) da PLA ₂ D49 F ₆ de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> e fração Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i>	32
3.15 Determinação da dose letal 50% DL ₅₀	33
3.16 Análise estatística	33
IV Resultados	34

4.1	Purificação da fração V a partir do veneno total de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> e <i>Crotalus durissus terrificus</i> (branco e amarelo), em coluna de exclusão molecular Protein Pack 300SW (Waters) em HPLC	34
4.2	Re-purificação da fração V-1 a partir da fração V obtida do veneno total de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em uma coluna μ -Bondapak C-18 (0,78 X 30 cm) preparativa de fase reversa acoplada a um sistema de HPLC (Waters)	34
4.3	Análise de aminoácidos da fração V-1 de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	35
4.4	Determinação da massa molecular por Espectrometria de Massa (MALDI Tof) da fração V-1 de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	36
4.5	Estudo da atividade neurotóxica na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC) da fração V-1 de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	37
4.6	Estudo da atividade neurotóxica na preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho da fração V-1 de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	40
4.7	Análises de aminoácidos dos componentes da crotoxina, isoformas de crotapotina (F3 e F4) e PLA ₂ (F6) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	42
4.8	Estrutura primária da PLA ₂ (F6) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	43
4.9	Homologia seqüencial da PLA ₂ (F6) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> com outras PLA ₂	45
4.10	Registros miográficos das frações re-associadas F3 + F6 e F4 + F6 a partir da crotoxina de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> nas doses de 10 e 20 μ g/mL na preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho	46
4.11	Registros miográficos dos componentes isolados da crotoxina crotapotina (F3 e F4) e a PLA ₂ (F6) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> nas doses de 10 e 20 μ g/ml na preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho	48
4.12	Caracterização miotóxica da PLA ₂ (F6) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> através dos níveis de CK plasmáticos “ <i>in vivo</i> ” intramuscular e intravenoso	50
4.13	Determinação do efeito citotóxico da PLA ₂ F6 de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na determinação dos níveis de LDH em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12)	50
4.14	Purificação de uma isoforma de Bj-IV (Bj-V) a partir do veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i> , em coluna de troca Iônica (Waters) em HPLC	51
4.15	Estudo comparativo dos perfis cromatográficos de veneno total em HPLC de fase reversa de <i>Bothrops alternatus</i> e <i>Bothrops jararacussu</i>	53
4.16	Determinação da massa molecular por espectrometria de massa (MALDI Tof) das isoformas Bj-IV e Bj-V de <i>Bothrops jararacussu</i>	54
4.17	Análises de composição de aminoácidos da isoforma Bj V de <i>Bothrops jararacussu</i>	55
4.18	Determinação da estrutura primária das isoformas de Bj-IV e Bj-V PLA ₂ D49 de <i>Bothrops jararacussu</i>	56
4.19	Estudos de homologia seqüencial das isoformas PLA ₂ Bj-IV e Bj-V D49 de <i>Bothrops jararacussu</i> com outras PLA ₂ .	59
4.20	Registro miográfico do efeito do veneno total e da isoforma PLA ₂ Bj V de <i>Bothrops jararacussu</i> na preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo	60
4.21	Determinação da atividade neurotóxica da isoforma Bj-V D49 de <i>Bothrops jararacussu</i> incubada em presença de isoformas de crotapotina crotálica (F3 e F4) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo	62
4.22	Determinação da atividade neurotóxica da isoforma PLA ₂ D49 Bj-V de <i>Bothrops jararacussu</i> incubada na presença de isoformas de crotapotina crotálica (F3 e F4) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho	63
4.23	Purificação da fração neurotóxica Bt II a partir do veneno total de <i>Bothrops alternatus</i> , em coluna de exclusão molecular Superdex G-75 (Waters) em LC	65
4.24	Purificação da fração neurotóxica Bt II-2 a partir do veneno total de <i>Bothrops alternatus</i> , em coluna μ -Boundapak C-18 (0.78 X 30 cm) (Waters) em HPLC de fase reversa	66

4.25	Análises de aminoácidos das frações neurotóxicas Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i>	67
4.26	Determinação da estrutura primária da fração neurotóxica Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i>	68
4.27	Homologia sequencial da PLA ₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de <i>Bothrops alternatus</i> com outras PLA ₂	70
4.28	Determinação da massa molecular por espectrometria de massa (MALDI Tof) da fração neurotóxica Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i>	71
4.29	Registros miográficos do veneno total e as frações isoladas Bt II e Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i> .	72
4.30	Registros miográficos da fração isolada Bt II-2 de <i>Bothrops alternatus</i> sob estímulo elétrico direto e indireto, em uma mesma preparação (nervo frênico-diafragma isolado de camundongo), na dose de 10 e 20 µg/mL	74
4.31	Estudos Electrofisiológicos	75
4.31.1	Efeitos da PLA ₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de <i>Bothrops alternatus</i> sobre o potencial de repouso na região da placa motora	75
4.31.2	Efeitos da PLA ₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de <i>Bothrops alternatus</i> sobre o potencial de repouso fora da região da placa motora	76
4.32	Determinação da DL ₅₀	77
4.33	Caracterização miotóxica “ <i>in vivo</i> ” da neurotoxina Bt II-2 isolada de <i>Bothrops alternatus</i>	77
4.33.1	Determinação dos níveis de CK plasmáticos “ <i>in vivo</i> ” intramuscular e intravenoso	77
4.33.2	Estudo do efeito citotóxico através dos níveis de LDH em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12)	78
4.33.3	Determinação do efeito inflamatório	78
V	Discussão	80
	Capitulo I Purificação, caracterização físico-química e estudo neurotóxico <i>in vitro</i> toxinas crotálicas e botrópicas	80
5.1	Purificação e caracterização bioquímica e neurotóxica da fração IV de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	80
5.2	Caracterização físico-química e biológica dos componentes do complexo crototoxina, isoformas de crotapotina F3 e F4, e PLA ₂ (F6) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	82
5.3	Isolamento e caracterização físico-química e biológica de uma PLA ₂ Bj-V de <i>Bothrops jararacussu</i>	87
5.4	Isolamento e caracterização físico-química e biológica de uma PLA ₂ K49 de <i>Bothrops alternatus</i>	91
	Capitulo II Análise Comparativa De Fosfolipases A ₂ No Bloqueio Neuromuscular E Á Ação Miotóxica Local E Sistêmica	97
	Isolamento	97
	Efeitos farmacológicos	98
	Atividade enzimática e efeitos farmacológicos	99
	Sítio neurotóxico pré-sináptico	100
	Região miotóxica	101
	Importância na identificação dos sítios farmacológicos	102
	Perspectivas futuras	103
VI	Conclusões	104
	Conclusões gerais	104
	Conclusão final	106
VII	Bibliografia	107

Lista de Abreviações

Lista de Abreviações - Purificação, Cromatografias

Sephadex G-75	Coluna de exclusão molecular com matriz composta de dextrano
PDA 991	Photodiode Array Detector
LC	Sistema cromatográfico HPLC de purificação de proteínas biocompatível da Waters, similar ao sistema FPLC da Pharmacia
HPLC	High (Pressure/ Performace) Liquid Chromatography
Protein-Pak 300SW	Série de Coluna da Waters baseadas em sílica em coluna de aço inox polido
RP HPLC	Reverse Phase HPLC
C18	18 High Carbon Load, High activity silica
μ-Bondapack C18	Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária

Lista de Abreviações - Reagentes, Sais, Tampões

TFA	Acido trifluoracético
Tampão A	TFA 0,1% utilizado para cromatografia de HPLC-FR
Tampão B	Acetonitrilo 66% utilizado em cromatografia de HPLC-FR
PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio
Tris	Tris[Hidroximetil]aminometano
KCl	Cloreto de potássio
Ach	Acetilcolina

Lista de Abreviações – frações, isoformas

PLA₂	Fosfolipase A ₂
F5, F7	Isoformas de crotapotina de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
F15, F16 e F17	Isoformas de PLA ₂ de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
F3 F4	Isoformas indistintas de crotapotina de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
IV-1	Nova toxina contida no complexo crotoxina de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
BthTX-I	Bothropstoxina-I PLA ₂ homóloga K49 de <i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-II	Bothropstoxina-II PLA ₂ D49 de <i>Bothrops jararacussu</i> (fração)
Bj-IV e V	Isoformas PLA ₂ D49 contidas na fração BthTX-II de <i>Bothrops jararacussu</i>
Bt II-2	PLA ₂ homóloga K49 de <i>Bothrops alternatus</i>

RESUMO

Através de metodologias otimizadas de purificação em HPLC, foram purificadas novas toxinas a partir do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* (V-1), *Bothrops jararacussus* PLA₂ D49 Bj-V (isoforma de Bj-IV) obtida da fração BthTX-II e *Bothrops alternatus* PLA₂ K49 Bt II-2; com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular, sem perda da atividade biológica.

A nova neurotoxina V-1 de *Crotalus durissus collilineatus* caracterizada físico-quimicamente como desprovida de atividade catalítica, ácida e com uma massa molecular de 9859.45 Da, uma única cadeia polipeptídica, induz uma facilitação contínua no modelo biológico nervo frênico diafragma isolado de camundongo e uma facilitação pronunciada seguida de um bloqueio súbito em biventer cervicis de pintainho, na junção neuromuscular.

Os estudos estruturais, neurotóxicos e miotóxicos da PLA₂ F6 do complexo crototoxina de *Crotalus durissus collilineatus* mostram que a PLA₂ F6 precisa da crotapotina (estudos de re-associação) para potencializar seu efeito neurotóxico na preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo, mas a PLA₂ F6 é capaz de induzir neurotoxicidade *in vitro* na ausência de crotapotina na preparação biventer cervicis de pintainho.

Foram purificadas, a partir da fração BthTX-II, duas PLA₂ D49 Bj-IV e V, sendo consideradas como isoformas devido ao fato de que compartilham de várias características físico-químicas, tais como: massa molecular, tempo de retenção na re-purificação em HPLC de fase reversa, análise de composição de aminoácidos, pI e estrutura primária, embora a isoforma Bj-V apresente algumas mutações com respeito à isoforma Bj-IV: W3 -> F3, Q4 -> E4, F5 -> W5, I16 -> N16 e G41 -> 41D; importantes para a atividade catalítica, os efeitos neurotóxicos *in vitro* foram mantidos e, quando foram inibidas cataliticamente por crotapotinas crotálicas de *Crotalus durissus collilineatus* (F3 e F4), continuaram diminuindo a resposta contrátil na junção neuromuscular nas preparações nervo frênico diafragma isolado de camundongo e biventer cervicis de pintainho, mostrando que são mais pronunciadas no músculo esquelético de camundongo.

A nova toxina Bt II-2 purificada, com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular, do veneno de *Bothrops alternatus*, foi caracterizada como uma PLA₂ básica K49, em função das características físico-químicas, evidenciadas: massa de 13898.71 Da, possui caráter básico e uma alta homologia seqüencial na sua estrutura primária, quando comparada com outras PLA₂ K49 procedentes de veneno de serpentes.

Essa nova PLA₂ K49 Bt II-2 revelou um potente efeito neurotóxico *in vitro* na preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo (1 µg/mL) pré-sináptico, como foi mostrado nos estudos de

estímulo indireto via nervo e potencial de membrana ou repouso, diferentemente de qualquer PLA₂ neurotóxica botrópica que, para causar um efeito neurotóxico, precisa de dosagem acima de 50 µg/mL.

Outros perfis biológicos foram estudados para a Bt II-2, que mostrou uma miotoxicidade local “in vivo”, citotoxicidade em mioblastos e miotubos C2C12, atividade inflamatória e letalidade, corroborando que se enquadra dentro da família de proteínas PLA₂ homólogas K49, mas com características únicas nos estudos de neurotoxicidade in vitro.

A reprodutibilidade da atividade biológica, através dos efeitos farmacológicos, só é possível com a utilização de frações quimicamente homogêneas que mantenham a integridade da função biológica. Essas frações são obtidas com metodologias de alta eficiência: HPLC, LC, espectrometria de massa, cujos resultados podem ser associados com sua atividade biológica, eliminando a subjetividade causada por veneno total ou frações impuras.

Essa abordagem pode ser aplicada nos estudos bioquímicos, estrutura-função, fisiológicos e farmacológicos, podendo revelar mecanismos ainda desconhecidos na relação estrutura-função das PLA₂ procedentes de veneno de serpentes. A presença de um sítio farmacológico distinto do sítio catalítico presente nas PLA₂ pode ser usada como ferramenta molecular para o reconhecimento dos receptores de membrana desconhecidos em células ou tecidos.

Abstract

Through optimized methodologies of purification in HPLC, new toxins were purified from total venom of *Crotalus durissus collilineatus* (V-1), *Bothrops jararacussus* PLA₂ D49 Bj-V (Bj-IV isoform) obtained from the fraction BthTX-II and *Bothrops alternatus* PLA₂ K49 Bt II-2; with a high level of purity and molecular homogeneity, with no loss of biological activity.

The new neurotoxin V-1 of *Crotalus durissus collilineatus*, chemically and physically characterized as unproved of catalytic, acid activity and with a molecular mass of 9859.45 Da, an only polypeptide sequence, induces to a continual facilitation in the biological isolated mouse phrenic nerve diaphragm model of mouse and a pronounced facility of a subital block in chick biventer cervicis preparation en, in the neuromuscular junction.

The structural, neurotoxic and miotoxic studies on PLA₂ F6 from crotoxin complex of *Crotalus durissus collilineatus* show crotopatin is necessary (re-association studies) to increase its neurotoxic effect in nerve phrenic diaphragm isolated preparation of mouse, but the PLA₂ F6 is able to induce neurotoxicity *in vitro* in ausency of crotopatin in the preparation chick biventer cervicis.

Two PLA₂ D49 Bj-IV and V were purified from the fraction BthTX-II and considered isoform because they share several chemical and physical characteristics, such as molecular mass, retention time in re-purification in reverse phase HPLC, analyses of amino acid composition, pI and primary structure, although the Bj-V isoform shows some mutations regarding Bj-IV: W3 -> F3, Q4 -> E4, F5 -> W5, I16 -> N16 e G41 -> 41D isoform. Important for the catalytic activity, neurotoxic *in vitro* effects were maintained and, when catalytically inhibited by crotopatin crotalic of *Crotalus durissus collilineatus* (F3 e F4), they continued diminishing the contractile reply in neuromuscular junction in nerve phrenic diaphragm isolated preparations of mouse and preparation chick biventer cervicis, which shows they are more pronounced in the skeleton muscle of the mouse.

The new and purified BtII-2 toxin of venom of *Bothrops alternatus*, with a high level of purity and molecular homogeneity, was characterized as a PLA₂ basic K49, because its chemical and physical evidenced characteristics, mass of 13898.71 Da, basic character and a high sequential homology in its primary structure, when it is compared with other PLA₂ K49 from venom of serpents.

This new PLA₂ K49 Bt II-2 has revealed a potent neurotoxic effect *in vitro* in neuromuscular junction in nerve phrenic diaphragm isolated preparation of mouse (1 µg/mL) ante-synaptic, as it was proved by studies on indirect stimulus through nerve and potential of membrane or rest, differently of some neurotoxic botropic PLA₂ that needs a dose above 50 µg/mL to cause a neurotoxic effect.

Other biological profiles were studied for the Bt II-2, and the conclusion was a local myotoxic “living”, a cytotoxic in myoblasts and myotubes C2C12, inflammatory and letality activity, showing they are fitted in the family of proteins PLA₂ homologous K49, but with particular characteristics in studies on neurotoxic *in vitro*.

The reproducibility of biological activity, through pharmacological effects, is just possible with the utilization of chemically homogenous fractions that maintain the integrity of biological function. These fractions were obtained with high efficient methodologies as HPLC, LC, and mass spectrometry, whose results may be associated with their biological activities, eliminating the subjectivity caused by total venom or impure fractions.

This approximation may be applied in the biochemical studies, structure-function, physiological and pharmacological, and it may reveal still unknown mechanisms in the relation structure-function of PLA₂ from the venom of serpents. The presence of a pharmacological site different of the catalytic one in the PLA₂ may be used as a molecular instrument to the recognition of the receptors of unknown membranes in cells or tissues.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Ofidismo

O envenenamento ofídico é um evento comum nos países pobres de regiões tropical e subtropical. As conseqüências dos envenenamentos ofídicos nestes países não têm recebido a devida atenção, deixando de ser registradas estatisticamente como casos de saúde e sendo, na maioria das vezes, tratadas com metodologias ultrapassadas e com procedimentos não efetivos.

Com a exceção de alguns estudos feitos ocasionalmente por pesquisadores destas regiões, este problema vem sofrendo um abandono quase internacional. É provável que, devido ao isolamento de algumas toxinas do veneno de serpentes que atuam seletivamente sobre determinados canais iônicos ou sob o sistema hemostático (Markland, 1998), o problema tenha atraído a atenção e a preocupação de muitos pesquisadores, embora o impacto destas descobertas só tenha servido para o desenvolvimento de ferramentas que reconheçam canais iônicos ou para mapear determinados receptores. Muito pouco das atuais descobertas têm sido bem utilizadas, pois isso ocorre apenas para o desenvolvimento de protocolos de tratamento do envenenamento ofídico ou para explicar os efeitos fisiopatológicos do veneno de serpentes (Monterrey, F. 2001).

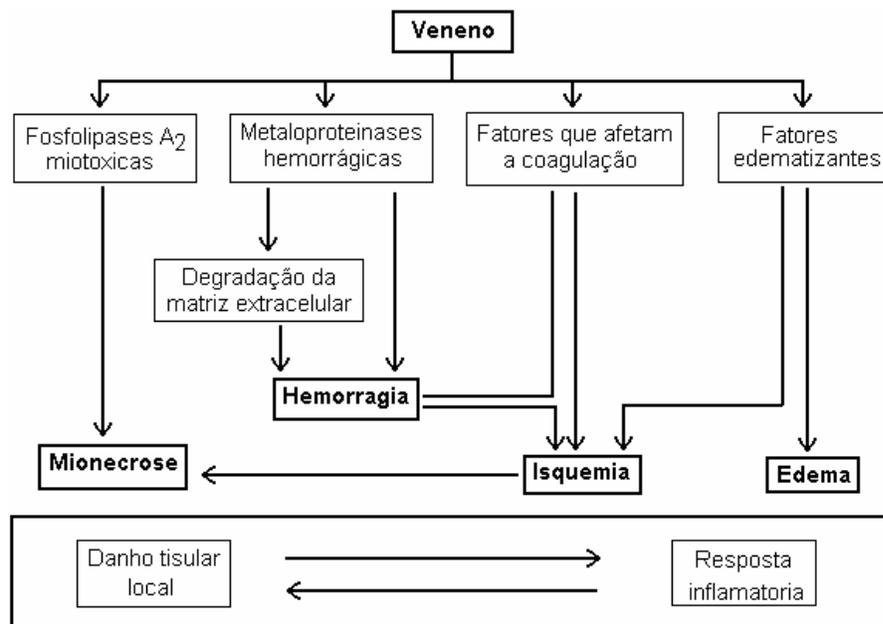
A nível mundial, o envenenamento por serpentes é um problema maior na Ásia e nas regiões da América Latina, como é o caso das ilhas do Caribe. A exatidão do número de casos é discutível, como fica ilustrado em um estudo dos anos 50, que sugere uma mortandade anual de 25 a 30 mil pessoas no mundo. No entanto, estes dados parecem não representar a real magnitude do problema, pois se acredita que a mortandade anual apenas na Ásia chegue a ser de até 100 mil pessoas (Rodriguez-Acosta, A. 2001).

Na América Latina, os envenenamentos por viperídeos caracterizam-se por uma fisiopatologia complexa, que inclui efeitos locais (neurotoxicidade, mionecrose, dermonecrose, hemorragia, edema, dor) e, em casos moderados e severos, alterações sistêmicas como coagulopatias, sangria, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda. Provavelmente, a exceção a esse padrão fisiopatológico se encontra no caso de algumas cascavéis sul-americanas, especialmente a *Crotaluss durissus terrificus*, cujo veneno induz a alterações locais irrelevantes, caracterizando-se bem mais por potentes atividades neurotóxicas e miotóxicas sistêmicas do que por alterações renais e de coagulação. Os venenos das serpentes corais (*Micrurus* sp) e da serpente marina *Pelamis platurus* (família Hydrophiidae) induzem unicamente um efeito neurotóxico, sem ocasionar alterações locais relevantes, do ponto de vista clínico. Experimentalmente se tem evidenciado que os venenos das serpentes corais induzem um efeito miotóxico em camundongos, embora este efeito não pareça ser relevante no envenenamento humano.

Os efeitos locais induzidos por venenos de viperídeos constituem um problema relevante por várias razões:

- 1) Desencadeiam-se muito rapidamente após a inoculação do veneno, o que dificulta a sua neutralização, se o soro antiofídico for administrado várias horas após o acidente ofídico.
- 2) Afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele, induzindo lesões que, com frequência, deixam seqüelas.
- 3) Frequentemente se complicam com infecções, o que dificulta ainda mais o manejo do quadro clínico.
- 4) Em alguns casos severos, desencadeia-se uma síndrome compartimental, exigindo a cirurgia de retirada do tecido já necrosado (fasciotomia), o que complica o tratamento e prolonga a permanência do paciente no hospital.
- 5) A experiência clínica mostra que estes efeitos locais são difíceis de neutralizar pelos conhecidos soros antiofídicos e por outros recursos terapêuticos complementais.

O esquema 1 sintetiza o que foi exposto. Mas indiscutivelmente ainda há uma série de incógnitas com relação à patogênese destes efeitos, que ainda permanecem como um desafio para a pesquisa toxinológica na América Latina (Gutierrez, J.M. e Lomonte, B. 2003).



Esquema 1. Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos das serpentes da família Viperidae (Gutierrez, J.M. e Lomonte, B. 2003).

1.2 Neurotoxinas

As neurotoxinas provenientes do veneno de serpentes são componentes clássicos deste e afetam particularmente a junção neuromuscular, produzindo uma paralisia flácida. No entanto, nem todas as neurotoxinas têm o mesmo sítio, modo de ação ou produzem efeitos clínicos similares (Rodríguez-Acosta, A. 2001).

Com respeito aos componentes neurotóxicos dos venenos de serpentes – sendo os mais bem descritos os da família Crotalidae –, sabe-se que muitos deles, em condições naturais não são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica, em condições profundas de alterações, podem alcançar o sistema nervoso central (SNC) e originar quadros patológicos até agora mal descritos (Monterrey, 2001).

Um dos maiores alvos do veneno das serpentes é o sistema nervoso somático, em particular a junção neuromuscular do músculo esquelético. A inibição da transmissão neuromuscular neste lugar produz paralisia bulbar e dos músculos oculares, resultando em uma paralisia da musculatura respiratória, como o diafragma, por exemplo, o que leva à morte. Por conseguinte, muitas das pesquisas têm sido dirigidas com o intuito de aumentar nossa compreensão sobre a ação do veneno das serpentes e das toxinas isoladas que agem na junção neuromuscular (Hodgson W., e Wickramaratna 2002).

1.3 Transmissão Neuromuscular.

A ação da maioria das neurotoxinas tem seu efeito revelado no sistema nervoso periférico, devido ao fato de não atravessarem a barreira hematoencefálica. No entanto, a ação do veneno e de suas toxinas na junção neuromuscular pode ser discutida. A acetilcolina é o principal neurotransmissor da união neuromuscular esquelética, sendo sintetizada e armazenada no terminal nervoso. A maior parte da acetilcolina empacota-se em vesículas (aproximadamente 80%) e difunde-se espontaneamente com a membrana pré-sináptica, ficando o restante em solução no axoplasma.

As serpentes têm desenvolvido, através de diferentes mecanismos genéticos, a capacidade de expressar potentes toxinas, capazes de inibir a transmissão neuromuscular pré-sináptica (β -neurotoxinas) e pós-sináptica (α -neurotoxinas) em determinados sítios específicos.

A neurotoxicidade pré-sináptica está associada muitas vezes a fosfolipases A_2 encontradas nos venenos das serpentes. Muitas destas fosfolipases A_2 têm evidenciado efeitos como miotoxicidade, hipotensão, cardiotoxicidade e hemorragia, dentre outros (Hodgson W., e Wickramaratna 2002).

Um estudo dos detalhes da estrutura química tem revelado uma inesperada inter-relação entre estrutura e função. O bloqueio do processo fisiológico é uma questão crucial a ser examinada, assim

como o conhecimento do sítio responsável e o mecanismo de ação a nível molecular. A ação neurotóxica não se dá apenas no nervo motor terminal, pois, isso também ocorre em preparações nervosas diferentes (Tu, A. 1991).

1.4 Inibidores da Condução

O axônio motor, ao ser estimulado, responde com a respectiva despolarização, que envolve uma mudança na condução de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Deste modo, qualquer substância capaz de alterar o movimento normal dos íons de Na^+ e K^+ pode ser considerada como sendo neurotóxica. Um dos exemplos mais conhecidos é a tetrodotoxina, uma neurotoxina obtida do “puffer fish”, mais conhecido como baiacu, e que tem a capacidade de bloquear os canais Na^+ (Narahashi e Hass, 1967). O veneno de toxinas de escorpiões também pode afetar a condutividade do axônio, devido à sua atuação sobre os canais de sódio e potássio (Rochart *et al.*, 1970, Zlotkin *et al.*, 1971, Strichartz *et al.*, 1986).

1.5 Inibidores da Transmissão Sináptica

A placa motora na junção neuromuscular é uma região especializada da fibra muscular, onde o impulso nervoso, ao atingir a terminação nervosa pré sináptica, determina a sua despolarização, ativando a entrada de cálcio para dentro da membrana, que sinaliza a liberação do neurotransmissor, a acetilcolina. A acetilcolina é então liberada e combina-se com os receptores nicotínicos pós-sinápticos. Esta ligação está relacionada ao potencial de placa terminal que, ao atingir o limiar de excitabilidade, desencadeia o potencial de ação muscular que se propaga ao longo dos túbulos “T”, induzindo a contração muscular. As toxinas que causam alteração no nível da transmissão sináptica podem ser divididas em dois grandes grupos: as neurotoxinas pré-sinápticas e as pós-sinápticas.

1.5.1 Toxinas Pré-sinápticas:

Denominadas como β -neurotoxinas, estas toxinas inibem o processo de liberação da acetilcolina e sua liberação é em geral maior do que a das toxinas pós-sinápticas. Como exemplo, citamos a toxina β -bungarotoxina, uma toxina composta por duas subunidades de 8800 e 12400 daltons, interligadas por pontes dissulfeto (Chang *et al.*, 1977, Kelly, 1979).

Dois tipos de neurotoxinas pre-sinápticas provenientes de veneno de serpentes têm sido reconhecidos: 1) as β -neurotoxinas, caracterizadas pela presença da atividade catalítica PLA_2 e estabelecidas nos venenos de serpentes das famílias *Elapidae*, *Crotalidae* e *Viperidae*; e 2) as neurotoxinas pré-sinápticas facilitatórias, incluindo a *dendrotoxina*, com bloqueio do canal de potássio

voltagem-dependente, e a toxina *antiacetylcholinesterase*, o fasciculins. As toxinas do segundo grupo são próprias de veneno de *Dendroaspis*. São polipeptídios com seqüências homólogas aos inibidores de proteinases tipo Kunitz e com as “curare-like” pós-sinápticas que são α -neurotoxinas e cardiotoxinas respectivamente (Harvey, *et al.*, 1998).

Várias neurotoxinas pré-sinápticas de veneno de serpentes têm sido isoladas. Elas vêm sendo identificadas nos venenos das quatro maiores famílias de serpentes peçonhentas: Crotalidae, Elapidae, Hydrophidae e Viperidae, o que indica a importância de sua atividade. Muitas delas possuem atividade fosfolipase A₂, cuja função provavelmente tem evoluído. Acredita que, além da digestão da presa, haja outros papéis desta proteína, como, por exemplo, uma que inclui a imobilização e morte da presa. No entanto, sua atividade neurotóxica não tem relacionamento direto com sua atividade fosfolipase A₂ e, subsequentemente, hidrólise de fosfolipídios de membrana. Nos seres humanos, a paralisia associada com estas toxinas pode durar por muito tempo, chegando até a três semanas. Em alguns pacientes envenenados, há a necessidade de uma prolongada ajuda na ventilação para sua sobrevivência.

As neurotoxinas pré-sinápticas podem ser polipeptídios de cadeia única – como, por exemplo, notexin – ou toxinas que consistem em subunidades múltiplas, como, por exemplo: crotoxina, Taipoxina e Textilotoxina que consistem em dois, três e cinco subunidades, respectivamente. Mas os venenos de serpente contêm múltiplas isoformas de uma neurotoxina em particular que difere na seqüência de um aminoácido na estrutura primária. No entanto, a aparente correlação direta entre estrutura da cadeia e potência torna-se matéria de discussão, pois parece existir uma correlação entre a estrutura da cadeia e sua união (Hodgson W., e Wickramaratna 2002).

No entanto, sua atividade geralmente se caracteriza por um efeito trifásico na liberação da acetilcolina (uma diminuição, seguida por um aumento transitório e depois um bloqueio completo). Estes dois passos iniciais parecem ser independentes da atividade fosfolipase A₂ e são particularmente evidentes quando o fator na transmissão é diminuído, reduzindo assim os níveis de Ca²⁺ e aumentando Mg²⁺ contidas no meio do banho.

Estas são algumas variações encontradas nas β -neurotoxinas, com respeito à atividade trifásica, quando observada em preparações de diferentes músculos. Por exemplo, embora a Paradoxin produza uma marcada facilitação na altura da tensão, a fase inibitória inicial parece estar ausente na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. Esta atividade é similar a notexin, onde a fase de inibição inicial também está ausente na mesma preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. Mas a Taipoxin encontra-se estritamente relacionada com a inibição, embora seja

registrado na literatura que a fase inibitória na Taipoxin e β -bungarotoxina seja notavelmente menos pronunciada na preparação do nervo frênico-diafragma isolado de camundongo.

A diferença, com relação à sensibilidade das preparações nervo-músculo das espécies no bloqueio da tensão por ação pré-sináptica das neurotoxinas com estrutura fosfolipase A₂, tem sido bem documentada, tem sido evidenciando que a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo é notavelmente mais sensível a Paradoxin, quando comparada à preparação biventer cervicis de pintainho. E a mesma ordem de sensibilidade tem sido mostrado para Taipoxin, Textilotoxin e notexin, as quais são todas neurotoxinas de elapídeos asiáticos. Em contraste, a crotoxina e a β -bungarotoxina são muito mais potentes na preparação biventer cervicis de pintainho. Textilotoxin possui uma reputação muito considerável como a mais potente neurotoxina pré-sináptica isolada de veneno de serpente.

Su. *et al.* (1984) tem evidenciado que a Textilotoxin (0,3 μ g/ml) é capaz de diminuir a resposta contrátil do nervo na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo: em 194 min. a uma concentração de 0,3 μ g/ml; e em 110 min. na concentração de 1 μ g/ml. Embora tenha sido evidenciado que 0,3 μ g/ml. de Paradoxin é capaz de diminuir a resposta contrátil em 110 min, indicando assim que este tipo de tecido para Paradoxin é muito mais sensível. Um tempo semelhante (103 min.) para a inibição completa na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, tem sido reportado para Taipoxin, embora a concentração fosse de 1 μ g/ml. Apesar dessa diferença clara na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, a ação do bloqueio da tensão neuromuscular produzida por Paradoxin (3 μ g/ml) e Taipoxin (3 μ g/ml) na preparação biventer cervicis de pintainho se mostrou quase idêntica (160 min).

Interessante foi o registro de que o aumentando da concentração de Paradoxin em 10 vezes, na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, não produziu um efeito significativo no tempo considerado para diminuir a resposta contrátil, o que sugere que exista uma saturação dos sítios específicos para a neurotoxina. Dessa forma, devido ao mecanismo de ação da toxina, não é possível produzir uma inibição completa em um tempo mais curto.

É de interesse clínico o descobrimento de que estas neurotoxinas ajam em um tempo relativamente curto (30 minutos aproximadamente), pois assim, pode-se concluir que seu efeito não pode ser invertido mesmo com a ação dos antivenenos, se este for administrado posteriormente. É conhecido que antivenenos testados *in vitro* podem prevenir a inibição causada por paradoxin e taipoxin, quando os dois são colocados juntos com os antivenenos.

Em um trabalho digno de consideração, tem-se discutido a identificação do sítio específico no terminal nervoso pré-sináptico para estas fosfolipases A_2 neurotóxicas (Igor Krizaj e Frane Gubensek, 2000). Sítios seletivos de união, que parecem ser comuns à maioria das fosfolipases A_2 , tem sido identificado em vários tecidos, inclusive em sinaptosomas de cérebro de rato (Tipo-N) e em cultura de células de músculo esquelético (Tipo-M). A afinidade das neurotoxinas para estes sítios específicos mostra uma boa correlação com sua toxicidade, embora sejam identificadas sérias e marcadas diferenças entre os sítios específicos nos tecidos diferentes, levando a pensar na existência de uma família de receptores para estas fosfolipases A_2 neurotóxicas. De forma adicional, tem sido demonstrado que aquelas uniões de notexin ao receptor do sítio específico na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo eram substancialmente reversíveis. Já a união da crotoxina foi ligeiramente reversível, enquanto a da β -bungarotoxina, taipoxin e textilotoxin, foi reversível escassamente.

Estudos anteriores sugerem que as neurotoxinas não são internalizadas, embora se acredite que haja uma ação interna das neurotoxinas dentro das vesículas sinápticas, sugerindo uma endocitose e uma hidrólise de fosfolipídios no interior da membrana. Esta hipótese parece ser considerada para a maioria das ações reportadas para estas toxinas. E isto se apóia em trabalhos que mostram a presença de calmodulina: uma proteína intracelular que age como um aceitador/receptor para a ammodytotoxin, uma toxina pré-sináptica (Montecucco C. e Rossetto O. 2000).

Recentemente os resultados de um estudo que analisa uma faixa de neurotoxinas pré-sinápticas –usando a técnica de patch clamping e alguns tipos de canais de K^+ clonados voltagem-dependentes estáveis expressados em linhas celulares de mamíferos – sugerem que a facilitação observada é diferente, devido a um bloqueio dos canais de K^+ . No entanto, os autores indicaram que eles não poderiam excluir a possibilidade de que os canais de K^+ voltagem dependentes clonados, usados em seus estudos, não foram capazes de expressar o sítio ou domínio específico para as fosfolipases A_2 neurotóxicas ou não se encontraram proteínas reguladoras importantes.

Alguns estudos analisaram os efeitos neuropatológicos de notexin e taipoxin em membros posteriores de rato, evidenciado que, depois de produzir uma depleção do neurotransmissor no terminal nervoso motor, estas toxinas causam uma degeneração deste terminal e do citoesqueleto axonal. Este fato foi constatado devido à presença de 70% das fibras musculares se encontrarem completamente desnervadas dentro de 24 horas, com a regeneração quase completa dentro de cinco dias. Dentro de nove meses, ocorre, na inervação co-lateral, a regeneração da musculatura, sendo que resultados

similares têm sido previamente reportados para β -bungarotoxina (Hodgson Wayne C. and Wickramaratna Janith 2002).

Quadro 1 Algumas β -neurotoxinas pré-sinápticas isoladas de veneno de serpentes representativas (Hodgson Wayne C. and Wickramaratna Janith 2002).

Toxina	Composição de Subunidades	Nome comum	Nome científico
Notexin	Cadeia simples	Serpente tigre	<i>Notechis scutatus</i>
Taipoxin	Três subunidades	Serpente da costa Taipán	<i>Oxyuranus scutellatus</i>
Paradoxin	Três subunidades	Serpente Taipán	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>
Crotoxina	Duas subunidades	Cascavel	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Textilotoxin	Quatro subunidades	Serpente marron	<i>Pseudonaja textilis</i>
β -Bungarotoxina	Duas subunidades	Serpente marina da Ásia	<i>Bungarus multicinctus</i>

1.5.1.1 Estrutura Molecular das β -neurotoxinas

As β -neurotoxinas são caracterizadas pela presença de uma fosfolipase A₂ ativa (EC 3.1.1.4) e, portanto, são enzimas que catalisam a hidrólise acil éster na posição 2 de um 3-sn-fosfogliceráldeído. As formas de PLA₂ extracelulares são extremamente abundantes nas secreções de glândulas exócrinas, semelhantes às PLA₂ de pâncreas de mamífero e glândulas de veneno de serpentes, abelhas e escorpiões. No entanto, muitas diferenças em detalhes de atividade catalíticas e estruturais podem ser importantes (Kini, R.M. 2003).

As PLA₂ mostram um maior grau de similaridade na seqüência de aminoácidos, o que indica uma extrema e alta conservação na posição de pontes dissulfeto e da estrutura tridimensional. A função primária destas PLA₂ é digestiva. No entanto, um pequeno grupo de PLA₂ provenientes de veneno de serpentes, as β -neurotoxinas, têm evoluído como potentes neurotoxinas no bloqueio da transmissão neuromuscular, primeiramente pela modificação na liberação da transmissão (Tu, A. 1991).

Três classes de neurotoxinas têm sido registradas basicamente pela sua estrutura molecular:

1) β -Neurotoxinas Monoméricas: compostas unicamente por PLA₂. Um exemplo desta classe é a Notexin de *Notechis s. scutatus* (Bon, 1997 e Kini,1997).

2) β -Neurotoxinas Multiméricas: compostas por uma molécula de PLA₂ associada, não por ponte dissulfeto, com uma outra molécula sem atividade enzimática. Como exemplo destas neurotoxinas, pode-se citar a crotoxina isolada de *Crotalus durissus terrificus* (Bon, 1997).

3) β -Bungarotoxinas: as primeiras neurotoxinas pré-sinápticas caracterizadas farmacologicamente foram as β -Bungarotoxinas purificadas de veneno de *Bungarus multicinctus*

(Chang e Lee, 1977). Mais tarde algumas outras foram purificadas de amostras de venenos (Abe *et al.*, 1977; Kondo *et al.*, 1989) e outras β - Bungarotoxinas de venenos de várias espécies de *Bungarus*.

As β -Bungarotoxinas são compostas de associação covalente, por uma ponte dissulfeto, sendo dois diferentes polipeptídios de cadeia A e B. O polipeptídio A consiste de 120 resíduos aminoacídicos e a seqüência da PLA₂ é homóloga às PLA₂ de pâncreas de mamífero. O polipeptídio contém 60 resíduos aminoacídicos, a seqüência é homóloga com os inibidores de proteinases tipo Kunitz de pâncreas de mamífero, venenos de serpentes e caramujo (Tu, A. 1991).

Alguns exemplos de toxinas pré-sinápticas são também as neurotoxinas do veneno de escorpiões que atuam sobre os canais de sódio e de potássio (Rochart *et al.*, 1970 e Marangoni *et al.*, 1995). Estas neurotoxinas também são encontradas em peçonhas de serpentes elapídicas e crotálicas. São exemplos de neurotoxinas elapídicas: as β -bungarotoxina, como a notexina (Karlsson *et al.*, 1979); e as crotálicas, como a crotóxina (Breithaupt, 1976, Faure and Bon, 1988 e Faure *et al.*, 1991).

1.5.2 Toxinas Pós-sinápticas:

As neurotoxinas pós-sinápticas são de baixo peso molecular (7 a 8 kDa) e são desprovidas de atividade enzimática (Karlsson *et al.*, 1979). As neurotoxinas pós-sinápticas ou α -neurotoxinas são antagonistas dos receptores nicotínicos no músculo esquelético. Elas são amplamente também chamadas de toxinas curare mimético, devido à sua similaridade na ação antagonista do receptor nicotínico competitivamente (+)-tubocurarine, mas sua combinação com estes receptores se faz de forma não covalente (Tu, 1991).

Estas se ligam com alta afinidade e especificidade aos sítios de união da acetilcolina dos receptores nicotínicos do músculo esquelético. O receptor nicotínico do músculo esquelético é uma proteína heteropentamérica, formada por cinco subunidades, este consiste de dois sítios específicos de união, a acetilcolina, localizados na interfase entre as subunidades. Estes sítios específicos de união interagem reciprocamente de forma cooperativa para ocupar uns dos sítios específicos semelhantes para as α -neurotoxinas de serpente, inibindo a abertura dos canais iônicos associados com o receptor em resposta aos agonistas colinérgicos. Assim, as α -neurotoxinas bloqueiam a transmissão nicotínica no músculo esquelético, causando a paralisia da presa.

Em contraste com as β -neurotoxinas, as α -neurotoxinas só se encontram nos venenos das serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae. Até o presente, cerca de 100 neurotoxinas tem sido isoladas e seqüenciadas. Dependendo da sua seqüência, as neurotoxinas pós-sináptica se subdividem em neurotoxinas de cadeia curta, que consiste de 60 a 62 aminoácidos ao longo da estrutura primária e

quatro pontes dissulfeto; e de cadeia longa, que possuem 66 a 74 resíduos de aminoácidos e usualmente cinco pontes dissulfeto. No entanto, as posições das quatro pontes dissulfeto são comuns para tais neurotoxinas, tanto de cadeias curtas quanto de cadeias longas; estas pontes na cadeia longa encontram-se localizadas entre as posições Cys30 e Cys34. Até recentemente se pensava que a maior diferença funcional entre estes dois tipos de α -neurotoxinas estava na cinética de associação e dissociação com os receptores nicotínicos do músculo esquelético.

Foi demonstrado que as neurotoxinas de cadeia curta tendem a se associar com o receptor aproximadamente seis vezes mais rápido e se dissociar cinco vezes mais rápido que as neurotoxinas de cadeia longa. Tem também sido mostrado que as neurotoxinas de cadeia longa ligam-se aos receptores neuronais nicotínicos com afinidade muito mais alta do que as neurotoxinas de cadeia curta. A toxina de *Laticauda colubrina* tem sido considerada como uma toxina de cadeia longa, sendo este dado baseado na seqüência de aminoácidos (estrutura primária) e nos respectivos estudos de homologia seqüencial, faltando, porém, algumas pontes dissulfeto nesta. Embora funcionalmente elas se comportem como neurotoxinas de cadeia curta com união aos receptores nicotínicos, esta classificação funcional das α -neurotoxinas ainda requer uma caracterização farmacológica mais detalhada, apesar destas serem semelhantes no músculo esquelético e nos receptores neuronais nicotínicos (Hodgson W., e Wickramaratna 2002).

1.6 Neurotoxinas: Ferramentas Moleculares

Peptídeos com atividade tóxica proveniente do veneno de origem animal, de microorganismos ou vegetais, têm sido largamente utilizados no estudo dos mecanismos de ação e dos processos metabólicos, pois estes peptídeos interagem especificamente com receptores, inibindo ou estimulando várias funções celulares, constituindo-se, portanto, como ferramentas moleculares valiosas dentro da fisiologia e farmacologia.

As toxinas em geral, bem como as neurotoxinas em particular, também têm sido utilizadas como sondas com diferentes finalidades, como, por exemplo, a síntese de novas drogas, como agentes terapêuticos (tubocurarina e a toxina botulínica) ou na forma de medicamentos como o Captopril, que foi sintetizado a partir do modelo molecular da toxina de *Bothrops jararaca* (Harvey *et al.*, 1998).

Atualmente, sabe-se que as neurotoxinas provenientes da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* poderiam atuar não somente na junção neuromuscular, mas também em células β de ilhotas de Langerhans isoladas de ratos, estimulando-se em condições experimentais a potência da secreção de

insulina. Assim, descobriu-se que os isômeros de crotamina podem potencializar a secreção de insulina, provavelmente utilizando-se de sua interação específica com os canais de sódio.

Existem neurotoxinas – tais como a crotamina, miotoxina a, cardiotoxinas, melitina e as fosfolipases A₂ – que são toxinas que exibem grande potencial para sua utilização como ferramentas moleculares no estudo de determinadas patologias, como a mionecrose. Estudos realizados por Rodrigues-Simioni *et al.* (1995) e Prado-Franceschi (1998) mostraram que a Bothrosptoxina-I é uma miotoxina com estrutura de PLA₂ (Cintra, *et al.*, 1993), mas sem atividade catalítica. Esta toxina pode interagir com canais de sódio tetrodoxina dependentes, para provocar o efeito biológico, a mionecrose, sendo que esta toxina também é capaz de promover a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático, interagindo então diretamente com os canais ou com um outro receptor.

Do ponto de vista toxicológico, as serpentes peçonhentas do Brasil da família *Crotalidae* pertencem a três gêneros: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. E, da família *Elapidae*, temos o gênero *Micrurus*.

1.7 O veneno Crotálico

O fracionamento do veneno crotálico tem revelado um grande número de componentes: peptídeos, enzimas e toxinas. Experimentalmente estudados, seus efeitos não podem ser simplesmente transpostos para os acidentes humanos, que evoluem pela dinâmica da interação do veneno bruto inoculado, para não dizer mais, em quantidades e locais variáveis e respostas biológicas individuais quase imprevisíveis. Considerando o conjunto dos dados já observados na fisiologia do acidente humano, podemos inferir a importância de algumas das frações desse veneno.

1.7.1 *Crotalus durissus*

As serpentes do gênero *Crotalus* estão distribuídas em:

- *Crotalus durissus terrificus* - encontrada em regiões altas e secas do Brasil, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais.
- *Crotalus durissus collilineatus* - distribuída nas regiões secas da zona Centro-Oeste do Brasil, desde o Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais até o Norte do Estado de São Paulo.
- *Crotalus durissus cascavella* - encontrada nas áreas de caatinga do Nordeste do Brasil, desde o Maranhão até Norte do Estado de Minas Gerais.
- *Crotalus durissus marajoensis* - encontrada na Ilha de Marajó e em toda América Equatorial.
- *Crotalus durissus trigonicus* - encontrada em Roraima.

- *Crotalus durissus ruruima* - distribuída em algumas regiões de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia, como na América Equatorial.
- *Crotalus durissus ruruima* - espécie que tem apresentado dois tipos de venenos, uma de coloração amarela e a outra branca, o que traz, como consequência, diferenças bioquímicas, tanto de estrutura como de atividade biológica.

Desde 1938, foram isoladas e purificadas, a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, as frações denominadas de:

Convulxina: caracterizada por induzir convulsões e distúrbios respiratórios e circulatórios, é uma toxina de alta massa molecular que se comporta como uma proteína homogênea (Prado-Franceschi, J. e Vital Brazil, O. 1981). Tem sido isolada e caracterizada uma convulxina de *Crotalus durissus collilineatus*, conformada por duas cadeias polipeptídicas, sendo capaz de estimular a secreção de insulina nas ilhotas de Langerhans em condições *in vitro* (Toyama, et al. 2000).

Giroxina: farmacologicamente pouco conhecida, produz uma síndrome convulsiva, em condições experimentais em camundongos. Seu isolamento foi descrito por Barrio, A. (1961), Barrabin *et al.* (1978) e Alexander *et al.* (1988). Esta fração não é afetada por congelamento ou por tratamento com temperaturas próximas a 40°C por 15 min.

Crotamina: proteína neurotóxica de baixo peso molecular de caráter básico, caracterizada pela primeira vez por Gonçalves e Vieira (1950). Esta toxina é encontrada no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, de certas regiões do Brasil, da Argentina e da Bolívia. É uma proteína de ponto isoelétrico de 10,3; uma massa molecular de 4,8 kDa; e três pontes dissulfeto (Gonçalves, 1950). Apresenta um pequeno número de resíduos de aminoácidos comparados com outras neurotoxinas (Ryden *et al.*, 1973; Yang, 1974). Sendo uma molécula resistente ao calor, suporta uma temperatura de 70°C por 18 horas sem perder sua propriedade tóxica. Esta fração é capaz de produzir, além de bloqueio na junção neuromuscular *in vitro*, uma miotoxicidade moderada. Na atualidade, várias isoformas têm sido isoladas (Toyama, M.H. *et al.*, 2000; 2003).

A crotamina (Chang and Tseng, 1978) e a miotoxina (Hong and Chang, 1985) despolarizam o músculo esquelético, através de um mecanismo que envolve a participação de canais de sódio tetrodoxina sensíveis, enquanto que a miotoxina promove a liberação do cálcio citoplasmático, através do receptor de riodina (Yudkowsky *et al.*, 1994).

A neurotoxina crotamina atua sobre os canais de sódio do músculo esquelético (Cameron e Tu, 1978, Tu, 1991), possuindo, segundo se acredita, até quatro diferentes isoformas (Smith e Schmidt, 1990). A crotamina, sendo uma neurotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, pode ser composta por várias isoformas, resultantes muitas vezes da alteração em até um único aminoácido. Até agora, todos

os estudos realizados com a fração de crotamina indicam que ela seria uma mistura de várias isoformas. No entanto, hoje os efeitos biológicos e farmacológicos da crotamina devem ser reavaliados sob a luz das novas metodologias como, a eletrofisiologia.

Crotoxina: sendo a principal neurotoxina, representa quase 50% do peso seco do veneno total, e foi a primeira neurotoxina a ser purificada e analisada, em 1938, por Fraenkel-Conrat. A crotoxina é a responsável pela alta toxicidade do veneno, atuando nas terminações nervosas e respondendo pelas paralisias motoras e respiratórias, em condições experimentais.

Esta proteína é um heterodímero, composto por duas diferentes subunidades: uma fosfolipase A₂ (PLA₂) (componente básico) com uma massa molecular de 14,5 kDa; e um componente denominado crotapotina (componente ácido) com uma massa molecular de 9 kDa. (Breithaupt 1976, Bon *et al.*, 1979).

Quando um componente da crotoxina é separado do outro, seu efeito tóxico é praticamente anulado, sendo dez vezes menor que a sua forma associada (Slotta e Fraenkel-Conrat 1938. Chang e Lee 1977, Hawgood e Santana de Sá S. 1979). A fosfolipase A₂ (PLA₂) é o componente principal e responsável pelo desencadeamento dos efeitos farmacológicos ocasionados pelo complexo crotoxina (Hendon e Fraenkel-Conrat 1971).

A crotoxina é o componente majoritário encontrado no veneno total de *Crotalus durissus sp.* Segundo Breithaupt (1976) e Bon *et al.* (1979), a crotoxina, do ponto de vista farmacológico e fisiológico, possui dois tipos de ações: uma pré-sináptica (Bon *et al.*, 1979, Hawgood e Santana de Sá, 1979) e uma pós-sináptica (Hawgood e Santana de Sá 1979 e Bon *et al.*, 1979). De acordo com Faure e Bom (1988), a crotoxina é formada por várias isoformas aparentemente resultantes: ou de modificações pós-traducionais, que ocorrem sobre uma única forma precursora, levando à formação de crotapotina (Bouchier *et al.*, 1991; Faure *et al.*, 1991); ou pela expressão de diferentes RNAs mensageiros (isolados a partir de uma mesma espécie), levando à formação das isoformas de PLA₂ (Faure *et al.*, 1994).

A crotapotina foi primeiramente descrita como uma molécula “chaperone” das fosfolipases A₂ de *Crotalus durissus terrificus*, que potencia a toxicidade da fosfolipase A₂ (PLA₂), sendo interpretada como um fenômeno farmacocinético, sugerindo que o componente ácido possa proteger a fosfolipase A₂ da inativação por ligação a sítios de baixa afinidade. No entanto, a crotapotina inibe a atividade enzimática da PLA₂. (Laure, C.J. 1990).

Sabe-se ainda que a crotoxina, uma das principais toxinas no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, possui até 16 diferentes isoformas, algumas com atividade mais acentuadas e outras menos acentuadas em sua toxicidade (Faure e Bon, 1988). A crotoxina, principal componente neurotóxico da

serpentes de *Crotalus durissus terrificus*, possui várias isoformas que podem ser, na verdade, combinações das subunidades de crotapotina PLA₂ associadas.

O grande problema para o estudo desta neurotoxina é o de obter um material com alto grau de homogeneidade molecular, tanto para o estudo da ação isolada do complexo crotapotina-PLA₂ bem como para estudar a atividade biológica de suas subunidades, como, por exemplo, a crotapotina.

Sabe-se que a crotoxina tem um comportamento diferente, como consequência da presença de várias isoformas. E estudos preliminares mostraram que os efeitos biológicos observados por algumas isoformas de crotoxina são diferentes, sendo que o complexo em si não explica esta variedade de efeitos.

Na atualidade, têm sido isoladas até três isoformas de PLA₂, a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, denominadas como F15, F16 e F17; e uma só de *Crotalus durissus collilineatus*, denominada como F6 (Ponce-Soto, *et al.*, 2002). A crotoxina, assim como a PLA₂ e crotapotina isoladas do complexo, tem revelado uma série de efeitos biológicos. Assim, recentemente, a crotoxina isolada de *Crotalus durissus cascavella* tem mostrado um efeito miotóxico, sendo capaz de bloquear a resposta contrátil da junção neuromuscular *in vitro* na preparação biventer cervicis de pintainho (Beghini, *et al.*, 2000), e a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* tem mostrado um efeito imunossupressivo (Rangel-Santos, *et al.*, 2000).

As subunidades isoladas do complexo crotoxina também são capazes de mostrar uma série de efeitos biológicos. Estudos mostram que há várias isoformas de crotapotina de *Crotalus durissus terrificus*: além de ser antiinflamatória (Landucci *et al.*, 1995), produz edema inflamatório; assim como as isoformas de crotapotina de *Crotalus durissus collilineatus* (Câmara, *et al.*, 2003), bactericida e nefrotóxico *in vitro* (de Oliverira, *et al.*, 2003) são capazes de induzirem a modificação na proliferação de linfócitos T mediada pela síntese de PG₂ (García, *et al.*, 2003). E recentemente tem sido evidenciado que a crotapotina de *Crotalus durissus terrificus* é capaz de inibir até em um 54% o efeito inflamatório e miotóxico de várias PLA₂ de origem botrópico, tais como: Bothropstoxina-I (BthTX-I) e Bothropstoxina-II (BthTX-II), de *Bothrops jararacussu*; Pirotoxina-I (PrTX-I) e Pirotoxina-III (PrTX-II), de *Bothrops pirajai* e Moojenitoxina-II (MjTX-II), de *Bothrops moojeni* (Cecchini *et al.*, 2004). Estudos recentes evidenciam que as PLA₂, de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus*, são capazes de produzir um efeito edematizante, miotóxico e até letal (Rangel-Santos, *et al.*, 2004b).

Com relação às serpentes crotálicas, até hoje, poucos são os estudos realizados com os componentes neurotóxicos do complexo crotoxina das subespécies *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, usando-se uma abordagem bioquímica ou biológica. E este assunto merece

ser estudado mais aprofundadamente, pois as descobertas recentes revelam que tais componentes são capazes de desencadear uma série de efeitos farmacológicos isoladamente, o que justifica seu estudo, a fim de compreender melhor a intrincada relação de estrutura-função.

1.8 O veneno Botrópico.

As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo o território nacional, totalizando vinte espécies. Habitam ambientes úmidos (como matas e áreas cultivadas), locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferia de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos e são consideradas bastantes importantes, do ponto de vista epidemiológico, pelo número de acidentes registrados.

O veneno das serpentes *Bothrops* causa intensa dor local, às vezes com hemorragia e necrose tecidual tão grave, que requer a amputação do local atingido (Brazil, 1911; Jiménez - Porras, 1973).

Os venenos destas serpentes também são responsáveis por diversos outros efeitos, tais como: coagulação sanguínea, parada cardiovascular, hemorragias, mioglobulúria e liberação de compostos farmacologicamente ativos, semelhantes à histamina e à bradicinina (Rothchild e Rothchild, 1979).

1.8.1 *Bothrops jararacussu*

A *Bothrops jararacussu* é uma serpente pertencente à família Crotalidae, sendo amplamente encontrada na América do Sul. No Brasil, tal serpente é encontrada nos estados de Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e sul da Bahia (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

As neurotoxinas de origem botrópico têm sido isoladas e caracterizadas em preparações biológicas e não parecem desempenhar papel relevante no envenenamento botrópico. Mas os venenos botrópicos das espécies brasileiras, de forma geral, foram pouco estudados em suas frações isoladas, devido à falta de uma otimização na metodologia, que permita a pronta recuperação da fração responsável do efeito neurotóxico, sem perda da atividade biológica. Existem fatores ainda desconhecidos que podem estar atuando de forma despercebida e que merecem ser abordados desde uma ênfase bioquímica até uma biológica.

Os estudos sobre fatores neurotóxicos no veneno botrópico têm sido realizados com algumas espécies, tais como a *Bothrops jararacussu* (Rodrigues-Simioni L., *et al.*, 1983; Queiroz L. S, Santo Neto H., *et al.*, 1985), revelando valiosas informações a respeito de sua ação neurotóxica em preparação nervo-músculo e nervo ciático de rã. Isso se revela, através de estudos miográficos e de eletrofisiologia sendo atribuída, à fração IV, desse inicial processo cromatográfico, o efeito acima citado. Posteriormente esta fração foi denominada Bothropstoxina (BthTX) e purificada em dois

processos cromatográficos: o primeiro, correspondendo à fração SIII; e o segundo, à S_{III}-SP_{IV}, sendo esta caracterizada e seqüenciada por Cintra, A.C., *et al.*, (1993) como uma fosfolipase A₂ Lys49 (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

Heluany, N.F., *et al.* (1992) evidenciaram o efeito neurotóxico da BthTX sobre as preparações *biventer cervicis* de pintainho e nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. Cogo, J.C., *et al.* (1993) mostraram que o veneno de *Bothrops insularis* também possui um efeito neurotóxico na preparação *biventer cervicis* de pintainho (evidenciando ser dose dependente) e também quantificaram níveis elevados de CK, revelando também o efeito miotóxico desse veneno. Posteriormente, foi demonstrado que a responsável pelo efeito neurotóxico era uma fosfolipase A₂ com atividade. (Cogo, J.C., *et al.*, 1998).

Bonfim, *et al.* (2001) isolaram uma fosfolipase A₂ com atividade catalítica, denominada BjIV, a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu*, e perceberam que esta era desprovida de atividade neurotóxica em doses de 50 µg/ml., na preparação de nervo frênico-diafragma isolado de camundongo.

Soares, A.M., *et al.* (2002) evidenciaram que a presença de íons Mg²⁺ diminui a atividade enzimática e farmacológica da BthTX-I de *Bothrops jararacussu*. Lobo de Araújo, A. *et al.* (2002) também tem evidenciado que tanto o veneno, como uma fração caseinolítica de *Bothrops lanceolatus*, possui um efeito neurotóxico sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, assim como os estudos eletrofisiológico mostram que o veneno total é capaz de aumentar ligeiramente a amplitude e frequência dos potenciais de placa em miniatura (PPM). No entanto, este efeito não foi observado na fração purificada. Estes resultados sugerem que esta neurotoxina purificada atue exclusivamente de forma pós-sináptica e que se trata de uma proteína de 27,5 kDa com estrutura não fosfolipásica e uma única cadeia polipeptídica.

Costa, P.D., *et al.* (1999) têm evidenciado que o veneno de *Bothrops pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de rato. Soares, A.M., *et al.* (2000) caracterizaram uma neurotoxina miotóxica, BnSP-7, uma Lys49 fosfolipase A₂ de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Prado-Franceschi J., *et al.* (1998), caracterizaram uma miotoxina com atividade neurotóxica de *Philodryas olfersii* (serpente verde), uma serpente da família Colubridae, considerada não peçonhenta, mas agressiva. Trata-se de uma proteína ácida de 20 kDa e um pI em torno de 4,8.

1.8.2 *Bothrops alternatus*.

Esta serpente é encontrada no centro, no norte e no nordeste da Argentina, no sul do Paraguai e nas regiões sul, sudeste e parte do centro-oeste do Brasil (Campbell & Lamar, 1989). Seu tamanho

médio é em torno de 1m de comprimento, podendo chegar perto de 2m, sendo possível relacionar o rendimento máximo de peçonha, acima de 200 mg (peso seco) por espécime, em relação a *B. atrox*, *B. insularis*, *B. moojeni*, e *B. jararacussu* (Furtado, *et al.*, 1991; De Roodt, *et al.*, 1998b).

Pela elevada quantidade de veneno presente na peçonha desta serpente, pode-se explicar, em parte, a gravidade do envenenamento causado por ela. Embora a *Bothrops alternatus* seja uma espécie agressiva e perigosa, o seu veneno é pouco estudado, quando comparado à peçonha de outras espécies, tais como *Bothrops jararaca*, amplamente estudada pela importância clínica que tem nos acidentes ofídicos.

A *Bothrops alternatus*, à semelhança com as outras serpentes botrópicas, possui uma variedade de proteínas e enzimas, algumas das quais já purificadas, como: 1) a PLA₂ (Nisenbom, *et al.*, 1986a; Nisenbom, *et al.*, 1986b; 1988); 2) a trombina-like balterobin, parcialmente caracterizada (Smolka, *et al.*, 1998); 3) um inibidor de trombina, a botroalternina, semelhante à botrojaracina de *Bothrops jararaca*; e 4) uma metaloprotease com um domínio tipo desintegrina, capaz de inibir a adesão celular (Souza, *et al.*, 2000).

Do ponto de vista imunológico, foi estudado o fato de estas proteínas compartilharem vários antígenos com outros venenos botrópicos, levando a uma neutralização de sua atividade biológica por antivenenos comerciais polivalentes (Siles, V. *et al.*, 1974, 1976, 1977; Antunes, *et al.*, 1989; Dias da Silva, *et al.*, 1989; Moura-da-Silva, *et al.*, 1990b, de Roodt, *et al.*, 1988a, 1999; Heneine, *et al.*, 1999; Estevão-Costa, *et al.*, 2000; Fernandes, *et al.*, 2000), assim como por soro de *Didelphis albiventris* (Soares, *et al.*, 1997).

Os efeitos locais observados no envenenamento de *Bothrops alternatus*, segundo os casos clínicos, assim como os trabalhos experimentais reportados (Bauab, *et al.*, 1994) são: edema (Flores, *et al.*, 1993; Marunak, *et al.*, 1999), hemorragia (Pérez, *et al.*, 1997b, 1998; Marunak, *et al.*, 1999; de Roodt, *et al.*, 2000) e necrose (Queiroz and Petta, 1984; Marunak, *et al.*, 1999).

No caso de acidentes humanos, tem sido reportado que as bolhas, a hemorragia e a necrose ocorrem no local da picada, em 22%, 41% e 9,4% dos casos, respectivamente. (Bauab, *et al.*, 1994). Estas estatísticas são muito semelhantes às aquelas observadas respectivamente nos envenenamentos botrópicos (Gutierrez & Lomonte, 1989; Watt, 1989; Jorge & Ribeiro, 1990; Fan & Cardoso, 1995, Moura-da-silva, *et al.*, 1990a, 1991; Andrião-Escarso, *et al.*, 2000), evidenciando-se a ausência de miotoxinas básicas (Moura-da-silva, *et al.*, 1990a, 1991; Andrião-Escarso, *et al.*, 2000) comuns a vários outros venenos botrópicos (Gutierrez & Lomonte, 1995, 1997).

Os efeitos locais, tais como edema e resposta inflamatória, poderiam estar sendo mediados pela presença de metaloproteinasas (Gutierrez & Rucavado, 2000), como consequência da liberação do

ácido araquidônico convertido em outros mediadores do processo inflamatório, tais como leucotrenos via lipoxigenase (Flores, *et al.*, 1993) ou pela liberação de mediadores endógenos como a histamina (Antunes, *et al.*, 1989) e citocinas, tal como TNF α (Moura-da-silva, *et al.*, 1996; Petricevich, *et al.*, 2000).

A DL₅₀ de *Bothrops alternatus* tem muita variação, embora seja semelhante à de outras serpentes botrópicas, pois varia de 2,2 a 11,5 mg/kg. i.p., devido à procedência geográfica (Sánchez, *et al.*, 1992) e a idade da serpente, pois se sabe que exemplares jovens possuem uma peçonha mais potente que adultos, tanto na letalidade (Furtado, *et al.*, 1991) quanto na atividade edematogênica e hemorrágica (Marunak, *et al.*, 1999).

Também a peçonha de *Bothrops alternatus* leva a distúrbios na cascata de coagulação sanguínea em humanos (Bauab, *et al.*, 1994) e em animais como o cão (Pérez, *et al.*, 1997a). Segundo dados clínicos, cerca de 97% dos acidentes causados por *Bothrops alternatus* apresentam alterações nos tempos de coagulação (Bauab, *et al.*, 1994).

A peçonha também apresenta uma atividade pró-agregante, mas também com baixa atividade anti-agregante (Francischetti, *et al.*, 1998), a qual é mediada por um inibidor de trombina. O estado de incoagulabilidade pode agravar o estado de hemorragia interna causada pela presença de proteases da peçonha. No entanto, tem sido apontada a presença de algumas metaloproteases no veneno de *Bothrops alternatus*, permanecendo ainda obscuro o desencadeamento da hemorragia sistêmica quando comparada a hemorraginas, como a jararagina de *Bothrops jararaca* (Kamiguti, *et al.*, 1996; Kamiguti, *et al.*, 1998). Essa hemorragia interna pode resultar em hipovolemia e choque circulatório, o qual, em conjunto com a IRA provocada pela peçonha, leva à morte da vítima (Rosenfeld, 1971; Watt, 1989; Fan and Cardoso, 1995; Russell, *et al.*, 1997).

Até agora não há estudos a respeito de um fator, ou fatores neurotóxicos, que apresente a peçonha de *Bothrops alternatus*, provavelmente pela ausência de sintomas neurotóxicos característicos do envenenamento causado por serpentes Corais e Cascavéis.

Nossos estudos iniciais têm revelado a presença de algum fator neurotóxico capaz de levar à diminuição da resposta contrátil no modelo de *biventer cervicis* de pintainho, criando uma grande expectativa pelo isolamento, purificação bioquímica e biológica do fator responsável por este efeito; sem desconsiderar a possibilidade de se tratar de uma PLA₂, com efeito neurotóxico, motivo que nos leva a colocar em consideração o presente projeto, que pode prover novas informações sobre o estudo da peçonha desta serpente.

1.9 Fosfolipases A₂

Além das PLA₂ cataliticamente ativas (Asp49), existem outras que são definidas conforme a sua natureza molecular como proteínas com estrutura molecular similar aos das PLA₂ (Asp49). São proteínas desprovidas de atividade catalítica e que, portanto, para desencadear suas atividades biológicas, dependem de outros mecanismos, que são independentes da liberação do ácido araquidônico (Pederson *et al.*, 1994; Maraganore *et al.*, 1984; Gutierrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1985 e Salistre de Araújo *et al.*, 1996).

Segundo Gutiérrez e Lomonte (1995), as PLA₂ poderiam se ligar a determinados sítios com uma carga parcial negativa que poderiam servir de ancoragem para as PLA₂. Unidas assim à membrana celular, poderiam gerar uma desorganização da membrana, levando a uma alteração na permeabilidade e conseqüente destruição celular, devido mais à desorganização celular do que pela toxicidade da PLA₂.

Um outro motivo que reforçaria a desorganização gerada pela PLA₂ poderia ser a própria fluidez da membrana. Gutierrez e Lomonte (1995) sugerem uma ligação ao próprio lipídio da membrana.

Pederson *et al.* (1994) estabelecem, contudo, que os trabalhos realizados com estas PLA₂ não são conclusivos, devido a um aspecto muito importante, como o grau de pureza das amostras utilizadas que poderiam estar contaminadas com PLA₂ (Asp49). Fletcher e Jiang (1993) postulam que estas PLA₂ inativas poderiam hidrolisar os fosfolipídios da membrana, com a correspondente liberação de ácido araquidônico.

Além das propriedades neurotóxicas desencadeadas pelas PLA₂, essas também apresentam uma atividade miotóxica própria de veneno de serpentes e abelhas. Estas são compostas de 110 a 135 resíduos de aminoácidos e possuem uma estrutura básica das PLA₂ ativas, sendo divididas em dois grandes grupos: 1) as Asp49 (D49), que possuem o resíduo Asp 49 conservado, importante para a catálise; e 2) as miotoxinas, caracterizadas por terem Lys49 no lugar de Asp49, o que gera assim uma perda na ligação ao cálcio (Ca²⁺) e também uma perda na atividade catalítica sobre o substrato.

O mecanismo mionecrótico sobre o músculo pelas PLA₂ (D49) e (K49) é o mesmo, ou seja, lises rápidas do sarconema, levando a um rápido estado mionecrótico. A função da atividade catalítica sobre o efeito miotóxico ainda não está esclarecida, já que as miotoxinas Lys49 não possuem atividade lipolítica, exibindo, portanto, outros mecanismos que devem estar envolvidos na expressão da atividade miotóxica (Fletcher *et al.*, 1997).

No caso do veneno Botrópico, como de outras espécies de serpentes, tem-se mostrado a presença de isoformas, tanto para diferentes indivíduos de uma mesma espécie, como para os mesmos

indivíduos. Sabe-se que as serpentes possuem vários genes que codificam várias isoformas. Contudo, a expressão e a síntese das diferentes isoformas ainda é desconhecida. A separação destas isoformas só tem sido possível com o uso de HPLC de fase reversa (Toyama, *et al.*, 2000).

Segundo Kini, R.M. (2003), as PLA₂ procedentes de veneno de serpentes compartilham uma similaridade em estrutura e função com as enzimas de mamífero. No entanto, dentre as PLA₂ de veneno de serpente, muitas são tóxicas e induzem um amplo espectro de efeitos farmacológicos. Propõe-se que as PLA₂ procedentes de veneno de serpentes possuam uma habilidade de se unir a um “sítio específico”, devido à sua alta afinidade de se ligar a proteínas específicas que atuam como receptores ou aceptores. Essa ligação específica de PLA₂ se dispõe pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico.

A interação da alta afinidade da PLA₂ com seuceptor (proteína alvo) deve-se provavelmente à complementariedade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waals, que se dá entre o sítio farmacológico e o sítio alvo na superfície do receptor protéico ouceptor. A PLA₂ pode induzir seus efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade enzimática.

A identificação dos sítios farmacológicos tem o potencial para a exploração no desenvolvimento de novos sistemas úteis, devido ao amplo espectro de especificidade em tecidos e órgãos, para o “direcionamento” de proteínas específicas a um tecido alvo particular ou órgão.

Assim, o esquema 2 representa a hipótese apresentada por Kini, R.M. (2003):

1 – A célula alvo difere de uma célula não alvo (extremo direito), pela presença de um sítio alvo (A). As células ou tecidos diferentes possuem os sítios alvos distintos na superfície. Estes sítios alvos podem ser uma proteína ou glicoproteína transmembrana que se encontra na superfície da célula.

2 – Temos o sítio complementar ao sítio alvo, o sítio farmacológico (F) está presente na PLA₂ específica, além do sítio catalítico (C). Uma PLA₂ não específica (extremo direito) não possui o sítio farmacológico (F). A natureza e a localização dos sítios farmacológicos na superfície molecular das PLA₂ variam com a enzima.

3 – Quando se administra a PLA₂, através da via intraperitoneal ou intravenoso, as PLA₂ específicas procuram e se ligam às células alvos, devido à sua afinidade alta pelo sítio alvo. Esta ligação específica, assim como a acessibilidade do sítio alvo, dependeria da acessibilidade da célula. De outro lado, uma PLA₂ não específica vai se ligar a muitos tipos diferentes de células. As PLA₂ não específicas, assim, não vão lesar a célula alvo eficazmente como a PLA₂ específica.

4 – Um sistema *in vitro* ou *ex vivo*, uma célula, tecido ou órgão incuba-se com a PLA₂. As PLA₂ específicas e não específicas podem lesar a célula alvo e poderiam exibir “Efeitos farmacológicos”. Isto é particularmente verdade quando a atividade enzimática desempenha um papel

maior, induzindo o efeito farmacológico, embora sejam necessárias quantidades mais altas (ou cataliticamente as quantidades muito eficazes) de enzimas não específicas para induzirem os efeitos similares das PLA₂ específica.

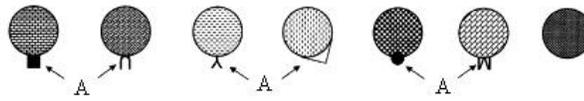
5 – As PLA₂ específicas se ligam ao alvo (ou acceptor), a proteína na membrana plasmática (MP) com uma alta afinidade (10^{-9} M). No entanto, também ocorre uma afinidade baixa (10^{-4} a 10^{-6} M) quando se liga a fosfolípidios. Os estudos de ligação específica sempre indicam a afinidade alta e baixa aos sítios alvos. A afinidade é alta ao sítio alvo, é baixa comparada a sítios de ligação de baixa afinidade. Os tratamentos para destruir as proteínas alvo produzem a perda da alta afinidade de se ligar, mas não baixa a afinidade dos sítios alvos. Assim, as PLA₂ não específicas ligam-se aos fosfolípidios com a afinidade baixa e não se liga ao sítio alvo.

6 – Vemos que o sítio alvo é um “bom encaixe” para o sítio farmacológico em espécies de células ou tecidos susceptíveis. Nas espécies não susceptíveis, aquelas que têm sofrido processos de mutações (M) ou modificações pós traducionais (MPT) como glicosilações, células ou tecidos susceptíveis são suficientes para alterar a afinidade específica da PLA₂ com a célula alvo. Isso explica a especificidade de das espécies observadas, na habilidade das PLA₂ de exibir seus efeitos farmacológicos (Kini, M.R 2003).

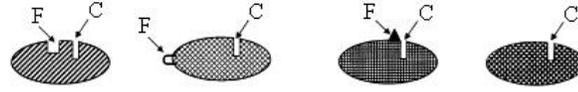
Por outro lado, Diaz-Oreiro e Gutiérrez (1997) demonstraram que modificações químicas realizadas nos resíduos de lisina inibem substancialmente a atividade miotóxica e anticoagulante, mostrando a importância dos resíduos de lisina. De acordo com os trabalhos de Arni e Ward (1996) e Selistre de Araujo *et al.* (1996), estas lisinas e outros aminoácidos carregados positivamente ajudariam as PLA₂ miotoxinas a se posicionarem sobre um ou mais sítios receptores localizados na membrana celular das fibras musculares. De acordo com Gutiérrez e Lomonte (1995) e Selistre de Araújo (1996), existem evidências da existência de receptores de alta afinidade. Estes receptores poderiam ser, de acordo com os trabalhos de Fletcher *et al.* (1997), receptores ligados aos canais de sódio ou o próprio canal poderia estar envolvido.

Tem sido estudado que o complexo crotóxina de *Crotalus durissus terrificus* atua de forma sinérgica, sendo que o componente ácido (crotapotina) estaria potencializando o efeito neurotóxico da crotóxina, como descrito por Rübsamen *et al.* (1971), Horst *et al.* (1972), Bom (1982), Faure e Bon (1988) e Kini (1997). Trabalhos semelhantes foram realizados para a *Crotalus durissus collilineatus* (Ponce Soto, L.A. 2002), a partir das isoformas de crotapotina (F3 e F4), com a fração PLA₂ (F6) nas doses de 10 e 20 µg/ml., utilizando uma razão molar 1:1 e mostrando o efeito neurotóxico no bloqueio da transmissão neuromuscular, evidenciado pelo bloqueio da resposta contrátil, como no registro miográfico, na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo.

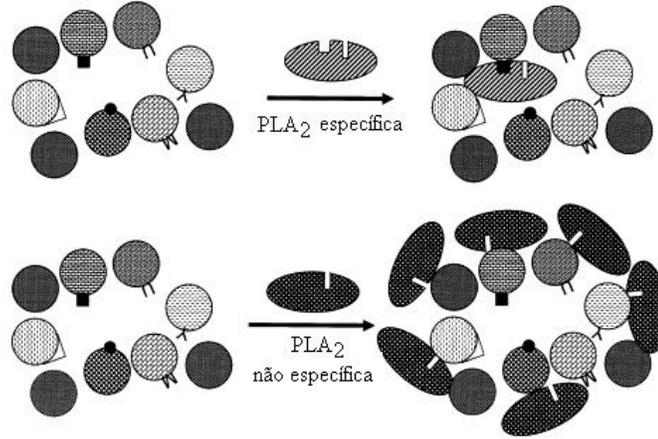
1. Sítios alvo na superfície celular



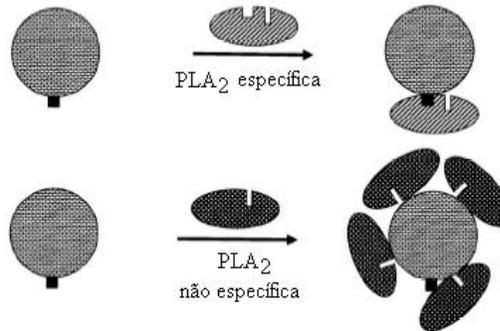
2. Sítio farmacológico das PLA₂



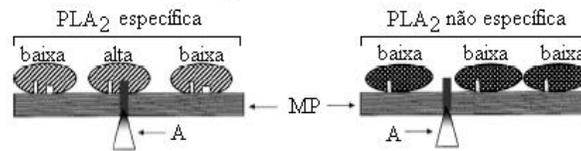
3. Administração *in vivo* das PLA₂



4. Estudos de PLA₂ *in vitro* ou *ex vivo*



4. Ligação de afinidade de PLA₂



5. Espécies específicas



Esquema 2 - Modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA₂ (Kini, M.R. 2003).

Estes resultados poderiam sugerir o alto grau de pureza das frações isoladas, já que foi utilizada uma razão molar tão baixa (1:1), o que sugeriria que a combinação do complexo crotoxina pode ser devido ao equilíbrio de cargas entre a crotapotina e a PLA₂, para reproduzir o efeito neurotóxico desejado.

Estudos de sinergismos entre os componentes do complexo crotoxina, provenientes de veneno crotálico e outros, com PLA₂ de veneno botrópico, assim como estudos de neutralização, poderiam ser de muita utilidade para estabelecer, através de estudos de homologia seqüencial de proteínas e de função biológica, a filogenia deste grupo de proteínas.

1.10 Função da atividade enzimática nos efeitos farmacológicos das PLA₂

As enzimas PLA₂ provenientes de veneno podem induzir sintomas farmacológicos, os quais podem ser dependentes ou independentes da atividade hidrolítica de fosfolipídios. No caso das atividades farmacológicas dependentes da atividade catalítica, muito dos sintomas podem ser causados pela hidrólise total de fosfolipídios ou pela liberação de lisofosfolipídios e ácidos graxos.

A hidrólise total de fosfolipídios de membrana tem registrado alguns efeitos, tais como: 1) Mudanças na conformação biológica das membranas (Lin-Shiau, *et al.*, 1978); 2) Alterações no comportamento da molécula alvo, devido a mudanças em seu micro ambiente; 3) Mudanças na permeabilidade seletiva a íons, drogas; 4) Alterações na função do sistema receptor-ligante, o qual depende muito de fosfolipídios acoplados ao sistema (Rosemberg, 1986).

Os mecanismos de indução dos efeitos farmacológicos, os quais são dependentes da ação enzimática, são detalhados no esquema 3A. Ao contrário, os efeitos farmacológicos podem ser induzidos pela união física da enzima PLA₂ à molécula alvo, sendo independentes da atividade catalítica. A união física pode interferir de alguma forma (esquema 3B), impedindo a união de metabólitos aos segundos mensageiros. As PLA₂ podem também evidenciar estes efeitos pela ação de agonistas. A união das PLA₂ a receptores específicos podem ser fundamentais no estímulo de dois dos mensageiros e contribuir com a alteração do status metabólico das células alvo. Nesta alteração do status metabólico das células alvo, pode haver liberação de mensageiros primários, que proporcionam os efeitos farmacológicos observados.

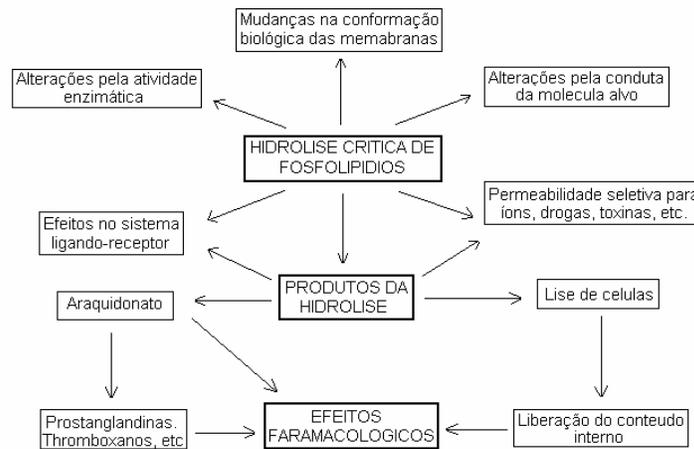
Dois (catalítico e farmacológico) são os principais mecanismos que poderiam desencadear os efeitos farmacológicos. Estes são provavelmente os mais importantes, nas quais as enzimas PLA₂ induzem efeitos farmacológicos em adição àqueles que foram citados aqui (esquema 3A e B).

No caso dos efeitos farmacológicos, estes podem estar envolvidos (sem dependência) com a atividade enzimática e assim potencializar a sua atividade farmacológica, que pode ser determinada

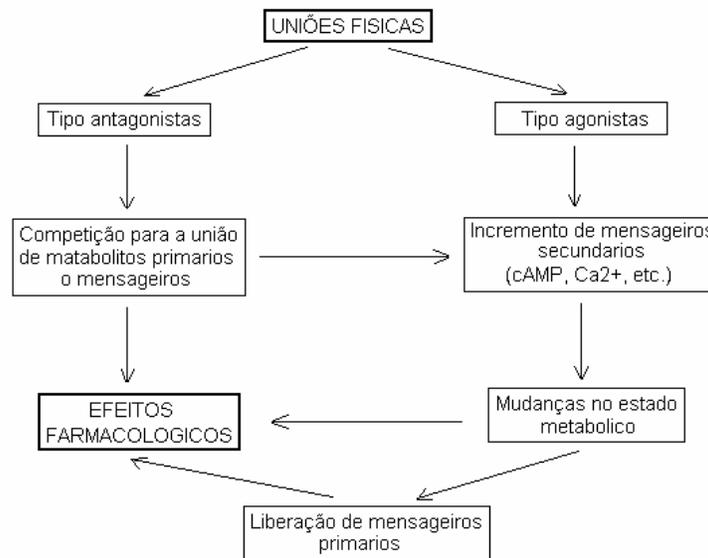
pela afinidade entre a molécula alvo, o sítio farmacológico e a eficiência enzimática. As neurotoxinas pré-sinápticas, crotoxina e taipoxin, que se unem à membrana sinaptosomal com alta afinidade, são exemplos de toxinas altamente específicas. (Tzeng, *et al.*, 1986).

As diferenças na potência farmacológica estão provavelmente relacionadas com a eficiência enzimática e a preferência por substrato da toxina. No caso dos efeitos farmacológicos independentes da atividade catalítica, existe uma absoluta afinidade com os receptores do tecido, sendo este um fator primário que determina a potência farmacológica. No entanto, a hidrólise de fosfolipídios pode agravar os efeitos farmacológicos (Kini R.M. and Evans, H.J. 1989a, b e c).

A



B



Esquema 3. Modos e mecanismos de ação de enzimas fosfolipases A_2 , sendo: A) Mecanismos dependentes da atividade catalítica; e B) Mecanismos independentes da atividade catalítica (Kini R.M. and Evans, H.J. 1989).

II. OBJETIVOS

- 2.1 Isolamento e caracterização físico-química de toxinas que agem na junção neuromuscular, provenientes de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus* (V-1, PLA₂ D49 F6) e *Bothrops jararacussu* (isoformas PLA₂ D49 Bj -IV e Bj-V) presentes na fração BthTX-II, *Bothrops alternatus* (Bt II-2), através de cromatografia convencional e de alta eficiência HPLC, eletroforese SDS-PAGE, espectrometria de massas (MALDI-Tof), análise de aminoácidos e estrutura primária.
- 2.2 Caracterização biológica das neurotoxinas *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, através de:
- 2.2.1 Uso de modelos de miografias, em nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, e biventer cervicis de pintainho.
- 2.2.2 Estudos de eletrofisiologia, através da determinação dos potenciais de membrana ou repouso (PM).
- 2.2.3 Caracterização miotóxica, citotóxica e edematizante da neurotoxina Bt II-2 PLA₂ homóloga (K49), isolada a partir do veneno total de *Bothrops alternatus*.
- 2.3 Análise comparativa no bloqueio da junção neuromuscular e ação miotóxica de fosfolipasas A₂ crotálicas (F6 de *Crotalus durissus collilineatus*) e botrópicas (Bj-IV eV de *Bothrops jararacussu* e Bt II-2 de *Bothrops alternatus*).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

São utilizados para os ensaios biológicos e farmacológicos camundongos Swiss (18-20g) e pintainhos de 6 a 8 dias de nascidos, obtidos no biotério central da UNICAMP.

3.2 Venenos e Reagentes

O veneno total de *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus* são adquiridos do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda (Fazenda Boa Esperança, Batatais, São Paulo).

Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza, obtidos da Sigma, Aldrich Chemicals, Merk e Bio Rad.

3.3 Purificação do veneno total *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*

3.3.1 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

Cerca de 20mg do veneno bruto é homogeneizado em tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9. Esta solução de veneno é então centrifugada a 10000 rpm por 2 minutos para clarificação da solução. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna pré-empacotada de exclusão molecular em HPLC, Protein Pack SW 300 (0.78 x 30cm) (Waters). A coluna cromatográfica acoplada ao sistema HPLC-biocompatível, APPS LC 650E (Waters), foi previamente equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio, pH 7,9, 0,1M, 60 minutos antes da corrida. A eluição do material é realizada a um fluxo constante de 0,2ml/min e monitorada a uma absorbância de 280 nm. As frações coletadas em um coletor de frações automático Foxy 200 são liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.3.2 HPLC troca iônica.

Para a purificação do veneno total de *Bothrops jararacussu*, é utilizada uma coluna Protein-Pack SP 5PW (0,78 x 8cm) (Waters Inc.). O sistema cromatográfico utilizado é o APPS LC650E (Waters), equipado com uma bomba para quatro canais de solventes. A coluna e o sistema cromatográfico é previamente equilibrados com tampão inicial (Bicarbonato de Amônio 0,05M, pH 7,6). A eluição das amostras é realizada usando-se um gradiente linear de concentração de Bicarbonato de Amônio (1,0M, pH 7,9).

A corrida cromatográfica é monitorada em 280 nm e as frações são coletados em um coletor automático Foxy 200. As amostras obtidas são agrupadas e posteriormente liofilizadas e guardadas a -20°C.

3.3.3 HPLC de fase reversa

Tanto as toxinas crotálicas como botrópicas são re-purificadas em uma coluna HPLC de Fase Reversa preparativa. O sistema cromatográfico a ser usado será o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 2,0ml e uma coluna μ -microbondapak C-18 0,78 X 30 cm (preparativa), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampão A). Inicialmente a eluição das amostras é realizada, através de um gradiente linear com acetonitrila 66% (Tampão B). Posteriormente este gradiente é modificado para a otimização da purificação das frações, bem como do veneno total. As frações são monitoradas a 280 nm.

3.4 Eletroforese em PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida é realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), em que as placas de poliacrilamida (PAGE) são feitas de modo descontínuo. O gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5% de acrilamida estoque (30%T, 0,8%C). Para o gel de concentração, foi usado o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, enquanto que para o gel de corrida foi usado o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%.

A corrida eletroforética é realizada em um Sistema High Small II SE 250 (Hoefer Scientific). Tanto as amostras quanto os marcadores foram dissolvidos no tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética é realizada usando-se uma amperagem constante de 40 mA, durante 60 minutos. Ao final da eletroforese, os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C e o excesso de corante removido em ácido acético 7%. Também são utilizadas, para análises do grau de homogeneidade molecular das amostras, as eletroforeses em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por Schägger e Von Jagow (1987).

3.5 Determinação da atividade PLA₂

A determinação da atividade fosfolipásica é realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996).

O substrato é ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. São utilizadas amostras com uma concentração de 0,1 mg/ml de amostra, no caso do veneno total, e fosfolipase A₂ isoladas. As amostras são incubadas junto com o substrato, tampão de reação (Tris-HCl 0,1M Ca²⁺ 0,01M pH=8) por 20 minutos. Após o tempo de incubação, a reação enzimática é lida em um espectro a 425 nm de absorbância.

3.6 Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos é realizada no analisador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters) seguindo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984). Os aminoácidos derivatizados (PTC aminoácidos) das amostras serão identificados, em uma coluna de fase reversa, de acordo com o tempo de retenção dos PTC-aminoácido padrão. Para estimativa da composição global, a análise de composição de aminoácidos será realizado de acordo com método descrito por Toyama *et al.*, (1995, 1998).

3.7 Determinação da estrutura primária (Sequenciamento)

3.7.1 Redução e Carboximetilação

As toxinas purificadas, conforme descrição na parte de purificação, são repurificadas em HPLC de fase reversa, usando-se uma coluna analítica.

A toxina pura é dissolvida em 6M guanidina/HCl, 0,4M Tris pH 8.15, 2mM EDTA, reduzida com dithiothreitol (DTT) e carboximetilada com ¹⁴C-ácido iodo acético (Marangoni, *et al.*, 1995). A dessalificação da amostra será realizada em coluna G-25, previamente equilibrada com ácido acético glacial 1M.

3.7.2 Digestão enzimática e purificação dos fragmentos peptídicos

As toxinas liofilizadas, reduzidas e carboximetiladas, são inicialmente digeridas com duas enzimas: a protease V8 de *Staphilococcus aureus*, por 16hr a 37°C com uma razão enzima substrato de 1:30. A reação é interrompida e a amostra é liofilizada logo em seguida de acordo com o método descrito por Houmard e Drapean (1972).

As toxinas também são digeridas com Clostripaina por 8h, a 37°C, segundo processo descrito por Cintra *et al.* (1993). Após interrupção da reação a amostra é liofilizada.

As toxinas digeridas com Clostripaina e com protease V8 são repurificadas em HPLC de fase reversa (Water PDA 991 System), usando-se uma coluna μ -Bondapak C-18. A separação dos peptídeos é feita com um gradiente de Acetonitrila em 0.1% de ácido Trifluoracético.

3.7.3 Sequenciamento N-terminal das Neurotoxinas

A seqüência de aminoácidos é obtida pelo sequenciamento da região N-terminal da proteína reduzida e carboximetilada, e sequenciamento completo, através dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática.

Tanto o sequenciamento automático da região N-terminal, como dos peptídeos, são feitos em um seqüenciador automático modelo Procise 491 da Applied Biosystem. Os PTH aminoácidos são identificados em um analisador automático de PTH aminoácidos modelo 120 A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção dos 20 PTH aminoácidos padrões.

A Cys é identificada como PTH carboximetil cisteína marcada e confirmada por contagem radioativa.

3.8 Análise por Espectrometria de Massas por Maldi-Tof (MS)

A massa molecular das toxinas é analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MAALDI TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 μ l. da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 μ l. da matriz. A matriz é preparada com ácido α -ciano-4-hidroxi-cinnamico (Sigma), 60% acetonitrila e 0.1% v/v TFA. E a massa é analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV o laser ajustado a 2890 mJ/cm² em 300 ns e o modo de análise é linear.

3.9 Medida da atividade neurotóxica em nervo frênico-diafragma de camundongo

Para estes experimentos são utilizadas preparações com nervo frênico de diafragma de camundongo. A preparação é removida cirurgicamente de animais anestesiados com hidrato de cloral (3mg/ kg) e mortos por seção e sangria dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragmático, juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico) é cuidadosamente retirada, como descrito por Bülbring (1946), e colocada em uma cuba contendo 5,0 ml de solução de Tyrode com a seguinte composição em mM; NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl₂ 1.88, KH₂PO₄ 1.17, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 25.0 e glicose 11.65. e em seguida, presa, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na

base da cuba. A temperatura é mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% de CO₂).

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

O músculo é submetido à tensão constante de 5g/cm, por meio de um fio preso à porção tendinosa, ligado ao transdutor isométrico, sendo a estimulação indireta, com pulsos supramaximais, gerados por estimuladores S48F (Grass Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 HZ de frequência, durante de 20 minutos para estabilização. Ao término do período de incubação, são aplicadas as amostras obtidas do fracionamento. Para cada experimento, são utilizados, no mínimo, três animais.

3.10 Medida da atividade neurotóxica em músculo biventer cervicis de pintainho

A preparação é isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos são anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo é suspenso em uma cuba de 5ml, contendo solução nutritiva de Krebs, com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ e C₆H₁₂O₆ 11,65. A solução é arejada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37°C. A preparação é submetida a uma tensão constante de 0,5 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo).

São aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição de KCl (13,4 mM) e ACh (110 µM) são registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM.

Os registros das contraturas para KCl e ACh são realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno). As concentrações de toxinas isoladas utilizadas são 1, 5, 10 e 20µg/ml.

3.11 Estudo Eletrofisiológico

A preparação com sua face torácica voltada para cima (hemidiafragma esquerdo), é fixada, horizontalmente, por meio de alfinetes entomológicos, em cuba revestida de resina e silicone, (“Doiw Corning-Sylgard”). A cuba foi preenchida com 3 ml. De solução Tyrode de composição já descrita. A temperatura foi mantida a 30-34°C com o auxílio de uma lâmpada de raios infravermelhos e aeração feita com o borbulhamento de carbogênio (mistura de 95% O₂ 5% CO₂). Para a observação dos

parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina de microscópio estereoscópico (WILD M7 S-SWITZERLAND) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Usou-se a técnica convencional de registro com microeletrodo (Fatt e Katz, 1951). (Os microeletrodos de vidro preparados com o auxílio do “Vertical Pipete Puller” (modelo 700 D-David Kopf Instruments; CA, USA), é preenchidos com KCl 3M, tendo uma resistência entre 8-30 M \cdot). As micropipetas são introduzidas intracelularmente (seis leituras em regiões distintas) sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador “Leitz”, para a medida do potencial de repouso (PR) e captação dos potenciais em miniatura de placa terminal (pptom).). O eletrodo indiferente constitui-se de um fio de platina incluído em tubo curvo (para adaptação a cuba) preenchido com agar-salina. O PR é registrado “on line”, usando-se microcomputador XT-DICOM com capacidade de registro para potencial de repouso, forma de onda dos potenciais, bem como as análises da amplitude e tempo para o pico dos potenciais evocados. Os pptom são registrados em osciloscópio Tektronix, ou em fisiógrafo GOULD RS 3400. A medida do PR foi feita na região das placas motoras e também, aleatoriamente, em regiões distantes destas.

3.11.1 Registro do Potencial de Membrana ou repouso

Nas experiências realizadas para avaliar o efeito da toxina sobre o potencial de membrana, esta é utilizada, na concentração de 1 μ g/ml A determinação do potencial de membrana (cinco leituras) são feitas em regiões distintas da fibra muscular. Após a determinação da medida do potencial de membrana-controle, adicionou-se mostra ao banho e procedeu-se as leituras aos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, na região da placa quanto fora da região da placa motora em cinco diferentes locais da fibra.

3.12 Determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados por via intramuscular (miotoxicidade local) e intravenosa (miotoxicidade sistêmica) com a PLA₂ D49 F₆ de *Crotalus durissus collilineatus* e a Bt II-2 de *Bothrops alternatus* (atividade miotóxica)

Pretendeu-se encontrar as diferenças nos níveis de CK plasmáticos em camundongos de 18 a 20g de peso, inoculados com a fração Bt II-2 (PLA₂ homologa K49) de *Bothrops alternatus*. É utilizado um n de 5 para cada experimento.

A dose inoculada de é 20 μ g tanto a nível intramuscular quanto intravenoso, da fração Bt II-2 (PLA₂ homologa K49) de *Bothrops alternatus*. São dosados os níveis de CK plasmáticos depois de 2, 4, 6, 9 e 24 horas respectivamente. O kit utilizado é CK – Nac (Creatine Kinase Bicon Diagnostick

Germany). A 1ml do substrato preparado, são acrescentados 10 µL do plasma obtido por centrifugação do sangrado da região caudal do camundongo. Incuba-se por 2 minutos e se lê a 430 nm o incremento da absorbância, posteriormente multiplica-se pelo fator 4130 (Creatine Kinase Bicon Diagnostick Germany).

3.13 Determinação da atividade inflamatória da fração Bt II-2 de *Bothrops alternatus*.

Para o presente experimento, são utilizadas uma solução stock e inicial de 400 g/ml de PBS (20 µg/50µl). Depois são feitas diluições, tomando-se 500 µl da primeira e mesclando-se com 500µl de PBS (10µg/50µl). Logo tomou-se 500 µl dessa e mesclou-se com outros 500 µl de PBS (5 µg/µl). E finalmente é feita a última diluição sob o mesmo procedimento para alcançar uma concentração de 2,5 µg/50µl.

Inoculou-se, via intraplantar 50 µg/50µl, grupos de cinco camundongos de 18 a 20 g de peso, determinando-se, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas após da injeção, a porcentagem de edema produzido, mediante comparação entre o aumento em mm da pata inoculada com Lys49 de *Bothrops alternatus* e o aumento da pata inoculada com solução de PBS.

3.14 Determinação do efeito citotóxico em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12) da PLA₂ D49 F6 de *Crotalus durissus collilineatus* e fração Bt II-2 de *Bothrops alternatus*

Pretendeu-se determinar o efeito citotóxico em cultivo celular de mioblastos C2C12, por ação da F6 de *Crotalus durissus collilineatus*, e a fração Bt II-2 (PLA₂ homologa K49) de *Bothrops alternatus*.

Uma micro-placa de 96 poços é utilizada como desenho experimental, escolhendo-se um n de 3, correspondente a 3 poços previamente preenchidos com uma cultura celular de mioblastos C2C12, em um meio DME com 10 – 15% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C e CO₂ 5% (50 µL) previamente incubado em uma estufa de cultura celular.

Depois de retirar 150 µl de meio (sobrenadante), foi acrescentado 150 µl de amostra previamente dissolvida em PBS, contendo as seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 40 µg. Consideram-se dois tipos de controles: positivo em presença de Triton X-100 (+) e negativo só na presença de meio de cultura de DME contendo soro fetal bovino a 1% (-), afim de poder estabelecer parâmetros

percentuais (%) de 0 a 100% de quantificação de lactato desidrogenase (LDH). Depois de 3 horas, retirou-se, de cada poço, 100 µl do sobrenadante, sendo estimada a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), liberada como resultado da lise celular por ação da toxina.

O meio de reação contém 1ml do substrato preparado de acordo com o indicado pelo kit do fabricante (LDH-P UV Método UV otimizado SFBC Lab. Winer), previamente incubado por dois minutos a 30°C. Logo se acrescenta 80 µL do sobrenadante, depois incubado por 3 minutos aproximadamente. E, em seguida, lê-se a absorbância a 340 nm.

Posteriormente ao valor obtido como negativo, transformou-se em simples positivo e multiplicou-se por 1000. O valor obtido é convertido em valor porcentual (%), em relação ao controle positivo máximo encontrado com o Triton X-100.

3.15 Determinação da dose letal 50% DL₅₀

A DL₅₀ da fração Bt II-2 de *Bothrops alternatus* é determinada em camundongos. A via é intravenosa (i.v. 0,1 ml) em músculo gastrocnemio direito, e a sobrevivência dos animais é avaliada 24 horas após. São utilizados camundongos pesando de 18 a 20 gr empregando-se 6 animais para cada dose. A fração é diluída em PBS e as concentrações utilizadas são: 100, 120, 140 e 160 µg/0,1 ml Para o cálculo da DL₅₀ é usado o método de Probits (World Health Organization, 1981).

3.16 Análise Estatística

Os resultados são representados pela média de experimentos ± erro padrão. A significância é obtida através do teste não-pareado *t*-Student e considerado como $p < 0,05$.

IV RESULTADOS

4.1 Purificação da fração V a partir do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus*, e *Crotalus durissus terrificus* (branco e amarelo), em coluna de exclusão molecular Protein Pack 300SW (Waters) em HPLC

20mg do veneno total são aplicados na coluna e o perfil cromatográfico mostra as seguintes frações: a) Cdcoll; I convulxina, II giroxina, III, IV e V crotoxina; b) Cdt(y) e d) Cdt(w). Além de se apresentarem as frações I, II, III, IV e V apresenta-se uma fração VI, que corresponderia a crotamina (Figura 1).

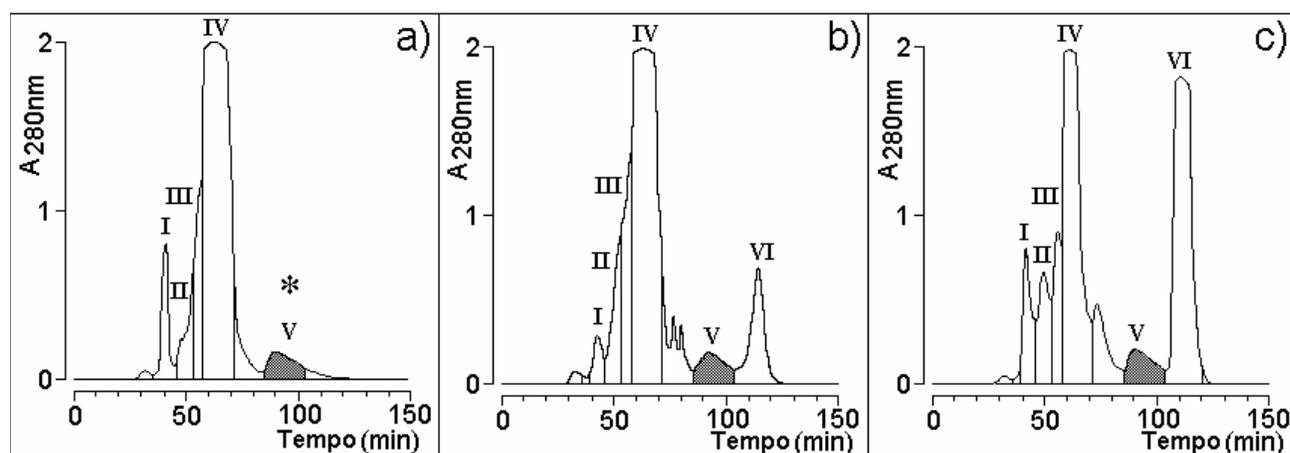


Figura 1 - Cromatografia de exclusão molecular em HPLC em coluna Protein Pack 300 SW (0,78 X 30cm) (Waters) do veneno total de a) Cdcoll, b) Cdt(y) c) Cdt(w). A corrida foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,2M pH 7.9), fluxo constante 0,3 ml/min, monitorada a uma absorvância de 280 nm. As frações denominadas foram I convulxina, II giroxina, III, IV e V crotoxina, e VI crotamina.

4.2 Re-purificação da toxina V-1 a partir da fração V obtida do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* em uma coluna μ -Bondapak C-18 (0,78 X 30 cm) preparativa de fase reversa acoplada a um sistema de HPLC (Waters)

A Figura 2b mostra o perfil cromatográfico da sub fração V-1, em uma coluna μ -Bondapck C-18 (0.78 X 30cm) preparativa (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. A fração V, previamente obtida em uma coluna de exclusão molecular em HPLC, mostra a presença de duas frações majoritárias V-1 e Cdcoll V-2, sendo a fração V-1 (*) a responsável pelo efeito neurotóxico,

segundo o perfil neurotóxico ensaiado. Esta fração mostra um alto grau de pureza e homogeneidade molecular, tanto em condições reduzidas, quanto em não reduzidas, através de eletroforese em SDS-PAGE (figura inserida no perfil cromatográfico), com uma massa relativa de 10 kDa aproximadamente.

O tempo de retenção foi de $21,06 \pm 0,19$ min, sendo eluída aos 50% do tampão B. O perfil cromatográfico da amostra V-1 mostra presença de um único pico de eluição, como mostrado na Figura 2b. As análises em HPLC de fase reversa mostraram também que a fração apresenta um grau de homogeneidade molecular ao redor de 95% de pureza.

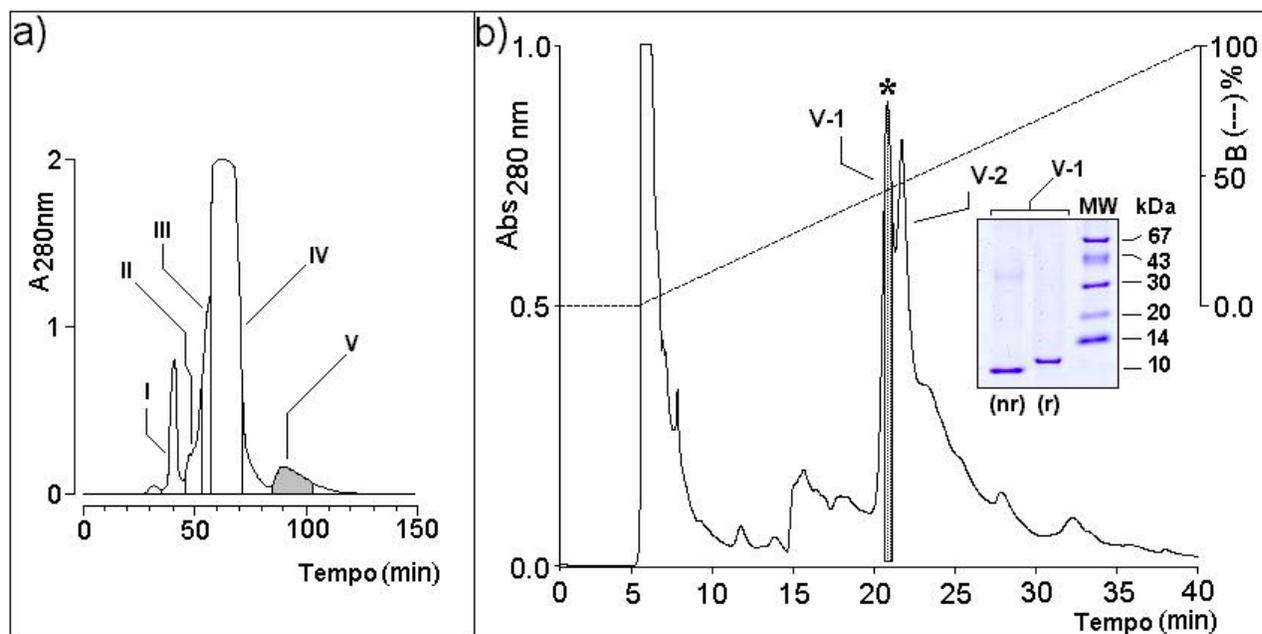


Figura 2 Perfil cromatográfico de re-purificação da fração V-1 (*) em HPLC de fase reversa usando uma coluna μ -Bondapck C-18 (Waters). A eluição da amostra é realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo é mantido constante a 2ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica é realizado a 280 nm de absorvância.

4.3 Análise de aminoácidos da V-1 de *Crotalus durissus collilineatus*

Com relação à análise da composição de aminoácidos da fração V-1 de *Crotalus durissus collilineatus* (Tabela 1), esta mostra que se trata de uma proteína ácida 25 (Glx, Asx) com um alto conteúdo de prolina 25(P) e apresenta um baixo conteúdo de aminoácidos básicos 13 (Lys, His e Arg).

Tabela 1 Composição de aminoácidos da neurotoxina V-1 de *Crotalus durissus collilineatus*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (ND) Não determinado.

<i>Aminoácido</i>	<i>Mo de AA/ Mol de Proteína</i>	<i>MM</i>
Asx	5	575,55
Glx	20	2582,6
Ser	6	522,54
Gly	6	342,42
His	1	137,16
Arg	5	781,05
Thr	2	222,24
Ala	2	142,18
Pro	25	2428,25
Tyr	1	114,15
Val	1	163,15
Met	1	131,21
Cys	2	206,28
Ile	2	206,34
Leu	1	113,17
Phe	2	194,38
Lys	7	897,33
Trp	ND	ND
Total	89	9860

4.4 Determinação da massa molecular por Espectrometria de Massas (MALDI Tof) da fração neurotóxica V-1 de *Crotalus durissus collilineatus*.

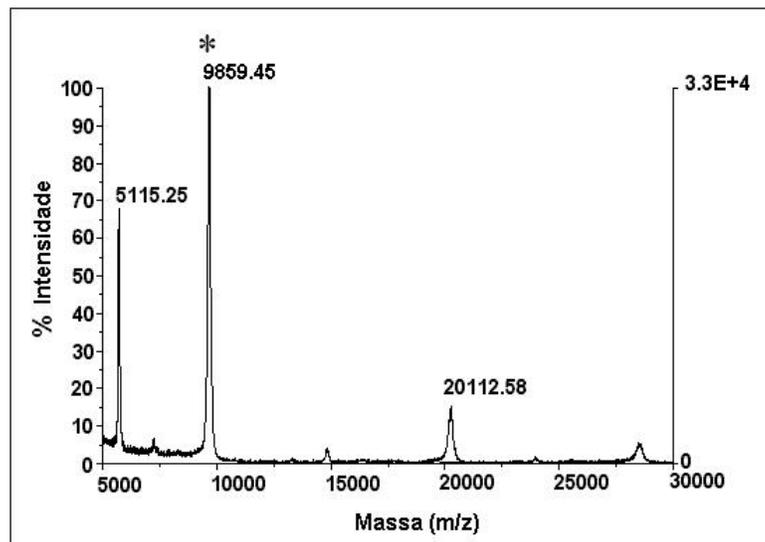
Através desta análise, pode-se constatar a pureza da sub fração V-1, obtida a partir da cromatografia em HPLC de fase reversa da fração IV, procedente do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus*.

A fração V-1 apresenta uma massa molecular de 9859.45 Da (Figura 3). A determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massa determinada por eletroforese em SDS-PAGE e a análise de composição de aminoácidos.

De acordo com o tipo de técnica empregada de espectrometria de massas (*MALDI-Tof*) (figura 3), pode-se apreciar a presença de outros dois picos a mais, um de massa 5115.25 Da e outro de 20112.28 Da respectivamente. O primeiro pico representa a massa real dividida por dois mais um próton (H^+) e o segundo pico, a massa real vezes dois, referindo-se à formação de um dímero (2X), o

que confirma que os parâmetros empregados na determinação de tipo linear foram adequadamente calibrados com o respectivo calmix de acordo com a massas a determinar.

Figura 3 A massas molecular da fração neurotóxica V-1 é analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO MalDI-TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 µl. da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 µl. da matriz. e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm², em 300 ns e o modo de análise é linear.



4.5 Estudo da atividade neurotóxica na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo (NF-DIC) de V-1 de *Crotalus durissus collilineatus*

As doses ensaiadas são 5, 10 e 20 µg/ml. da fração V-1, procedente da purificação por exclusão molecular em HPLC, em uma coluna Protein Pack 300 SW (0.78 X 30cm) (Waters), conforme a figura 4.

Os resultados da fração V-1 evidenciam que o efeito facilitador (Figura 5), semelhante ao comportamento da crotamina de *Crotalus durissus terrificus*, mostra-se mais diferente ao comportamento da própria crotoxina e do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de 10 20 µg/ml. (Figura 6). Para todas as doses o efeito facilitador pós-lavagem é constante.

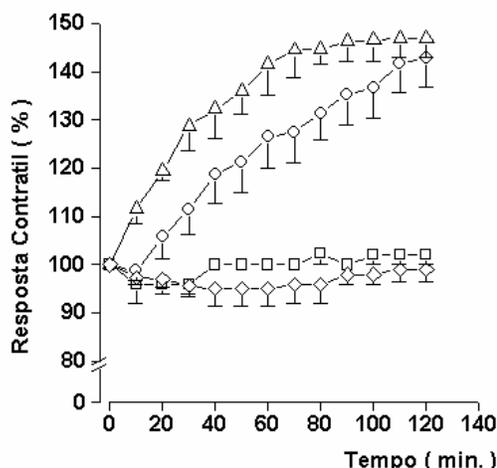


Figura 4 Representação gráfica do efeito facilitador da fração V-1 nas doses de 5, 10 e 20 µg/ml. na preparação NF-DIC (Estímulo indireto). Dose de 5 µg/ml. (□), 10 µg/ml. (○), 20 µg/ml. (△) e controle (◇) (n=5). Nível de significância das concentrações de 10 e 20 µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

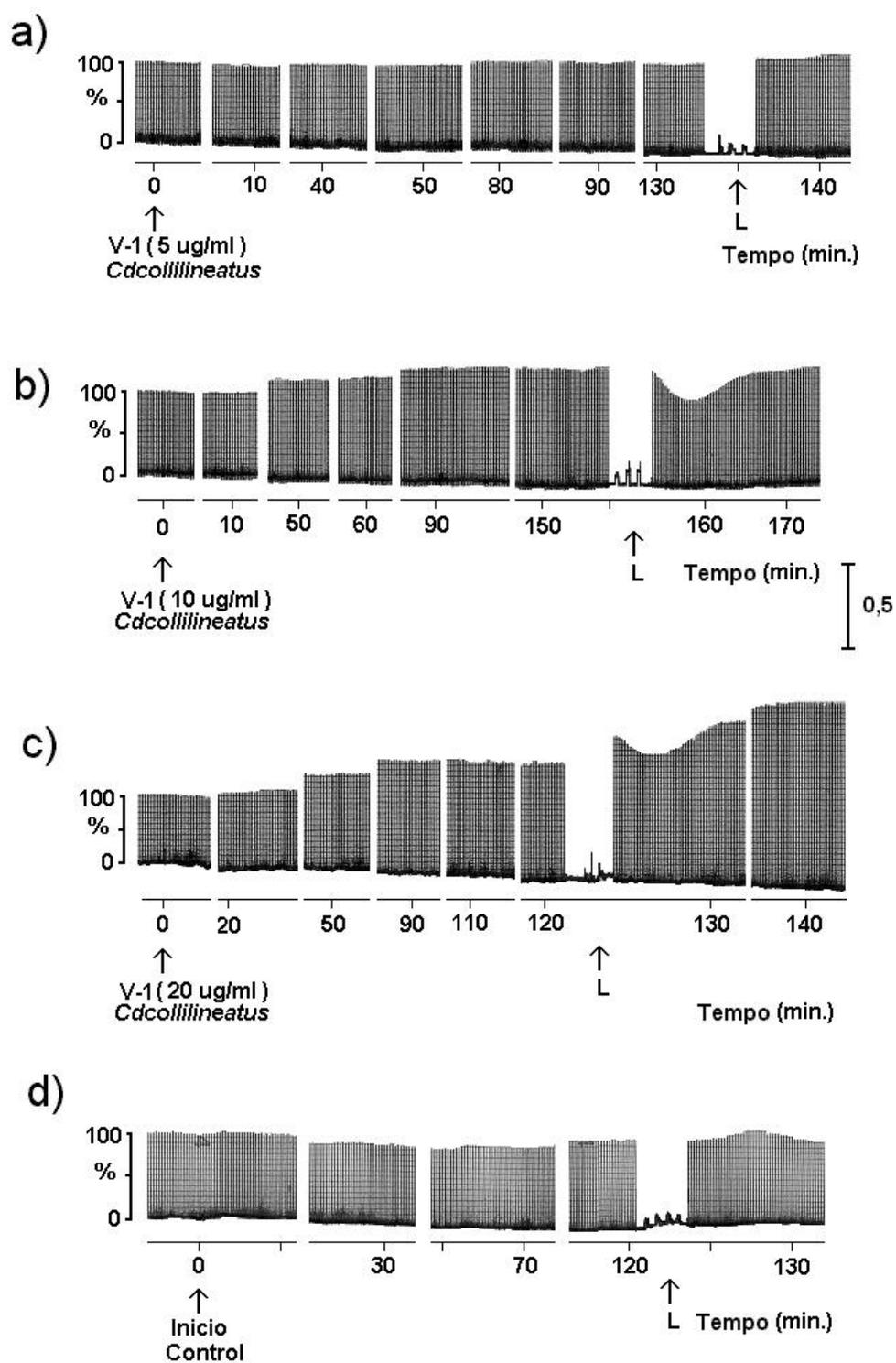


Figura 5 Registros miográficos da força contrátil na preparação NF-DIC (Estimulo indireto) da V-1 de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de: a) 5, b) 10 e c) 20 µg/ml. d) controle. ↑ adição da fração, L lavagem.

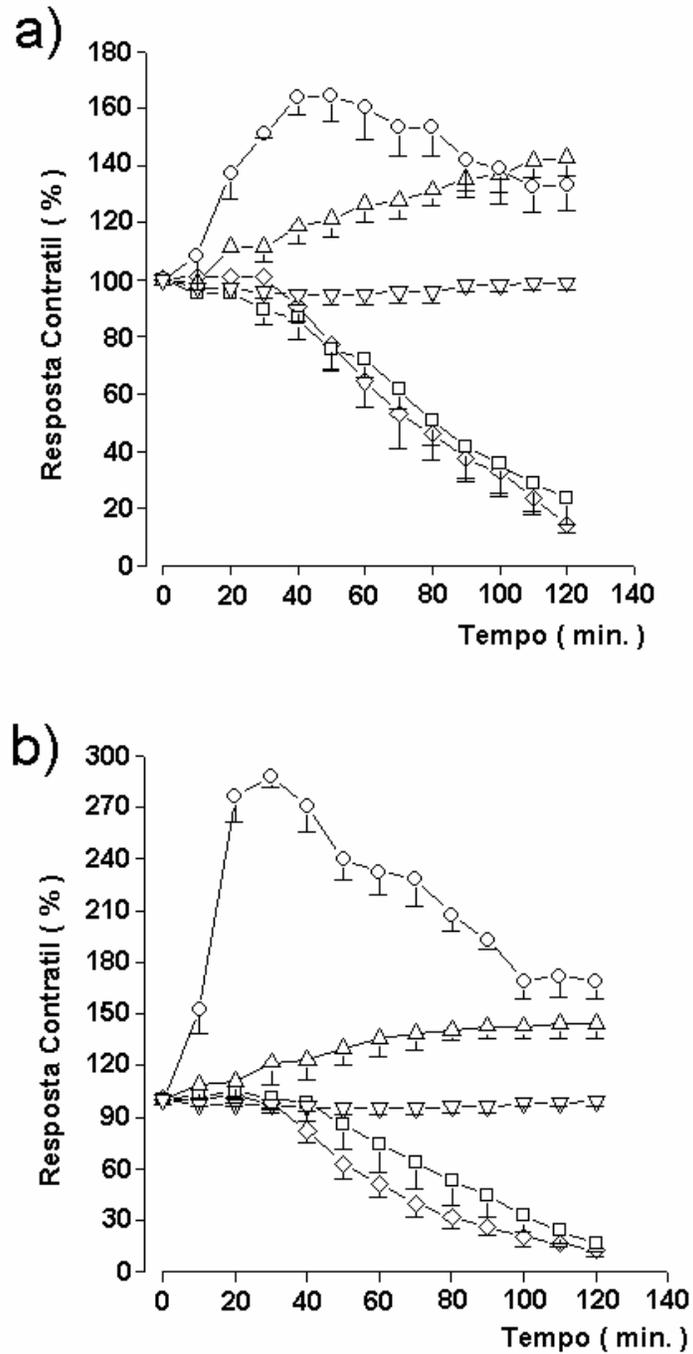


Figura 6 - Representação gráfica do efeito facilitador da fração V-1 nas doses: a) 10 e b) 20 µg/ml comparadas com na preparação NF-DIC (Estímulo indireto). Crotamina Cdt (O), V-1 (Δ), crotoxina Cdcoll (□), veneno total Cdcoll (◇) e controle (▽).(n=5). Nível de significância das concentrações de 10 e 20 µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

4.6 Estudo da atividade neurotóxica na preparação biventer cervicis de pintainho de V-1 de *Crotalus durissus collilineatus*

Os experimentos realizados correspondem a um n=3, na preparação biventer cervicis de pintainho.

Os resultados evidenciam que a V-1 apresenta um efeito facilitador que supera extremamente a crotamina de *Crotalus durissus terrificus*, para logo após continuar com um bloqueio total da junção neuromuscular (Figura 7 e 8).

O tempo de bloqueio para atingir 50 % da resposta contrátil é, para dose de 10 µg/ml de 54,06 ± 06 min. e para dose de 20 µg/ml é 53,07 ± min.

Ambas doses causaram bloqueio irreversível pós-120 minutos como se observa nos registros miográficos da figura 8.

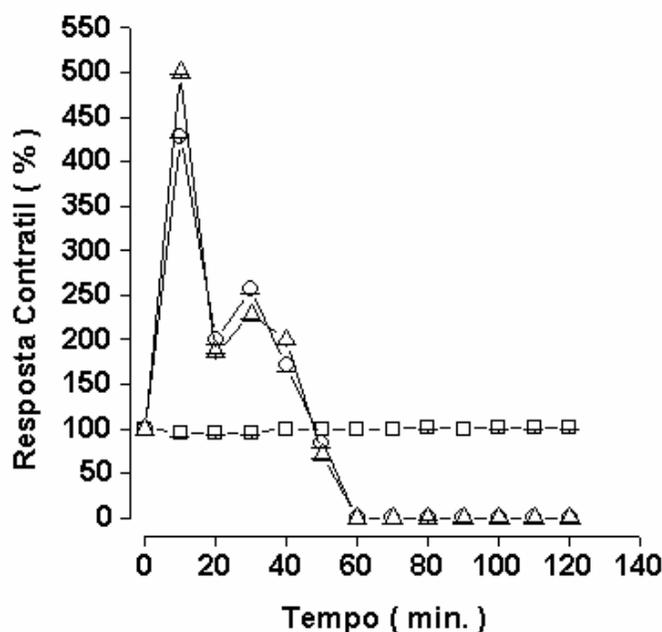


Figura 7 Representação gráfica do efeito da facilitação e bloqueio da V-1 de *Crotalus durissus collilineatus*, nas doses 10 µg/ml (○) e 20 µg/ml (△) controle (□), comparadas na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo indireto). (n=5). Nível de significância das concentrações de 10 e 20 µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

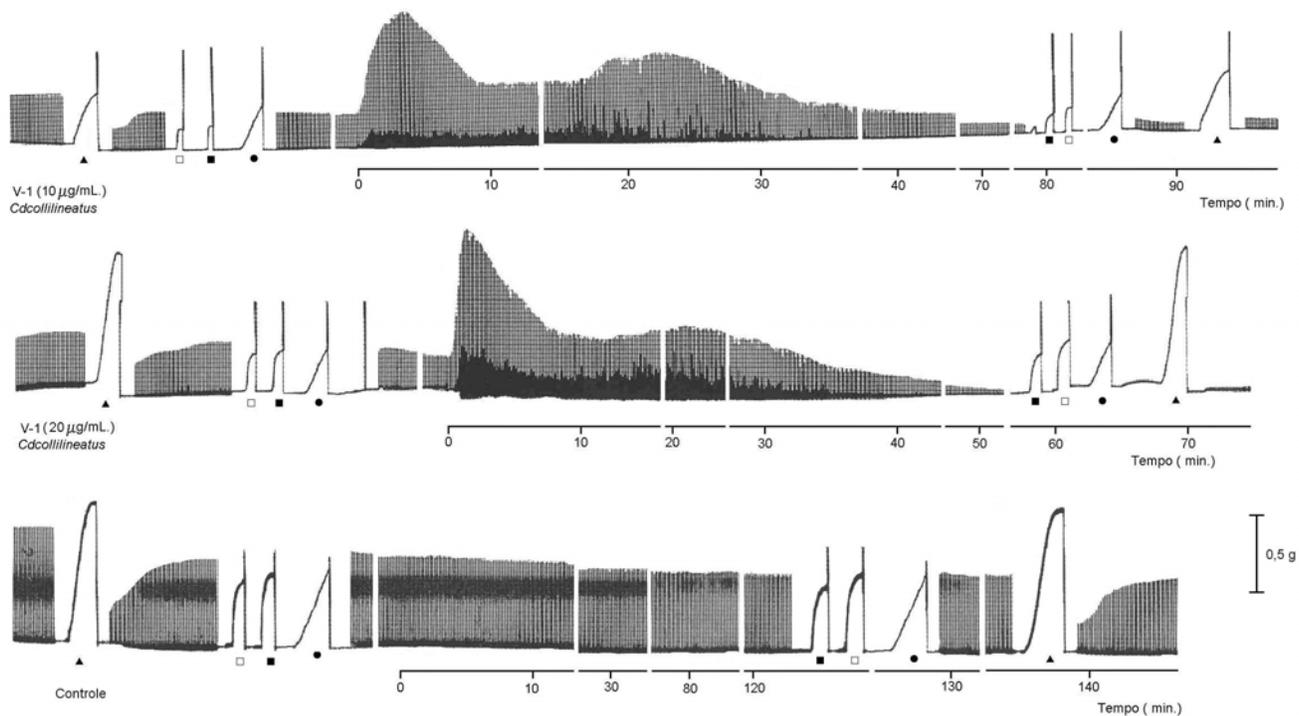


Figura 8 Registro da força de Contração Muscular em Preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo indirecto). Mostram-se os perfil miográficos dos efeitos da V-1 de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de 10 e 20 µg/ml., demonstrando a facilitação aumentada seguida do bloqueio. Em tempo 0 a amostra de V-1 e adicionada, L lavagem. A resposta contraturante para a adição de ACh (□ 55 mM e ■ 110 mM), KCl (▲ 13,4 mM) e carbacol (● 12 µg/ml.) é registrada antes e após a adição da fração V-1.

4.7 Análises de aminoácidos dos componentes da crotoxina, isoformas de crotapotina (F3 e F4) e PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus*.

Em relação a análises de composição de aminoácidos (Tabela 2), a PLA₂ F6 um alto conteúdo de aminoácidos básicos (Lys, Arg) e 14 cisteínas (Cys). No caso das isoformas de crotapotina (F3 e F4), as análises de composição de aminoácidos não mostram muita diferença com relação ao caráter ácido das isoformas de crotapotina, embora existam diferenças em termos de conteúdo, tais como: a F3 é mais hidrofóbica que a F4; em consequência, a isoforma F3 possui um alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Gly, e Pro.

<i>Amino ácido</i>	<i>PLA₂ (F6)</i>	<i>Mol aa/ proteína</i>	<i>Crtp (F3)</i>	<i>Mol aa/ proteína</i>	<i>Crtp (F4)</i>	<i>Mol aa/ proteína</i>
Asx	8	920.8	8	920.88	12	1381,32
Glx	8	1032.8	13	1678.69	17	2195.21
Ser	3	261.3	5	435.45	5	435.45
Gly	14	798.98	12	684.84	10	570.7
His	3	411.48	1	137.16	1	137.16
Arg	12	1874.52	2	312.42	2	312.42
Thr	8	888.96	5	555.6	5	555.6
Ala	10	710.9	7	497.63	5	355.45
Pro	7	679.91	10	971.3	6	582.78
Tyr	12	1369.8	3	342.45	4	456.6
Val	4	652.6	1	163.15	1	163.15
Met	2	262.4	1	131.21	1	131.21
Cys	14	1443.4	8	825.12	9	928.26
Ile	5	515.85	2	206.34	3	309.51
Leu	6	679.02	1	113.17	1	113.17
Phe	7	1030.33	3	441.57	3	441.57
Lys	11	1410.09	2	256.38	2	256.38
Trp	ND	-	ND	-	ND	-
Total	134	14943.14	84	8691.36	87	9343.94

Tabela 2 Composição de aminoácidos dos componentes da crotoxina, isoformas de crotapotina (F3 e F4) e PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína.

4.8 Estrutura primária da PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus*.

A PLA₂ (F6) neurotóxica de *Crotalus durissus collilineatus*, usada na determinação da estrutura primária da PLA₂, foi obtida e repurificada em HPLC de fase reversa seguindo a metodologia de Ponce-Soto, *et al.* (2002).

A PLA₂ (F6) é considerada pura, pelos critérios de homogeneidade molecular em SDS-PAGE, assim como o perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa, que evidenciou um único pico simétrico de eluição, e a análise da região N-terminal confirmaram o grau de pureza da F6. (Figura 9).

A determinação da estrutura primária da PLA₂ F6 é obtida pelo sequenciamento N-terminal até o 46º resíduo (Figura 9) e dos peptídeos obtidos por digestão enzimática da PLA₂ (F10) pelas proteases Sv8 de *Staphylococcus aureus* e Clostripaina (Clit) de *Crostridium hystolitica*, separados em HPLC de fase reversa.

O sequenciamento dos peptídeos SV8 07 obtidos por digestão com Clostripaina e repurificados em HPLC de fase reversa confirmaram parte da seqüência N-terminal do 13º até 71º e permitiu um aumento da seqüência da região N-terminal mais 25 resíduos. O sequenciamento de SV8 07 permitiu a formação de uma região de sobreposição entre a porção N-terminal da molécula com a seqüência de Clit 04, permitindo, desta forma, a construção da PLA₂ (F6) até 90º resíduo.

O peptídeo SV8 02 foi essencial para a determinação da seqüência C-terminal, permitindo a união da região C-terminal com o restante da cadeia.

A estrutura primária completa da PLA₂ (F6) neurotóxica, determinada pela sobreposição do sua região N-terminal e dos peptídeos seqüenciados é mostrada na figura 9e. Sua estrutura primária tem 122 resíduos de aminoácidos.

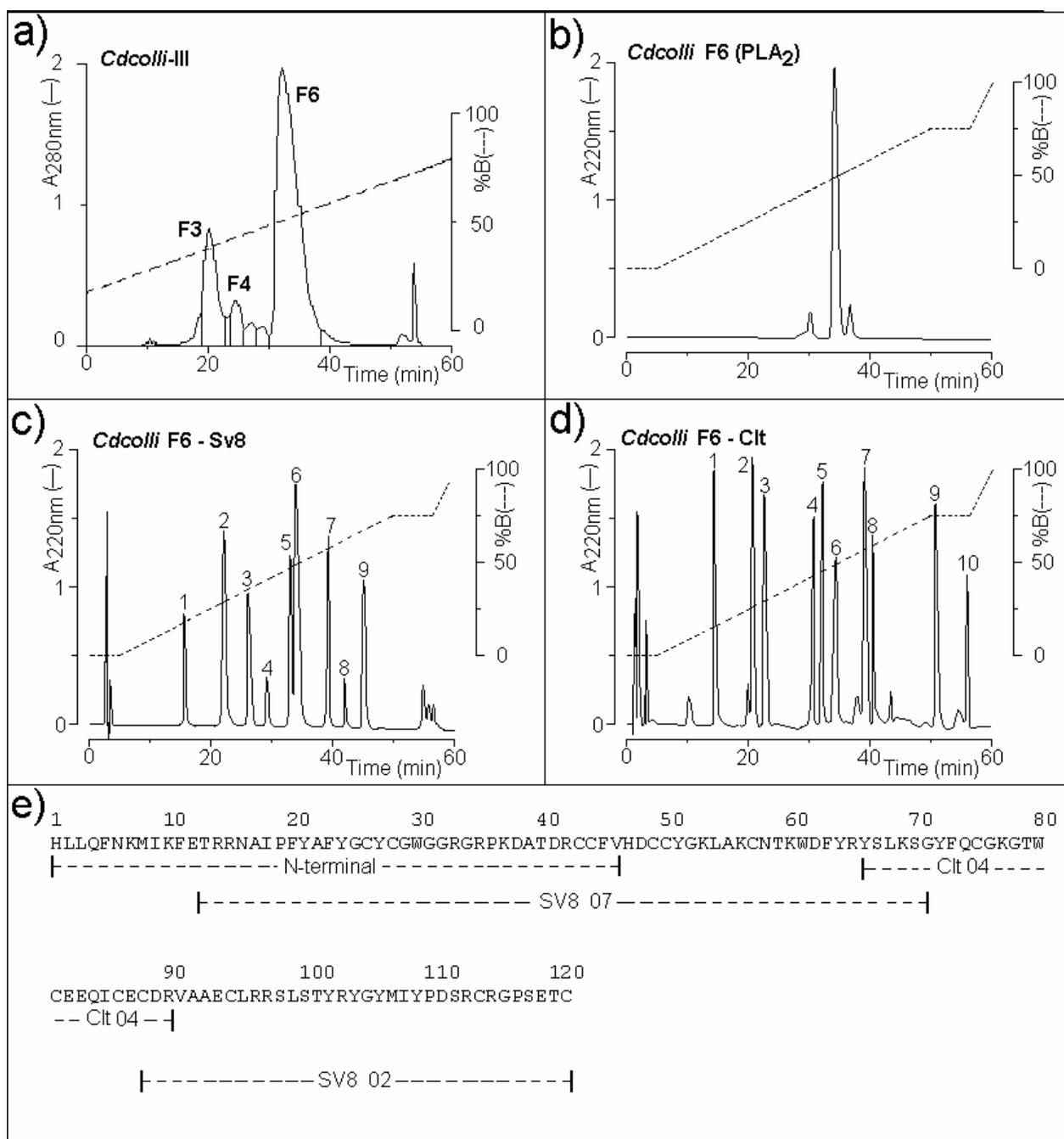


Figura 9 - a) Perfil de eluição dos componentes da crotoxina (III), b) Perfil de eluição da F6 reduzida e carboximetilada, c) Eluição dos peptídeos produzidos pela digestão com SV8 RC-F6, d) Clostripaina e) Peptídeos digeridos, usados na determinação da sequência de aminoácidos da PLA₂ F6.

4.9 Homologia sequencial da PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* com outras PLA₂

A análise da estrutura primária da PLA₂ (F6) e sua homologia sequencial com outras PLA₂ mostra uma alta homologia de até 90% com outras PLA₂ de veneno de serpentes (Figura 10).

Quando a PLA₂ (F6) é comparada com PLA₂ ativas esta homologia se mantém em torno de 75% a 80% (em caixa). As posições dos resíduos de cisteína (sombreado em cinza) se encontram em posições idênticas com as outras PLA₂, pelo que se trata de proteínas muito relacionadas, mantendo os mesmos motivos (motif) estruturais.

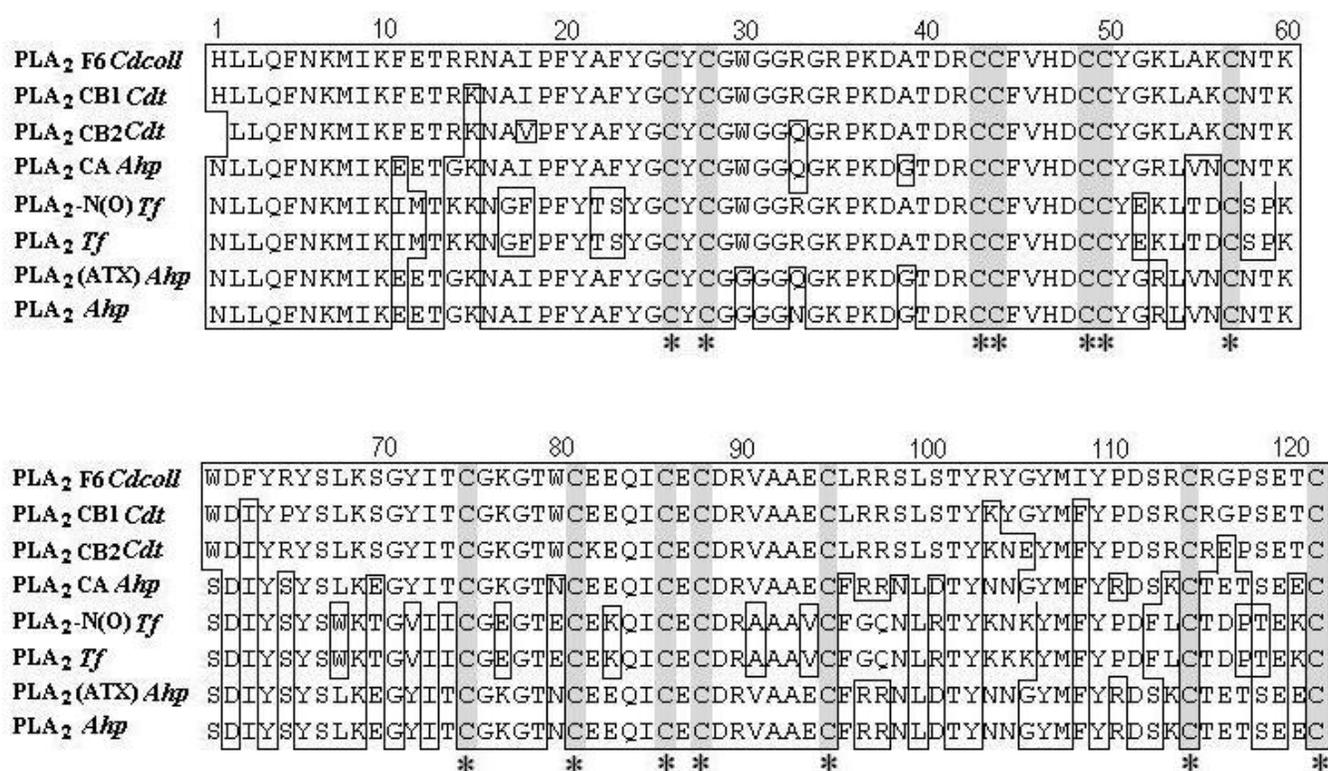


Figura 10 Alinhamento da PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* com outras PLA₂, CB1 *Crotalus durissus terrificus*, (Bouchier,C., et al., 1988), CB2 *Crotalus durissus terrificus* (Bouchier,C., et al., 1991), CA *Agkistrodon halys pallas* (Tang,L., et al., 1998), PLA₂-N(O) *Trimeresurus flavoviridis*, *Trimeresurus flavoviridis* (Guo,Y.-W., et al., 2001), (ATX) *Agkistrodon halys pallas* (Chijiwa,T., et al., 2003a) e *Agkistrodon halys pallas* (Chijiwa,T., et al., 2003b).

4.10 Registros miográficos das frações re-associadas F3 + F6 e F4 + F6 a partir da crotoxina de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de 10 e 20 µg/ml na preparação biventer cervicis de pintainho

As doses ensaiadas são de 10 e 20 µg/ml. na razão molar 1:1 conforme a figura 23, 24 e 25. Os resultados evidenciam o efeito neurotóxico da crotoxina a partir da reassociação de suas frações isoladas de crotapotina (isoformas) F3 e F4 com a PLA₂ (F6).

As reassociações mostram um bloqueio da resposta contrátil. O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (10 µg/ml.) para F3 + F6 é de $33,88 \pm 1,32$ min. e (20 µg/ml.) $17,12 \pm 2,31$ min. Para o caso da F4 + F6 (10 µg/ml.) $22,74 \pm 5,32$ min. e (20 µg/ml.) $11,78 \pm 8,06$ min. Respectivamente (Figura 11).

Para todos os casos, as re-asociações de crotapotina F3 e F4 + F6 mostraram um bloqueio irreversível pós-lavagem como se observa nos registros migráficos das figuras 12 e 13.

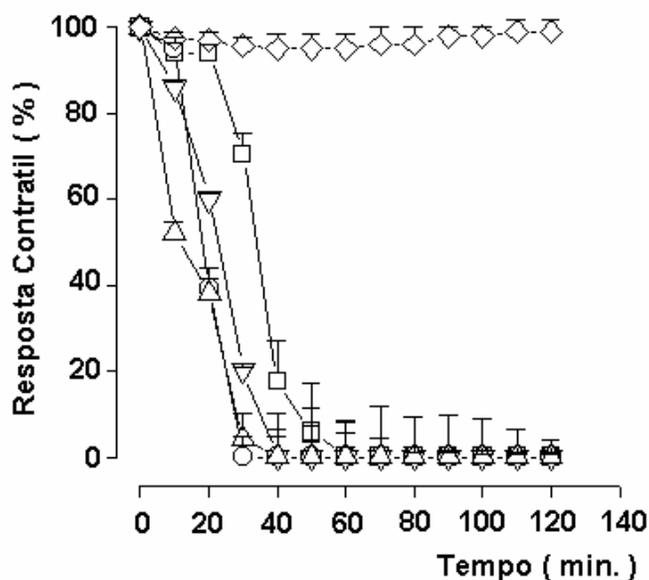


Figura 11 Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil em preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo de campo). O bloqueio neuromuscular é dose-dependente. Cada ponto corresponde a recombinações das isoformas de crotapotina (F3 e F4) e a PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de 10 e 20 µg/ml. As doses são representadas: F3 + F6 10 µg/ml (□), F3 + F6 20 µg/ml (○), F4 + F6 10 µg/ml (▽), F4 + F6 20 µg/ml (△), e controle (◇). (n=5). Nível de significância das concentrações de 10 e 20 µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

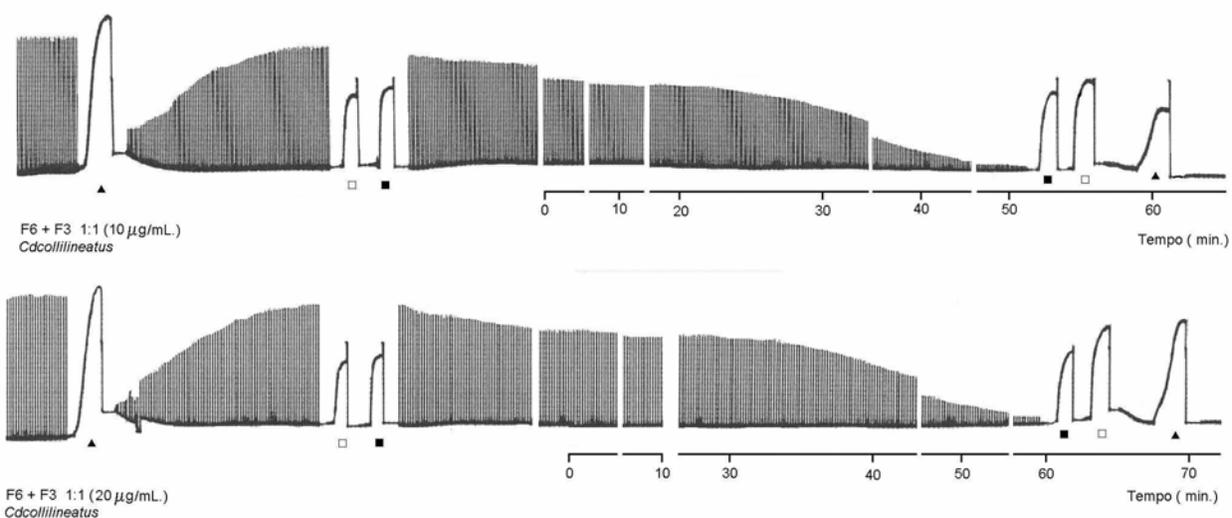


Figura 12 Registros da força de contração muscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo de campo). Mostram-se os perfis miográficos dos efeitos das recombinações da isoforma de crotapotina F3 + F6 nas doses de 10 e 20 µg/ml., demonstrando o bloqueio. Em 0 a adição das amostras. A resposta contrátil a Acetilcolina, 10 µg/ml □ e 20 µg/ml. ■ e KCl 13,4 mM ▲ (n=5).

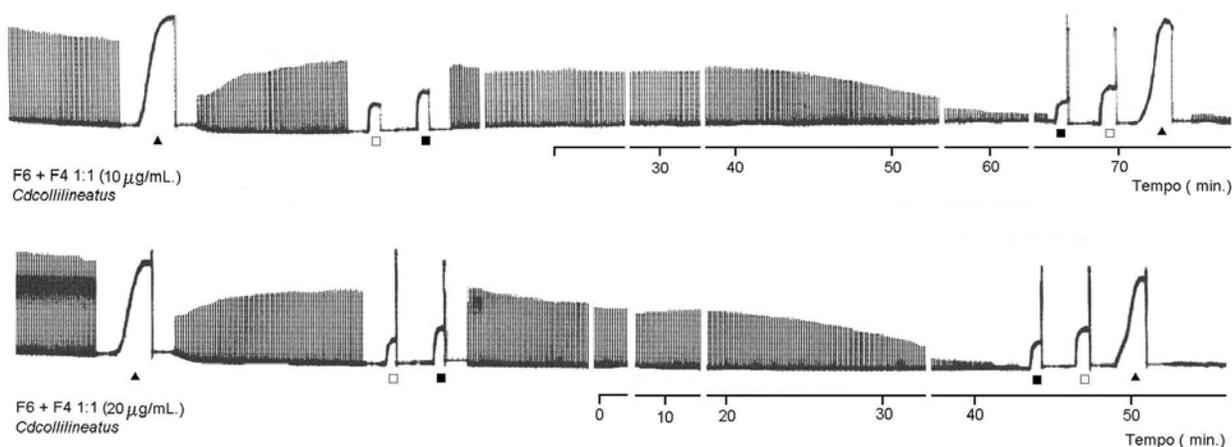


Figura 13 Registros da força de contração muscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo de campo). Mostram-se os perfis miográficos dos efeitos das recombinações da isoforma de crotapotina F4 + F6 nas doses de 10 e 20 µg/ml., demonstrando o bloqueio. Em 0 a adição das amostras. A resposta contrátil a Acetilcolina, 10 µg/ml □ e 20 µg/ml. ■ e KCl 13,4 mM ▲ (n=5).

4.11 Registros miográficos dos componentes isolados da crotoxina crotapotina (F3 e F4) e a PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de 10 e 20 µg/ml na preparação *biventer cervicis* de pintainho

As doses ensaiadas são de 10 e 20 µg/ml. conforme a figura 14. Os resultados mostram a ausência do efeito neurotóxico das isoformas isoladas de crotapotina (F3 e F4). Não se observou qualquer mudança na amplitude da resposta contrátil, ao longo dos 120 minutos do experimento em ambas doses.

A PLA₂ (F6) mostrou um comportamento diferente, pois é capaz de levar um bloqueio total da resposta contrátil da junção neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho.

O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (10 µg/ml.) é de 42,61 minutos e para a dose de 20 µg/ml. é de 36,14 min. As figuras 15 e 16 mostram os registros da resposta contrátil com bloqueio da transmissão neuromuscular.

Em ambas as doses, a PLA₂ (F6) causa um bloqueio irreversível pós-lavagem como se observa nos registros miográficos das figuras 15 e 16 respectivamente.

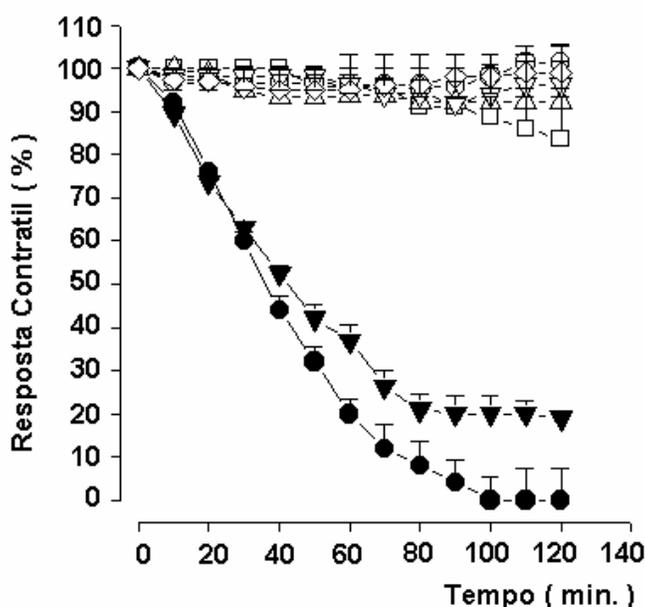


Figura 14 Efeito das isoformas de crotapotina (F3 e F4) e PLA₂ (F6) isoladas nas doses de 10 e 20 µg/ml. da crotoxina de *Crotalus durissus collilineatus* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo indireto). Mostra-se a ausência do efeito neurotóxico das isoformas de crotapotinas (F3 e F4), mas a PLA₂ (F6) isolada evidencia um efeito de bloqueio na junção neuromuscular. As doses são representadas: F3 10 (□), F3 20 (○), F4 10 (△), F4 20 (▽), F6 10 (●), F6 20 (●) e controle (◇). (n=5). Nível de significância das concentrações de 10 e 20 µg/ml da PLA₂ F6 em relação ao controle (P<0,05).

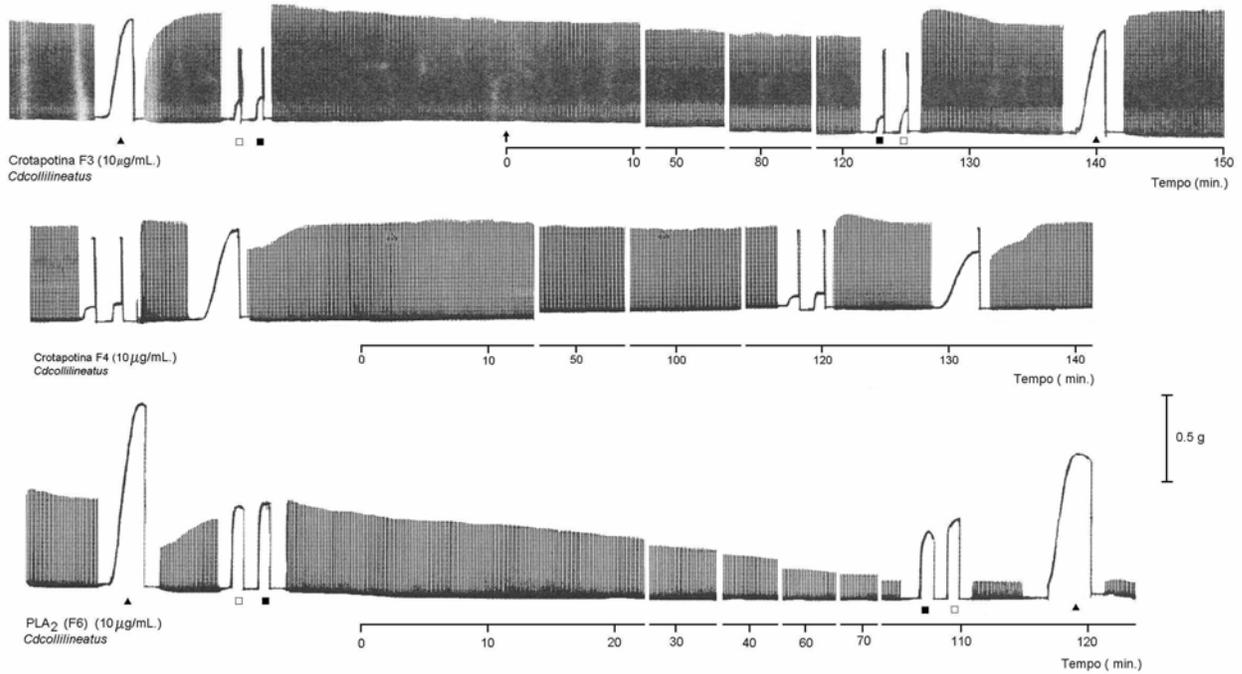


Figura 15 Registro da força de contração muscular em Preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo de campo). Mostram-se os perfis miográficos dos efeitos das isoformas isoladas da crotopatina F3 e F3 assim como a PLA₂ (F6) na dose de 10 µg/ml. Efeito não tóxico das isoformas da crotopatina, mas a PLA₂ (F6) isolada é capaz de levar a um bloqueio da transmissão neuromuscular. Em tempo 0 as amostras são adicionadas (N=5).

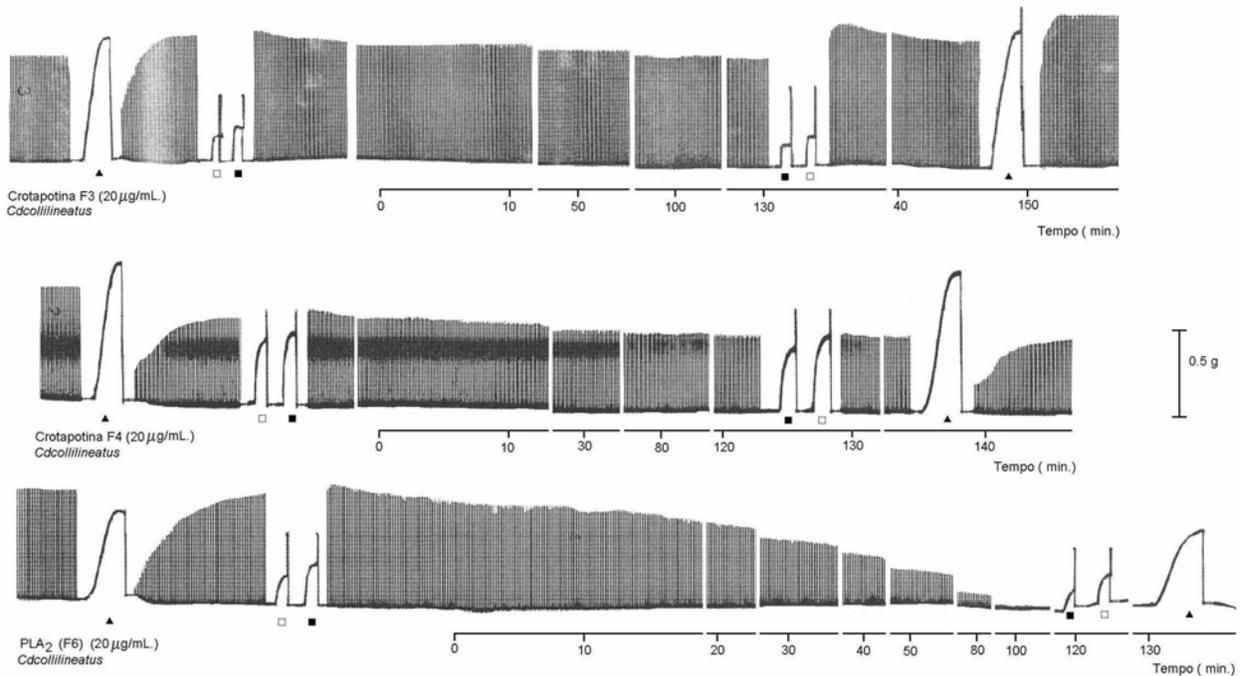
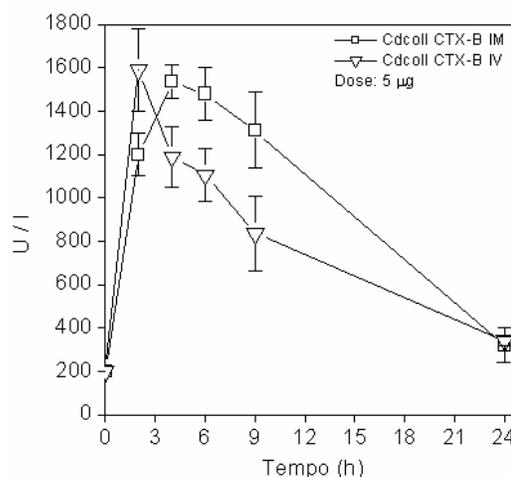


Figura 16 Registro da força de Contração Muscular em Preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo de campo). Mostram-se os perfis miográficos dos efeitos das isoformas isoladas da crotopatina F3 e F3, assim como a PLA₂ (F₆) na dose de 20 µg/ml., demonstrando o efeito não tóxico das isoformas da crotopatina, mas a PLA₂ (F₆) isolada é capaz de levar a um bloqueio da transmissão neuromuscular. Em tempo 0 as amostras são adicionadas (n=5).

4.12 Caracterização miotóxica da PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* através dos níveis de CK plasmáticos “*in vivo*” intramuscular e intravenoso

Os estudos realizados para determinar o efeito miotóxico da PLA₂ (F6) “*in vivo*” são feitos em camundongos inoculados por via intramuscular e intravenosa com a F6 em uma concentração de 5 µg. São aplicados a nível intramuscular e intravenoso. Os resultados mostram que os níveis de CK plasmáticos aumentam drasticamente nas primeiras 3 horas do tratamento, tanto pela vía intramuscular, atingindo até $1536,03 \pm 76,62$ U/L de CK a 2 horas; para, posteriormente, a níveis normais, após 9 a 24 horas, como pela vía intravenosa $1590,55 \pm 190,0$ U/L de CK (Figura 17).

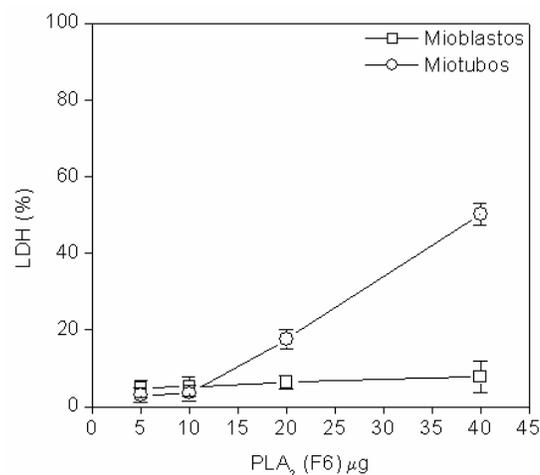
Figura 17. Representação gráfica da atividade miotóxica da PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus*, inoculado em camundongo de 20 g de peso. Mostra-se o curso-tempo dos níveis de creatina kinase (CK) incrementados ao longo do tempo depois de administrada a fração. Intramuscular (□) e intravenoso (▽) (n=5).



4.13 Determinação do efeito citotóxico da PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus* na determinação dos níveis de LDH em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12)

A PLA₂ D49 F6 mostra um comportamento citotóxico só em miotubos, mas não em mioblastos, pois à medida que as doses da fração se vêm acrescentadas, os níveis de LDH também aumentam significativamente, depois de acrescentada a PLA₂ F6, atingindo até $50,05 \pm 7,45$ % de LDH, tal como se evidencia na figura 18.

Figura 18. Representação gráfica da atividade citotóxica da PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus* “*in vitro*”, sob cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12). A lise celular foi estimada pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) do sobrenadante, após 3 horas de exposição da fração, em um volume de 150 µL/poço. Cada ponto representa a média ± SD do triplicado da cultura celular.



4.14 Purificação de uma isoforma de Bj-IV (Bj-V) a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu*, em coluna de troca Iônica (Waters) em HPLC

O veneno total foi submetido a uma etapa cromatográfica, usando-se uma coluna de HPLC de troca iônica Protein Pak SP 5PW (0.78 X 8cm) (Waters).

A coluna foi previamente equilibrada com tampão AMBIC 0.05M, pH 7,9 (Tampão A) por 30 minutos. 30mg são dissolvidos e homogeneizados em tampão A, o extrato total é clarificado, usando-se uma centrífuga de bancada a 10000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante é aplicado a uma coluna cromatográfica e a eluição é realizada, usando-se um gradiente linear descontínuo de concentração de AMBIC 1.0M, pH 8 (Tampão B) (Figura 19).

A purificação na coluna de troca iônica mostra a presença de 9 frações de eluição, que são denominadas de Bj I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX, respectivamente (Figura 19), sendo a fração Bj V isoforma da Bj IV (PLA₂) D49 e a Bj VII considerada como a BthTX I (PLA₂) K49. As frações Bj IV e Bj V mostraram atividade PLA₂ moderada, enquanto que a Bj VII mostrou apenas uma atividade residual.

As frações Bj IV e Bj V, posteriormente, são submetidas a mais uma etapa de purificação em HPLC de fase reversa para confirmar seu grau de pureza (Figura 20). O perfil cromatográfico das amostras Bj IV e Bj V mostram a presença de um único pico de eluição, com uma diferença de tempos de retenção de apenas 6 décimos de segundo, como representado na figura 20. As análises em HPLC de fase reversa mostraram também que as frações Bj IV e Bj V apresentam um grau de homogeneidade molecular ao redor de 95% de pureza.

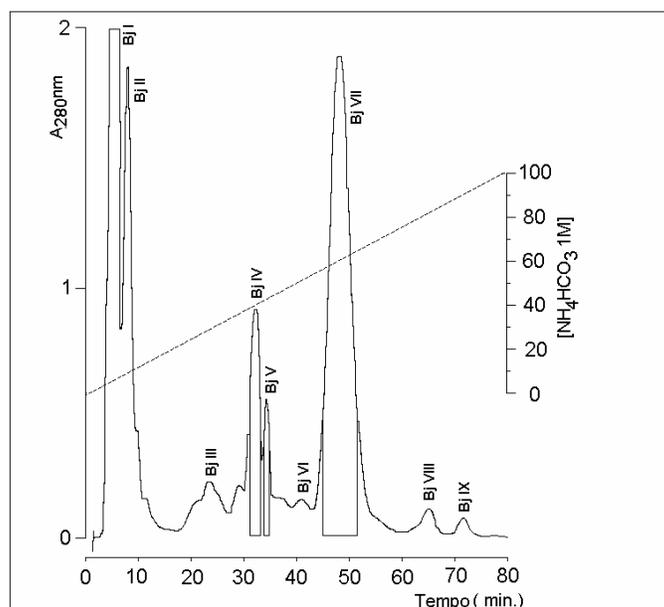


Figura 19 Perfil cromatográfico de troca iônica do veneno total de *Bothrops jararacussu* em LC em uma coluna Protein Pack SP 5PW (Waters). A corrida cromatográfica foi realizada, usando-se um fluxo constante de 1.0 ml/min. O monitoramento da corrida foi feito a 280 nm.

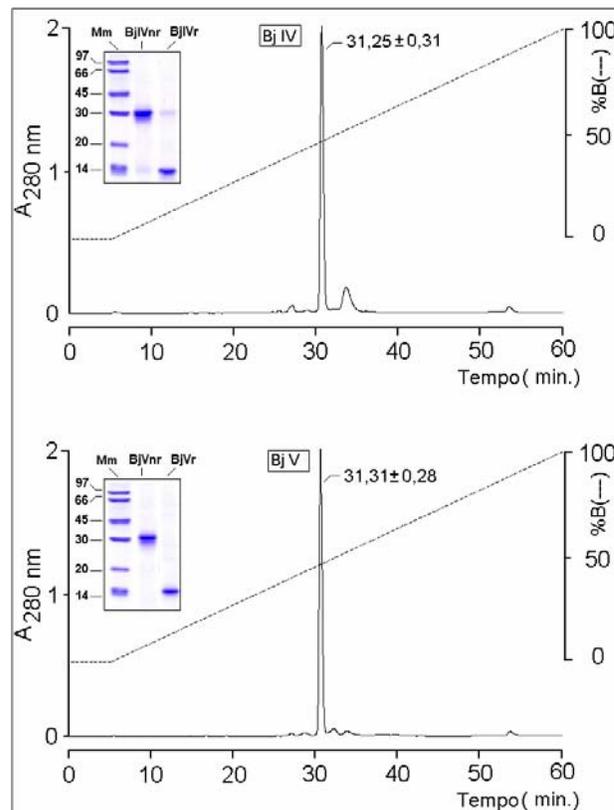


Figura 20 Perfil cromatográfico de re-purificação das frações Bj-IV e V em HPLC de fase reversa, usando-se uma coluna μ -Bondapck C-18 (Waters). A eluição da amostra é realizada, usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo é mantido constante a 2ml/min.

4.15 Estudo comparativo dos perfis cromatográficos de veneno total em HPLC de fase reversa de *Bothrops alternatus* e *Bothrops jararacussu*

O perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa do veneno total de *Bothrops jararacussu*, por ser muito abordado na identificação de frações neurotóxicas (BhTX I e BthTX II), é utilizado como perfil de referência para a identificação provável da PLA₂ neurotóxica de *Bothrops alternatus*.

Sob as mesmas condições cromatográficas para a purificação das BthTX I e II (PLA₂), é realizada uma purificação dos venenos de *Bothrops alternatus* e *Bothrops jararacussu*. Os resultados da purificação dos dois referidos venenos botrópicos, utilizando-se sistema de HPLC de Fase Reversa são apresentados na figura 21.

A figura 21 mostra que os perfis cromatográficos dos venenos de *B. alternatus* e *B. jararacussu* possuem uma fração principal com mobilidade cromatográfica em comum (sombreado) equivalente ao mesmo tempo de retenção da Bt-b (Figura 21a) e o pico 6 (Figura 21b), que é eluída aos 59% do solvente B. Esta fração (6), com atividade PLA₂ para aquela proveniente de *B. jararacussu*, trata-se da fração BthTX II (isoformas Bj IV e Bj V) e, para o veneno de *B. alternatus*, (Bt-b) aquela se trata de uma fração, que tem uma baixa ou atividade PLA₂ residual, mas com efeito neurotóxico.

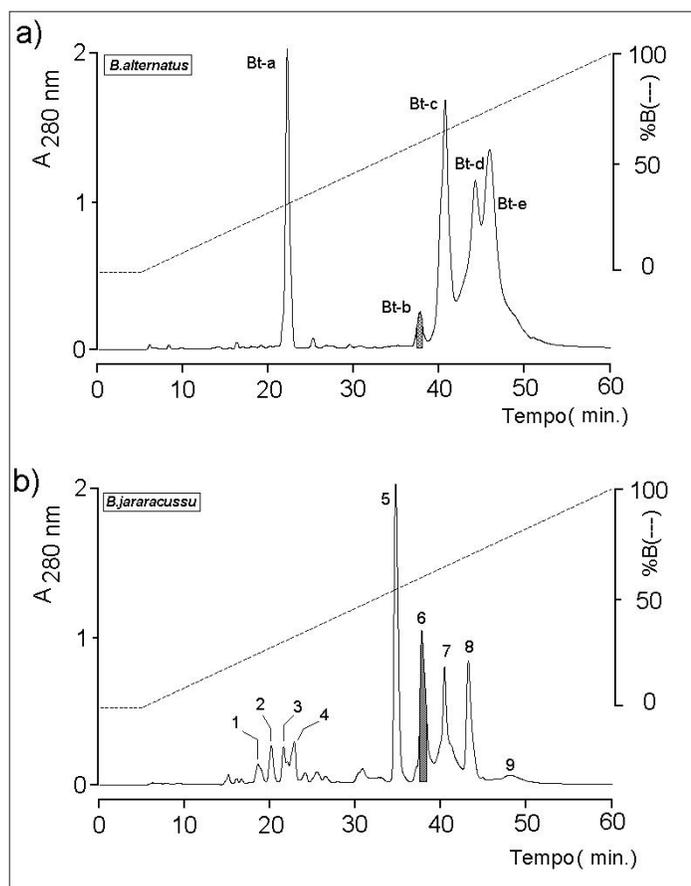


Figura 21 Perfil cromatográfico comparativo dos venenos de a) *Bothrops alternatus* e b) *Bothrops jararacussu*. Alíquotas de 5 a 10 mg dos venenos são dissolvidos no tampão inicial e eluídos em gradiente linear contínuo de 60 min com tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%) em (HPLC), usando-se uma coluna μ -Bondapck C-18 (Waters). O monitoramento é realizado a 280 nm. O fluxo é mantido constante a 2 ml/min.

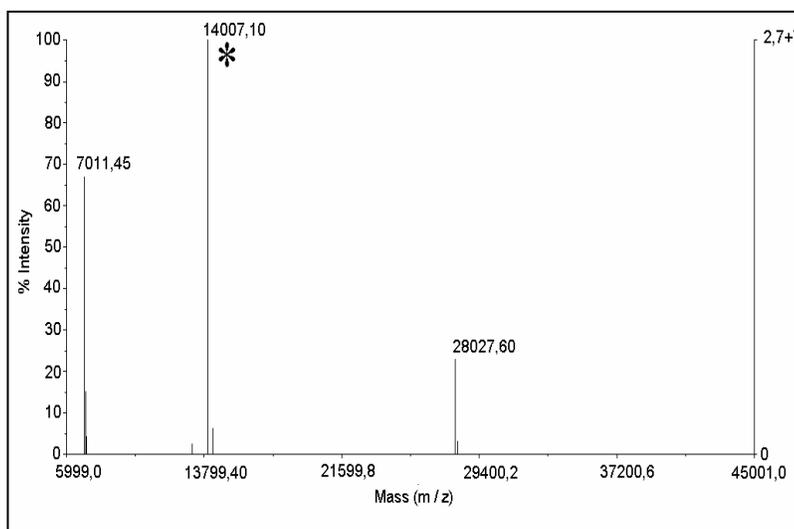
4.16 Determinação da massas molecular por espectrometria de massas (MALDI Tof) das isoformas Bj-IV e Bj-V de *Bothrops jararacussu*.

Através desta análise, pode-se constatar o grau de pureza das isoformas PLA₂ Bj-IV e Bj-V, de *Bothrops jararacussu*, obtidas a partir da cromatografia de troca iônica catiônica SP 5PW (Waters).

A isoforma Bj-IV apresenta uma massas molecular de 14007,10 Da (*), segundo o que é mostrado na figura 22, sendo que a determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massas determinada por eletroforese em SDS-PAGE e a análise de composição de aminoácidos como comentado anteriormente.

De acordo com o tipo de técnica empregada de espectrometria de massas (MALDI-Tof) (Figura 22), pode-se notar a presença de dois picos a mais, um de massas 7011,45 Da e o outro de 28027,60 Da respectivamente. Cada um deles representa a massas real dividida por dois mais um próton (H⁺) e o outro representa a massas real multiplicada por dois, referidos à formação de um dímero da massas real (2X), o que confirma que os parâmetros empregados na determinação de tipo linear foram adequadamente calibrados com o respectivo calmix, de acordo com a massas a determinar.

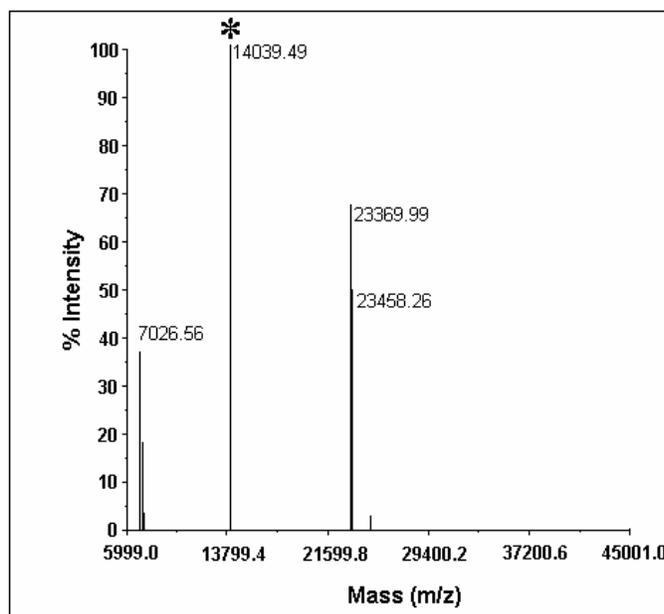
Figura 22 A massa molecular da fração neurotóxica da uma isoforma de PLA₂ Bj-IV (*) de *Bothrops jararacussu* é analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO Maldi-TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 µL. da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 µl. da matriz. e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/com², em 300 ns e o modo de análise é linear.



A isoforma Bj-V apresenta uma massa molecular de 14039,46,10 Da (*) (Figura 23). A determinação da massas molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massas determinada por eletroforese em SDS-PAGE e a análise da composição de aminoácidos.

De acordo com a técnica empregada de espectrometria de massas (MALDI-Tof) (Figura 23), pode-se apreciar a presença de dois picos a mais, um de massas 7026,56 Da e outro de 23369,99 Da respectivamente. Cada um deles representa a massas real dividida em dois, mais um próton (H^+). E outro não chegou a formar um dímero. Provavelmente temos a massas real somada à parte da matriz.

Figura 23 A massa molecular da fração neurotóxica da isoforma de PLA₂ Bj-V (*) de *Bothrops jararacussu* é analisada por Espectrometria de Massas Maldi-TOF. 1 µL. da amostra em TFA 0,1% é misturada em 2 µl. da matriz e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm², em 300 ns e o modo de análise é linear.



4.17 Análises de composição de aminoácidos da isoforma Bj V de *Bothrops jararacussu*

Em relação a análises de composição de aminoácidos das frações neurotóxicas de *Bothrops jararacussu* (Tabela 3), a isoforma Bj-V mostra que não existe muita diferença com relação ao caráter das neurotoxinas.

A análise da composição global de aminoácidos mostra que se trata de proteínas homólogas entre si.

<i>Aminoácido</i>	* Bj IV	Bj V
Asx	11	14
Glx	15	11
Ser	2	3
Gly	10	10
His	1	2
Arg	6	6
Thr	8	6
Ala	7	6
Pro	9	7
Tyr	10	3
Val	4	5
Met	2	1
Cys	14	14
Ile	3	4
Leu	7	9
Phe	4	6
Lys	13	21
Trp	**ND	**ND
Total	126	128

Tabela 3 Composição de aminoácidos dos componentes das neurotoxinas Bt II-2 de *Bothrops alternatus* e Bj IV e Bj V de *Bothrops jararacussu*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. * Bonfim, *et al.*, (2001). ** Não determinado.

4.18 Determinação da estrutura primária das isoformas de Bj-IV e Bj-V PLA₂ D49 de *Bothrops jararacussu*

O seqüenciamento dos primeiros 23 aminoácidos da isoforma Bj-IV e dos primeiros 25 aminoácidos da isoforma Bj-V N-terminais foram obtidos através do seqüenciamento direto da proteína nativa reduzida e carboximetilada.

Para a determinação da estrutura primária completa, foram sequenciados os peptídeos obtidos da purificação dos digestos protéicos, de forma separada com protease V8 e clostripaina.

Os peptídeos efetivamente importantes que contribuíram para a determinação da estrutura primária da isoforma Bj-IV foram: Clt6, Clt17, Clt4, SV8 5 e SV8 8 (Figura 24). E os peptídeos que contribuíram para a determinação da estrutura primária da isoforma Bj-V foram Clt3, Clt08, Clt10, SV8 6 e SV8 10 (Figura 25).

Para a isoforma Bj-IV, a proteína reduzida e carboximetilada permitiu a determinação da região N-terminal até o 23º resíduo. O seqüenciamento dos resíduos Clt 6 e Clt 17 permitiram o aumento da seqüência até 71º resíduo, o peptídeo Clt 06 foi importante para a junção do segmento N-terminal com o peptídeo Clt 17.

O seqüenciamento do peptídeo SV8-05 permitiu a obtenção do segmento carboxi terminal da toxina Bj-IV. Já o seqüenciamento do peptídeo SV8-08 permitiu a confirmação da seqüência desta região. O peptídeo SV8-08 2 foi crucial para junção da região Carboxi terminal com o restante da estrutura. A isoforma Bj-IV possui um total de 121 resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo N-terminal o Ácido aspártico (figura 24).

De acordo a análise da estrutura primária da proteína, determinou-se que sua massas molecular é de 13934,46 Da e seu ponto isoelétrico é 7,89 deduzido a partir da estrutura primaria.

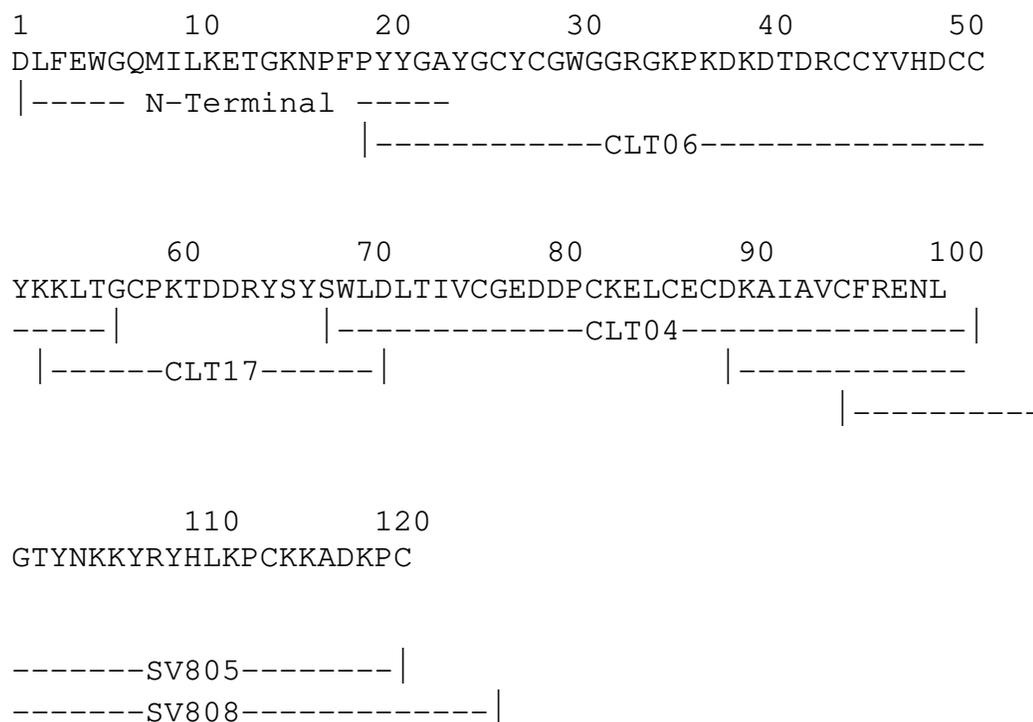


Figura 24. Determinação da estrutura primária da isoforma Bj-IV, uma neurotoxina "PLA₂" D49 mostrando a região N-terminal, que foi obtida pelo seqüenciamento direto da proteína reduzida e carboximetilada. As siglas *Clt* e *sv8* indicam os digestos obtidos do tratamento da Bj-IV com a clostripaina e com a protease V8 de *Staphilococcus aureus*.

Para a determinação da estrutura primária completa da isoforma Bj-V, foram sequenciados os peptídeos obtidos da purificação dos digestos protéicos de cada, de forma separada com protease V8 e clostripaina. Os peptídeos efetivamente importantes que contribuíram para a determinação da estrutura primária da isoforma Bj-V foram Clt3, Clt08, Clt10, SV8 6 e SV8 10 (Figura 25).

Para a isoforma Bj-V, a proteína reduzida e carboximetilada permitiu a determinação da região N-terminal até o 29º resíduo. O seqüenciamento dos resíduos Clt 8 e Clt 10 permitiram o aumento da seqüência até 110º resíduo, o peptídeo Clt 03 foi importante para a junção do segmento N-terminal com o peptídeo Clt 08.

O seqüenciamento do peptídeo SV8-06 e SV8-10 permitiu a obtenção do segmento carboxi terminal da Bj-V. Já o seqüenciamento do peptídeo Clt 10 permitiu a confirmação desta seqüência desta região. A isoforma Bj-V possui um total de 121 resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo N-terminal o Ácido aspártico (Figura 25). De acordo com a análise da estrutura primária da proteína, determinou-se que sua massa molecular é de 13933,35 Da e seu ponto isoelétrico é de 7,86.



Figura 25. Determinação da estrutura primária da isoforma Bj-V, uma neurotoxina "PLA₂" D49, mostrando a região N-terminal, que foi obtida pelo seqüenciamento direto da proteína reduzida e carboximetilada. As siglas *Clt* e *sv8* indicam os digestos obtidos do tratamento da Bj-V com a clostripaina e com a protease V8 de *Staphilococcus aureus*.

4.19 Estudos de homologia seqüencial das isoformas PLA₂ Bj-IV e Bj-V D49 de *Bothrops jararacussu* com outras PLA₂

As duas isoformas de PLA₂ Bj-IV e Bj-V D49 de *Bothrops jararacussu* são neurotoxinas básicas com uma massa molecular de 13.4 kDa, com atividade PLA₂ que possui, além destas atividades biológicas, uma atividade miotóxica e citotóxica (dados não mostrados). Estas neurotoxinas PLA₂ D49 possuem uma homologia seqüencial de aproximadamente 75%, com outras PLA₂ neurotóxicas e miotóxicas do veneno botrópico; e de 60%, em relação a outras miotoxinas não botrópicas. (Figura 26).

Consensus #1	. L . . . G . M I L . E T G K . P . . . Y . . . G C . C G . . G	
		10 20 30 40
Bj IV	D L F E W G Q M I L K E T G K N P F P Y Y G A Y G C Y C G W G G R G - K P K D K D T	41
Bj V	D L W Q F G Q M I L K E T G K I P F P Y Y G A Y G C Y C G W G G R G G K P K D - G T	41
BthTX II	D L W Q F G Q M I L K E T G K L P F P Y Y T T Y G C Y C G W G G R G - K P V D P - T	40
1171971 17	D L W Q F G Q M I L K E T G K L P F P Y Y T T Y G C Y C G W G G Q G Q - P K D A - T	40
16974918 1	D L W Q F G K M I L K E T G K L P F P Y Y V T Y G C Y C G V G G R G G - P K D A - T	40
17865540 1	D L W Q F G Q M I L K E T G K L P F P Y Y T Y G G C Y C G V G G R R G - - L G T K D	40
P24605	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R G - K P K D A - T	40
S13900	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R G - K P K D A - T	40
AAB25286	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R G - K P K D A - T	40
P82287	S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R G - K P K D A - T	40
Consensus #1	D R C C . V H . C C Y . K . T . C . . . D R Y S Y S C C .	
		50 60 70 80
Bj IV	D R C C Y V H D C C Y K K L T G C P K T D D R Y S Y S W L D L T I V C G E D D P C -	82
Bj V	D R C C Y V H D C C Y K K L T G C P K T D D R Y S Y S W L D L T I V C G E D D P C -	82
BthTX II	D R C C F V H D C C Y - K V T N C P K K N D R Y S Y S R V S Y N Y - C - L G G P C D	79
1171971 17	D R C C F V H D C C Y G K L T N C K P K T D R Y S Y S R E N G V I I C G E G T P C E	82
16974918 1	D R C C F V H D C C Y G K L T S C K P K T D R Y S Y S R K D G T I V C G E N D P C R	82
17865540 1	D R C C Y V H D C C Y K K L T G C P K T D D R Y S Y S W L D L T I V C G E D D P C -	81
P24605	D R C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N S C L	82
S13900	D R C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N S C L	82
AAB25286	D R C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N S C L	82
P82287	D R C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N P C L	82
Consensus #1	K . . C E C D K A . A . C . R E N L . T Y . K	
		90 100 110 120
Bj IV	K E L C E C D K A I A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L K P - - C K K A D K P C	121
Bj V	K E L C E C D K A I A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L K P - - C K K A D K P C	121
BthTX II	K Q I C E C D K A I A V C F R E N L G T Y N K K - A Y H L K P - F C K E P A E T C	118
1171971 17	K Q I C E C D K A A A V C F R E N L R T Y K K R Y M A Y P D V	113
16974918 1	K E I C E C D K A A A V C F R E N L D T Y N K K Y M S Y L K S	113
17865540 1	K E L C E C D K A I A V C F R E N L G T Y N K K Y R Y H L K P	112
P24605	K E L C E C D K A V A I C L R E N L N T Y N K K Y R Y Y L K P L - C K K A D - A C	121
S13900	K E L C E C D K A V A I C L R E N L N T Y N K K Y R Y Y L K P L F C K K A D - A C	122
AAB25286	K E L C E C D K A V A I C L R E N L G T Y N K K Y R Y H L K P - F C K K A D - P C	121
P82287	K E L C E C D K A V A I C L R E N L G T Y N K K Y R Y H L K P - F C K K A D - D C	121

Figura 26. Alinhamento das isoformas de PLA₂ Bj-IV e Bj-V D49 de *Bothrops jararacussu* com outras PLA₂.D49 e K49 procedentes da SWISS-PROT: Annotated protein sequence database:

<http://www.expasy.ch/sprot/>

4.20 Registro miográfico do efeito do veneno total e da isoforma PLA₂ Bj V de *Bothrops jararacussu* na preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo

A isoforma PLA₂ Bj V utilizada foi aquela proveniente da purificação na coluna de troca iônica Protein Pack SP 5PW (Waters) acoplado a um sistema de LC (Waters). As doses ensaiadas foram de 50 e 100 µg/ml. As figuras 27 e 28 evidenciam um bloqueio acentuado da junção neuromuscular.

O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (50 µg/ml.) é, para o caso do veneno total, de 15,04 min.; e Bj V, de 38,65 min. respectivamente. A figura 29a apresenta o registro da resposta contrátil, mostrando um bloqueio de transmissão neuromuscular.

O tempo necessário para o bloqueio de 50% na dose de 100 µg/ml é para o veneno total, de 8,60 min.; e Bj V, de 37,87 min. (Figura 28). A figura 29b mostra também os registros da resposta contrátil, mostrando um bloqueio de transmissão neuromuscular.

Para ambas as doses, o bloqueio é irreversível pós-lavagem, como se observa no registro miográfico 29a e 29b.

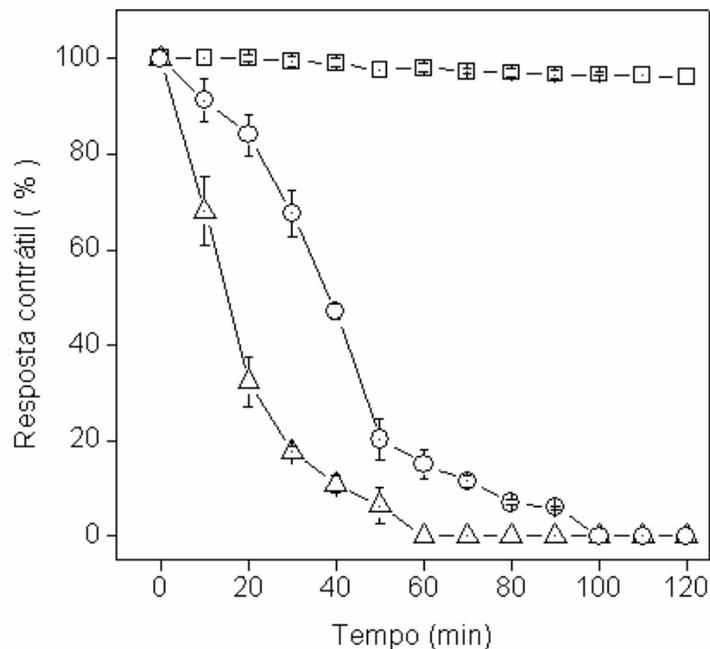


Figura 27 Representação gráfica do efeito do bloqueio da isoforma de PLA₂ Bj V e veneno total de *Bothrops jararacussu*, nas doses 50 µg/ml comparadas na preparação NF-DIC (Estímulo indireto). Controle (□), veneno total (△) e Bj V (○). (n=5). Nível de significância das concentrações do veneno total e a isoforma de PLA₂ Bj-Vem relação ao controle (P<0,05).

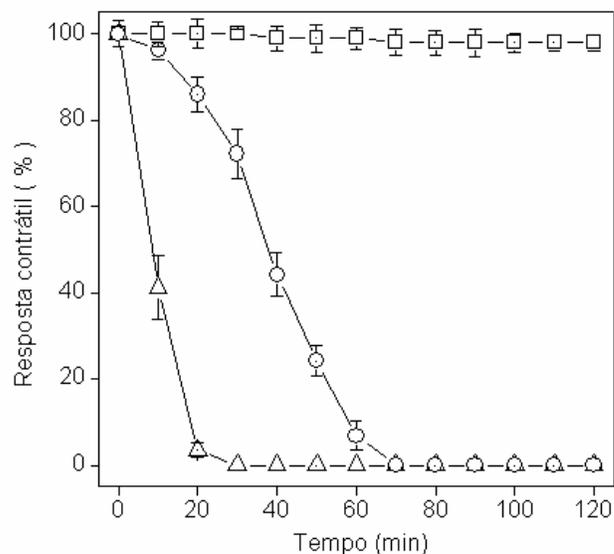


Figura 28 Representação gráfica do efeito do bloqueio da isoforma Bj V e veneno total de *Bothrops jararacussu*, nas doses 100 µg/ml comparadas na preparação NF-DIC (Estímulo indireto). Controle (□), veneno total (△) e Bj V (○). (n=5). Nível de significância das concentrações do veneno total e a isoforma Bj-V PLA₂ em relação ao controle (P<0,05).

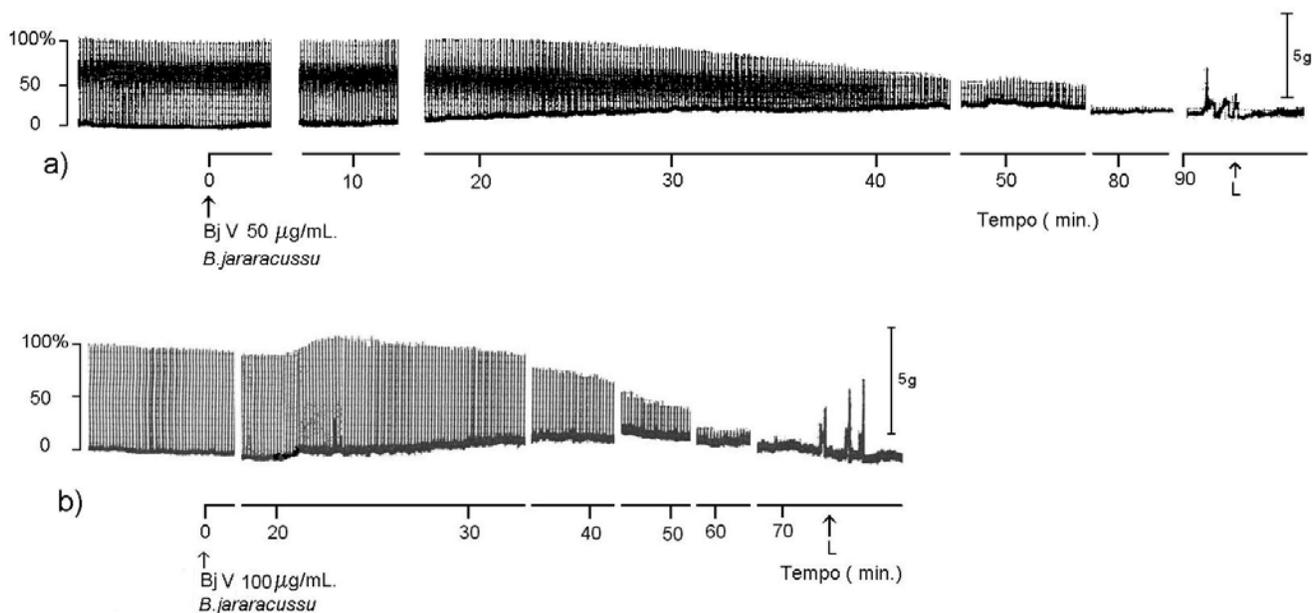


Figura 29 Registros da força de Contração Muscular em Preparação NF-DIC (Estímulo indirecto). a e b ilustram o perfil miográfico dos efeitos da isoforma PLA₂ Bj V nas dose de 50 e 100 µg/ml., demonstrando o bloqueio. ↑ adição da amostra L lavagem. (n=5). Nível de significância das concentrações de 50 e 100 µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

4.21 Determinação da atividade neurotóxica da isoforma Bj-V D49 de *Bothrops jararacussu* incubadas em presença de isoformas de crotapotina crotálica (F3 e F4) de *Crotalus durissus collilineatus* na preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo

A isoforma Bj-V na dose de 50 µg/ml analisada sob nervo frênico diafragma isolado de camundongo, na presença de duas isoformas de crotapotina crotálica, provenientes de *Crotalus durissus collilineatus* (F3 e F4). Este ensaio mostrou que, embora a atividade catalítica possa ser diminuída, a potência no bloqueio da resposta contrátil mostra-se evidente, conforme a figura 30. Não existe diferença significativa no tempo necessário para alcançar os 50% do de bloqueio da resposta contrátil, quando incubadas com ambas isoformas de crotapotina crotálica (F3 e F4), pois os tempos são muito semelhantes (Figura 30).

O tempo para atingir os 50% do bloqueio da resposta contrátil foi: para o veneno total, de $14 \pm 0,86$ min., Bj-V + F3 $37 \pm 0,78$ min e Bj-V + F4 $38 \pm 0,48$ min.

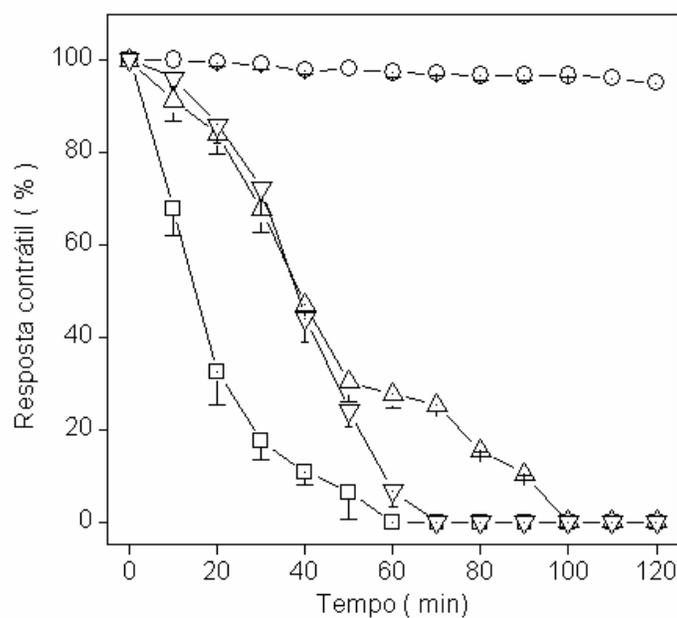


Figura 30. Bloqueio da resposta contrátil em preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo NF-DIC (estímulo indireto). A isoforma Bj-V incubada com a crotapotina F3 (▽) e incubada com a crotapotina F4 (△). E o bloqueio para o veneno total de *Bothrops jararacussu* (□) e controle (O). (n=5). Nível de significância das associações em relação ao controle ($P < 0,05$).

4.22 Determinação da atividade neurotóxica da isoforma PLA₂ D49 Bj-V de *Bothrops jararacussu* incubadas na presença de isoformas de crotapotina crotática (F3 e F4) de *Crotalus durissus collilineatus* na preparação biventer cervicis de pintainho

Primeiramente foi ensaiada a isoforma Bj-V e o veneno total em ausência das crotapotinas F3 e F4 (Figura 31a). Evidenciou-se o bloqueio, tanto para a isoforma Bj-V quanto para o veneno total. Depois foi ensaiada a isoforma Bj-V, na presença das duas isoformas de crotapotina crotática F3 e F4, provenientes de *Crotalus durissus collilineatus*. Este ensaio mostrou que, embora a atividade catalítica possa ser diminuída, a potência no bloqueio da resposta contrátil mostra-se evidente conforme a figura 31b.

Para ambas condições a razão molar foi 1:1 na dose de 50 µg/ml respectivamente.

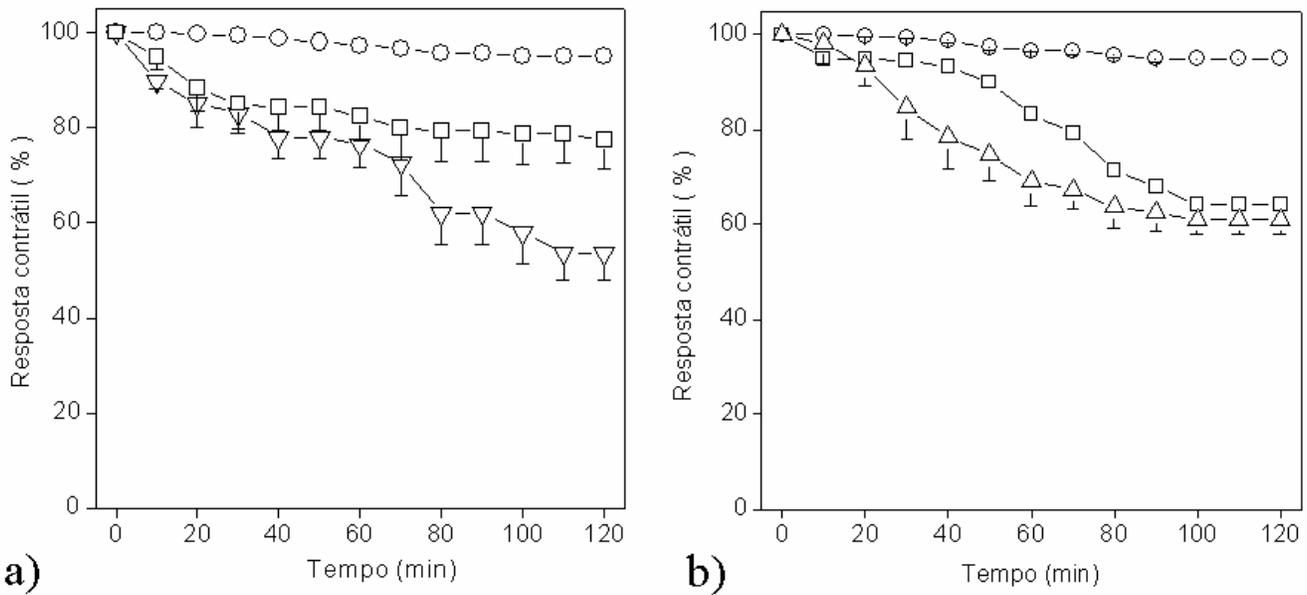


Figura 31: Bloqueio da resposta contrátil na preparação biventer cervicis de pintainho (estímulo de campo). Em a) Efeito do veneno total de *Bothrops jararacussu* (▽) e a isoforma Bj- V (□) em ausência das crotapotinas crotáticas F3 e F4. Em b) Bloqueio efeito da isoforma Bj-V incubada com a crotapotina F3 (□) e incubada com a crotapotina F4 (△) e controle (○) (n=5). Nível de significância das associações em relação ao controle (P<0,05).

Após a adição da dose (50 ug/ml) do veneno total de *Bothrops jararacussu* e da isoforma Bj-V, na ausência das crotapotinas crotálicas, houve discreta diminuição na resposta à adição de acetilcolina (ACh) 55 e 100 mM (Figura 32).

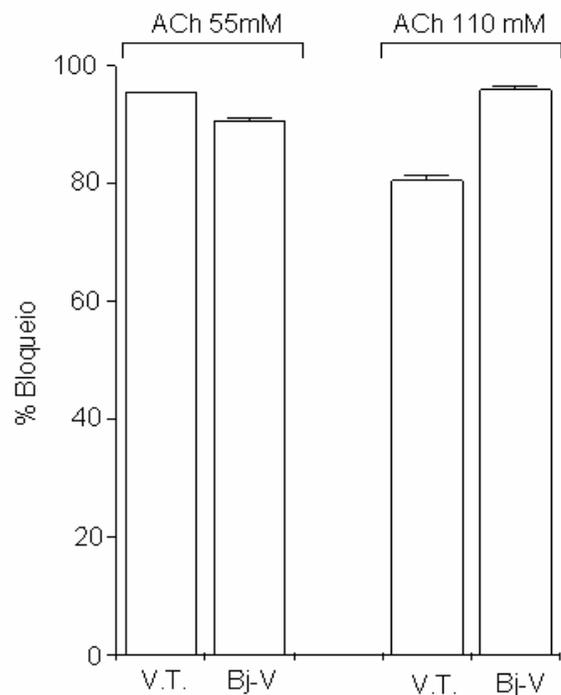


Figura 32. Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante a acetilcolina (ACh), obtida após 120 minutos de incubação com o veneno total e Bj-V de *Bothrops jararacussu*, em músculo biventer cervicis de pintainho (n=5). Nível de significância das amostras em relação ao controle (P<0,05).

Este resultado mostra que as respostas contraturante à acetilcolina e ao KCl 13.4 mM não foram significativamente diferentes entre o veneno total e a isoforma Bj-V em ausência das crotapotinas crotálicas F3 e F4.

Para as incubações da isoforma Bj-V com as crotapotinas crotálicas F3 e F4, não foi evidenciada uma ligeira alteração na curvas de KCl (Figura 33).

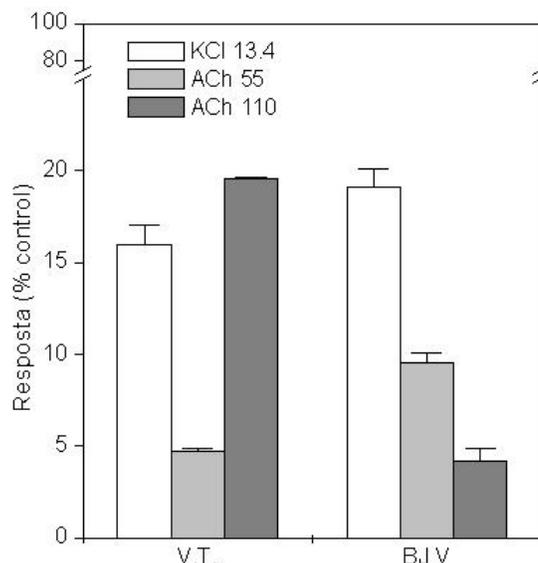


Figura 33. Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante ao potássio, na forma de KCl, obtida após 120 minutos de incubação com veneno total e a isoforma Bj-V de *Bothrops jararacussu*, em músculo biventer cervicis de pintainho (n=5). Nível de significância das concentrações de 10 e 20 µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

4.23 Purificação da fração neurotóxica Bt II a partir do veneno total de *Bothrops alternatus*, em coluna de exclusão molecular Superdex G-75 (Waters) em LC

35 mg foram aplicados a uma coluna de exclusão molecular Superdex G-75 acoplada a um sistema LC (Waters), monitorado a 280 nm, a um fluxo constante de 0,3 ml/min. E foram obtidas três frações denominadas de Bt I, Bt II e Bt III, sendo a fração com atividade neurotóxica registrada no pico Bt II (Figura 34).

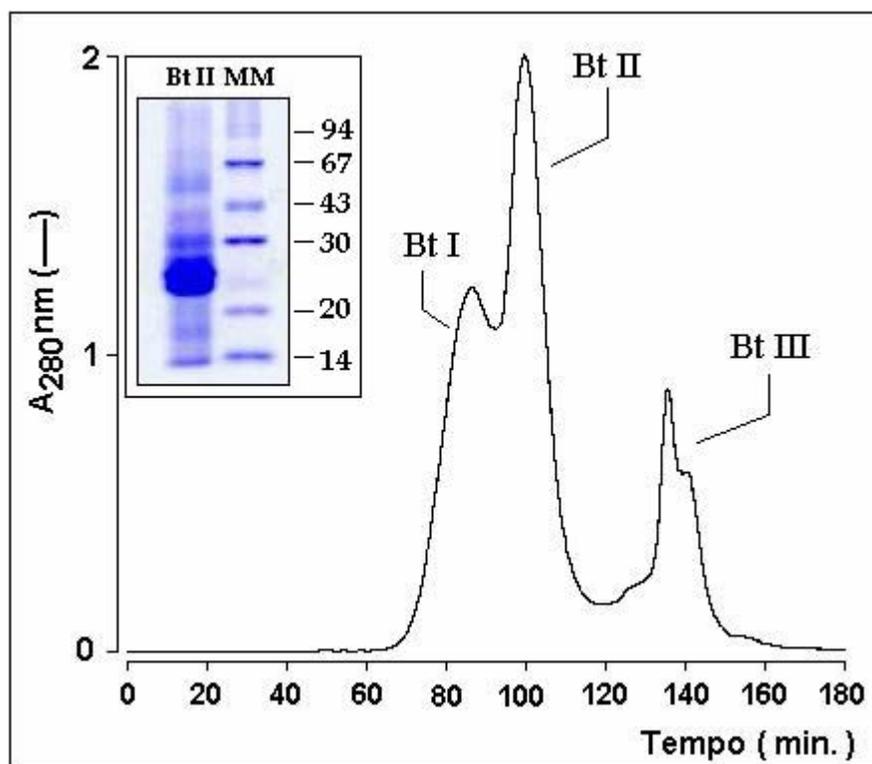


Figura 34 Cromatografia de exclusão molecular em LC, utilizando uma coluna Superdex G-75 (100 X 0.60cm) (Waters) do veneno total de *Bothrops alternatus*. A corrida foi realizada com tampão bicarbonato de amônio (0,2M pH 7.9), fluxo constante 0,3 ml/min. Monitorado a uma absorvância de 280 nm. As frações eluídas foram Bt I, Bt II e Bt III.

4.24 Purificação da fração neurotóxica Bt II-2 a partir do veneno total de *Bothrops alternatus* em coluna μ -Bondapack C-18 (0.78 X 30 cm) (Waters) em HPLC de fase reversa

A figura 35 mostra o perfil cromatográfico da fração Bt II, em uma coluna μ -Bondapck C-18 (0.78 X 30cm) preparativa (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. A fração Bt II, previamente obtida em exclusão molecular, mostra a presença de quatro frações Bt II-1, Bt II-2, Bt II-3 e Bt II-4 (Figra 35), sendo a fração Bt II-2 a responsável pelo efeito neurotóxico. A repurificação em HPLC de fase reversa da fração Bt II-2 mostra uma única banda na pista eletroforética e uma massas molecular relativa de 14 kDa em relação aos marcadores de massas.

A amostra, posteriormente, foi submetida a mais uma etapa de re-purificação em HPLC de fase reversa para confirmar seu grau de pureza. O tempo de retenção foi de $16,36 \pm 0,31$ minutos. O perfil cromatorgráfico da amostras Bt II-2 mostrou a presença de um único pico de eluição, como representado na figura 36. As análises em HPLC de fase reversa mostraram também que a fração BT II-2 apresenta um grau de homogeneidade molecular ao redor de 95% de pureza.

Figura 35 Perfil cromatográfico de purificação da fração Bt II em HPLC de fase reversa, usando-se uma coluna μ -Bondapck C-18 (Waters). A eluição da amostra é realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo é mantido constante a 2ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica é realizado a 280 nm de absorbância

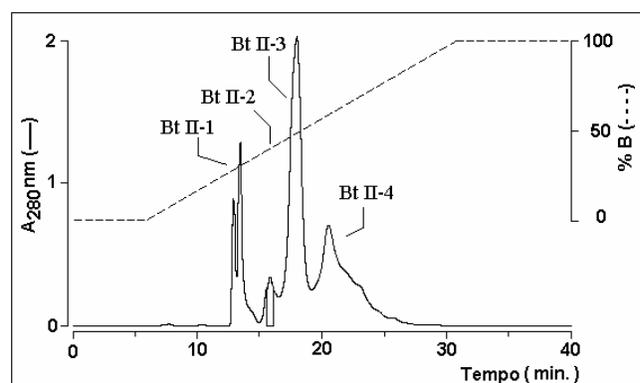
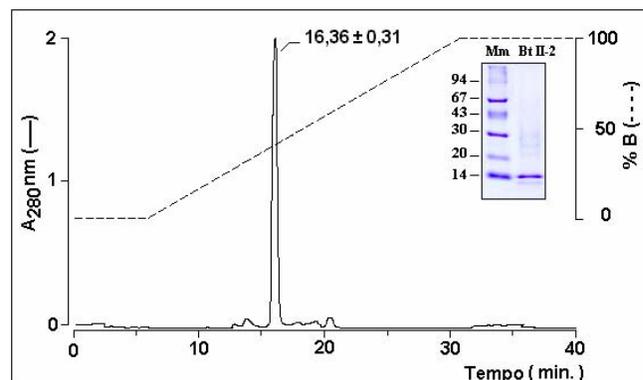


Figura 36 Perfil cromatográfico de re-purificação da fração Bt II-2 em HPLC de fase reversa, usando-se uma coluna μ -Bondapck C-18 (Waters). A eluição da amostra é realizada usando-se um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 60%, TFA 0.025%). O fluxo é mantido constante a 2ml/min. O monitoramento da corrida cromatográfica é realizado a 280 nm de absorbância.



4.25 Análises de aminoácidos da fração neurotóxicas Bt II-2 de *Bothrops alternatus*

Em relação à análises de composição de aminoácidos, a fração neurotóxica *in vitro* Bt II-2 de *Bothrops alternatus* (Tabela 4) mostra ser uma proteína básica 32 (Lys, His e Arg). Mostra a presença de 14 cisteínas e o número da aminoácidos determinado (122) sugere que se trata de uma PLA₂, por compartilhar muitas das características físico-química deste grupo de proteínas.

<i>Aminoácido</i>	Bt II-2
Asx	10
Glx	6
Ser	5
Gly	9
His	7
Arg	6
Thr	7
Ala	5
Pro	5
Tyr	9
Val	5
Met	1
Cys	14
Ile	3
Leu	9
Phe	2
Lys	19
Trp	*ND
Total	122

Tabela 4 Composição de aminoácidos da fração Bt II-2 de *Bothrops alternatus* Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. * Não determinado

4.26 Determinação da estrutura primária da fração neurotóxica Bt II-2 de *Bothrops alternatus*

A PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus*, usada na determinação da estrutura primária da PLA₂, foi obtida e repurificada em HPLC de fase reversa.

A PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* é considerada pura, pelos critérios de homogeneidade molecular em SDS-PAGE, também pelo perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa, que evidenciou um único pico simétrico de eluição e também pela análise da região N-terminal, que confirmou o grau de pureza da PLA₂ K49 Bt II-2.

A determinação da estrutura primária da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* é obtida pelo sequenciamento N-terminal até o 24º resíduo. E dos peptídeos pela digestão enzimática da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus*, pelas proteases SV8 de *Staphylococcus aureus* e pela tripsina bovina de alto grau de seqüência (Sigma), separadas em HPLC de fase reversa (Figura 37a e b).

O sequenciamento dos peptídeos Trp-04, obtidos por digestão com tripsina bovina de alto grau de seqüência e repurificados em HPLC de fase reversa, confirmou parte da seqüência N-terminal do 20º até 42º e permitiu um aumento da seqüência da região N-terminal por mais 25 resíduos. O sequenciamento de Trp-10 permitiu a formação de uma região de sobreposição entre a porção Trp-04 da molécula com a seqüência de Trp-07, permitindo, desta forma, a construção da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* até 63º resíduo.

Os peptídeos SV8-02, Trp-06 e Trp-09 foram essenciais para a determinação da seqüência C-terminal, permitindo a união da região C-terminal com o restante da cadeia.

A estrutura primária completa da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus*, determinada pela sobreposição do seu N-terminal e dos peptídeos seqüenciados, é mostrada na Figura 37c, sendo sua estrutura primária formada por 121 resíduos de aminoácidos.

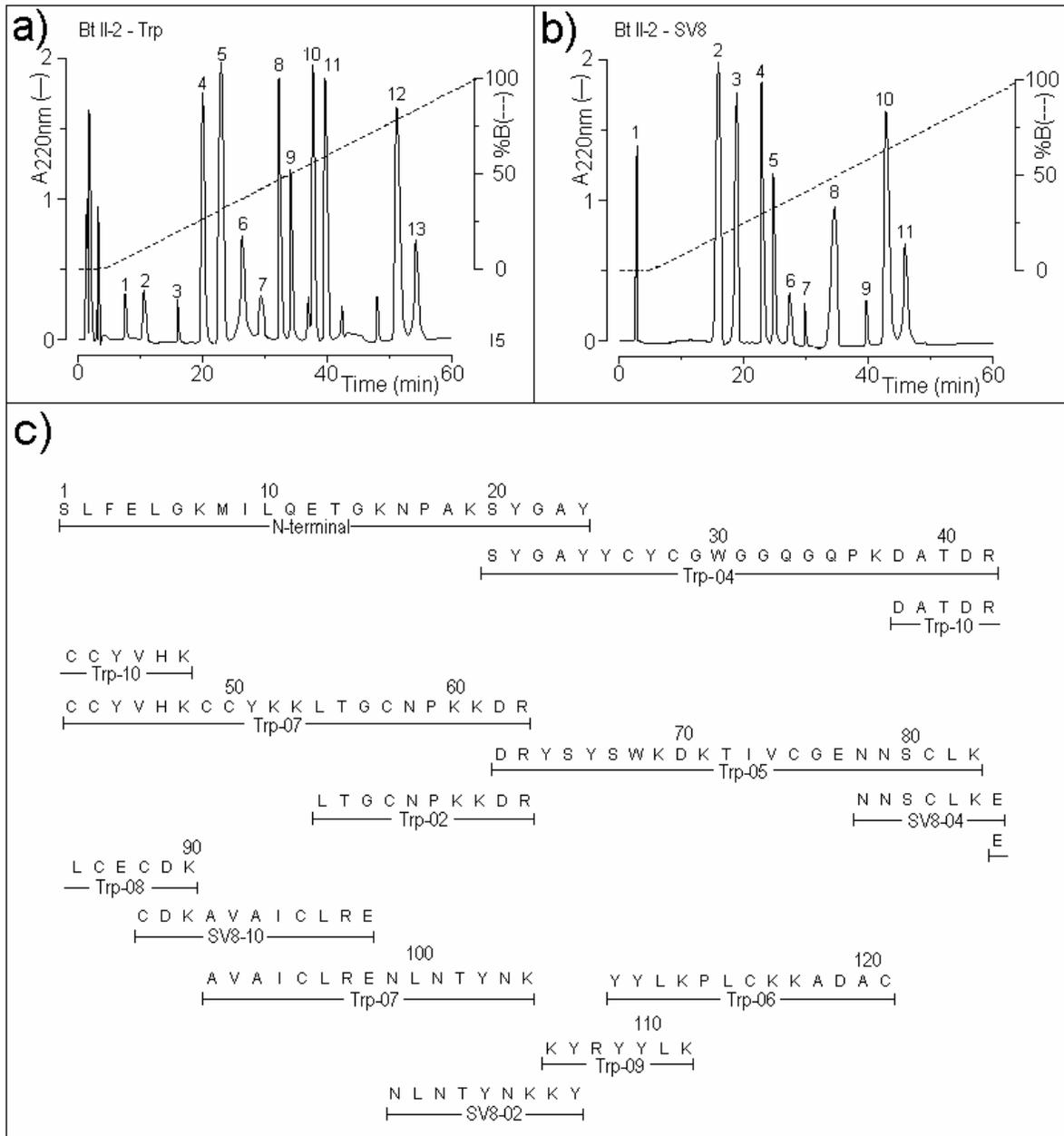


Figura 37 a) Eluição dos peptídeos produzidos pela digestão com tripsina bovina de alto grau de seqüência (Trp) e SV8 b) Peptídeos digeridos, usados na determinação da seqüência de aminoácidos da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* e em c) os peptídios necessários que contribuíram para a determinação da estrutura primária.

4.28 Determinação da massa molecular por espectrometria de massas (MALDI Tof) da fração neurotóxica Bt II-2 de *Bothrops alternatus*

Através desta análise, pode-se constatar a pureza da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* obtida a partir da cromatografia em HPLC de fase reversa.

A fração PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* apresenta uma massa molecular de 13898.71 Da (*) (Figura 39). A determinação da massa molecular real mostra que não existe diferença significativa entre a massa determinada por eletroforese em SDS-PAGE e a análise de composição de aminoácidos.

De acordo com o tipo de técnica empregada de espectrometria de massas (MALDI-Tof) (Figura 39), pode-se notar a presença de dois picos a mais, um de massa 6950.15 Da e outro de 27780.48 Da respectivamente. Cada um deles representa a massa dividida por dois mais um próton (H⁺) e outro a massa multiplicada por dois, referidos à formação de um dímero da massa real (2X), o que confirma que os parâmetros empregados na determinação de tipo linear foram adequadamente calibrados com o respectivo calmix de acordo com a massa a determinar.

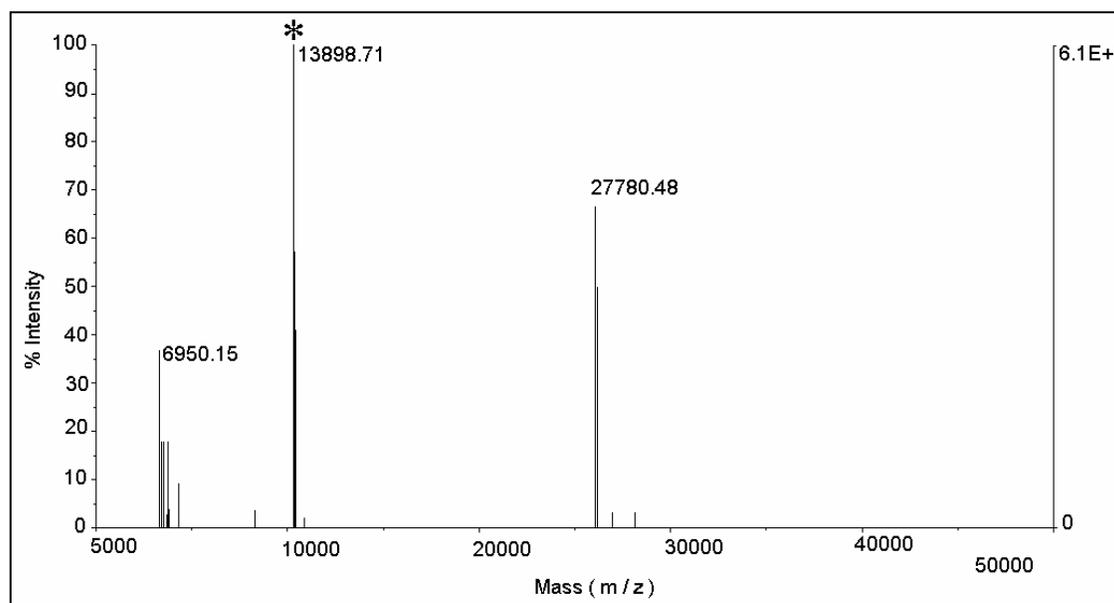


Figura 39 A massa molecular da fração neurotóxica Bt II-2 (*) de *Bothrops alternatus* é analisada por Espectrometria de Massas, utilizando-se um Voyager DE PRO Maldi-TOF mass spectrometry. 1 µl. da amostra em TFA. 0,1% é misturada em 2 µl. da matriz. e analisada sob as condições seguintes: aceleração de voltagem 25 kV, o laser ajustado a 2890 mJ/cm², em 300 ns e o modo de análise é linear.

4.29 Registros miográficos do veneno total e as frações isoladas Bt II e Bt II-2 de *Bothrops alternatus*

As doses ensaiadas para o caso do veneno total são de 50 e 100 $\mu\text{g/ml.}$ e, para as frações Bt II e Bt II-2, de 10 e 20 $\mu\text{g/ml.}$, conforme a figura 40. Os resultados de veneno total evidenciam um quase ligeiro efeito neurotóxico, mas a diferença das frações isoladas Bt II – por exclusão molecular em coluna de Superdex G-75 LC (Waters) e Bt II-2. em HPLC de fase reversa em coluna μ -Bondapack C-18 – mostra a fração Bt II-2 ser eminentemente neurotóxica, ao produzir bloqueio na transmissão neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Fig. 41 e 42).

O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50%, para Bt II (10 $\mu\text{g/ml.}$), é de 67,94; min. e para a dose de 20 $\mu\text{g/ml.}$, é de 47,16 min. Para o caso das frações Bt II-2, é (10 $\mu\text{g/ml.}$) 24,90 min.; e para a dose de 20 $\mu\text{g/ml.}$, é de 18,97 min respectivamente. As figuras 41 e 42 mostram os registros da resposta contrátil, apresentando os efeitos do veneno total, Bt II e Bt II-2.

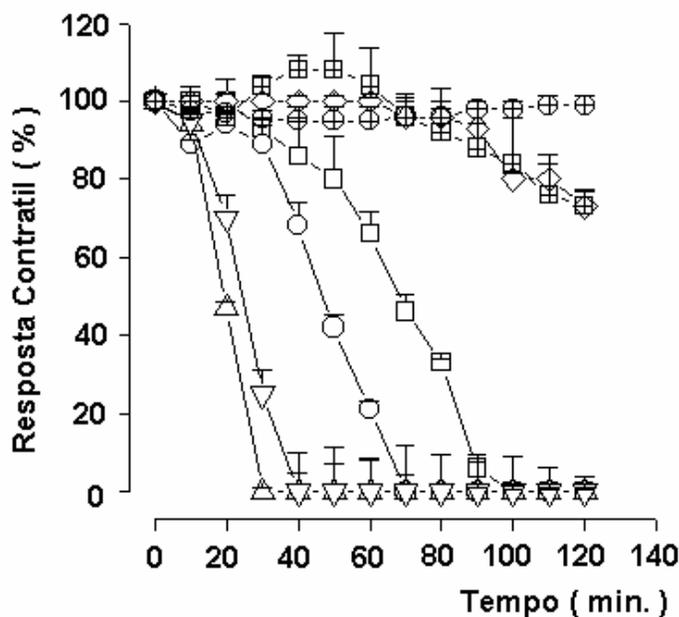


Figura 40 Representação gráfica da resposta contrátil em preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo indireto) do veneno total de *Bothrops alternatus* (50 $\mu\text{g/ml.}$) (◇), 100 $\mu\text{g/ml.}$ (⊠), Bt II 10 $\mu\text{g/ml.}$ (□), Bt II 20 $\mu\text{g/ml.}$ (○), Bt II-2 10 $\mu\text{g/ml.}$ (▽) e Bt II-2 20 $\mu\text{g/ml.}$ (△), controle (⊕) (n=5). Nível de significância em relação ao controle ($P < 0,05$) (n=5). Nível de significância das frações Bt II e Bt II-2 em relação ao controle ($P < 0,05$).

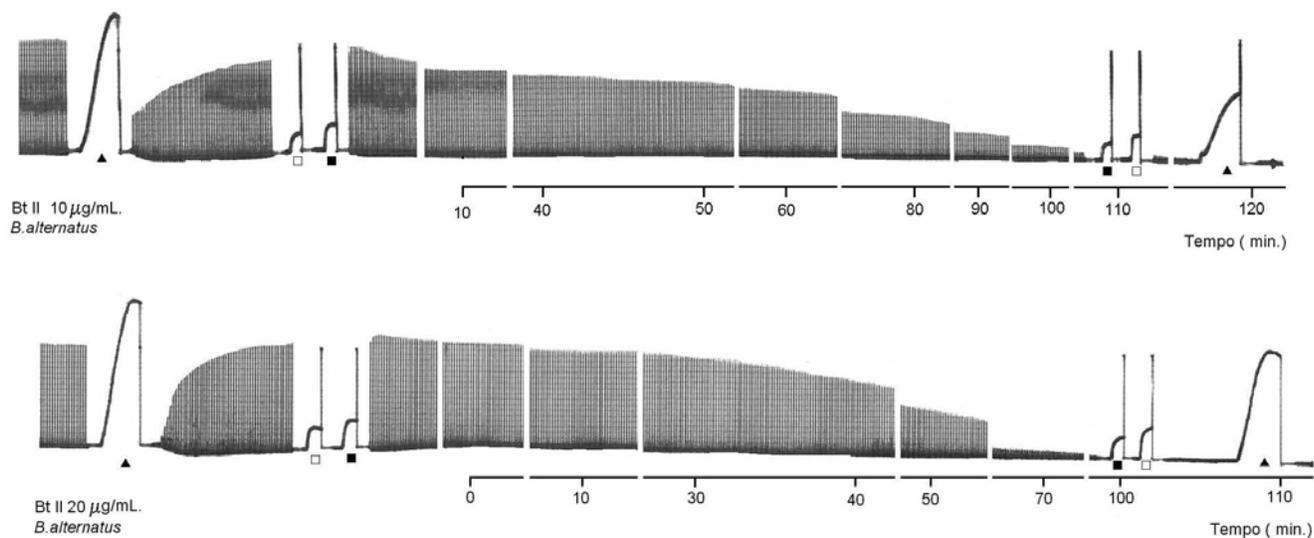


Figura 41 Registros da força de contração muscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo de campo). Perfis miográficos dos efeitos da fração Bt II nas doses de 10 e 20 µg/ml., demonstrando o bloqueio. Em 0 a adição das amostras. A resposta contrátil a Acetilcolina, 10 µg/ml □ e 20 µg/ml. ■ e KCl 13,4 mM ▲.

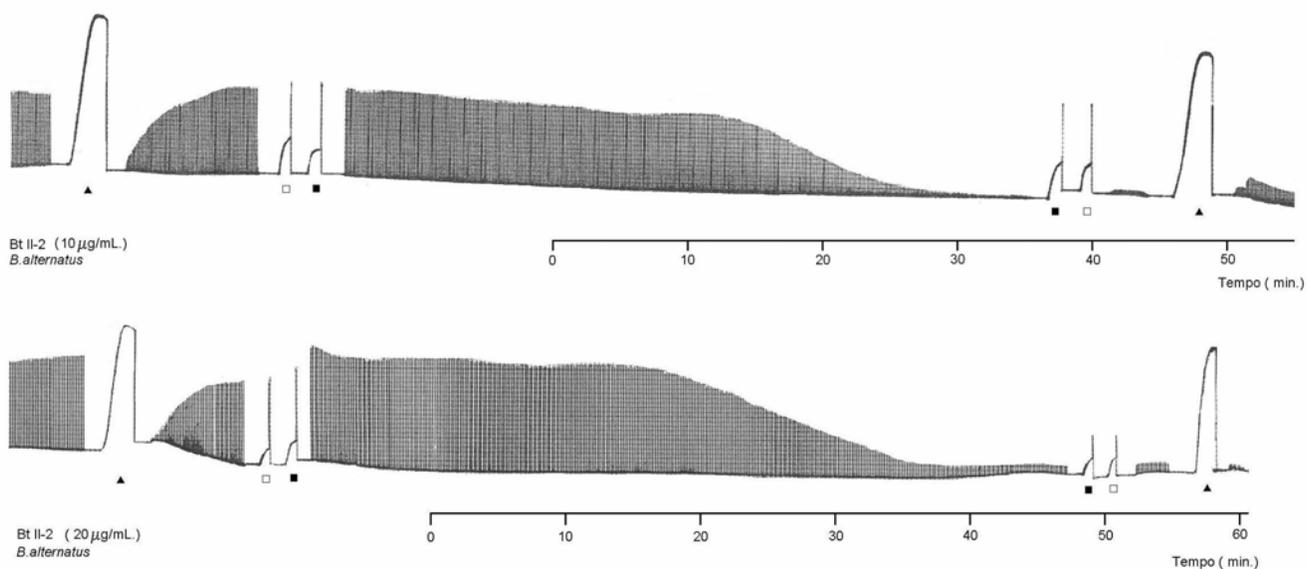


Figura 42 Registros da força de contração muscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Estímulo indireto). Perfis miográficos dos efeitos da fração Bt II-2 nas doses de 10 e 20 µg/ml., demonstrando o bloqueio. Em 0 a adição das amostras. A resposta contrátil a Acetilcolina, 10 µg/ml □ e 20 µg/ml. ■ e KCl 13,4 mM ▲.

4.30 Registros miográficos da fração Bt II-2 de *Bothrops alternatus* sob estímulo elétrico direto e indireto, em uma mesma preparação (nervo frênico-diafragma isolado de camundongo), na dose de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$.

A fração Bt II-2 foi estudada em duas doses (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$). Este tipo de experimento é avaliado em uma mesma preparação, nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, sob estímulo direto e indireto.

Conforme a Figura 43, pode-se evidenciar que o bloqueio neuromuscular ocorre sob a forma indireta via nervo e não direta via músculo, sendo possível, a partir deste experimento, obter valiosas informações que serão discutidas adiante.

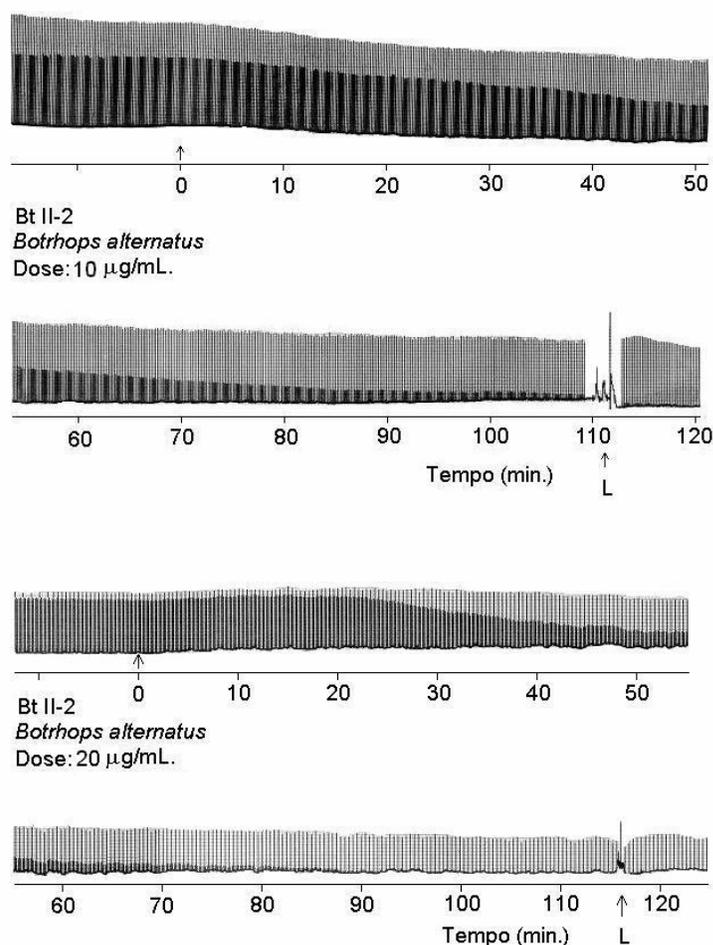


Figura 43 Registro da força de contração muscular em preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo (estímulo direto e indireto). Perfis miográficos sobrepostos da fração neurotóxica Bt II-2 de *Bothrops alternatus* nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$., evidenciando um bloqueio da transmissão neuromuscular (n=5). Nível de significância das concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ em relação ao controle ($P < 0,05$).

4.31 Estudos Electrofisiológicos:

4.31.1 Efeitos da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* sobre o potencial de repouso na região da placa motora

O potencial de repouso na região da placa motora são captados através da inserção de microeletrodo nas fibras musculares, tanto na região da placa motora, quanto fora dela. Nestes experimentos se verifica o efeito da neurotoxina sobre a frequência e a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura, onde se usa a neurotoxina na dose de 1 µg/ml.

A figura 44 mostra que a região da placa motora, na presença da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* na concentração de 1 µg/ml não é capaz de levar a mudanças no potencial de membrana, pois não leva a uma despolarização do potencial de repouso.

A presença de carbacol na concentração de 12 µg/ml é capaz de levar a um estado de despolarização da placa, que se comporta como um controle positivo reversível capaz de criar uma despolarização da membrana muscular. Na pós-lavagem, observa-se a re-polarização da membrana.

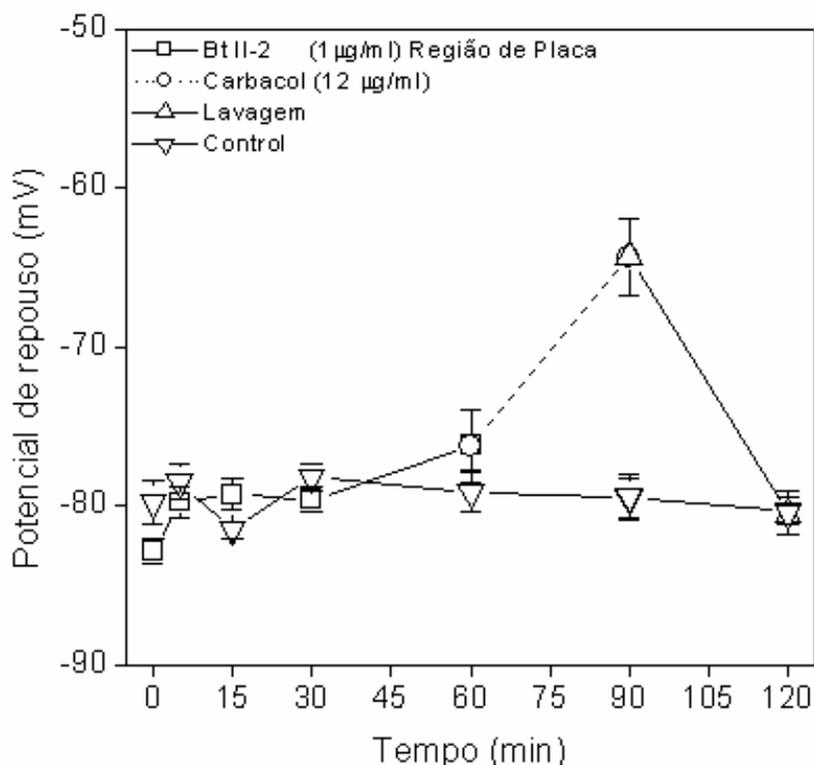


Figura 44 Representação gráfica do efeito da PLA₂ K49 homóloga de *Bothrops alternatus* no potencial de repouso o membrana (PM) na região da placa motora (n=5). Nível de significância da concentração de 1µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

4.31.2 Efeitos da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* sobre o potencial de repouso fora da região da placa motora

A figura 45 mostra que, na região fora da placa motora, em presença da PLA₂ K49 Bt II-2 neurotóxica de *Bothrops alternatus* na concentração de 1 µg/ml, não há mudanças no potencial de membrana (PM), já que não há alteração da condutância (mV).

A presença de carbacol na concentração de 12 µg/ml é capaz de levar a um estado de despolarização da placa, que se comporta como um controle como o curare, que é capaz de despolarizar a membrana. Na pós-lavagem, observou-se a re-polarização da membrana.

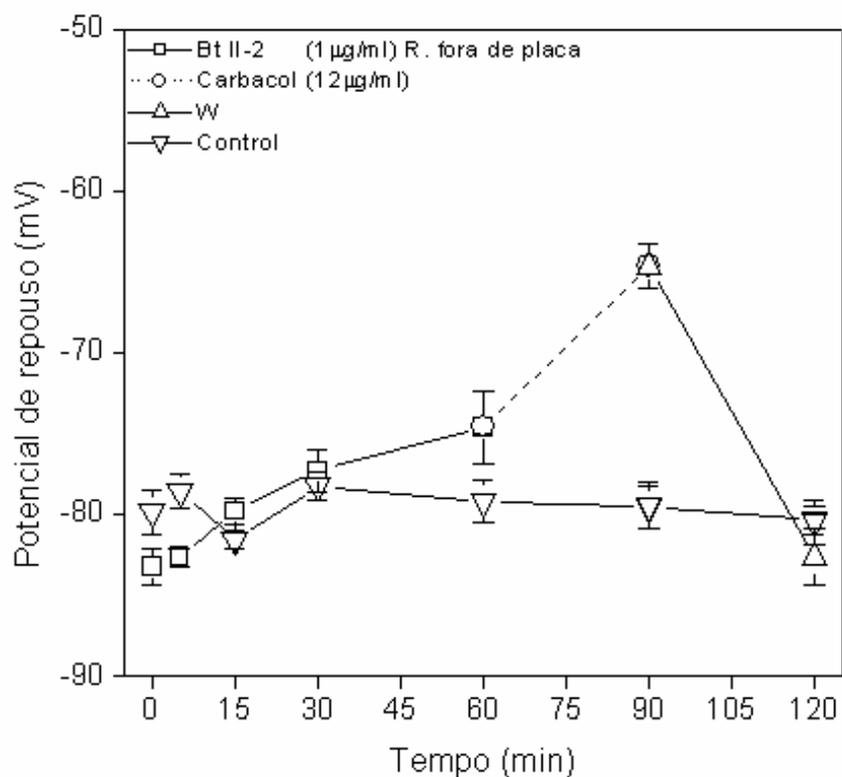


Figura 45 Representação gráfica do efeito da PLA₂ K49 homóloga de *Bothrops alternatus* no potencial de repouso o membrana (PM) na região fora da placa motora (n=5). Nível de significância da concentração de 1 µg/ml em relação ao controle (P<0,05).

4.32 Determinação da DL₅₀

A atividade letal (DL₅₀) da toxina Bt-II-2 é testada por via intravenosa e é estimada em 7,04 mg/kg, atingindo um intervalo de confiança (CI95%) 5,9 mg/kg – 9,05 mg/kg. É utilizado o método de Probits para a determinação da Dosis Letal.

4.33 Caracterização miotóxica “*in vivo*” da neurotoxina Bt II-2 isolada de *Bothrops alternatus*

A fração isolada e caracterizada como neurotoxina do veneno total de *Bothrops alternatus*, denominada Bt II-2, foi caracterizada como uma miotoxina de acordo com os seguintes ensaios:

4.33.1 Determinação dos níveis de CK plasmáticos “*in vivo*” intramuscular e intravenoso

Os estudos realizados para determinar o efeito miotóxico da fração Bt-II-2 “*in vivo*” foram feitos em camundongos inoculados com a fração, em uma concentração de 20 µg. Foram aplicados por via intramuscular e intravenosa.

Os resultados mostram que os níveis de CK plasmáticos aumentam drasticamente nas primeiras 6 horas do tratamento, por via intramuscular, atingindo até 1392.63 ± 175.87 U/L de CK nas primeiras 2 horas gradativamente até atingir os níveis normais, após 9 e 24 horas. Mas quando a fração é administrada por via intravenosa mostra um comportamento tipo controle, pois os níveis de CK não aumentam (Figura 46).

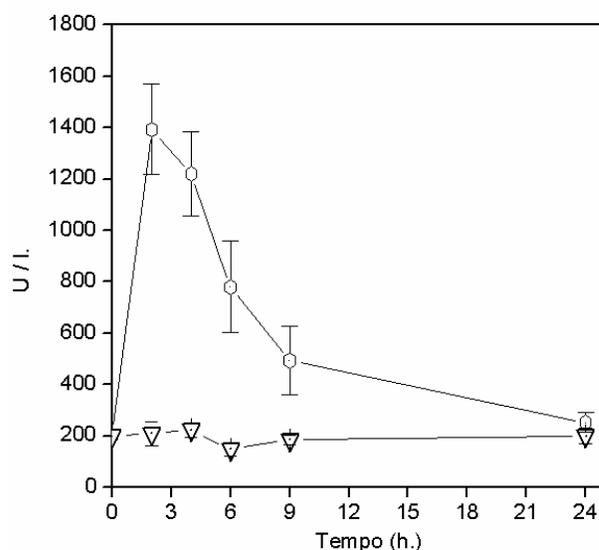


Figura 46. Representação gráfica da atividade miotóxica da fração Bt II-2 de *Bothrops alternatus* inoculado em camundongo de 20 g de peso. Mostra-se o curso-tempo dos níveis de creatina kinase (CK) incrementados ao longo do tempo depois de administrada a fração (20 µg). Intramuscular (○) e intravenoso (▽) (n=5). Nível de significância da fração em relação ao controle (P<0,05).

4.33.2 Estudo do efeito citotóxico através dos níveis de LDH em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12)

O efeito citotóxico ensaiado em cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12) da fração mostra um comportamento citotóxico, pois, à medida que as doses da fração vão sendo acrescentadas, os níveis de LDH também aumentam significativamente depois de acrescentada a fração Bt II-2, atingindo até $87.05 \pm 7.45 \%$ para mioblastos e $91,56 \pm 43,58 \%$ para miotubos, tal como se evidencia na figura 47.

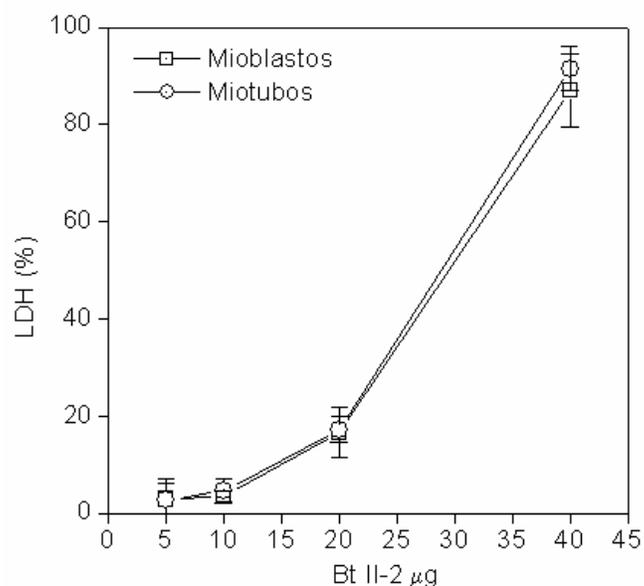


Figura 47. Representação gráfica da atividade citotóxica da fração Bt-II-2 de *Bothrops alternatus* “*in vitro*”, sob cultura celular de mioblastos e miotubos (C2C12). A lise celular foi estimada pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) do sobrenadante, após 3 horas de exposição da fração, em um volume de 150 μL/poço. Cada ponto representa a média ± SD do triplicado da cultura celular.

4.33.3 Determinação do efeito inflamatório

Foi estimada a ação inflamatória da fração Bt II-2 “*in vivo*” sob a região intraplantar de camundongo, inoculando-se a fração em várias concentrações (2.5, 5, 10 e 20 μg). A figura 48 mostra a ação edematizante da fração, observando-se um comportamento próprio deste tipo de toxina. Após 24 horas, o efeito inflamatório diminuiu drasticamente até alcançar os níveis normais.

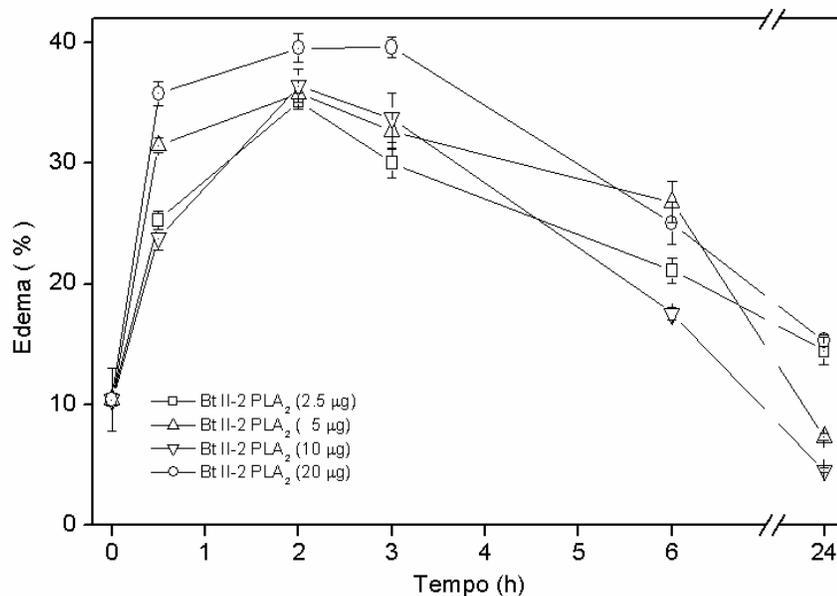


Figura 48. Representação gráfica da atividade inflamatória da fração Bt-II-2 de *Bothrops alternatus* inoculado na região intraplantar de camundongo de 20 g de peso. O aumento do volume de inflamação atingida pela pata do animal ao longo do tempo, até 24 horas, sendo comparado com o controle e expressado em porcentagem de edema induzido. As doses aplicadas foram 4 (2.5, 5, 10 e 20 µg respectivamente) (n=5). Nível de significância das concentrações em relação ao controle (P<0,05).

V. DISCUSSÃO

CAPÍTULO I

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO NEUROTÓXICO *IN VITRO* DE VENENOS CROTÁLICOS E BOTRÓPICOS

5.1 Purificação e caracterização bioquímica e neurotóxica da fração V-1 de *Crotalus durissus collilineatus*

A crotoxina proveniente de *Crotalus durissus terrificus* foi caracterizada como sendo a mais representativa das subespécies das cascavéis sul-americanas e, sendo a mais abundante (50% do veneno), esta possui diferentes atividades biológicas como: PLA₂ e neurotoxicidade pré e pós-sináptica (Bon *et al.*, 1979, Hawgood e Santana de Sá, 1979).

A purificação da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* é feita em várias etapas cromatográficas, partindo-se de uma coluna convencional de Sephadex G-75, indo para CM-celulose e, em seguida, para a purificação das isoformas em sistemas de HPLC de fase reversa ou então troca iônica em HPLC. Faure e Bon (1988), assim, conseguiram purificar várias isoformas de crotoxina. Utilizando 16 etapas cromatográficas, chegaram a isolar 16 isoformas de crotoxina.

No entanto, esta metodologia tem alguns aspectos negativos que merecem ser avaliados, como a perda de material durante as inúmeras etapas e o gasto de tempo experimental. Aguiar *et al.* (1997) propuseram um novo método, mais rápido, de purificação da crotoxina por cromatografia de isofocalização. Contudo, os resultados foram confusos, associados à quantidade reduzida de material obtido.

A nossa proposta foi desenvolver um método, não só capaz de fornecer material com alto grau de homogeneidade molecular, mas também que pudesse revelar a presença de alguma fração não descrita na literatura ou mal caracterizada, que pudesse ser útil como ferramenta molecular nos estudos dos canais iônicos. e, ao mesmo tempo, poder dispor de quantidades razoáveis de material para a realização dos experimentos propostos.

O fracionamento convencional do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e de outras subespécies crotálicas mostra um perfil cromatográfico característico, composto de quatro frações principais, eluídas por exclusão molecular na seguinte ordem: convulxina (fração I), giroxina (fração II), crotoxina (fração III, IV e V) e crotamina (fração V). Dados bioquímicos e farmacológicos têm sido

descritos na literatura para essas frações de veneno crotálico, sendo consideradas como molecularmente homogêneas.

A análise cromatográfica dos venenos de *Crotalus durissus collilineatus* (Figura 1a) e *Crotalus durissus terrificus* (veneno branco e amarelo; Figura 1b, c respectivamente) mostra a presença de uma fração (V) que, nos venenos, foi eluída entre as frações de crotoxina e crotamina.

A combinação de HPLC de exclusão molecular com HPLC de fase reversa mostrou ser eficiente. Houve preservação da seletividade assim como também da capacidade de resolução e do alto grau de homogeneidade molecular e atividade biológica.

Nossos resultados, utilizando cromatografia de alta eficiência (HPLC de exclusão molecular), mostram que os venenos de *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus* (branco e amarelo) podem ser decompostos em mais de quatro frações, dentre as quais uma nova fração denominada V, eluída entre as frações crotoxina e a crotamina.

O maior grau de eficiência cromatográfica obtida em nossos experimentos leva a supor que a fração V (10 kDa) foi discriminada do complexo crotoxina (23 kDa). Laure (1990) mostrou um perfil cromatográfico com a presença de uma fração denominada Inter-CRO, eluída entre o complexo crotoxina e crotamina, sendo considerada como uma iso-crotoxina, não sendo caracterizada bioquímica e farmacologicamente.

Desta forma, conseguimos isolar, a partir da re-purificação de Cdcoll V, a fração V-1, responsável pelo efeito neurotóxico facilitador (Figura 2), através da padronização de duas metodologias de purificação, em larga escala, de toxinas e neurotoxinas de *Crotalus durissus collilineatus*.

Estudos de neurotoxicidade *in vitro*, da fração V-1 proveniente de *Crotalus durissus collilineatus*, mostram evidente atividade neurotóxica facilitatória. Nossos resultados permitem concluir que vários efeitos, descritos anteriormente para crotoxina e denominados como efeito trifásico (Chang e Lee 1977), ocorreriam devido à presença dessa fração na crotoxina. Quando testamos crotoxina sem a presença de V-1, notamos a ausência do efeito trifásico (tese de mestrado 2001, Luis Alberto Ponce Soto).

A análise de aminoácidos da V-1 (Tabela 1) revela que se trata de uma proteína ácida, diferente da crotoxina e da crotamina, com um elevado conteúdo de prolina (25), que provavelmente é o responsável pelo dobramento desta em sua estrutura secundária. E a presença de aminoácidos hidrofóbicos poderia estar relacionada com sua potência neurotóxica. Sabe-se que a distribuição de carga apropriada e resíduos não polares ou hidrofóbicos sobre a superfície da β -neurotoxina Ts 1 de

Tityus serrulatus determina a especificidade com o canal de Na⁺ (Polikarpov, I., *et al.*, 1999). Em tal sentido, provavelmente a fração V-1 poderia agir sobre determinados canais.

Os estudos obtidos por espectrometria de massas (Maldi-Tof) mostram que a neurotoxina V-1 apresenta um alto grau de pureza e homogeneidade molecular (Figura 3), sendo sua massa molecular de 9859,45 Da diferente da crotoxina (23 kDa) (Ponce-Soto, *et al.*, 2002) e da crotamina (4.8 kDa) (Toyama, *et al.*, 2000, 2003).

Na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, a fração V-1 foi capaz de induzir um processo de facilitação nos registros miográficos nas doses de 10 e 20 µg/ml mostrando ser dose-dependente (Figura 4 e 5). Esse resultado poderia levar a crer que teríamos purificado uma nova crotamina, mas os dados das características físico-químicas (tempo de retenção-cromatografia; massas molecular relativa- SDS-PAGE; massas molecular-espectrometria de massas) e a observação somente do efeito facilitador dose-dependente na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, dados esses diferentes da crotamina que possui um efeito facilitador seguido de um bloqueio na transmissão neuromuscular (Figura 6a e b), revelam que se trata de uma fração desconhecida.

A fração V-1 frente à preparação *biventer cervicis* de pintainho mostrou um comportamento neurotóxico *in vitro* facilitador bastante proeminente, seguida de um bloqueio total, diferentemente da crotoxina que mostra um efeito facilitador discreto e um bloqueio total (tese de mestrado 2002 Luis Alberto Ponce Soto), como mostrado na representação gráfica (Figura 7) e no registro miográfico (Figura 8). Esta diferença de efeitos pode estar relacionada com as diferenças morfofisiológicas entre músculo esquelético de mamífero e ave (inervação uni e multifocal, nervo frênico-diafragma isolado de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho respectivamente) como sugerido por Harvey, *et al.* (1994).

5.2 Caracterização físico-química e biológica dos componentes do complexo crotoxina, isoformas de crotapotina F3 e F4, e PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus*

Desde os trabalhos iniciais de Breithaup (1975) até os recentes (Oliveira *et al.*, 2002), tem-se isolado isoformas de componentes da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* (Beghini, *et al.*, 2000). Ponce-Soto *et al.* (2002) têm purificado duas isoformas de crotapotina F3 e F4 e uma de PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus*, para assim tentar compreender melhor tanto a relação que existe entre estrutura-função deste heterodímero, quanto suas subunidades na forma isolada.

Para a obtenção das isoformas de crotapotina F3 e F4, como de PLA₂ de *Crotalus durissus collilineatus* seguiu-se a metodologia estabelecida por Ponce-Soto *et al.* (2002). A análise de aminoácidos das isoformas da crotapotina (F3 e F4) e da PLA₂ (F6) (Tabela 2) mostrou semelhança aos

resultados obtidos para *Crotalus durissus terrificus* (Lennon e Kaiser, 1990) e *Crotalus durissus cascavella* (Beghini, *et al.*, 2000). Onde a isoforma F3 possui uma massa de 8691 Da e F4 9343 Da, ambas de caráter ácido e a PLA₂ (F6) com massa de 14943 Da com um caráter básico.

Uma das características estruturais mais importantes das PLA₂, provavelmente é a presença de ácido aspártico (D49) nas PLA₂ cataliticamente ativas. Nessa região molecular se localiza o sítio onde este resíduo é um dos responsáveis pela ligação com o cálcio, que é um cofactor essencial da atividade enzimática. A conservação dos segmentos 44-50 e 28-32 representa a região mais diretamente envolvidas com a função catalítica. Estas seqüências também poderiam ter uma grande importância estrutural dentro das PLA₂ neurotóxicas com atividade catalítica (Arni e Ward, 1996).

Para as PLA₂ D49, existem, como regra, três resíduos conservados na porção N-terminal que são Q(4), F(5), I(9), enquanto, nas variantes PLA₂ K49, estas possuem L(5) no lugar de Q(5) (Arni e Ward, 1996).

O estudo de homologia seqüencial das PLA₂ D49 mostram determinadas posições altamente conservadas. Na posição 2-10, predomina a seqüência (LLQFNKMIK), 19-21 (PFY), 24-29 (YGCYCG), 31 e 32 (GG), 34 (G), 36-38 (PKD), 40-51 (TDRCCFVHDCCY), 54 (L), 57 (C), 60 (K), 62 (D), 64 (Y), 66 e 67 (YS), 69 (K), 71, (G), 73 I), 75 e 76 (CG), 78 e 79 (GT), 81 e 82 (CE), 85-90 (ICECDR), 92 E 93 (AA), 95 (C), 100 (L), 102 E 103 (TY), 107 E 108 (YM), 110 (Y), 115 (C), 120 (E) e 122 (C), sendo de extrema importância para o desenvolvimento da atividade catalítica (Arni e Ward, 1996).

Nosso resultado a PLA₂ F6 (Figura 10) possui um alto grau de homologia não somente seqüencial, mas também estrutural, de acordo com as fosfolipases A₂ descritas até o presente (Gutierrez, *et al.*, 1995; Arni e Ward, 1996; Oliveira *et al.*, 2002).

A PLA₂ F6 possuem uma alta homologia seqüencial (90%). Com outras PLA₂ neurotóxicas, este valor se vê diminuído, quando se compara com outras PLA₂ provenientes de serpentes botrópicas. A análise da seqüência mostra a posição extremamente conservada dos resíduos de cisteínas, quando comparadas com as seqüências de outras PLA₂. Assim temos as cisteínas nas posições 26, 28 43, 44 49, 50, 57, 75, 81, 86, 88, 95 115 e 121, as mesmas que se encontram formando provavelmente as sete pontes dissulfeto.

A seqüência da PLA₂ F6 mostrou uma alta identidade seqüencial (85–90%), com a crototoxina B, caracterizada previamente por Aird e Kaiser (1985) e Aird *et al.* (1989). A F6 apresentou a região C terminal rica em lisina, que – segundo Lomonte, *et al.* (1994); Gutierrez e Lomonte (1995), Selistre de Araújo, *et al.*, (1996) – é responsável pelo processo de miotoxicidade.

A ação das PLA₂ D49 poderia ser classificada como neurotóxica ou como uma combinação de neurotóxica e miotóxica (Selistre de Araújo *et al.*, 1996).

Os estudos realizados por Bon, *et al.*, 1979, 1989 e Fraenkel-Conrad 1982, têm revelado o efeito neurotóxico da crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. O complexo crotoxina atua de forma sinérgica, onde o componente ácido (crotapotina) estaria potencializando o efeito neurotóxico da crotoxina, como descrito Rubsamen, *et al.* (1971) e Kini (1997). A crotapotina foi inicialmente descrita como uma molécula “chaperone” das fosfolipases A₂ de *Crotalus durissus terrificus*. A crotapotina potencializa a toxicidade da PLA₂ (Bon, *et al.*, 1979); e este fenômeno de potencialização é interpretado como um fenômeno farmacocinético, onde o componente ácido pode proteger a fosfolipase A₂ da inativação por ligação a sítios de baixa afinidade. No entanto, a crotapotina inibe a atividade enzimática da PLA₂. (Kini, 1997).

Em nosso trabalho, foi evidenciada a presença do efeito sinérgico nos experimentos de recombinações dos componentes da crotoxina de *Crotalus durissus collilineatus* F3 + F6 e F4 + F6, nas doses de 10 e 20 µg/ml, na razão molar de 1:1 (m/m), mostrando o efeito neurotóxico no bloqueio da transmissão neuromuscular, evidenciado pelo bloqueio da resposta contrátil como mostrado no registro miográfico, na preparação *biventer cervicis* de pintainho (Figura 11, 12 e 13). Estes resultados são semelhantes na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, onde se estuda a recombinação das isoformas de crotapotina (F3 e F4) e PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* (Tese de mestrado Luis Alberto Ponce Soto).

Esses resultados confirmam a integridade da crotoxina de *Crotalus durissus collilineatus*, em seu rearranjo molecular para desencadear o efeito neurotóxico, demonstrando assim a otimização de nossas metodologias de purificação que leva à conservação da função biológica das proteínas isoladas.

O efeito irreversível da resposta contrátil ao efeito neurotóxico da crotoxina re-associada pós-adição de acetilcolina e KCl, da crotoxina re-associada de *Crotalus durissus collilineatus* em *biventer cervicis* de pintainho, esteve presente em todos os registros miográficos (Figura 12 e 13).

Os estudos das frações isoladas do complexo crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* (crotapotina e fosfolipase A₂) têm demonstrado a ausência do efeito neurotóxico na junção neuromuscular e foram considerados como desprovidos de atividade farmacológica, tanto em músculo esquelético de camundongo, por Slotta e Fraenkel-Conrad (1938); Chan e Lee (1977); Haberman e Breithaupt, (1978) e Verheij, *et al.*, (1981) e Gopalakrishnarone, *et al.*, (1984), quanto em músculo esquelético de rã, por Hawgood e Santana de Sá S. (1979).

Nos estudos de neurotoxicidade *in vitro* na preparação de nervo frênico diafragma-isolado de camundongo, a crotoxina de *Crotalus durissus collilineatus* mostra-se semelhante as estudadas por

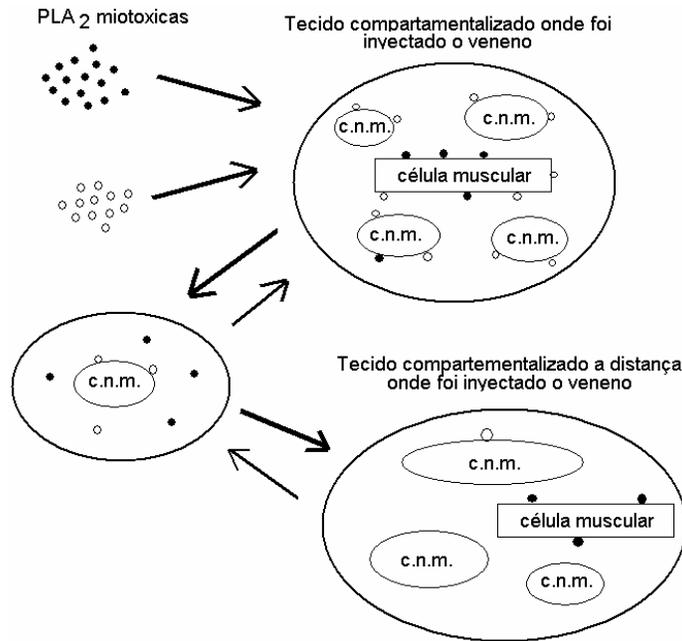
Ponce-Soto, L.A (Tese mestrado 2001 Luis Alberto Ponce Soto). Na preparação *biventer cervicis* de pintainho, o efeito neurotóxico *in vitro* das isoformas de crotapotina F3 e F4 são semelhantes aos do nervo frênico diafragma-isolado de camundongo, do complexo crototoxina de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de 10 e 20 µg/ml mas, no caso da PLA₂ (F6), foi observado o contrário. Nas doses de 10 e 20 µg/ml leva a um efeito neurotóxico de forma isolada ao produzir um bloqueio da transmissão neuromuscular (Figura 14, 15 e 16).

O efeito neurotóxico *in vitro* da PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* reforça nossos estudos para realizar uma melhor caracterização farmacológica, desde a eletrofisiologia, que será abordada em outro momento. Os estudos realizados por Harvey *et al.* (1994) sugerem usar a preparação *biventer cervicis* de pintainho como a mais indicada para testar neurotoxinas, pela sua alta sensibilidade, embora estes diferentes mecanismos de ação possam ser facilmente diferenciados, usando-se as preparações de nervo frênico diafragma isolado de rato ou camundongo; a preparação *biventer cervicis* de pintainho resulta ser a mais eficiente. Uma neurotoxina pura pré-sinápticamente ativa poderia abolir a resposta contrátil provocada, sem afetar as respostas aos agonistas colinérgicos ou as respostas à estimulação direta pelo KCl. Neurotoxinas ativas pós-sinápticas bloqueariam tanto respostas aos agonistas colinoceptores, quanto a estimulação indireta, mas não afetariam as respostas a elevadas concentrações de potássio ou a estimulação direta.

Estudos feitos com veneno total de *Crotalus durissus terrificus* evidenciam alterações locais irrelevantes, sendo o veneno caracterizado mais por seus potentes efeitos neurotóxicos e atividades de mioxicidade sistêmica do que por alterações renais e trastornos da coagulação sanguínea (Gutierrez e Lomonte 2003, Fan, *et al.*, 1995).

Segundo o proposto por Gutierrez, J.M. e Ownby, C.L. (2003), as PLA₂ são os componentes miotóxicos mais importantes nos venenos de serpentes, induzindo eventos de degeneração muscular. As PLA₂s miotóxicas ligam-se aos aceptores da membrana plasmática, os quais poderiam se tratar de lípidos ou proteínas, podendo diferir de sua afinidade pelas PLA₂.

Ao ligar-se às PLA₂s miotóxicas, estas produzem uma destruição da membrana através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA₂, no entanto, provocam uma entrada de Ca²⁺ bastante pronunciada e que, por sua vez, produzem uma série de eventos degenerativos associados com uma hipercontração, ativação de calpinas e PLA₂ citosólicas e mitocondriais Ca²⁺-dependentes (Esquema 3).



Esquema 3. Modelo hipotético que explica a diferença entre PLA₂s miotóxicas predominantemente locais (○), e PLA₂s que induzem uma miotoxicidade sistêmica (●). No compartimento de tecido do músculo, as PLA₂s miotóxicas agem localmente e ligam-se a sítios de baixa-afinidade e alta afinidade aos aceptores presentes no músculo da membrana celular; com relação aos aceptores, estes se encontram presentes nas células não musculares (c.n.m.) ou ligando-se a células não musculares e sendo seqüestrada uma quantidade significativa de PLA₂s. Uma proporção reduzida destas PLA₂s chega ao compartimento central vascular, onde elas ligam-se a células não musculares de sangue. Poucas moléculas de PLA₂ livres chegam a outros compartimentos do músculo em sítios distantes, onde elas também se ligam a células não musculares. Como consequência deste modelo toxicocinetico, o dano do músculo por estas PLA₂s limita-se principalmente ao sítio de injeção, com uma miotoxicidade sistêmica muito pequena. Em contraste, as PLA₂s miotóxicas locais e sistêmicas são caracterizadas devido ao fato de apresentarem uma ligação muito seletiva aos aceptores no músculo da membrana plasmática celular, induzindo primeiro uma miotoxicidade local. Assim uma proporção pequena destas PLA₂s ligam-se às membranas de células não musculares, onde uma quantidade significativa destas PLA₂s alcançam a corrente sangüínea e se distribuem aos músculos de outras regiões do corpo, ligando-se preferencialmente ao músculo das membranas celulares, produzindo um dano muscular de forma extensa (Gutiérrez e Ownby 2003).

Em nossos estudos de mitotoxicidade local e sistêmica, da PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus*, evidenciamos um efeito miotóxico sistêmico *in vivo*, ao aumentar os níveis de creatino kinase (CK) séricos, quando administrados em níveis intramuscular e intravenoso em camundongo (Figura 17), revelando deste modo um dano muscular à distância. Estes resultados corroboram plenamente com a hipótese estabelecida por Gutierrez e Ownby (2003), revelando que a PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus* é a responsável pela miotoxicidade sistêmica no veneno, e ela é altamente específica, não sendo seqüestrada por nenhum tipo de aceptores na corrente sangüínea ao unir-se com uma alta afinidade a receptores presentes no músculo esquelético de camundongo.

Os modelos de cultura celular de citotoxicidade indicam que algumas PLA₂ miotóxicas afetam miotubos diferenciados em um processo de diferenciação celular de forma muito seletiva, considerando-se que existem outras PLA₂ com um efeito amplo (Gutierrez e Ownby, 2003).

Recentes estudos demonstram uma alta susceptibilidade de PLA₂ de veneno de serpentes pertencentes a grupo II a miotubos do que para mioblastos (C2C12) (Angulo e Lomonte 2005). Por outro lado, a ausência do efeito citotóxico da crotoxina em cultura celular de mioblastos C1C12, revela que o efeito citotóxico é de responsabilidade da subunidade B (PLA₂) isolada do complexo heterodimérico (Lomonte, *et al.*, 1999).

Nossos resultados de citotoxicidade da PLA₂ (F6) de *Crotalus durissus collilineatus* em mioblastos e miotubos confirmam o proposto por Angulo e Lomonte (2005) e Lomonte, *et al.* (1999), ao mostrar um incremento dos níveis de lactato desidrogenase (LDH) em cultura celular de miotubos, mostrando uma alta susceptibilidade e que está ausente para com mioblastos C2C12 (Figura 18).

5.3 Isolamento e caracterização físico-química e biológica de uma PLA₂ Bj-V de *Bothrops jararacussu*

Estudos de purificação e atividade miotóxica foram realizados com a Bothropstoxina-I por Homs-Brandeburgo *et al.*, (1988) e BthTX II (Cintra, *et al.*, 1993, Pereira *et al.*, 1998). Utilizando cromatografias de alta eficiência (HPLC), Bonfim *et al.* (2001) purificaram uma isoforma de PLA_{2s} básica da fração denominada BthTX-II, presente no veneno de *Bothrops jararacussu*. Esta isoforma de PLA₂ foi denominada Bj-IV e mostrou atividade fosfolipásica, capaz de bloquear a transmissão do impulso nervoso em estudos de neurotoxicidade *in vitro* no modelo nervo frênico diafragma isolado de comundongo. A presença da Bj-V mostra a necessidade de desenvolver metodologias para purificar e detectar a presença de isoformas nas frações consideradas homogêneas e assim explicar melhor o comportamento farmacológico.

Em nosso trabalho, procuramos desenvolver uma metodologia onde pudéssemos obter uma nova isoforma de PLA₂ de Bj-IV, denominada Bj V, em um só passo cromatográfico, usando uma coluna de troca iônica SP 5 PW Protein Pack (Waters) e que estaria contida na fração BthTX-II (Figura 19).

As características físico-químicas das frações Bj IV e Bj V – tais como, hidrofobicidade com tempos de retenção muito próximos na coluna (Figura 20) e também quando comparados com os tempos de retenção de outra PLA₂ básica de *Bothrops alternatus* purificada em uma única etapa cromatográfica (Figura 21), massas molecular e a tendência a formar dímeros quando em solução (Figura 22 e 23), atividade fosfolipásica (dados não mostrados), basicidade na composição de

aminoácidos (Tabela 3) e alta homologia seqüencial em sua estrutura primária (Figura 26) – evidenciam que a Bj-V e a Bj-IV são isoformas de PLA₂ D49 e são provenientes da fração BthTX-II anteriormente descrita.

As isoformas de PLA₂ Bj-IV e Bj-V D49 de *Bothrops jararacussu* possuem uma massa molecular relativa de 13,5 kDa e têm uma atividade PLA₂ moderada quando comparada com outras PLA₂ isoladas de serpentes crotálicas. A presença de Y28, G30, G32, D49, H48 e Y52 está direta ou indiretamente envolvida na catálise. Assim, nas isoformas Bj-IV e V, estes resíduos encontram-se conservados.

As duas isoformas aqui discutidas mostram a presença de algumas mutações importantes, em sua estrutura primária. Assim a Bj-IV mostra W3 -> F5, Q4 -> E4, F5 -> W5 y L16 -> N16 que são posições estratégicas para a expressão da atividade catalítica. A presença de W5 na Bj-IV mostra que este resíduo pode contribuir para a manutenção conformacional da cavidade hidrofóbica na região N-terminal e que é altamente conservada para as PLA₂ cataliticamente ativas para a formação do "canal hidrofóbico", podendo não ser indispensável, já que a presença de W5 não impede a função catalítica. Este canal permite ao substrato lipídico ganhar o acesso ao sítio catalítico das PLA₂, de acordo com Arni e Ward (1996).

Kini e Iwanaga (1986a e b), Kini e Evans (1987, 1989a, b e c) e Kini (2003) propuseram vários modelos para explicar as atividades catalíticas e farmacológicas das PLA₂. Nestes modelos, as PLA₂ possuem dois sítios separados: um responsável pela atividade catalítica e um outro responsável pela expressão da atividade biológica. De acordo com estes autores, o sítio farmacológico poderia estar localizado na superfície das moléculas de PLA₂. De acordo com o modelo proposto por Kini e Evans (1987), o sítio anticoagulante estaria localizado em uma região entre os resíduos 53 e 76. Esta região é carregada positivamente nas PLA₂ com atividade anticoagulante forte. E nas PLA₂ com atividade anticoagulante fraca ou moderada esta região tem um predomínio de cargas negativas. Esta região é colocada em um local distinto e separada das regiões previstas para a neurotoxicidade e miotoxicidade.

Por outro lado, Corredano *et al.*, (1988) mostra os dados obtidos nos estudos de cristalografia de raios X realizados com duas PLA₂. E, de acordo com seus resultados, as PLA₂ com atividade anticoagulante forte possuem em comum a presença de E53, enquanto que outras PLA₂ com atividade anticoagulante moderada ou fraca não a possuem.

Nas isoformas Bj-IV e V, a posição E53 é substituída por um resíduo de Lys, indicando que essas isoformas poderiam apresentar uma atividade moderada anticoagulante, o que poderia ser explicada por esta substituição.

Estudos têm mostrado que outras espécies botrópicas também possuem efeito neurotóxico, como o reportado por Costa *et al* (1999), evidenciando que o veneno de *Bothrops pirajai* possui um efeito miotóxico e neurotóxico, capaz de bloquear a resposta contrátil na preparação extensor digitorum longus (EDL) de rato sob estímulo de campo em baixa voltagem.

Cogo *et al* (1993) mostraram que o veneno de *Bothrops insularis* também possui um efeito neurotóxico na preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho em concentrações que não afetam as respostas contraturantes a ACh e ao KCl e nem mesmo interferem sobre a liberação de CK. Posteriormente, ficou demonstrado que a fração responsável pelo efeito neurotóxico continha uma fosfolipase A₂ com atividade catalítica. (Cogo, *et al.*, 1998).

Soares *et al.* (2000) caracterizaram uma neurotoxina miotóxica, BnSP-7, uma Lys49 fosfolipase A₂ de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Também observam que tanto o veneno como uma fração caseinolítica de *Bothrops lanceolatus* possuem um efeito neurotóxico sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, assim como os estudos eletrofisiológico mostraram que o veneno total é capaz de aumentar ligeiramente a amplitude e frequência dos potenciais de placa em miniatura (Lobo de Araújo A., *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que esta neurotoxina purificada atue exclusivamente de forma pós-sináptica e que se trate de uma proteína de 27,5 kDa com estrutura não fosfolipásica e uma única cadeia polipeptídica.

As preparações de nervo-frênico diafragma isolado de camundongo e músculo *biventer cervicis* de pintainho são as mais amplamente utilizadas nos estudos de toxinas que agem na junção neuromuscular (Hodgson and Wickramaratna, 2002).

A importância de se estudar em diferentes modelos se baseia no fato de que diferentes espécies de serpentes exibem venenos com diferentes potências sobre as várias preparações biológicas. Assim, segundo Hodgson *et al.* (1997), o modelo diafragma isolado de camundongo é marcadamente mais sensível do que o *biventer cervicis* de pintainho para a paradoxin, uma β-neurotoxina isolada do veneno da serpente *Oxyuranus microlepidotus*. A mesma ordem de sensibilidade tem sido registrada para a taipoxin, textilodoxin e notexin, todas β-neurotoxinas provenientes de serpentes elapídicas australianas, em contraste, com a crotoxina e a β-bungarotoxina que são muito mais potentes em pintainhos (Chang, 1985).

Os estudos realizados sobre as BthTX I e BthTX II têm revelado valiosas informações em relação à atividade miotóxica e, alguns casos, neurotóxicas (Rodrigues-Simioni L., *et al.*, 1983; Queiroz LS, Santo Neto H., *et al.*, 1984; Cintra, A.C., *et al.*, 1993; Honsi-Brandeburgo *et al.*, 1988; Bonfim, *et al.*, 2001; Soares, A.M., *et al.*, 2002).

No presente trabalho, foi caracterizada como neurotóxica *in vitro* uma nova isoforma de Bj-IV; a Bj-V, na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, nas doses de 50 e 100 µg/ml e logo depois incubadas com isoformas de crotapotina crotálica (F3 e F4) de *Crotalus durissus collilineatus*, em duas preparações: nervo frênico-diafragma isolado de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho. Para se estabelecer se existe uma relação direta entre a atividade catalítica e neurotóxica ou uma complementariedade entre ambas, este último experimento foi realizado na dose de 50 µg/ml para ambas as preparações.

Nossos resultados mostram que a isoforma Bj-V na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo é capaz de diminuir a resposta contrátil, produzindo um bloqueio na transmissão neuromuscular (Figura 27 a 29). Vemos também que não existem maiores diferenças nos tempos de bloqueio 50%, ou seja, a isoforma Bj-V não se mostra dose-dependente, mas exibe uma atividade neurotóxica definida. Estes resultados inéditos mostram que a isoforma Bj-V é neurotóxico *in vitro*, o que explica melhor o comportamento do veneno de *Bothrops jararacussu*.

A caracterização neurotóxica *in vitro* da isoforma Bj-V, no modelo nervo frênico-diafragma isolado de camundongo incubadas com as isoformas de crotapotina crotálica, mostrou que a isoforma Bj-V não diminui seu efeito de bloqueio na preparação nervo frênico isolado de camundongo na presença das isoformas de crotapotina crotálica (F3 e F4) (Figura 30). Na preparação *biventer cervicis* de pintainho, mostra-se um bloqueio menor, quando comparado com a preparação de camundongo (Figura 31b).

A isoforma Bj-V é bem menos ativa que os venenos crotálicos (Figura 31a), já que estes últimos levam a um bloqueio da transmissão neuromuscular muito mais rapidamente e usando-se baixas concentrações; no entanto, não se pode negar que o veneno botrópico, assim como a isoforma Bj-V, exibe uma ação neurotóxica *in vitro*, tanto em presença de crotapotinas crotálicas, sugerindo que no veneno botrópico poderiam existir possíveis crotapotinas “like” que poderia diminuir a atividade catalítica e, por outro lado, potencializar o efeito neurotóxico das PLA₂ botrópicas e agirem tipo crotóxina.

As neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes que desencadeiam paralisia neuromuscular agem pré-juncionalmente, causando interferência na liberação ou síntese de acetilcolina (ACh), ou pós-juncionalmente, bloqueando os receptores para a acetilcolina. Estes diferentes mecanismos de ação não podem ser facilmente diferenciados, usando-se as preparações nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, mas podem ser diferencialmente demonstrados usando-se a preparação *biventer cervicis* de pintainho. Uma neurotoxina pré-sináptica ativa pode abolir a resposta contrátil evocada, sem afetar as respostas aos agonistas colinérgicos ou as respostas à estimulação direta pelo KCl. Neurotoxinas

ativas pós-sinápticamente bloqueiam respostas aos agonistas dos colinoreceptores, tanto quanto a estimulação indireta, mas podem não afetar as respostas a elevadas concentrações de potássio ou a estimulação direta (Harvey, 1994).

Nos experimentos com o modelo biventer cervicis de pintainho, não houve relevante atividade neurotóxica, indicando assim que este modelo não é sensível à isoforma Bj-V, que foi incubada com as isoformas de crotapotina crotálica (F3 e F4), na dose de 50 µg/ml.

Na dose de 50 µg/ml, a isoforma Bj-V não mostrou diminuição significativa na curvas de ACh (55 e 110 mM) (Figura 32). No entanto, foi capaz de bloquear a resposta contrátil com relação à adição de KCl (13,4mM), havendo uma ligeira diminuição da resposta contraturante, confirmando assim o caráter o possível caráter miotóxico da isoforma Bj-V (Figura 33).

Este resultado mostra que a resposta contraturante a acetilcolina não foi significativamente diferente entre o veneno total de *Bothrops jararacussu* e a isoforma Bj-V. No entanto, o resultado obtido a partir da resposta para o KCl revelou indiretamente um efeito miotóxico, de acordo com o descrito.

5.4 Isolamento e caracterização físico-química e biológica de uma PLA₂ K49 de *Bothrops alternatus*

Os trabalhos realizados por Nisenbom *et al.* (1986a, 1986b, 1988) mostraram a presença da atividade PLA₂ no veneno total de *Bothrops alternatus*, não sendo purificada nem caracterizada bioquímica e farmacologicamente a fração responsável por esta atividade biológica.

A partir do veneno total de *Bothrops alternatus*, purificamos uma PLA₂ K49 em dois passos cromatográficos. O primeiro passo foi de exclusão molecular em uma coluna Superdex G-75 acoplada a um sistema LC (Waters), revelando a presença da PLA₂ na fração denominada de Bt II (Figura 34). A fração Bt II foi re-purificada em um segundo passo cromatográfico, usando-se uma coluna de hidrofobicidade µ-Bondapack C-18 acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa, onde obtivemos a fração Bt II-2. A análise do material vindo da coluna µ-Bondapack C-18 em HPLC de fase reversa mostra a presença de uma única banda no gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5%, uma massas molecular aparente de 14 kDa com grande homogeneidade molecular (Figura 35 e 36), e os resultados evidenciados pelo espectro de massas (Figura 39) confirmam o alto grau de pureza. Esses resultados são compatíveis pela presença da uma PLA₂ na fração Bt II-2.

A estrutura primária das PLA₂ K49 tem sido determinada, tanto pelo sequenciamento químico da própria PLA₂, quanto por dedução através de cDNA. No entanto, mais de 40 PLA₂ D49 têm sido seqüenciadas; só algumas K49 são informadas.

Selistre de Araujo *et al.* (1996a, 1996b) observou que as PLA₂ K49 compreendem uma família de proteínas com estrutura altamente conservada, distinta das PLA₂ D49, e mostrou que, nos estudos comparativos entre as PLA₂ K49, a Bt II-1 mostrou um alto grau de homologia (70 a 95%), em contraste com as PLA₂ D49 (47%). No entanto, existem regiões homólogas entre as K49 e D49. As PLA₂ K49 evidenciam fortes semelhanças que caracterizam esta família de proteínas, uma dessas características importantes é a presença de um alto número de resíduos básicos (Lys 15% de resíduos totais) na região C-terminal que reage estruturalmente com a heparina (Dua e Cho, 1994). Este fato poderia explicar o efeito neutralizante da heparina com esta proteína PLA₂ K49 (Melo, *et al.*, 1993; Lomonte, *et al.*, 1994).

Existem evidências de que a região N-terminal (1-17 resíduos) estaria envolvida na miotoxicidade (Díaz, *et al.*, 1994; Selistre de Araujo *et al.*, 1996a,b). Tem-se proposto que os resíduos K7, E12, T13 e K15, juntamente com as lisinas conservadas K78, K80, K115 e K116, formariam regiões que, juntas, estariam formando o sítio farmacológico miotóxico para as PLA₂ K49. No entanto, Arni *et al.*, (1995) propôs a função para os resíduos E12 e K80, e estes estariam envolvidos na formação de dímeros da Miotoxina II, uma PLA₂ K49 de *Bothrops asper*. A seqüência Y25-G-C-Y/F-C-G-X-G-G33 correspondente à alça do cálcio (resíduos 25 a 33) das PLA₂ D49, mas esta não se conserva nas PLA₂ K49.

A análise da estrutura primária da fração Bt II-2 mostrou que é uma PLA₂ K49, apresentando uma alta homologia seqüencial que comparte com outras PLA₂ K49 provenientes de veneno de serpentes (82-96%), localizando-se na família de proteínas com estrutura PLA₂ homologas (Figura 38).

A presença dos resíduos K7, E12, T13 e K15, na Bt II-2, junto com outros da região C-terminal, poderia gerar um processo miotóxico no envenenamento pela *Bothrops alternatus*, assim com E12 pode estar participando de uma possível formação dimérica.

Existe uma completa ausência da seqüência Y25-G-C-Y/F-C-G-X-G-G33 (própria das PLA_{2s} D49), na Bt II-2, responsável pela alça que fixa o cálcio, íon importante para a atividade catalítica, revelando assim que se trata de uma PLA₂ K49.

O fato de haver vários resíduos extremamente conservados nas PLA₂ K49, também é visto na Bt II-2. Assim temos L5, K7, Q11, E12, T13, G14, K15, N16 e G24, os quais se encontram ausentes nas PLA₂ D49, o que reforça ainda mais o fato de se tratar de uma PLA₂ K49. Por outro lado, no estudo de homologia seqüencial percebem-se poucas mudanças na estrutura primária entre a Bt II-2 e o resto de

PLA₂ K49 (Figura 38). Tais mudanças encontram-se registradas por substituições nas posições Y5 por G5, W30 por V30 Q33 por K33, estas substituições provavelmente podem estar relacionadas com determinada atividade biológica. No entanto, conforme os perfis hidropáticos de PLA₂ neurotóxicas a região em estudo se encontra entre as posições 80 e 100.

Baseada em perfis hidropáticos, foi deduzida a região correspondente aos resíduos que se encontram entre os posicionamentos 80 -110, onde o grau de homologia seqüencial entre a Bt II-2 e as PLA₂ K49 descritas é muito alto. No entanto, a potência neurotóxica pode estar relacionada com a hidrofobicidade, densidade de carga, estrutura conformacional e outros parâmetros, os quais influenciam a afinidade entre a PLA₂ e o sitio pré-sináptico (Kini R. M. e Iwanaga S, 1986b) com o devido reconhecimento de receptores específicos.

O número de seqüências de aminoácidos de PLA₂ de veneno de serpentes conhecido é relativamente grande. As tentativas para a determinação dos fatores responsáveis pelas atividades farmacológicas, baseadas na comparação destas seqüências (Kini e Iwanaga, 1986a e b; Kini e Evans, 1987), distribuição de aminoácidos carregados ou características de hidrofobicidade (Tsai, *et al.*, 1987), não mostram categoricamente a elucidação real da ação farmacológica. O conhecimento e a comparação das estruturas cristalográficas são importantes para o entendimento da base molecular desta atividade importante, como é a neurotoxicidade e miotoxicidade.

Existem poucos estudos farmacológicos de PLA₂ K49, quando comparados às de D49, que são as mais estudadas (Mebs y Ownby, 1990, Ownby, 1990; Gutierrez e Lomonte, 1997, Fletcher *et al.*, 1997). Quando se realizam comparações entre as K49 e D49, tem-se a tendência de associar a atividade PLA₂ das duas e, no caso das PLA₂ K49, que são desprovidas de atividade PLA₂, alguns autores consideram que estas proteínas poderiam estar ativando enzimas lipolíticas de tecido, o que seria revelado no aumento dos níveis de ácidos graxos.

Atualmente a função da atividade PLA₂ nos mecanismos neurotóxico e miotóxico ainda não se encontra totalmente elucidada. A falta de atividade PLA₂ nas K49 pode ser um fato contraditório importante, pois, apesar de haver esta falta de atividade catalítica, ela ainda é importante com relação à sua atividade neurotóxica, embora os mais recentes estudos sugiram que as PLA₂ D49 possam estimular enzimas lipolíticas de membrana nos tecidos de cultura de células (Ownby, *et al.*, 1999).

No presente trabalho, foi caracterizada neurotóxica e miotóxicamente uma PLA₂ K49, denominada Bt II-2 purificada a partir do veneno total de *Bothrops alternatus*.

Geralmente os fatores neurotóxicos de veneno botrópico tem registrado tal atividade em doses acima de 50 µg/ml (Rodrigues-Simioni L., *et al.*, 1983; Queiroz LS, Santo Neto H., *et al.*, 1984). Estas

diferenças em relação à Bt II-2 poderiam estar relacionadas não só com o grau de pureza, mas com a própria potência desta PLA₂.

Em termos de potência neurotóxica, os nossos resultados demonstram que a fração Bt II-2 de *Bothrops alternatus* se apresenta como a mais tóxica dentre as demais PLA₂ estudadas procedentes de veneno botrópico. De fato, ao compará-lo com os demais, na concentração de 1 µg/ml (dados não mostrados) o veneno da *Bothrops alternatus* produz um bloqueio neuromuscular total num tempo marcadamente inferior aos descritos para a *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops moogeni*, *Bothrops neuwied* e outras.

Nossos resultados mostram a atividade neurotóxica *in vitro* da Bt II, ensaiada na preparação *biventer cervicis* de pintainho, nas doses de 10 e 20 µg/ml., ao produzir um bloqueio na transmissão neuromuscular, tal como é mostrado na figura 40, o que foi realizado com o objetivo de monitorar a presença da fração com atividade neurotóxica. Essa diferença nos tempos de bloqueio 50%, para ambas dosagens, mostra-se dose-dependente. As figuras 41 e 42 mostram os registros da resposta contrátil, na presença de Bt II e Bt II-2, nas dosagens de 10 e 20 µg/ml.

Nos registros miográficos (figura 43 e 44), destacam-se uns leves aumentos da amplitude da contração, seguidos de progressivo bloqueio, na vigência do qual não parecem estar envolvidos os componentes sub e pós-sináptica do sarcolema desses músculos. Isto se afigura particularmente evidente nas preparações isoladas de *biventer cervicis* de pintainho, cuja maioria de fibras musculares, sendo do tipo multi-nervadas, apresenta respostas contraturantes, obtidas após adição da acetilcolina ao banho, que ativa os receptores nicotínicos tipo N₁ a nível subsináptico, isto é, da placa motora ou do potássio, que atua a nível pós-sináptico, isto é, no sarcolema quimicamente insensível, de forma não específica.

Assim temos que tais contraturas continuam presentes, mesmo na vigência do bloqueio neuromuscular total. Embora tais aspectos não possam ser reproduzidos em preparações isoladas de diafragma de camundongos, cuja grande maioria de fibras musculares apresenta inervação unifocalfocal. Ainda assim, é possível afirmar que o bloqueio ocorre fundamentalmente ao nível da junção neuromuscular, praticamente não envolvendo diretamente o músculo, como demonstra o registro simultâneo da miografia por estímulos indiretos e diretos aplicados de forma alternada e seqüencial (Figura 43).

Além da proporcionalidade concentração-efeito, a fração ativa Bt II-2 também se revelou particularmente potente na indução do bloqueio neuromuscular. A este propósito, correlacionando-se essa potência com a acentuada secreção e conseqüente elevada inoculação do veneno decorrente da

picada pela *Bothrops alternatus*, poderia ser explicada a gravidade do envenenamento causado por essa serpente.

De acordo com nossos resultados, obtidos do ponto de vista eletrofisiológico, a fração neurotóxica PLA₂ K49 Bt II-2 de *Bothrops alternatus* mostra que é capaz de causar efeitos evidentes sobre a junção neuromuscular de músculos esqueléticos de aves e mamíferos.

Portanto, com base nesta discussão, não parece pairar dúvidas sobre o envolvimento do terminal nervoso motor somático (TNMS) como principal local de ação da PLA₂ K49 Bt II-2. Por outro lado, no sentido de estabelecer o(s) sítio(s) específico(s) de ação, consideramos importante uma reavaliação rápida das etapas fisiológicas que regem a neurotransmissão no terminal nervoso motor somático (TNMS), procurando assim assinalar os possíveis pontos alvos, através da PLA₂ K49 Bt II-2, que poderiam exercer a sua atividade bloqueadora neuromuscular a nível pré-sináptico.

Com o objetivo de agilizar o processo de transmissão, bem como de compreensão das nossas interpretações, envolvendo nossos resultados experimentais, o TNMS apresenta uma série de fenômenos até hoje revelados e/ou demonstrados como elementos participantes da neurotransmissão a esse nível. Além dos aspectos metabólicos, relacionados com a síntese, armazenamento e liberação do mediador, verifica-se que, neste último, há um relacionamento da acetilcolina com um conjunto de proteínas envolvidas nos processos de ancoramento e exocitose das vesículas. Além disso, deve se considerar os canais de íons envolvidos nessa neurotransmissão, isto é, o canal de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, bem como, considerar também os sistemas de transporte da colina para dentro do terminal e da acetilcolina para dentro da vesícula.

De outro lado, devemos considerar que tanto os receptores pré- sinápticos, como os nicotínicos (N₂) e os muscarínicos (M₂), finalmente, podem ser considerados juntos. A inativação da acetilcolina e do receptor nicotínico sub-sináptico (N₁), cuja interação com o mediador proporcionará o surgimento do potencial de placa terminal (PPT), originará o potencial de ação do músculo (PAM), com conseqüente deflagração da contração muscular.

Começando pela análise dos canais iônicos, os mesmos não parecem estar envolvidos no bloqueio neuromuscular induzido por a PLA₂ K49 BT II-2, pois não há relação com esses canais de sódio voltagens dependentes, já que para explicar o bloqueio neuromuscular, a fração deveria diminuir a ativação ou aumentar a inativação desses canais, condições que invariavelmente implicariam na ocorrência de fenômenos análogos em canais semelhantes presentes no sarcolema, com conseqüente bloqueio da contração muscular aos estímulos diretos, isto é, efeito oposto ao registrado no presente trabalho.

Igualmente, os canais de potássio também não parecem participar no desencadeamento do bloqueio, pois, para que isso ocorresse, a fração deveria aumentar a saída desse íon do terminal nervoso motor somático, fenômeno pouco comum a esse nível, embora muito freqüente nas musculaturas lisas e cardíacas.

Já uma interação da PLA₂ K49 Bt II-2 com o conjunto de proteínas responsáveis pelo processo de ancoragem das vesículas no neurilema do terminal nervoso motor somático leva ao fenômeno de exocitose. E este fato não pode ser descartado, pois as nossas condições experimentais não fornecem dados suficientes para inferi-la ou negá-la. Contudo, outras técnicas eletrofisiológicas poderiam contribuir para o esclarecimento da ação da fração, tais como a técnica de Platch-clamp.

As PLA₂ encontram-se entre os componentes mais abundantes e versáteis do veneno das serpentes, evidenciando uma ampla faixa de atividades, embora possuam uma estrutura global conservada (Valentin y Lambeau, 2000, Kini, 2003). Entender a base estrutural que determina a suas atividades tóxicas diversas, incluindo a neurotoxicidade e a miotoxicidade, entre outras, é ainda um desafio. Com tais informações, seria possível compreender melhor algumas pistas no estudo de variantes naturais ou sintéticas (mutantes).

No presente trabalho, um perfil de atividades tóxicas foi estudado para a neurotoxina e miotoxina Bt-II-2, isolada e caracterizada fisicoquimicamente por (Ponce-Soto, *et al.*, não publicado), e seus efeitos incluem uma local e rápida ação prejudicial no tecido muscular esquelético (figura 46). O estudo da miotoxicidade “*in vitro*”, proposto por Lomonte *et al.* (1999), de PLA₂ miotóxicas em mioblastos (C2C12), estabelece uma correlação perfeita com os nossos experimentos na capacidade da PLA₂ K49 Bt II-2 de produzir uma lise de mioblastos em cultura celular (C2C12), mostrando assim o potente efeito citotóxico ao elevar os níveis de LDH no meio (figura 47), assim como uma indução de edema moderado (figura 48). O efeito miotóxico poderia ser o impulso para desencadear a atividade pro-inflamatória e provavelmente incrementar os níveis de Interleuquina 6 (IL-6) para a neurotoxina e miotixina Bt II-2 de *Bothrops alternatus*, da mesma forma como sugerido por Nuñez, *et al.* (2004), para a miotoxina I PLA₂ K49 de *Bothrops atrox*.

Todos estes efeitos biológicos induzidos pela PLA₂ K49 Bt II-2 acontecem na ausência da atividade catalítica PLA₂ “*in vitro*”, apoiando os conceitos de mecanismos independentes da atividade catalítica própria das PLA₂ K49 (Kini, R.M. 3003; Lomonte, *et al.*, 2003, Gutierrez e Ownby, 2003).

As miotoxinas botrópicas geralmente possuem uma toxicidade sistêmica baixa, em contraste com as PLA₂ miotóxicas que possuem um potente efeito neurotóxico (Rosenberg, 1997a e b). De acordo com a Dose Letal (i.v.) DL₅₀ aqui verificada da fração Bt II-2, que foi de 7,04 mg/kg, evidencia-

se uma baixa potência, quando comparada com outras PLA₂ D49 (kini, R.M. 1997), sugerindo que a presença da atividade enzimática poderia reforçar ainda mais a ação letal destas proteínas.

Os estudos comparativos da miotoxicidade, induzida a nível intravenoso e intramuscular “*in vivo*”, mostram que a fração neurotóxica e miotóxica Bt II-2 de *Bothrops alternatus* possui uma miotoxicidade local, mas não sistêmica, ao incrementar só os níveis de CK séricos naquela miotoxicidade induzida por via intramuscular, ao contrário daqueles níveis encontrados para a miotoxicidade induzida por via intravenosa que mostraram resultados muito baixos, como se fosse controle (figura 46).

Estes resultados estão de acordo com a teoria proposta por Kini, R.M. (1997, 2003); e Gutierrez, J.M e Ownby, C.L (2003); ao considerar-se a existência de PLA₂ específicas e PLA₂ não específicas. Assim a fração Bt II-2 parece ser seqüestrada não a nível intravenoso, produzindo só uma miotoxicidade local e não sistêmica. Gutierrez, J.M. e Ownby, C.L. (2003) propõem que as PLA₂s miotóxicas ligam-se aos aceptores da membrana plasmática, os quais poderiam se tratar de lípidos ou proteínas, podendo diferir de sua afinidade pelas PLA₂. Ao se ligar, as PLA₂s miotóxicas produzem uma destruição da membrana através de mecanismos catalíticos ou mecanismos independentes de atividade PLA₂. No entanto, provocam uma entrada de Ca²⁺ bastante pronunciada e que por sua vez, produzem uma série de eventos degenerativos associados com uma hipercontração, ativação de calpinas e PLA₂ citosólicas e mitocondriais Ca²⁺-dependentes.

Os modelos de cultura celular de citotoxicidade indicam que algumas PLA₂ miotóxicas afetam miotubos diferenciados em um processo de diferenciação celular de mioblastos, devido a uma alta sensibilidade muito seletiva, considerando que existem outras PLA₂ com um efeito amplo (Angulo e Lomonte 2005).

CAPITULO II

ANÁLISE COMPARATIVA DE FOSFOLIPASES A₂ NO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR E A AÇÃO MIOTÓXICA LOCAL E SISTÊMICA

Isolamento

O tipo de fosfolipasa A₂ expressa pelo organismo é de extrema importância na relação estrutura-função, no mecanismo de ação, e a presença de qualquer contaminante pode contribuir com a apresentação de um resultado não válido, complicando a análise da estrutura-função. Existem dois fatores críticos que devem ser levados em consideração no processo de isolamento:

a) Os venenos de serpentes contêm usualmente um número relativamente considerável de isoenzimas e isoformas, por exemplo, os venenos de *Naja naja*, *Vipera russelli*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Austrelaps superbus* e *Pseudechis australis* contêm mais de dez isoenzimas (Braganca e Sambray, 1967; Vishwanath *et al.*, 1987; Vishwanath *et al.*, 1988; Takasaki *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 1992; Subburaju e Kini, 1997; e Singh *et al.*, 2000), assim como *Crotalus durissus terrificus* (Ponce-Soto, *et al.*, 2002), *Bothrops jararacussu* (Ponce –Soto, *et al.*, em preparação). A co-eluição destas PLA₂ “contaminantes” poderia exibir efeitos farmacológicos ambíguos, fato que exige o emprego de métodos de purificação mais selectivos que possam garantir frações com um alto grau de homogeneidade molecular. A determinação da massas molecular por eletroforese SDS-PAGE, o gel filtração, assim como pelo ponto isoelétrico (pI), incluso a determinação da seqüência N-terminal, não garantem a pureza no isolamento. A escolha de uma “ótima” metodologia que possa empregar uma cromatografia em HPLC e espectrometria de massas poderia ser útil na determinação da homogeneidade molecular. Este laboratório procura padronizar uma série de metodologias que cada vez se otimizam de acordo com as características físico-química das PLA₂ a isolar.

b) As interações proteína-proteína entre PLA₂, assim como o estado de agregação é um grande problema no isolamento. Além disso, as PLA₂ interagem com outras proteínas ou enzimas, as quais contribuem na atividade enzimática e farmacológica (Condrea *et al.*, 1970). Em alguns casos, a formação de complexo é importante para a potência farmacológica e toxicidade das PLA₂, como é o caso da crotoxina.

Efeitos farmacológicos

As PLA₂ presentes nos venenos de serpentes exibem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos. No estudo da relação estrutura-função, é importante analisar seus efeitos farmacológicos “*in vivo*”, ao invés de “*in vitro*”. Os estudos “*in vitro*” às vezes evidenciam efeitos não específicos devidos à atividade enzimática inerente, levando a conclusões erradas. Só em alguns casos os efeitos farmacológicos podem ser analisados em sistemas “*in vitro*” como, por exemplo, em cultura celular (Lomonte, *et al.*, 2003). Nossos estudos de miotoxicidade local e sistêmica “*in vivo*”, como de citotoxicidade, permitem analisar melhor os efeitos entre a PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus* com a PLA₂ K49 Bt II-2 de *Bothrops alternatus*, mostrando as diferenças entre a miotoxicidade local e sistêmica.

Na maioria das vezes, as PLA₂ são capazes de desencadear seus efeitos farmacológicos de forma isolada de outros componentes, por exemplo, notexin, as ammodytoxinas e outros exibem neurotoxicidade pré-sináptica (Gubensek *et al.*, 1997).

No entanto, algumas outras PLA₂ só exibem efeitos farmacológicos de forma potenciada quando formam complexos com outras proteínas. Em alguns casos essa ligação é de natureza covalente como a bungarotoxina. Em outros, são de tipo não covalente como a crotoxina, a toxina de mojave, tapoixina e a textilotoxina, naquelas que possuem uma ou mais sub unidades, as quais podem ter atividade catalítica (Bon, 1977). A crotoxina e a toxina de mojave possuem as subunidades ácidas derivadas de uma proteólise de uma PLA₂. Em contraste, as β-bungartoxinas PLA₂ se unem covalentemente, através de uma ponte dissulfeto, a uma segunda subunidade, homóloga a um inibidor de proteinases e dendrotoxinas. Todos estes complexos de PLA₂ exibem neurotoxicidade presináptica. As subunidades adicionais atuam como chaperones e contribuem para que as PLA₂ possam se ligar de forma específica ao sítio alvo presináptico. Em nossos estudos de re-associação (sinergismo) entre as isoformas de crotapotina F3 e F4 com a PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus*, mostramos que a PLA₂ F6 e as isoformas de crotapotina F3 e F4, são capazes de reconstituir a crotoxina nativa, reforçando a potência neurotóxica desta, mesmo sendo uma ligação de natureza não covalente, o que confirma esse fato.

Atividade enzimática e efeitos farmacológicos

As PLA₂, quando se ligam a seu sítio alvo, podem induzir seus efeitos farmacológicos através de mecanismos dependentes ou independente de sua atividade enzimática. Nos mecanismos dependentes da atividade catalítica, o produto da hidrólise de fosfolipídios ou os produtos liberados, como os lisofosfolipídios e os ácidos graxos, podem desencadear os efeitos farmacológicos (Kini e Evans 1989). A atividade enzimática inerente pode causar a ruptura da membrana e gerar uma mudança no ambiente protéico do limite da membrana, particularmente da proteína alvo.

Nos mecanismos independentes da atividade enzimática, a PLA₂ liga-se a proteínas alvo, causando o efeito farmacológico e atuando como agonista ou antagonista e interferindo na interação da proteína alvo com seu ligante fisiológico (Kini e Evans 1989a e b). No entanto, a presença de PLA₂ cataliticamente ativas pode hidrolisar fosfolipídios na zona de suas proteínas alvo, sendo inconseqüente o efeito farmacológico evidenciado (Evans e Kini, 1997; Mounier *et al.*, 2000). Em alguns casos os efeitos farmacológicos são devidos a uma provável combinação de ambos mecanismos específicos e inespecíficos. Em conseqüência, torna-se crítico determinar o papel da atividade enzimática induzindo efeitos farmacológicos.

Em nossos experimentos de inibição da atividade enzimática das isoformas Bj-IV e V purificadas da fração BthTX-II com crotapotinas crotálicas F3 e F4 de *Crotalus durissus collilineatus*, mostrou-se uma neurotoxicidade “*in vitro*” independente da atividade catalítica, pois se sabe que as

crotapotinas crotálicas são capazes de inibir a atividade PLA₂ da isoforma Bj-IV (Bonfim, *et al.*, 2001). Esses resultados reforçam a idéia da presença de sítios farmacológicos distintos ao sítio catalítico, evitando que as isoformas Bj-IV e V possam se ligar de forma inespecífica à membrana plasmática das células musculares. No entanto, estudos de modificação química poderiam contribuir melhor para entender esse fato na neurotoxicidade das isoformas de Bj-IV e V como a PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus*.

Sítio neurotóxico presináptico

Vários grupos têm previsto o sítio neurotóxico das PLA₂ por métodos teóricos. Duffon *et al.*, (1983a) foram os primeiros a prever o sítio neurotóxico responsável do efeito, através da análise de homologia direta entre PLA₂ β-neurotóxicas e não neurotóxicas (Dufton e Hider, 1983b e Dufton *et al.*, 1983a). Com base nos perfis hidropáticos de PLA₂, também foi previsto que a hélice hidrofóbica E pode ser importante na neurotoxicidade pré-sináptica baseada na seqüência de 26 PLA₂ (Kini e Iwanaga 1986). Recentemente a análise da seqüência de 40 PLA₂ neurotóxicas mostra o segmento hidrofóbico na região 80-110, embora algumas das 47 PLA₂ não específicas também tenham evidenciado uma hidrofobicidade similar, o que indica uma falta de correlação entre a neurotoxicidade e a hidrofobicidade (Khan, 2002). Embora existam várias outras tentativas de identificar o sítio neurotóxico presináptico (Tsai *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1989; Arrigada e Cid, 1989 e Takasaki *et al.*, 1990), a questão ainda permanece não muito clara.

O esforço mais significativo tem sido feito por Gubensk e colaboradores (Krizaj, *et al.*, 1989; Curin-Serbec, *et al.*, 1991; Pungercar *et al.*, 1999; Ivanovski *et al.*, 2000; e Prijatelj *et al.*, 2000). Eles têm purificado várias isoenzimas PLA₂ a partir do veneno de *Vipera ammodytes ammodytes*, evidenciando uma diferença na potência neurotóxica. Da seqüência de aminoácidos na estrutura primária, de 3 Ammodytoxinas (PLA₂ de cadeia simple), foi identificado o sítio neurotóxico no segmento C terminal das PLA₂ (Krizaj *et al.*, 1989). Anticorpos contra o péptido C terminal, foi capaz de inibir os efeitos neurotóxicos da Ammodytoxin.(Curin-Serbec *et al.*, 1991). Este sítio é importante, mas não suficiente para a neurotoxicidade. Prijatelj, *et al.*, (2002) e Petan, *et al.*, (2002).

Em estudo de neurotoxicidade *in vitro* da PLA₂ D49 F6, pode-se observar uma diferença de resposta em duas preparações nervo-músculo, como o bloqueio da resposta contrátil em *biventer cervicis* de pintainho e a ausência deste na preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo. Este fato pode nos levar a pensar que a susceptibilidade em ambas preparações poderia estar relacionada com a presença de mais de um domínio ou região da seqüência, incluída a região C terminal. De outro lado, há a presença de receptores específicos diferentes em ambos tipos de tecidos.

poderia encontrar-se relacionado com a potência do efeito neurotóxico na Bt II-2 PLA₂ K49 a diferença de outras PLA₂ K49 ou das PLA₂ D49 procedentes de veneno botrópico.

Região miotóxica

Pela distribuição da densidade de carga, foi possível identificar o sítio miotóxico nas PLA₂ miotóxicas (Kini e Iwanaga, 1986b). Este sítio catiônico é característico +00+++00+ nas PLA₂ miotóxicas e não se encontra presente nas PLA₂ não miotóxicas. Este sítio catiônico é localizado na região N terminal da hélice hidrofóbica E (Kini e Iwanaga, 1986b) e ambos formam a região miotóxica completa. Uma combinação semelhante entre a região hidrofóbica e o sítio catiônico também foi encontrada nas miotoxinas não enzimáticas (Kini e Evans 1986a e b).

Subseqüentemente um segmento hidrofóbico que rodeia o sítio catiônico comumente encontra-se em várias classes de citolisinas, hemolisinas e péptidos antibacterianos (Kini e Evans 1989). Quando se tem modificado quimicamente resíduos de lisina das cardiotoxinas, ou seja quando as cargas positivas das Lys são trocadas por cargas negativas ou neutras, por succinilação ou carbamilação, respectivamente; a atividade citolítica é perdida, mas quando se mantém guanidinizados e as cargas positivas retidas, a atividade citolítica permanece intacta (Kini e Evans, 1989).

Lomonte, B. (1994) identificou a região catiônica e hidrofóbica C terminal no segmento (115-129) sítio de ligação da heparina, como sendo responsável da atividade citotóxica das PLA₂ K49. O peptídeo responsável deste sítio é capaz de lesar células endoteliais, produzir um efeito bactericida e desencadear uma necrose induzida do músculo esquelético (Lomonte *et al.*, 1994; Gutiérrez e Lomonte, 1997; Páramo *et al.*, 1998; Lomonte *et al.*, 1999 e Núñez *et al.*, 2001).

Estes estudos indicam que esse sítio é responsável pela citotoxicidade de células musculares. Exceto por sua localização, este sítio é semelhante ao sítio predito descrito anteriormente (de Araújo, *et al.*, 1996), predizendo um papel para as lisinas conservadas nos resíduos 78-80 na miotoxicidade destas PLA₂. Alape-Girón, *et al.*, (1999) propuseram que um grupo de resíduos carregados positivamente na superfície das PLA₂ da classe I pode constituir o sítio miotóxico.

As PLA₂ OS₁ e OS₂ de *Oxyuranus scutellatu* ligam-se a receptores M de células musculares de coelho (Lambeau *et al.*, 1990 y Lambeau *et al.*, 1997). Os resíduos envolvidos na ligação foram determinados, usando-se vários mutantes de PLA₂ pancreáticas de porcino (Lambeau *et al.*, 1995). Os resultados indicam que os resíduos Gly 30 e Asp 49 dentro de ou perto da alça do cálcio se encontram envolvidos nesta interação. Os resíduos 31 a 34 poderiam contribuir para essa interação, mas a hélice terminal e a alça pancreática não participam. O fato de que a Gly 30 e a Asp49 encontram-se muito

conservadas não torna claro o modo como elas podem contribuir para a especificidade, para induzir a miotoxicidade.

Algumas PLA₂ induzem uma miotoxicidade sistêmica e mioglobinúria (Gopalakrishnakone *et al.*, 1997), diferente de uma ação local. Estas enzimas mostram inclusive miotoxicidade, quando são administradas intraperitonealmente. A PLA₂ F6 de *Crotalus durissus collilineatus* apresentou o resíduo Gly conservado respeito de outras PLA₂, mas situado na posição 29 e a região C terminal com uma carga positiva (K e R). Já as isoformas Bj-IV e V (PLA₂ D49) de *Bothrops jararacussu*, como a Bt-II 2 (PLA₂ K49) de *Bothrops alternatus*, apresentam a região N-terminal rica em Lys. Em todos os casos, destaca-se a região N-terminal com uma forte carga positiva, capaz de interagir com as membranas plasmáticas musculares, que, segundo Lomonte, *et al.*, (1994); Gutierrez e Lomonte (1995), Selistre de Araújo, *et al.*, (1996), é responsável, mas não suficiente para os processos de miotoxicidade.

Por outro lado, as diferenças entre miotoxicidade local, gerada por a Bt II-2 (K49) de *Bothrops alternatus*, e a sistêmica, por a F6 (D49), são evidentes. Estes resultados poderiam estabelecer que, além da região N-terminal, existem outra(s) região(ões) responsáveis pela miotoxicidade local ou sistêmica, através de mecanismos desconhecidos que podem apoiar a presença de sítio(s) farmacológico(s) independente(s) do sítio catalítico, pois trata-se de duas PLA₂ catalítica (F6) e não catalítica (Bt II-2).

O estudo de citotoxicidade em mioblastos e miotubos detectam possíveis diferenças entre PLA₂ específicas e não específicas, entre PLA₂ crotálicas, como é a F6, e a botrópica, como a Bt II-2. Assim a F6 é capaz de desencadear uma citotoxicidade só em miotubos mas não em mioblastos, diferentemente da PLA₂ K49 Bt II-2 que não mostra essa diferença, pois ela é capaz de desenvolver uma citotoxicidade não diferenciada entre mioblastos e miotubos.

Esses resultados indicam que a fusão e diferenciação de mioblastos em miotubos induzem mudanças que conferem às células maior susceptibilidade ao mecanismo tóxicos de PLA₂ miotóxicas específicas, como a PLA₂ D49 F6. É provável que tais mudanças possam envolver sítio(s) receptores de miotoxina(s), que aparecem para ser identificados, tal como postula o trabalho de Yamileth Angulo e Bruno Lomonte (2005). No caso da PLA₂ K49 Bt II-2, os mecanismos podem estar relacionados especificamente com a presença da carga positiva na região C terminal, ao agir em mioblastos o miotubos.

Importância na identificação dos sítios farmacológicos

Os sítios farmacológicos das PLA₂ determinam a afinidade entre as PLA₂ e as proteínas alvo. Assim, a identificação do(s) sítio(s) farmacológico(s) poderia contribuir para:

- a) Compreender melhor a relação estrutura-função das PLA₂.
- b) Desenvolver estratégias para a neutralização da toxicidade e os efeitos farmacológicos pela especificidade destes sítios.
- c) Desenvolver novas ferramentas moleculares que possam contribuir na pesquisa, assim como de agentes terapêuticos.

Quando as PLA₂ usam estes sítios no reconhecimento de um tecido específico ou célula alvo, elas atuam como proteínas direcionadas que colaboram com o reconhecimento específico. Esse direcionamento poderia ser explorado para o desenvolvimento de um sistema de transporte a um tipo de tecido a célula alvo. Partindo do fato de que as PLA₂ afetam quase cada órgão vital ou tecido, poder-se-ia obter um direcionamento do tipo de célula ou tecido alvo. Tal é a possibilidade de manter o interesse em estudar essa relação de estrutura-função das PLA₂ e identificar os diferentes sítios farmacológicos, não só aqueles responsáveis pelos efeitos neurotóxicos ou miotóxicos.

Perspectivas futuras

As PLA₂ presentes no veneno das serpentes são enzimas pequenas responsáveis por uma série de efeitos farmacológicos que alteram os processos fisiológicos normais da presa. Essas moléculas são um desafio aos químicos de proteínas, afim de poder estabelecer as mais difíceis relações de estrutura-função. Uma ampla discussão contribui ao nosso conhecimento das interações proteína-proteína, para o desenvolvimento de carregadores moleculares altamente específicos.

Independentemente de pesquisar as proteínas alvo, este estudo vai nos permitir estabelecer os mecanismos de ação dos efeitos farmacológicos a níveis celulares e moleculares. No futuro os estudos nestas áreas podem produzir novas hipóteses, diferentes da resposta aos efeitos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* das PLA₂, como a das proteínas alvos presentes nas células e tecidos.

VI. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES GERAIS:

6.1 Nossas pesquisas utilizando metodologias otimizadas de purificação em HPLC de exclusão molecular e de fase reversa, permitiram purificar novas toxinas a partir do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus* (V-1), *Bothrops jararacussus* PLA2 D49 Bj-V (isoforma da PLA₂ Bj-IV) presente na fração BthTX-II e *Bothrops alternatus* PLA2 K49 Bt II-2; com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular e sem perda da atividade biológica.

6.2 A fração V-1 de *Crotalus durissus collilineatus* é uma nova neurotoxina que age na junção neuromuscular *in vitro* e foi caracterizada físico-quimicamente como desprovida de atividade catalítica, possui caráter ácido e uma massa molecular de 9859.45 Da, composta de uma cadeia polipeptídica e capaz de induzir uma facilitação contínua na junção neuromuscular no modelo biológico nervo frênico diafragma isolado de camundongo e uma facilitação pronunciada seguida de um bloqueio súbito em *biventer cervicis* de pintainho.

6.3 A V encontra-se presente também no veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (variantes amarelo e branco) e faz parte do “complexo crotoxina”, sendo responsável por um efeito biológico específico, fato que sugere reavaliar todos os efeitos biológicos até hoje estudados e atribuídos ao complexo crotoxina.

6.4 Os componentes do complexo crotoxina do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* foram caracterizados físico-quimicamente, revelando uma massa de 8691.36 Da, para a isoforma de crotapotina F3, e de 9343.94 Da, para a F4. A PLA₂ F6 revelou uma massa de 14943.14 Da. A estrutura primária da PLA₂ F6 mostrou uma homologia em torno de 80% aproximadamente com outras PLA₂ provenientes de veneno crotálico, e os resíduos de cisteína mantiveram-se altamente conservados na estrutura primária.

6.5 Os componentes isolados do complexo crotoxina de *Crotalus durissus collilineatus* ensaiados nos modelos biológicos da junção neuromuscular nervo frênico diafragma isolado de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho mostraram-se como sendo desprovidos de atividade neurotóxica, com a única exceção da PLA₂ F6, que evidenciou um efeito de bloqueio irreversível no modelo *biventer cervicis* de pintainho, mostrando uma especificidade por músculo esquelético de ave.

6.6 A re-associação dos componentes do complexo crotoxina de *Crotalus durissus collilineatus* na razão molar de 1:1 foi capaz de revelar a integridade estrutural e biológica destes, ao se recompor novamente o complexo crotoxina e induzir um bloqueio irreversível da resposta contrátil no modelo *biventer cervicis* de pintainho.

6.7 A PLA₂ F6 foi capaz de induzir uma miotoxicidade local e sistêmica “*in vivo*”, incrementando os níveis de CK plasmáticos e citotóxico em cultura de células C2C12 de forma seletiva em miotubos e não em mioblastos, ao incrementar os níveis de LDH no meio. Estes resultados evidenciam que a PLA₂ F6 poderia se tratar de uma PLA₂ específica e seus efeitos farmacológicos podem se dever em parte ou totalmente a mecanismos independentes da atividade catalítica.

6.8 As características físico-químicas registradas para a PLA₂ D49 Bj-V procedente da fração BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, tais como massas molecular de 14039,46,10 Da, tempo de retenção na re-purificação em HPLC de fase reversa, análise de composição de aminoácidos, pI e estrutura primária mostram que se trata de uma isoforma de Bj-IV presente na fração BthTX-II.

6.9 Ambas isoformas Bj-IV e V, procedentes da fração BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, foram capazes de induzir um bloqueio irreversível da resposta contrátil na preparação nervo frênico diafragma isolado de camundongo.

6.10 As isoformas Bj-IV e V, quando inibidas cataliticamente por crotapotinas crotálicas de *Crotalus durissus collilineatus* (F3 e F4), foram capazes de diminuir a resposta contrátil na junção neuromuscular nas preparações nervo frênico diafragma isolado de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho, mostrando-se mais pronunciadas no músculo esquelético de camundongo.

6.11 Uma nova toxina purificada Bt II-2, com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular, do veneno de *Bothrops alternatus*, foi caracterizada como uma PLA₂ básica K49, devido às características físico-químicas, mostrando uma massa de 13898.71 Da, de caráter básico, como revelado na análise de composição de aminoácidos e alta homologia seqüencial na sua estrutura primária.

6.12 A Bt II-2 foi capaz de induzir um bloqueio irreversível da resposta contrátil na junção neuromuscular na preparação *biventer cervicis* de pintainho. O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (10 µg/ml.) foi de 24,90 min., e para a dose de 20 µg/ml., foi de 18,97 min.

6.13 A PLA₂ K49 Bt II-2 evidenciou que o bloqueio irreversível ocorre sob a forma indireta, via nervo, e não direta, via músculo, revelando seu caráter pré-sináptico. Os estudos electrofisiológicos de potencial de membrana ou repouso, tanto na região da placa quanto fora da placa motora, ao não produzirem uma despolarização da membrana, corroboraram seu caráter pré-sináptico.

6.14 A PLA₂ K49 Bt II-2 evidenciou, além de um efeito miotóxico local, *in vivo*, um efeito inflamatório, citotóxico em mioblastos e miotubos e uma DL₅₀, próprio deste tipo de toxinas.

CONCLUSÃO FINAL

Muitas das toxinas isoladas e estudadas em seus efeitos biológicos precisam ser reavaliadas, a luz de metodologias otimizadas em HPLC e confirmadas por espectrometria de massas, devido à possível presença de algum componente. Isso pode levar ao erro de se assumir que se trata de uma só toxina, quando na realidade pode existir mais de uma, o que pode desencadear um efeito farmacológico de forma ambígua, levando a conclusões duvidosas.

As PLA₂ D49 e K49 procedentes de veneno de serpentes, ao exhibir uma gama de eventos farmacológicos, apresentam um enigma em sua relação estrutura-função, no sentido de determinar que mecanismo ou mecanismos encontram-se envolvidas em determinado efeito biológico analisado. Porém, todos os esforços na área bioquímica, molecular, fisiológica e farmacológica poderiam contribuir para uma melhor compreensão de seu mecanismo da ação.

Os estudos comparativos entre PLA₂ crotálicas e botrópicas, D49 ou K49, evidenciam que alguns de seus efeitos farmacológicos abordados no presente trabalho são devidos a mecanismos independentes da atividade catalítica, sugerindo a presença de receptores específicos nas células alvo, como a especificidade particular entre PLA₂, levando em consideração que seus efeitos específicos e inespecíficos são capazes de desenvolver efeitos biológicos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abe, T., Alema, S., Miledi, R., 1977. Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of Bungarus snakes. *Eur. J. Biochem.* 80, 1–12.
- Aguiar AS, Melgarejo AR, Alves CR, Giovanni-De-Simone S. (1997) Single-step purification of crotopotin and croctactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing. *Braz J Med Biol Res.* Jan;30(1):25-8
- Aird SD, Kaiser II. (1985) Comparative studies on three rattlesnake toxins. *Toxicon.* 23(3):361-74.
- Aird SD, Steadman BL, Middaugh CR, Kaiser II. (1989) Comparative spectroscopic studies of four crotoxin homologs and their subunits. *Biochim Biophys Acta.* Aug 31;997(3):211-8.
- Alape-Giron, A., Persson, B., Cederlund, E., Flores-Diaz, M., Gutiérrez, J.M., Thelestam, M., Bergman, T., Jornvall, H., 1999.
- Alexander, A., Grothusen, J., Zepeda, H. And Schwartzman, R.J. (1988) Gyroxin a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombin-like enzyme. *Toxicon* 26(6):953-960.
- Andriao-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Diaz C, Lomonte B, Gutierrez JM, Giglio JR. (2000) Myotoxic phospholipases A₂ in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*;82(8):755-63.
- Angulo Y, Lomonte B., (2005) Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms. *Cell Biochem Funct.* 2005; [Epub ahead of print].
- Antunes E, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. (1989) Cross-neutralization on the histamine-releasing activity of snake venoms. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*;39(4):431-8
- Arni RK, Ward RJ, Cintra AC, Giglio JR. (1995) Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon.* Mar;33(3):383-6.
- Arni RK, Ward RJ. (1996) Phospholipase A₂-a structural review. *Toxicon.* Aug;34 (8):827-41.
- Arni, R.K.; Ward, R.J.; Cintra, A. C. O. And Giglio, J.R. (1985) Crystallization and preliminary diffraction data of BthTX-I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23: 877-885.
- Arrigada, E., Cid, H., 1989. Search for a toxic site in snake venom phospholipases A₂. *Arch. Biol. Med. Exp.* 22, 97–105.
- Barrabin, A. Gruthusen, J. Zepeda, H. And Schwartzman, R.J. (1978) Gyroxin, a Toxin from t he Venom of *Crotalus durissus terrificus*, Is A Trombin-Like Enzyme. *Toxicon* 26, 953-960.
- Barrio, A., (1961) Gyroxin, A New Neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* Venom. *Acta Physiol. Latino Americana* 11, 224.
- Bauab, F.F., Junqueira, G.R., Corradini, M.C., Silveira, P.V., Nishioka, A.S. (1994) Clinical and epidemeological aspects of the “urutu” lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. *Trop Med Parasitol*, 45: 243-45.
- Beghini, D.G., Toyama, M.H., Hyslop, S., Sodek, L.C., Novello, J.C., and Marangoni, S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracamboia) venom. *J. Protein Chem.* (2000). 19(8):679-84.
- Bon C, Bouchier C, Choumet V, Faure G, Jiang MS, Lambezat MP, Radvanyi F, Saliou B. (1989) Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.* 39(4):439-48.
- Bon C, Changeux JP. (1977) Chemical and pharmacological characterization of toxic polypeptides from the venom of *Bungarus caeruleus*. *Eur J Biochem.* Mar 15;74(1):31-42.
- Bon C. (1982) Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon.* 20(1):105-9.

- Bon, C. (1997) Multicomponent Neurotoxic Phospholipases A₂. In: Venom Phospholipase A₂ Enzymes, Structure, Function and Metabolism, Kini, M.R. (ed.), cap11, pp 269 - 285. John Wiley & Sons - Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Bon, C.; Changeux, J. P.; Jeng, T. W. And Fraenkel-Conrat, H. (1979). Postsynaptic Effects of Crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.*, 99: 471-481.
- Bonfim VL, Toyama MH, Novello JC, Hyslop S, Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. (2001) Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J Protein Chem*; 20(3):239-45.
- Bouchier, C., Ducancel, F., Guignery-Frelat, G., Bon, C., Boulain, J.C. and Menez, A. (1988) Cloning and sequencing of cDNAs encoding the two subunits of Crotoxin. *Nucleic Acids Res.* 16 (18), 9050.
- Bouchier, C.; Boulain J.C.; Bon, C. and Menez, A. (1991) Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1088(3):401-408.
- Braganca, B.M., Sambray, Y.M., 1967. Multiple forms of cobra venom phospholipase A. *Nature* 216, 1210-1211.
- Brazil, V.- (1911) La Défense Contre L'Ophidisme. São Paulo: Pocal- Weiss & C. p. 152.
- Breithaupt H (1975) Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex. *Toxicon* 14(3):221-233
- Bülbring, E. (1946) Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1: 38 -61
- Camara PR, Esquisatto LC, Camargo EA, Ribela MT, Toyama MH, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. (2003) Inflammatory oedema induced by phospholipases A₂ isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon.* Jun;41(7):823-9.
- Cameron, D.L. and Tu, A. T. (1978) Chemical and functional homology of myotoxin a from prairie rattlesnake venom and crotamine from South rattlesnake venom. *Biochim. biophys. Acta* 532: 147 - 154.
- Campbell & Lamar (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Cornell Univ. Press, Ithaca.
- Carredano E, Westerlund B, Persson B, Saarinen M, Ramaswamy S, Eaker D, Eklund H. (1998) The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. *Toxicon.* 36(1):75-92.
- Cecchini AL, Soares AM, Cecchini R, de Oliveira AH, Ward RJ, Giglio JR, Arantes EC. (2004) Effect of crotapotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from *Bothrops* snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Aug;138(4):429-36.
- Chang, C.C. and Lee, J.D. (1977) Crotoxin, The Neurotoxin of South American Rattlesnake Venom, is a Presynaptic Toxin Acting Like β -Bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg. Arch.Pharmacol.* 296, 159-168.
- Chang, C.C. and Tseng, K.H. (1978) Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 63(3):551-559.
- Chang, G.C. (1985) Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. *Proc.Natn.Sci.Council, R.O.C.* p. 126-142.
- Chijiwa, T., Yamaguchi, Y., Ogawa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakashima, K., Oda-Ueda, N., Fukumaki, Y., Hattori, S., Ohno, M., (2003a). Interisland evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom phospholipase A₂ isozymes. *J. Mol. Evol.* 56, 286-293.
- Chijiwa, T. (2003b) Direct Submission Takahito Chijiwa, Sojo University, Dept. of Applied Life Science; Ikeda 4-22-1, Kumamoto, Kumamoto 860-0082, Japan (E-mail:chijiwa@life.sojo-u.ac.jp, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=AB102728.1>

- Cho, W. and Kezdy, F.J. (1991) Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. *Methods Enzymol.* 197:75-79.
- Cintra, A. C. O.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Giglio, J.R. (1993) Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function *Jurnal of Protein Chemistry* 12: 57-64
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. (1993) Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 31(10):1237-47.
- Cogo JC, Prado-Franceschi J, Giglio JR, Corrado AP, Cruz-Hofling MA, Donato JL, Leite GB, Rodrigues-Simioni L. (1998) An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicon*; 36(10):1323-32.
- Condrea, E., Barzilay, M., Mager, J., 1970. Role of cobra venom direct lytic factor and Calpin promoting the activity of snake venom phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta* 210, 65–73.
- Costa PD, Toyama MH, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L, da Cruz-Hofling MA. (1999) Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. *Toxicon*;37(8):1143-53.
- Curin-Serbec, V., Novak, D., Babnic, J., Turk, D., Gubensjek, F., 1991. Immunological studies of the toxic site in ammodytoxin A. *FEBS Lett.* 280, 175–178.
- De Araujo, H.S.S., White, S.P., Ownby, C.L., 1996. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 326, 21–30.
- De Oliveira RB, Ribeiro LA, Jorge MT. (2003) Risk factors associated with coagulation abnormalities in *Bothrops* envenoming *Rev Soc Bras Med Trop.* 36(6):657-63.
- De Roodt AR, Dolab JA, Dokmetjian JC, Litwin S, Segre L, Vidal JC. (2000) A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. *Toxicon* 2000;38(6):865-73.
- De Roodt AR, Dolab JA, Galarce PP, Gould E, Litwin S, Dokmetjian JC, Segre L, Vidal JC. (1998b) A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon*;36(12):1949-57.
- De Roodt, A.R., Dolab, J.A., Fernanadez, T., Segre, L., Hajos,S.E. (1998a) Cross-reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. *Toxicon*.;36(7):1025-38.
- Dias da Silva, W., Guidolin, R., Raw, I., Higashi, H.G., Caricatti, C.P., Morais, J.F., Lima, M.L., Yamiguchi, I.K. Nishikawa, A. K., Stephano, M.N., Marcelino, J.R., Pinto, J.R., Santos, M.J. (1989) Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem Inst Buntantan*, 51 153-68.
- Díaz, C., Alape, A., Lomonte, B., Olamendi, T., Gutiérrez, J.M., 1994. Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane-destabilizing efect. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 336-339.
- Diaz-Oreiro C, Gutierrez JM. (1997) Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35(2):241-52.
- Dua, R., Cho, W., 1994. Inhibition of human secretory class II phospholipase A₂ by heparin. *Eur. J.Biochem.* 221, 481-490.
- Dufton, M.C., Eaker, D., Hider, R.C., 1983a. Conformational properties of phospholipases A₂. Secondary-structure prediction, circular dichroism and relative interface hydrophobicity. *Eur. J. Biochem.* 137, 537–544.
- Dufton, M.C., Hider, R.C., 1983b. Classification of phospholipases A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem.* 137, 545–551.
- Estêvão-Costa, Maria I.; Martins, Maria S.; Sánchez, Eladio F.; Diniz, Carlos R.; Chávez-Olórtegui, Carlos (2000) Neutralization of the hemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysin-II. *Toxicon*, 38: 139-44.

- Evans, H.J., Kini, R.M., 1997. Anticoagulant effects of phospholipases. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 353–368.
- Fan, H.W. and Cardoso, J.L.C. (1995) Clinical toxicology of snake bites in South America. In: (Meier, J., White, J. ed) *Handbook of Clinical Toxicology of Animals Venoms and Poisons.*, Boca Raton CRC Press. pp. 667-688.
- Faure, G. Choumet, V.; Bouchier, C.; Camoin, L.; Guillaume, J.L.; Monegier, B.; Vuilhorgne, M. And Boon, C. (1994). The origin of the diversity of crotoxin isoforms In *The venom of Crotalus durissus terrificus*. *Eur.J.Biochem.*, 223: 161-164.
- Faure, G., and Bon, C. (1988). Crotoxin, A Phospholipase A₂ neurotoxin from the south american rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and a Comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry*, 27 (2): 730-738.
- Faure, G.; Guillaume, J.L.; Camoin, L.; Saliou, B. and Bon, C. (1991) Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. *Biochemistry* 30(32):8074-8083
- Fernandes I, Lima EX, Takehara HA, Moura-da-Silva AM, Tanjoni I, Gutierrez JM. (2000) Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon*;38(5):633-44.
- Fletcher, J.E. and Jiang, M.S. (1993) Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. *Toxicon* 31(6):669-695
- Fletcher, J.E., Selistre de Araujo, H.S., Ownby, C.L., 1997. Molecular events in the myotoxic action of phospholipases. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 455–497.
- Flores CA, Zappellini A, Prado-Franceschi J. (1993) Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon*;31(12):1551-9.
- Fraenkel-Conrat, H., 1982-83. Snake venom neurotoxins related to phospholipase A₂. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1, 205–221.
- Francis B, Gutierrez JM, Lomonte B, Kaiser II. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch Biochem Biophys.* Feb 1;284(2):352-9.
- Francischetti IM, Castro HC, Zingali RB, Carlini CR, Guimaraes JA. (1998) *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*;119 (1):21-9.
- Furtado MF, Maruyama M, Kamiguti AS, Antonio LC. (1991) Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*;29(2):219-26.
- Garcia F, Toyama MH, Castro FR, Proenca PL, Marangoni S, Santos LM. (2003) Crotoxin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE₂ synthesis. *Toxicon.* 42(4):433-7.
- Ginsborg, B.L. and Warriner, J. (1960) Spontaneous activity in muscle fibres of the chick. *Brit. J. Physiol* (150) 707-717
- Gonçalves, J.M. and Vieira, L.G. (1950) Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. *Ana.Acad.Brás.Cien.* 22: 141, 1950.
- Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J., Elder, H.Y., 1984. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon* 22, 85–98.
- Gopalakrishnakone, P., Ponraj, D., Thwin, M.M., 1997. Myotoxic phospholipases from snake venoms: general myoglobinuric and local myonecrotic toxins. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 287–320.

- Gubensek, F., Krizaj, I., Pungercar, J., (1997}. Monomeric phospholipase A₂ neurotoxins. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 245–268.
- Guo, Y.-W., Chen, C.-T. and Chang, T.-Y. (2001) Direct Submission.
- Gutierrez JM, Lomonte B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon*;33(11):1405-24.
- Gutierrez JM, Ownby CL (2003) Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. Dec 15;42(8):915-31.
- Gutierrez JM, Rucavado A. (2000) Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*;82(9-10):841-50
- Gutierrez, J.M. and Lomonte, B.(1989) Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. *Mem Inst Butatan*, 51: 211-23.
- Gutierrez, J.M. e Lomonte, B. (2003) Cap. 32 Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina - ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL: *Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* Ed. Sarvier, São Paulo pp 310-323.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1997. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 321–352.
- Habermann, E. and Brethaupt, H. (1978) Mini-Review, The crotoxin complex-an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon* 16: 19-30.
- Harvey, A.L.; Barfaraz, A.; Thompson, E.; Faiz, A.; Preston, S. & Harris, J.B. (1994) Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32: 257-265.
- Harvey, A.L.; Bradley, K.N.; Cochran, S.A.; Rowan, E.G.; Pratt, J.A.; Quillfeldt, J.A.; Jerusalinsky, D.A. (1998) What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 36(11):1635-1640
- Hawgood, B. J. and Santana de Sá, S. (1979) Changes spontaneous and evoked release of transmitters induced by Crotoxin and its Complex component Phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience (Oxford)* 4, 293-303.
- Heinrikson, R. L. & Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry* 13: p.65-72. Edman, P., Begg, G., (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1: (1). 80-91.
- Heluany, N.F.; Homsí-Brandeburgo, M.I. Giglio, J.R.; Prado-Franceschi, J. And Rodrigues-Simioni, L. (1992) Effects induced by Bothropstoxin a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon* 30: 1203-1210.
- Hendon, R.A, and Fraenkel-Conrat, H. (1971). Biological Role of the two components of Crotoxin. *Pnas*, 68 (7): 1560-1563.
- Heneine, L.G., Araujo dos Santos, M.R., Dutra de Carvalho, Jr A., Da Silva Gontijo, S. (1999) A Capture enzyme-linked immunosorbent assay for species-specific detection of Bothrops venoms. *J Immunoassay*, 20: 91-101.
- Hodgson Wayne C. and Wickramaratna Janith (2002) *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 29, 807-814.
- Hodgson, WC, Rowan EG. The neuromuscular activity of paradoxin: A presynaptic neurotoxin from the venom of the inland taipan. *Proc. Aust. Soc. Clin. Exp. Pharmacol. Toxicol.* 1997; pp.4: 59.
- Holzer, M. and Mackessy, S.P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34 (10) 1149-1155
- Homsí-Brandeburgo, M. I.; Queiroz, L. S.; Santo Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; and Giglio, J. R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial Chemical Characterization and Biological Activity of Bothropstoxin. *Toxicon* 26(7): 615 - 627.

- Hong, S.J. and Chang, C.C. (1985) Electrophysiological studies of myotoxin a, isolated from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom, on murine skeletal muscles. *Toxicon* 23(6):927-937.
- Horst J, Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. (1972) The active components of crotoxin. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 16;46(3):1042-7.
- Houmard J, Drapeau GR. (1972) Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;69(12):3506-9.
- Ivanovski, G., Copic, A., Krizaj, I., Gubensek, F., Pungercar, J., 2000. The amino acid region 115-119 of ammodytoxins plays an important role in neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1229–1234.
- Jimenez-Porras, J. M. (1973) Reptile toxins. In: *Biolog Data Book*, 2nd edn, Vol. II. P.697. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Bethesda, MD., U.S.A.
- Jorge, M.T. e Ribeiro, L.A.R., (1990) Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev Ass Med Bras*, 36:66-77.
- Kaiser II, Gutierrez JM, Plummer D, Aird SD, Odell GV. (1990) The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys.* May 1;278(2):319-25.
- Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. (1996) Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*;34(6):627-42.
- Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RD. (1998) Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz J Med Biol Res*;31(7):853-62.
- Karlsson, E. (1979) Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp 159-212. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kelly, R.B., von Wedel, R.J., Strong, P.N., 1979. Phospholipase-dependent and phospholipase-independent inhibition of transmitter release by b-bungarotoxin. *Adv. Cytopharmacol.* 3, 77–85.
- Khan, M.A., 2002. Snake venom PLA₂: bioinformatics approach. Honours thesis, National University of Singapore, Singapore.
- Kini, R. M. (1997). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism.* P. 269-282.
- Kini, R.M. (Ed.), 1997b. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 1–511.
- Kini, R.M., 1997a. Phospholipase A₂—a complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M., (Ed.), *Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp.1–28.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 42, 827–840.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1987. Structure–function relationships of phospholipases: The anticoagulant region of phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* 262, 14402–14407.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989a. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 27, 613–635.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989b. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* 34, 277–286.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989c. Role of cationic amino acid residues in cytolytic activity. Modifications of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activities. *Biochemistry* 28, 9209–9215.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986a. Structure function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* 24, 527–541.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986b. Structure function relationships of phospholipases II: charge density distribution and themyotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24, 895–905.

- Kondo, K., Zhang, J., Xu, K. and Kagamiyama, H. (1989) Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin, agkistrodotoxin, from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. *J. Biochem.* 105 (2), 196-203.
- Krizaj, I., Gubensek, F., 2000. Neuronal receptors for phospholipases A₂ and b-neurotoxicity. *Biochimie* 82, 807–814.
- Krizaj, I., Turk, D., Ritonja, A., Gubensek, F., 1989. Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 999, 198–202.
- Lambeau, G., Ancian, P., Nicolas, J.P., Beiboer, S., Moinier, D., Verheij, H., Lazdunski, M., 1995. Structural elements of secretory phospholipases A₂ involved in the binding to M type receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 5534–5540.
- Lambeau, G., Cupillard, L., Lazdunski, M., 1997. Membrane receptors for venom phospholipases A₂. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 389–412.
- Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., Barhainin, H., 1990. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265, 9526–9532.
- Landucci E. C. T.; Antunes. E.; Donato J. L.; Faro. R.; Hyslop S.; Marangoni S.; Oliveira B.; Cirino G. e Nucci De G. (1995). Inhibition of Carregeenin-Induced rat paw o edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phopolipase A₂. *Brithish J. Pharmacol* 114: 578-583.
- Laure, C.J. (1990) *Crotalus durissus terrificus* Venom: Crotoxin and Inter-Cro Mem.Inst.Butantan Vol.52 (Supl.) p.17-19.
- Lennon, B.W, and Kaiser, I.I. (1990) Isolation of a crotin-like protein the venom of a South American Rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*) *Comp. Biochem Physiol* 97 (4):695-9.
- Lobo de Araujo A, Donato J, Leite G, Prado-Franceschi J, Fontana M, Bon C, Rodrigues Simioni L. (2002) Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. *Toxicon*;40(9):1283
- Lomonte, B., Angulo, Y., Caldero'n, L., 2003. An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.
- Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L.A., Maccarana, M., 1994. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J. Biol. Chem.* 269, 29867–29873.
- Lomonte, B., Pizarro-Cerda', J., Angulo, Y., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1999. Tyr ! Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A2 expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461, 19–26.
- Maraganore JM, Merutka G, Cho W, Welches W, Kezdy FJ, Heinrikson RL. (1984) A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem.* Nov 25;259(22):13839-43.
- Marangoni S, Toyama MH, Arantes EC, Giglio JR, da Silva CA, Carneiro EM, Goncalves AA, Oliveira B (1995) Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta.* Apr 13;1243(3):309-14.
- Markland, F (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36:1749-1800.
- Marunak SL, Acosta de Perez O, Ruiz de Torrent RM, Teibler GP, Koscinczuk P, Sanchez Negrette M. (1999) [Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz)] [Article in Spanish] *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*;49(3):149-54

- Mebs D, Ownby CL. (1990) Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities *Pharmacol Ther.* 48(2):223-36.
- Melo, P.A.; Homsí-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R.; Suarez-Kurtz, G. (1993) Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon* 31: 285-291.
- Montecucco C. e Rossetto O. (2000) How do presynaptic PLA₂ neurotoxins block nerve terminals?. *Trends Biochem Sci.* 25(6): 266-70.
- Monterrey, F. (2001) Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, Venezuela.
- Mounier, C.M., Luchetta, P., Lecut, C., Koduri, R.S., Faure, G., Lambeau, G., Valentin, E., Singer, A., Ghomashchi, F., Beguin, S., Gelb, M.H., Bon, C., 2000. Basic residues of human group IIA phospholipase A₂ are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition comparison with other mammalian secreted phospholipases A₂. *Eur. J. Biochem.* 267, 4960–4969.
- Moura da Silva, A.M., Dimperio Lima, M.R., Nishikawa, A.K., Brodoskin, C.I., Dos Santos, M.C., Furtado, M.F., Dias da Silva, W., Mota, I. (1990b) Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. *Toxicon* 28, 181-88.
- Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. (1990a) Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon*;28(11):1293-301.
- Moura-da-Silva AM, Desmond H, Laing G, Theakston RD. (1991) Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*;29(6):713-23.
- Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM, Theakston RD. (1996) Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol*;26(9):2000-5.
- Narahashi, T.; Hass, H.G. and Therrien, E.F. (1967) Saxitoxin and tetrodotoxin: comparison of nerve blocking mechanism. *Science*, 22; 157 (795); 1441-2.
- Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC. (1986b) Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. *Toxicon*;24 (8):807-17
- Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC. (1988) Effect of chemical modification with p-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz) venom. *Toxicon*;26(12):1137-44.
- Nisenbom HE, Seki C, Vidal JC. (1986a) Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. *Toxicon*;24(3):259-72.
- Núñez, C.E., Angulo, Y., Lomonte, B., 2001. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 39, 1587–1594.
- Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K.I., Sasaki, H., Hattori, M., Sasaki, Y., Kihara, H., Ohno, M., 1992. Unusually high conservation of untranslated sequences of cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂ isoenzymes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 8557–8561.
- Oliveira DG, Toyama MH, Novello JC, Beriam LO, Marangoni S. (2002) Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Protein Chem* 2002 Mar;21(3):161-8.
- Ownby CL, Selistre de Araujo HS, White SP, Fletcher JE. (1999) Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon.* Mar;37(3):411-45.
- Ownby, C.L., 1990. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Shier, W.T., Mebs, D. (Eds.), *Handbook of Toxinology*. Marcel Dekker, New York, pp. 601-654.

- Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerda, J., Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253, 452–461.
- Pederson, de Arcuri, B.F., Morero, R.D., Rufini, S., 1994. Phospholipase-like myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 177–180.
- Pereira MF, Novello JC, Cintra AC, Giglio JR, Landucci ET, Oliveira B, Marangoni S. (1998) The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* venom with low phospholipase A₂ activity. *J Protein Chem.* May;17(4):381-6.
- Perez O.A., Koscinczuk, P., Flinta, S.M., Maidana, H.R., Negrette, M.S. (1997a) *Bothrops alternatus* envenoming in young dogs. *J Venom Anim Toxins.* 3:43-47.
- Perez, O.A., Marunak, S., Ruíz, R., Koscinczuk, P., Teibler, P., (1997b) Hemorrhage induced by snake venoms in Argentina. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinam.* 47: 221-4.
- Petan, T., Krizaj, I., Gubensek, F., Pungercar, J., 2002. Phenylalanine- 24 in the N-terminal region of ammodytoxins is important for both enzymic activity and presynaptic toxicity. *Biochem. J.* 363, 353–358.
- Petricevich VL, Teixeira CF, Tambourgi DV, Gutierrez JM. (2000) Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*;38(9):1253-66.
- Polikarpov, I, Mario Sanches Matilde Junior, Sergio Marangoni Marcos H. Toyama and Alexei Teplyakov (1999) Crystal Structure of Neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* Provides Insights into the Specificity and Toxicity of Scorpion Toxins *J. Mol. Biol.* 290, 175-184.
- Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. (2002) Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem*; 21(3):131-6.
- Prado-Franceschi, J. and Vital, B. O (1981) Convulxin, a new toxin from the venom of the venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Toxicon*, Vol. 19, N°4,: 658-665.
- Prado-Franceschi, J.; Hyslop, S.; Cogo, J.C.; Andrade, A.L.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Cruz-Hofling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L. (1998) Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36(10):1407-1421
- Prijatelj, P., Copic, A., Krizaj, I., Gubensek, F., Pungercar, J., 2000. Charge reversal of ammodytoxin A, a phospholipase A₂-toxin, does not abolish its neurotoxicity. *Biochem. J.* 352, 251–255.
- Prijatelj, P., Krizaj, I., Kralj, B., Gubensek, F., Pungercar, J., 2002. The C-terminal region of ammodytoxins is important but not sufficient for neurotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 269, 5759–5764.
- Pungercar, J., Krizaj, I., Liang, N.S., Gubensek, F., 1999. An aromatic, but not a basic, residue is involved in the toxicity of group-II phospholipase A₂ neurotoxins. *Biochem. J.* 341, 139–145.
- Queiroz LS, Santo Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. (1984) Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*; 22(3):339-46.
- Queiroz, L.S., and Petta, C.A. (1984) Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 26: 247-53.
- Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Assakura, M.T.; Reich, A.P. and Mandelbaum, F.R. (1985) Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 18: p. 337-340.
- Rangel-Santos A, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso DF, Mota I. (2004) A comparative study of biological activities of crototoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon.* Jun 1;43(7):801-10.

- Rangel-Santos A, Lima C, Lopes-Ferreira M, Cardoso DF. (2004) Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. Nov;44(6):609-16.
- Rangel-Santos, A. C. and Mota I. (2000) Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom, *Toxicon*, ;38 (10):1451-7.
- Rochat, H.; Rochat, C.; Miranda, F.; Lissitzky, S. and Edman, P. (1970) The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* 17: 262.
- Rodrigues-Simioni, L.; Borgese, N. and Ceccarelli, B. (1983) The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* 10: p. 475-489.
- Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Jiang, M.S.; Fletcher, J.E.. (1995) No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. *Toxico*, 33: 1479-1489.
- Rodriguez-Acosta, Alexis (2001)
<http://caibo.ucv.ve/vitaenueve/articulos/medicinatropical/archivosPDF>
- Rosenberg, P., 1986. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases. In: Harris, J.B., (Ed.), *Natural Toxins*, Oxford University Press, Oxford, pp. 129–174.
- Rosenberg, P., 1997a. Lethal potency of snake venom phospholipase A₂ enzymes. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 129–154.
- Rosenberg, P., 1997b. Pitfalls to avoid in the study of correlations between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipase A₂ enzymes. In: Kini, R.M., (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 155–183.
- Rosenfeld, G. (1971) Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: (Bucherl, W. and Buckley, E.E., ed). *Venomous Animals and their Venoms*, New York, Academic Press, pp. 345-384, Vol 2.
- Rotchild, A. M. and Rotchild, Z. (1979) Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: *Snake Venoms*, p. 541 (Lee, C. Y. Ed). New York: Springer Verlag.
- Rubsamen K, Breithaupt H, Habermann E. (1971) Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol.* 270(3):274-88.
- Russell FE, Walter FG, Bey TA, Fernandez MC. (1997) Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon*;35(10):1469-522.
- Ryden, L., Gabel, D. and Eaker, D. (1973) A model of tree-dimensional structure of snake venom neurotoxins based on chemical evidence. *int. J. Peptide Protein Res.* 5, 261.
- Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Cotta G, Diniz CR. (1992) Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*;30(1):95-103
- Schagger, H. A.; Von Jagow, G. (1987). Comassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Selistre de Araujo HS, White SP, Ownby CL. (1996) cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. *Arch Biochem Biophys.* Feb 1;326(1):21-30.
- Siles Villarroel, M.S., Furlanetto, R.S., Rolim Rosa, R., Zelante, F., Navas, J. (1976/1977) Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos III Análise dos componentes antigênicos comuns através da dupla difusão em gel de agar., *Mem. Inst Butantan* 40/41: 241-50,

- Siles Villarroel, M.S., Zelante, F., Furlanetto, R.S., Rolim Rosa, R. (1974) Contribuição ao estudo imunológico de venenos botrópicos I. Análise comparativa dos componentes antigênicos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de agar Mem. Inst Butantan 38: 13-30.
- Singh, B.S., Armugam, A., Kini, R.M., Jeyaseelan, K., 2000. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. Arch. Biochem. Biophys. 375, 289–303.
- Slotta, K.H. and Fraenkel-Conrat, H. (1938) Schlangengifte, Iii Reinigung Und Krystallisation Des Klapperschlangen-Giftes. Ber. Deut. Chem. Ges., 71:1076-1081.
- Smith, L.A. and Schmidt, J. (1990) Cloning and nucleotide sequence of crotamine genes. *Toxicon* 28(5): 575 – 585.
- Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. (1998) Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 1998;36(7):1059-63.
- Soares AM, Guerra-S inverted question mark R, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, Fontes MR, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi* pauloensis venom. Arch Biochem Biophys 2000Jun 15;378(2):201-9
- Soares AM, Oshima-Franco Y, Vieira CA, Leite GB, Fletcher JE, Jiang MS, Cintra AC, Giglio JR, Rodrigues-Simioni L. (2002) Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. Int J Biochem Cell Biol; 34(6):668-77.
- Soares AM, Rodrigues VM, Borges MH, Andriao-Escarso SH, Cunha OA, Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR. (1997) Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A₂ from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum. Biochem Mol Biol Int;43(5):1091-9.
- Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homsí-Brandeburgo, M.I., Toyama, M.H., Lombardi, F.R., Arni, R.K., Giglio, J.R., 1998. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon* 36, 503–514.
- Souza DH, Iemma MR, Ferreira LL, Faria JP, Oliva ML, Zingali RB, Niewiarowski S, Selistre-de-Araujo HS. (2000) The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. Arch Biochem Biophys 15;384(2):341-50.
- Strichartz, G.R. and Wang, G.K. (1986) Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion α -toxin coupled to Na channel inactivation in myelinated nerve. J. Gen. Physiol 88: 413 - 435.
- Su, M.J., Chang CC. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A₂ activity (β -bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon* 1984; 22: 631–40.
- Subburaju, S., Kini, R.M., 1997. Isolation and purification of superbins I and II from *Austrelaps superbis* (copperhead) snake venom and their anticoagulant and antiplatelet effects. *Toxicon* 35, 1239–1250.
- Takasaki, C., Yutani, F., Kajiyashiki, T., 1990. Amino acid sequences of eight phospholipases A₂ from the venom of Australian king brown snake *Pseudechis australis*. *Toxicon* 28, 329–339.
- Tang, L., Zhou, Y.C. and Lin, Z.J. (1998) Crystal structure of Agkistrodotoxin, a phospholipase A₂-type presynaptic neurotoxin from agkistrodon halys pallas. J. Mol. Biol. 282 (1), 1-11.
- Toyama MH, Costa PD, Novello JC, de Oliveira B, Giglio JR, da Cruz-Hofling MA, Marangoni S. (1999) Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity. J Protein Chem. 1999 Apr;18(3):371-8.

- Toyama MH, de Oliveira DG, Beriam LO, Novello JC, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. (2003) Structural, enzymatic and biological properties of new PLA₂ isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. Jun;41(8):1033-8.
- Toyama, M. H., Mancuso, L. C., Giglio, J. R., Novello, J. C., Oliveira, B., and Marangoni, S. (1995). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 1047– 1055.
- Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Marangoni, S.; Barbosa, R. L.; Corso, G. and Bochero, A. C. (2000) Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets, *Bioch. Biophys. Acta.* 1474: 56-60.
- Toyama, M.H., Soares, A.M., Vieira, C.A., S.H, Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R. and Marangoni, S. (1998) Amino acid sequence of Piratoxina-I, a Myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-Bromophenacyl bromide. *J. Protein. Chem.* 17(7): 713 - 717.
- Tsai IH, Liu HC, Chang T. (1987) Toxicity domain in presynaptically toxic phospholipase A₂ of snake venom. *Biochim Biophys Acta.* Nov 5;916(1):94-9.
- Tu, A. T. (1991). *Chemistry of rattlesnake venoms. in rattlesnake venoms, their actions and treatment.* New York, Marcel Dekker.
- Tzeng, M.C., Hseu, M.J., Yang, J.H., Guillory, R.J., 1986. Specific binding of three neurotoxins with phospholipase A₂ activity to synaptosomal membrane preparations from the guinea pig brain. *J. Protein Chem.* 5, 221–228.
- Valentin E, Lambeau G. (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* Oct 31;1488(1-2):59-70.
- Valentin E, Lambeau G. (2000) What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie* 82(9-10):815-31.
- Verheij, H.M., Slotboom, A.J., De Haas, G.H., 1981. Structure and function of phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91, 92–203.
- Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V., 1987. Characterization of three edema inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with an alkaloid, aristolochic acid. *Toxicon* 25, 501–515.
- Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V., 1988. Purification and partial biochemical characterization of an edema inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. *Toxicon* 26, 713–720.
- Watt, G. (1989) Snakebite treatment and first aid. I: (Cambell, J.A., Lamr, W.W., ed) *The venomous Reptiles of Latin America.* Ithaca, NY Comstock Publishing/Cornell University Press, pp. 6-13.
- World Health Organization, (1981) *Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms*, WHO offset publication No. 58, Geneva.
- Yang. C.C. (1974) *Chemistry and evolution of toxins in snake venoms.* *Toxicon* 12, 1.
- Yudkowsky, M.L.; Beech, J. and Fletcher, J.E. (1994) Myotoxin a reduces the threshold for calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Toxicon* 32(3):273-278.
- Zlotkin, E.; Fraenkel, F.; Miranda, F. and Lissitzky, S. (1971) The effect of scorpion venom on blowfly larvae-a new method for the evaluation of scorpion venoms potency. *Toxicon* 9: 1-8.