

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Ação do extrato bruto etanólico da *Tabernaemontana catharinensis* e de seu alcalóide isolado sobre as atividades de fosfolipases A<sub>2</sub> ofídicas em preparação neuromuscular de camundongos.**

**CICILIA DE CARVALHO**

**Botucatu – SP**

**2011**

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Ação do extrato bruto etanólico da *Tabernaemontana catharinensis* e de seu alcalóide isolado sobre as atividades de fosfolipases A<sub>2</sub> ofídicas em preparação neuromuscular de camundongos.**

**CICILIA DE CARVALHO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA GALLACCI**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia)**

**Botucatu – SP**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Carvalho, Cíclia de.

Ação do extrato bruto etanólico da *Tabernaemontana catharinensis* e de seu alcalóide isolado sobre as atividades de fosfolipases A<sub>2</sub> ofídicas em preparação neuromuscular de camundongos / Cíclia de Carvalho. – Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Márcia Gallacci

Capes: 21000000

1. Junção Neuromuscular. 2. *Tabernaemontana*.

Palavras-chave: Compostos vegetais; Junção Neuromuscular; PLA<sub>2</sub>s ofídicas.

*Dedico este trabalho aos meus pais Maria e Luiz .*

*Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Gallacci pela oportunidade de desenvolver este trabalho, aprendi muito. Muito obrigada!*

*Agradeço ao Prof Dr Andreimar pela colaboração no fornecimento das toxinas usadas!*

*Agradeço ao Prof Dr Paulo Sérgio Pereira pela colaboração no fornecimento dos extratos vegetais!*

*Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maeli pela colaboração na complementação deste trabalho através dos estudos morfológicos!*

*Agradeço ao Prof Dr Marcos Roberto de Matos Fontes pela complementação deste trabalho através dos estudos de docking!*

*Agradeço aos colegas de laboratório: Walter, Fábio, Fernanda, Carlos e Renata por todo tipo de ajuda durante a realização deste trabalho!*

*Agradeço a todos os funcionários e docentes da Universidade Estadual Paulista que de algum modo se envolveram neste trabalho!*

*Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional!*

*Agradeço ao Rafael  
companheiro de  
todas as horas!*

*Agradeço a Deus por tudo!*

*O dia mais belo? Hoje*  
*A coisa mais fácil? Equivocar-se*  
*O obstáculo maior? O medo*  
*O erro maior? Abandonar-se*  
*A raiz de todos os males? O egoísmo*  
*A distração mais bela? O trabalho*  
*A pior derrota? O desalento*  
*Os melhores professores? As crianças*  
*A primeira necessidade? Comunicar-se*  
*O que mais faz feliz? Ser útil aos demais*  
*O mistério maior? A morte*  
*O pior defeito? O mau humor*

*(Madre Teresa de Caucutá)*

## Resumo

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) estão entre os principais componentes de venenos ofídicos, podendo representar até 60 % do conteúdo protéico destas secreções em algumas espécies. As clássicas (PLA<sub>2</sub>s Asp49) são enzimas dependentes de cálcio que hidrolisam a ligação ester *sn*-2 de glicerofosfolipídeos de membrana liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos. Algumas variantes das PLA<sub>2</sub>s apresentam a substituição de resíduos críticos envolvidos na coordenação do co-fator Ca<sup>2+</sup>, dentre estas se destacam as PLA<sub>2</sub> Lys49, cataliticamente inativas, que apresentam um resíduo de lisina na posição 49. As PLA<sub>2</sub>s ofídicas são capazes de promover uma ampla variedade de efeitos dentre os quais miotoxicidade e neurotoxicidade são os mais frequentemente observados. Apesar de serem cataliticamente inativas, as PLA<sub>2</sub>s Lys49 induzem intensa mionecrose local. Embora sejam classificadas com miotoxinas não-neurotóxicas, estas promovem paralisia muscular *in vitro*. Recentemente sugeriu-se que estes efeitos promovidos pelas PLA<sub>2</sub>s Lys49 seriam decorrentes da ação desestabilizadora de membrana promovida por estas toxinas. Em contraste, as neurotoxinas PLA<sub>2</sub>s bloqueiam a transmissão neuromuscular *in vivo* e *in vitro*. Sugere-se que tal efeito seja consequência de ações pré e/ou pós-sinápticas. As PLA<sub>2</sub>s tem sido intensamente estudadas uma vez que os acidentes ofídicos ocasionam elevada morbidade e mortalidade em populações do mundo todo. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avançar no entendimento dos mecanismos de ação bem como da relação entre a estrutura e a atividade de PLA<sub>2</sub>s ofídicas dos tipos Asp49 e Lys49. Para tanto, foram realizados estudos miográficos e morfológicos na preparação neuromuscular de camundongos utilizando a bothropstoxina-I (miotoxina, PLA<sub>2</sub> Lys49 do veneno da *Bothrops jararacussu*), crototoxina (neurotoxina heterodimérica do veneno da *Crotalus durissus terrificus*) bem como sua PLA<sub>2</sub> Asp49 isolada e potenciais neutralizadores vegetais (extrato etanólico de *Tabernaemontana catharinensis* e seu alcalóide 12-metoxi-4-metilvoacalotina). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o potencial neutralizador do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* sobre os efeitos induzidos pela bothropstoxina-I, na preparação neuromuscular de camundongos, é limitado por sua toxicidade. Por outro lado, o alcalóide 12-metoxi-4-metilvoacalotina não apresentou toxicidade para a preparação neuromuscular e neutralizou parcialmente tanto o efeito miotóxico quanto o paralisante promovido pela bothropstoxina-I *in vitro*. Estes resultados corroboram a hipótese de que ambos os efeitos induzidos pela toxina são decorrentes de sua atividade desestabilizadora de membrana. As simulações de *docking* molecular indicam a necessidade investigar se ocorre a formação de um complexo entre o alcalóide 12-metoxi-4-

metilvoacalotina e a bothropstoxina-I e quais os sítios da toxina envolvidos nesta possível interação. O extrato de *Tabernaemonthana catharinensis* bem como o alcalóide 12-metoxi-4-metilvoacalotina não afetaram o efeito neurotóxico promovida pela crotoxina e nem tampouco por sua subunidade básica isoladamente.

## Abstract

Phospholipases (PLA<sub>2</sub>s) are among the main toxic components of snake venoms, representing in some species about 60% of venoms protein. The classic PLA<sub>2</sub>s (Asp49 PLA<sub>2</sub>s) are calcium-dependent enzymes that hydrolyse the *sn*-2 acyl bond of glycerophospholipids, generating free fatty acids and lysophospholipids. Some variants of PLA<sub>2</sub>s present substitution of critical aminoacid residues involved in the coordination of the co-factor calcium, as a consequence, enzymatic activity is drastically impaired. Among these variants, the Lys49 PLA<sub>2</sub>s present a lysine residue at position 49 and are catalytically inactive. Snake venom PLA<sub>2</sub>s are able to promote a wide range of biological activity including myotoxicity and neurotoxicity. Despite their lack of enzymatic activity, Lys49 PLA<sub>2</sub>s induce severe local myonecrosis, and although they are non-neurotoxic myotoxins, the Lys49 PLA<sub>2</sub>s induce neuromuscular blockade *in vitro*. Recently, it was suggested that both the myotoxic and the paralyzing effects promoted by Lys49 PLA<sub>2</sub>s are consequences of their membrane destabilizing activity. In contrast, the PLA<sub>2</sub>s neurotoxins block the neuromuscular transmission both *in vivo* and *in vitro* by means of presynaptic and/or postsynaptic actions. Snake venom PLA<sub>2</sub>s have been extensively investigated given that the snake bites are associated with high level of mortality worldwide. Thus, in the present work, we investigated the mechanisms of action and the structure-activity relationship of both Asp49 PLA<sub>2</sub>s and Lys 49 PLA<sub>2</sub>s. In this way, myographic and morphological studies were performed in mice neuromuscular preparations using bothropstoxin-I (a Lys49 PLA<sub>2</sub> myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom), crotoxin (a heterodimeric neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom), as well as its Asp49 PLA<sub>2</sub> isolated subunit and potential vegetal neutralizer (ethanolic extract of *Tabernaemontana catharinensis* and its alkaloid 12-methoxy-4-methylvoachalotine). The results of this work show that the neutralizer potential of *Tabernaemontana catharinensis* extract upon the effects of bothropstoxin-I on mice neuromuscular preparation is limited by its toxicity. On the other hand, the 12-methoxy-4-methylvoachalotine alkaloid did not present toxicity on neuromuscular preparation and neutralized both the myotoxic and the paralyzing effect induced by bothropstoxin-I *in vitro*. These results support the hypothesis that both effects induced by the toxin are due to the membrane destabilizing activity. The docking simulations indicate that it is necessary to investigate whether there are the formation of a complex between the alkaloid 12-methoxy-4-methylvoachalotine and bothropstoxin-I and the identification of the sites involved in the possible interaction. The *Tabernaemontana catharinensis* extract and alkaloid 12-methoxy-4-

methylvoachalotine affect neither the neurotoxicity promoted by CTX nor that caused by its subunit.

## Lista de Abreviaturas, Siglas, Símbolos

ACh = acetilcolina

AChE = acetilcolinesterase

bothropstoxina-I = BthTX-I

CB = PLA<sub>2</sub> Asp49

crotoxina = CTX

DL<sub>50</sub> = concentração da toxina capaz de matar 50% da população testada

en = endomísio

EPM = erro padrão da média

f = fibras

HE = hematoxilina eosina

i.m. = intramuscular

MMV = 12-metoxi-4-metilvoachalotina

m = miofibrilas

mi = mitocôndria

N = número de animais

n = núcleo

PLA<sub>2</sub>s = fosfolipases A<sub>2</sub>

Tc = *Tabernaemontana catharinensis*

t<sub>1/2</sub> = tempo médio para a toxina reduzir a amplitude das contrações musculares em 50%

## Lista de Ilustrações

		Páginas
Figura 1	Sítios de hidrólise das fosfolipases A1, A2, C e D	2
Figura 2	Estrutura tridimensional de PLA <sub>2</sub> s ofídicas.	4
Figura 3	Representação da região do “loop de ligação do Ca <sup>2+</sup> ” de PLA <sub>2</sub> s dos tipos I e II.	6
Figura 4	Serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	7
Figura 5	Serpente <i>Crotalus durissus terríficus</i>	8
Figura 6	<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	10
Figura 7	Estrutura química do alcalóide MMV isolado da <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	11
Figura 8	Decurso temporal dos efeitos da BthTX-I e da CTX sobre a amplitude das contrações musculares evocadas diretamente (A) e indiretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos	24

Figura 9	Decurso temporal do efeito da CB sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	25
Figura 10	Decurso temporal do efeito da BthTX-I e do produto de sua pré-incubação com o extrato etanólico de Tc sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	26
Figura 11	Decurso temporal do efeito da CTX e do produto de sua pré-incubação com o extrato etanólico de Tc sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico - músculo diafragma de camundongos	27
Figura 12	Decurso temporal do efeito da CB e do produto de sua pré-incubação com o extrato etanólico de Tc sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	28
Figura 13	Decurso temporal do efeito da BthTX-I e do produto de sua pré-incubação com o alcalóide MMV sobre o da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	29
Figura 14	Efeito da CTX e do produto de sua pré-incubação com o alcalóide MMV sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	30
Figura 15	Decurso temporal do efeito da CB e do produto de sua pré – incubação com o alcalóide MMV sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico – músculo diafragma de camundongos	31

Figura 16	Microscopia ótica do músculo diafragma de camundongo submetido à coloração hematoxilina e eosina (HE). (A) controle, (B) BthTX-I, (C) extrato etanólico de Tc isoladamente e (D) produto de pré-incubação da BthTX-I com extrato etanólico de Tc	34
Figura 17	Microscopia ótica do músculo diafragma de camundongo submetido à coloração hematoxilina e eosina (HE). (A) controle, (B) BthTX-I, (C) alcalóide MMV isoladamente e (D) produto de pré-incubação da BthTX-I com alcalóide MMV	35
Figura 18	Microscopia ótica do músculo diafragma de camundongo submetido à coloração hematoxilina e eosina (HE). (A) controle, (B) CTX	36
Figura 19	Efeito do extrato etanólico de Tc e do alcalóide isolado MMV sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I em preparações do músculo diafragma de camundongos	36
Figura 20	Microscopia eletrônica do músculo diafragma de camundongos. (A) controle, (B e C) BthTX-I, (D e E) extrato etanólico de Tc isoladamente, (F) produto de pré-incubação da BthTX-I com Tc	37
Figura 21	Microscopia eletrônica do músculo diafragma de camundongos. (A) controle, (B e C) BthTX-I, (D e E) alcalóide isolado MMV, (F) produto de pré-incubação da BthTX-I com MMV	38
Figura 22	Interação de uma PLA <sub>2</sub> Lys49 botrópica dimérica com a membrana.	42

Figura 23	Representação esquemática da junção neuromuscular com os principais eventos envolvidos no processo de neurotransmissão	44
Figura 24	Hipótese para o bloqueio neuromuscular induzido pelas PLA <sub>2</sub> s Lys49 <i>in vitro</i> .	45
Figura 25	Ilustração da simulação de <i>docking</i> molecular entre a estrutura cristalográfica da BthTX-I e o modelo <i>in silico</i> do alcalóide MMV	48
Figura 26	Detalhes da interação entre a BthTX-I e o alcalóide MMV	49

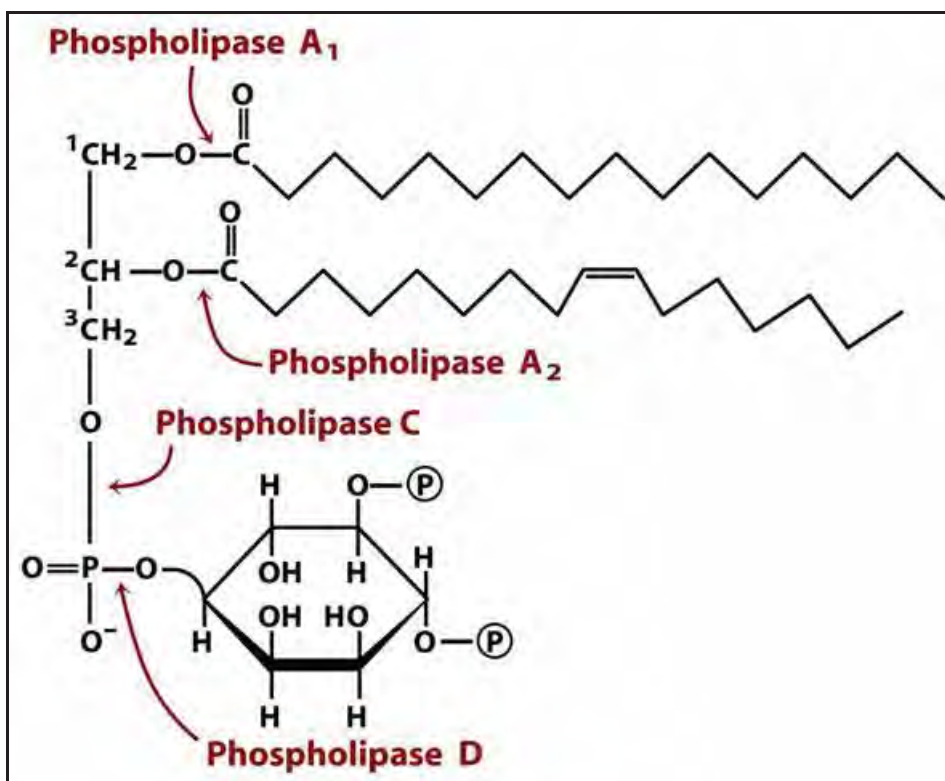
## Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	12
2.1. Objetivo Geral: .....	13
2.2. Objetivos Específicos: .....	13
3. Materiais e métodos .....	14
3.1. Reagentes, Toxinas e Extrato Vegetal .....	15
3.2. Soluções Nutrientes .....	15
3.3. Animais .....	16
3.4. Estudo Funcional .....	17
3.4.1. Preparação do nervo frênico-músculo diafragma de camundongo .....	17
3.4.2. Protocolo experimental.....	18
3.4.3. Condições da pré-incubação das toxinas com extrato de Tc ou com o alcalóide isolado MMV .....	19
3.5. Estudo Morfológico e Morfométrico .....	19
3.5.1. Análise Morfométrica.....	20
3.5.2. Análise ultra-estrutural .....	20
3.6. Análise Estatística.....	20
4. Resultados .....	21
4.1. Estudo Funcional .....	22
4.1.1. Efeito da BthTX-I, da CTX e da CB sobre as contrações musculares diretas e indiretas .....	22
4.1.2. Influência do extrato etanólico de Tc sobre o efeito da BthTX-I nas contrações musculares indiretas .....	24
4.1.3. Influência do extrato etanólico de Tc sobre o efeito da CTX nas contrações musculares indiretas .....	25

4.1.4. Influência do extrato etanólico de Tc sobre o efeito da CB nas contrações musculares indiretas .....	26
4.1.5. Influência do alcalóide isolado MMV sobre o efeito da BthTX-I nas contrações musculares indiretas .....	27
4.1.6. Influência do alcalóide MMV sobre o efeito da CTX nas contrações musculares indiretas	28
4.1.7. Influência do alcalóide MMV sobre o efeito da CB nas contrações musculares indiretas	29
4.2. Estudo Morfológico e Morfométrico .....	31
5. Discussão.....	38
6. Conclusões .....	51
7. Referências .....	53

# **1. INTRODUÇÃO**

As fosfolipases constituem uma superfamília de enzimas diferentes (A1, A2, C e D), que são caracterizadas pela habilidade em hidrolisar fosfolipídeos, liberando diversos produtos de acordo com o sítio de ação no substrato (Figura 1).



**Figura 1-** Sítios de hidrólise das fosfolipases A1, A2, C e D (Nelson and Cox - Lehninger, 2011)

Entre essas se destacam as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2s</sub> EC 3.1.1.4), que atuam sobre a ligação éster *sn*-2 de moléculas de glicerofosfolipídeos de membrana, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos (Six & Dennis, 2000; Valentim & Lambeau, 2000; Burke & Dennis, 2009a). Estas enzimas podem ser secretadas ou intracelulares, e estão classificadas em vários grupos e diversos subgrupos com base em critérios bioquímicos e estruturais (Six & Dennis, 2000; Marcussi *et al.*, 2007; Burke & Dennis, 2009a; b).

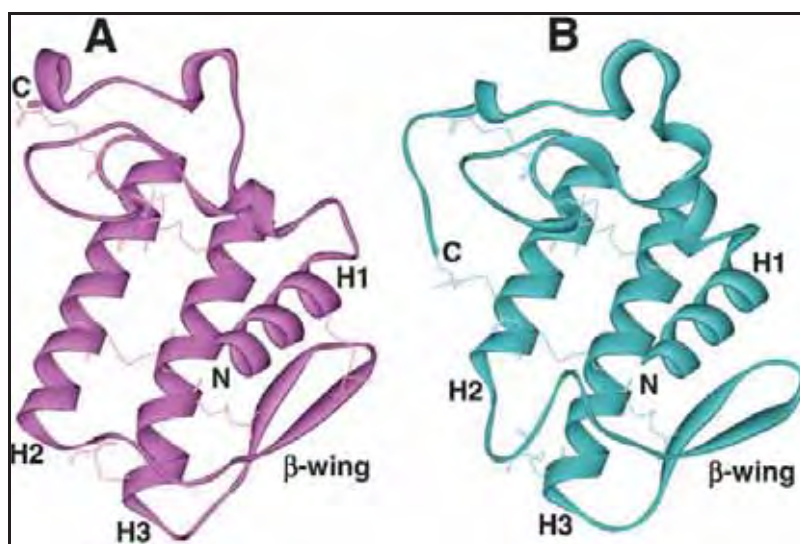
As PLA<sub>2s</sub> estão amplamente distribuídas na natureza e, em mamíferos, desempenham papel chave em muitos processos, incluindo a sinalização celular, a remodelagem de fosfolipídeos de membrana, e a mediação do processo inflamatório, entre outros (Moolenaar

*et al.*, 1997; Bingham & Austen, 1999; Gijon & Leslie, 1999; Six & Dennis, 2000). Além disso, as PLA<sub>2</sub>s estão entre os principais componentes dos venenos de animais invertebrados e vertebrados, onde exercem várias atividades tóxicas envolvidas na captura e digestão da presa (Valentin & Lambeau, 2000; Lynch, 2007). Estas toxinas são particularmente abundantes em venenos de serpentes podendo representar, em algumas espécies, até 60% do conteúdo protéico total destas secreções (Calvete *et al.*, 2007). As PLA<sub>2</sub>s ou complexos protéicos contendo essas enzimas estão entre os componentes tóxicos mais potentes encontrados nos venenos de serpentes. Algumas PLA<sub>2</sub>s atuam especificamente sobre o sistema nervoso periférico e paralisam a presa rapidamente, outras atuam principalmente no músculo esquelético, promovendo mionecrose, e algumas atuam tanto no sistema nervoso periférico quanto na musculatura esquelética. Há ainda aquelas que afetam a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária, causam hipotensão, hemólise e edema (Kini, 2003; Montecucco *et al.*, 2008).

O conjunto das PLA<sub>2</sub>s ofídicas tem sido intensamente estudado uma vez que os acidentes por picadas de serpentes representam um problema de saúde pública grave em muitos países tropicais e subtropicais, com reflexos sociais importantes em vista da elevada morbidade e mortalidade que ocasionam (Gutiérrez *et al.*, 2006; Montecucco *et al.*, 2008; Kini, 2003). No entanto, as autoridades têm dado pouca atenção a este problema, relegando os envenenamentos ofídicos à categoria de uma das principais doenças tropicais negligenciadas do século XXI (Gutiérrez *et al.*, 2006; 2010; 2011; WHO, 2007).

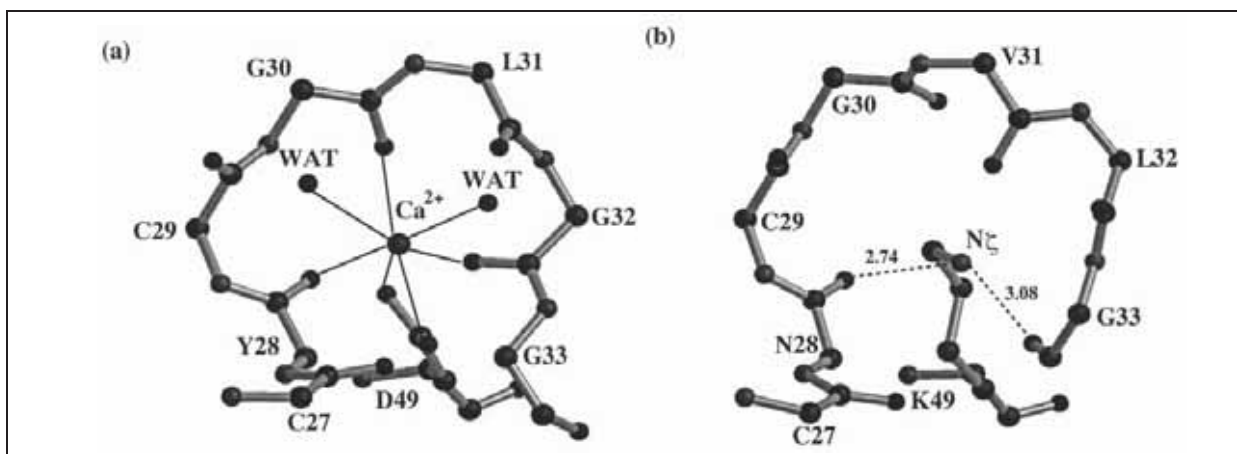
Todas as PLA<sub>2</sub>s ofídicas são do tipo secretada e pertencem aos grupos I (*Elapidae*) e II (*Viperidae*) da classificação geral (Valentin & Lambeau, 2000; Burke & Dennis, 2009a). Estas proteínas apresentam baixo peso molecular ( $\cong 14$  kDa), são altamente estáveis, devido à presença de várias pontes de dissulfeto, e dependentes do co-fator cálcio para a catálise da reação (Valentin & Lambeau, 2000). As PLA<sub>2</sub>s ofídicas são constituídas por cerca de 120-

125 resíduos de aminoácidos e apresentam estrutura geral conservada caracterizada por 4 hélices principais, interligadas por 7 pontes de dissulfeto (Figura 2). Duas dessas hélices se mantêm em posição anti-paralela formando um “canal hidrofóbico” que leva o substrato fosfolipídico para o sítio catalítico. Esse é caracterizado por quatro resíduos chaves His48, Asp49, Tyr52 e Asp99, o hidrogênio do resíduo de His48 se liga à molécula de água usada para a hidrólise, enquanto que o resíduo de Asp49 coordena e posiciona o íon cálcio, o qual se liga e polariza tanto os grupos fosfato e *sn*-2 carbonil da molécula de fosfolípido durante a hidrólise. Outra região altamente conservada nas PLA<sub>2</sub>s é o sítio de ligação de cálcio (“*loop* de ligação do Ca<sup>2+</sup>”), que compreende os resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, que em combinação com o resíduo de Asp49 liga o íon cálcio necessário para catálise. São ainda identificadas nestas proteínas duas folhas pregueadas antiparalelas, que constituem a asa β. As PLA<sub>2</sub>s dos grupos I e II diferem basicamente pela posição de uma das pontes de dissulfeto e pela presença do chamado “*loop* pancreático” em algumas enzimas do tipo I e pelo *loop* C-terminal expandido nas do tipo II (Valentin & Lambeau, 2000; Montecucco *et al.*, 2008).



**Figura 2-** Estrutura tridimensional de PLA<sub>2</sub>s ofídicas. (A) Notexina do veneno da *Notechis scutatus scutatus*, uma PLA<sub>2</sub> do grupo I e (B) PLA<sub>2</sub> Asp49 básica, uma enzima do grupo II do veneno da *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Montecucco *et al.*, 2008, adaptado)

Algumas variantes das PLA<sub>2</sub>s do grupo II apresentam substituições de resíduos de aminoácidos críticos envolvidos na coordenação do co-fator Ca<sup>2+</sup>, embora mantenham o enovelamento característico das PLA<sub>2</sub>s secretadas do grupo II (Valentin & Lambeau, 2000; Montecucco *et al.*, 2008; Lomonte *et al.*, 2009). Estas proteínas, frequentemente denominadas PLA<sub>2</sub>s homólogas, são constituídas por 120-122 resíduos de aminoácidos estabilizados por sete pontes de dissulfeto (Arni & Ward, 1996; Lomonte *et al.*, 2009). Entre as variações mais notáveis nestas proteínas está a substituição do resíduo-chave de Asp por resíduos de Lys, Arg, Ser, Gln ou Asn na posição 49 (Maraganore *et al.*, 1984; Mebs *et al.*, 2006; Krizaj *et al.*, 1991; Polgár *et al.*, 1996; Bao *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 1998). Como ilustrado na Figura 3, a presença do resíduo de Lys na posição 49 inviabiliza a ligação do co-fator cálcio nas PLA<sub>2</sub>s Lys49 homólogas, conseqüentemente, estas proteínas são desprovidas de atividade enzimática (Gutiérrez & Owmbly, 2003). No entanto, essas variantes são capazes de promover a desestabilização da membrana da fibra muscular esquelética, através de um mecanismo independente de catálise, levando ao estabelecimento de severa mionecrose local (Lomonte *et al.*, 2003a; 2009). Os determinantes estruturais críticos para as ações tóxicas das PLA<sub>2</sub>s Lys49 homólogas se encontram na sua região C-terminal, entre os resíduos 115 e 129 (de acordo com a numeração de Renetseder *et al.*, 1985). Estes achados foram inicialmente revelados por estudos utilizando peptídeos sintéticos e agentes neutralizadores e foram corroborados por análises de mutagênese sitio-dirigida (Lomonte *et al.*, 1999; Núñez *et al.*, 2001; Angulo & Lomonte, 2003; Lomonte *et al.*, 2003; Chioato & Ward 2003; Lomonte *et al.*, 2009).



**Figura 3-** Representação da região do “loop de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ ” (resíduos 27-33 e 49, segundo a numeração de Renetseder *et al.*, 1985) de  $\text{PLA}_2$ s dos tipos I e II. (a)  $\text{PLA}_2$  Asp49 do tipo I, cataliticamente ativa, da *Naja naja atra*; (b) região análoga de uma  $\text{PLA}_2$  Lys49, cataliticamente inativa, da *Bothrops pirajai* (Ward *et al.*, 1998, modificado)

As  $\text{PLA}_2$ s ofídicas, quer sejam cataliticamente ativas ou inativas, podem ser encontradas sob as formas monomérica, homomultimérica e heteromultimérica (Valentin & Lambeau, 2000; Montecucco *et al.*, 2008). Há evidências de que o arranjo oligomérico de várias destas proteínas seja essencial para o estabelecimento de suas atividades tóxicas (Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Bon *et al.*, 1979).

Miotoxicidade e neurotoxicidade são dois dos principais efeitos tóxicos induzidos pelas  $\text{PLA}_2$ s ofídicas (Montecucco *et al.*, 2008). Dentre as  $\text{PLA}_2$ s miotóxicas encontradas nos venenos de serpentes brasileiras, destaca-se a bothropstoxina-I (BthTX-I), que é o principal componente do veneno da *Bothrops jararacussu* (Figura 4; Honsi-Brandeburgo *et al.*, 1988). Deve-se enfatizar que esta serpente pertence ao gênero envolvido na maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil e em vários outros países da América Latina (WHO, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2006; de Oliveira *et al.*, 2009). A BthTX-I é uma  $\text{PLA}_2$  Lys49 homóloga básica de aproximadamente 14.000 daltons que pode ser encontrada sob a forma de homodímeros tanto no estado cristalino quanto em solução (Cintra *et al.*, 1993; Da Silva Giotto *et al.*, 1998). Esta toxina induz intensa mionecrose local caracterizada por lesões musculares e por aumento na liberação de creatina quinase, porém sua potencia letal é muito

baixa em ensaios de DL<sub>50</sub> uma vez que elevadas doses não resultam em letalidade (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Melo *et al.*, 1993; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Fletcher *et al.*, 1996; Owmy *et al.*, 1999; Lomonte *et al.*, 2003). Embora a BthTX-I não apresente efeitos neurotóxicos característicos *in vivo*, uma série de estudos mostra que esta toxina é capaz de promover o bloqueio das contrações musculares *in vitro* (Heluany *et al.*, 1992; de Oliveira *et al.*, 2003; Cavalcante *et al.*, 2005; 2007; Gallacci *et al.*, 2006). Uma recente revisão dos dados disponíveis na literatura levou à hipótese de que o bloqueio neuromuscular *in vitro* induzido pela BthTX-I decorre fundamentalmente de sua atividade desestabilizadora de membrana (Gallacci & Cavalcante, 2010).



**Figura 4-** Serpente *Bothrops jararacussu* (Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br>)

Já, entre as PLA<sub>2s</sub> neurotóxicas destaca-se a crotoxina (CTX), que corresponde ao principal componente tóxico do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Figura 5), constituindo até 75% do peso seco total deste veneno (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Vital Brazil, 1966). É importante ressaltar que esta serpente pertence ao gênero responsável pelo

maior índice de letalidade dentre os acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (Ribeiro *et al.*, 1993; de Oliveira *et al.*, 2009; Brasil, 2010)

A CTX é um complexo heterodimérico de 23.000 dáltons, composto por uma PLA<sub>2</sub> Asp49 (CB) de caráter básico e uma subunidade de caráter ácido, denominada crotapotina (Hendon & Fraenkel-Conrat *et al.*, 1971; Breithaupt *et al.*, 1976). Esta toxina bloqueia a transmissão neuromuscular e pode levar a morte de animais experimentais devido à paralisia respiratória com baixa DL<sub>50</sub> (Vital Brazil *et al.*, 1966; Lomonte *et al.*, 2003). Além da ação neurotóxica, a CTX exerce atividades miotóxica sistêmica (Azevedo-Marques *et al.*, 1982), hemolítica (Rosenfeld, 1971) e agregante plaquetária (Landucci *et al.*, 1994).



**Figura 4-** Serpente *Crotalus durissus terrificus* (Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br>)

A ampla variedade de efeitos tóxicos promovidos pelas PLA<sub>2</sub>s e o envolvimento destas proteínas em diferentes patogenias despertam interesse por moléculas, naturais ou sintéticas, capazes de neutralizá-las, visando o avanço no conhecimento do mecanismo de ação e da relação estrutura/atividade dessas proteínas. Em adição, tais inibidores podem ser

úteis no tratamento complementar dos envenenamentos ofídicos bem como na síntese de novos fármacos de interesse médico (Soares *et al.*, 2005; Marcussi *et al.*, 2007).

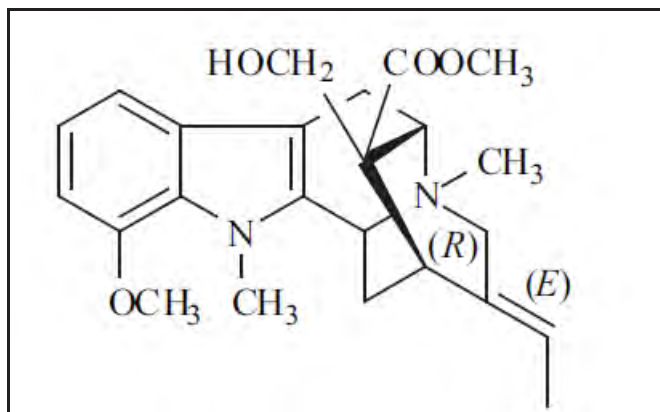
A busca por antídotos contra envenenamentos ofídicos, em plantas utilizadas na medicina popular brasileira, iniciou-se com estudos utilizando espécies de *Curcuma* (“cabeça de negro”), originária da região nordeste do país (Cherdchu *et al.*, 1978; de Almeida *et al.* 2004). Assim, demonstrou-se que o extrato aquoso-etanólico da raiz de “cabeça de negro” inibe a ação de uma neurotoxina do veneno da *Naja naja siamesis* e o efeito carditóxico do veneno da *Bothrops atrox* (Cherdchu *et al.*, 1978; Nakagawa & Nakanishi, 1982; de Almeida *et al.*, 2004). Posteriormente Rizzini e colaboradores (1988) listaram 82 espécies de plantas pertencentes a 34 famílias utilizadas na medicina popular brasileira contra venenos animais, especialmente os ofídicos, dentre estas se destacam várias espécies da família Apocynaceae.

A *Tabernaemontana catharinensis* (Tc; Figura 6), popularmente conhecida no Brasil como “leiteiro de vaca”, é uma espécie arbórea da família Apocynaceae que ocorre na Argentina, Paraguai, Bolívia e sudeste do Brasil (de Almeida *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2008). Esta espécie é bem conhecida por seus componentes alcalóides que são responsáveis por várias atividades farmacológicas como: antibacteriana, antitumoral, hipoglicêmica, analgésica e carditônica (Leeuwemberg, 1994; Pereira *et al.*, 2008). Em levantamento realizado junto à população rural da cidade de Assis (SP - Brasil), Batina e Penço (1992) constataram o uso da espécie *Peschiera fuchsiaefolia*, atualmente reclassificada como *Tabernaemontana catharinensis*, no tratamento de acidentes botrópicos e crotálicos (Batina *et al.*, 1997).



**Figura 6-** *Tabernaemontana catharinensis* (Giehl, 2007, FloraRS disponível em <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>)

Veronese e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato de Tc reduz em 37% a atividade miotóxica da BthTX-I, avaliada através da liberação de creatina quinase de preparações isoladas do músculo sóleo de ratos. Usando o mesmo método de avaliação da atividade miotóxica, estes autores observaram ainda que o produto da pré-incubação do extrato da planta com a BthTX-I inibe em 57% o efeito miotóxico desta toxina “*in vivo*”. Além disso, Batina e colaboradores (1997, 2000) demonstraram que o efeito letal do veneno da *Crotalus durissus terrificus* em ratos (DL<sub>50</sub>, i.m.) é inibido pela administração intramuscular do extrato de Tc, bem como pelo produto da pré-incubação do extrato da planta com o veneno. O produto de pré-incubação também foi capaz neutralizar em 40% o efeito miotóxico deste veneno (de Almeida *et al.*, 2004, Soares *et al.*, 2005). Há ainda evidências de que o efeito letal do veneno da *Crotalus durissus terrificus* em ratos (DL<sub>50</sub>, i.m.) é totalmente inibido pela administração intramuscular do alcalóide quaternário 12-metoxi-4-metilvoachalotina (MMV, Figura 7) isolado do extrato de Tc (Batina *et al.*, 2000). No entanto, não há registro de estudos que avaliem o efeito do extrato bruto ou do alcalóide isolado da Tc sobre as atividades das PLA<sub>2</sub>s ofídicas (CTX e BthTX-I) em preparações neuromusculares isoladas.



**Figura 7-** Estrutura química do alcalóide MMV isolado da *Tabernaemontana catharinensis* (Soares *et al.*, 2005, adaptado)

Em vista do exposto, e considerando que a junção neuromuscular consiste em um alvo de ação importante de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas e neurotóxicas, no presente estudo investigou-se a influência da *Tabernaemontana catharinensis* e do seu alcalóide isolado MMV sobre os efeitos da bothropstoxina-I (PLA<sub>2</sub> Asp49), da crotoxina e de sua subunidade básica isolada (PLA<sub>2</sub> Asp49) em preparação neuromuscular de camundongos.

## **2.OBJETIVO**

## **2.1.Objetivo Geral:**

Avançar no entendimento dos mecanismos de ação bem como da relação entre a estrutura e a atividade de PLA<sub>2</sub>s ofídicas dos tipos Asp49 e Lys49.

## **2.2.Objetivos Específicos:**

Avaliar a habilidade do extrato etanólico da *Tabernaemontana catharinensis* e de seu alcalóide isolado MMV em neutralizar os efeitos da bothropstoxina-I (PLA<sub>2</sub> Lys49), isolada do veneno *Bothrops jararacussu* e da crotoxina, isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* bem como de sua subunidade básica (PLA<sub>2</sub> Asp49) na preparação neuromuscular isolada de camundongos, através de abordagens miográfica e morfológica.

Identificar possíveis sítios de interação entre a bothropstoxina-I e o alcalóide MMV, utilizando a técnica de modelagem molécula.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1.Reagentes, Toxinas e Extrato Vegetal**

Todos os sais utilizados no presente estudo foram de qualidade pró-análise. O brometo de pancurônio (Pancuron®) foi adquirido do laboratório Cristália.

A toxinas, bothropstoxina-I, isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* e crotoxina, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, bem como sua fração básica, PLA<sub>2</sub> Asp49, purificadas e liofilizadas, foram cedidas pelo Dr. Andreimar M. Soares.

O extrato bruto etanólico liofilizado das cascas das raízes de *Tabernaemontana catharinensis* e o seu alcalóide quaternário 12-metoxi-4-metilvoachalotina foram cedidos pelo Dr. Paulo Sérgio Pereira da Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, Brasil. As exsiccatas do material estão depositadas no herbário (SPFR) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP (Reg. N° 02940, 02944 e 03224).

### **3.2.Soluções Nutrientes**

Foi utilizada solução nutriente de Ringer com a seguinte composição em água destilada: 135mM de cloreto de sódio (NaCl), 15mM de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), 5mM de cloreto de potássio (KCl), 2mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), 1mM de fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O), 2mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) e 11mM de dextrose anidra (glicose).

### 3.3. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (20-25g), machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu. Os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu e mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada ( $24 \pm 2$  °C) e ciclo claro-escuro (12/12 h).

Os animais foram agrupados da seguinte forma:

- Grupo Controle (**C**)
- Grupo toxina PLA<sub>2</sub> Lys49 (**BthTX-I**)
- Grupo toxina PLA<sub>2</sub> Lys49+*Tabernaemontana catharinensis* (**BthTX-I +Tc**)
- Grupo toxina PLA<sub>2</sub> Lys49+MMV (**BthTX-I +MMV**)
- Grupo Crotoxina (**CTX**)
- Grupo Crotoxina+*Tabernaemontana catharinensis* (**CTX+Tc**)
- Grupo Crotoxina+MMV (**CTX+MMV**)
- Grupo PLA<sub>2</sub> Asp49 da CTX (**CB**)
- Grupo PLA<sub>2</sub> Asp49 da CTX+*Tabernaemontana catharinensis* (**CB+Tc**)
- Grupo PLA<sub>2</sub> Asp49 da CTX+MMV (**CB+MMV**)
- Grupo *Tabernaemontana catharinensis* (**Tc**)
- Grupo do alcalóide isolado (**MMV**)

### **3.4. Estudo Funcional**

#### **3.4.1. Preparação do nervo frênico-músculo diafragma de camundongo**

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e exanguinados por secção dos grandes vasos cervicais. Após toracotomia ampla, a preparação do nervo frênico-músculo diafragma foi removida (BULBRING, 1946). Durante este período a preparação foi umedecida intermitentemente com solução nutriente. A seguir, o hemidiafragma esquerdo foi cortado em forma de triângulo e montado verticalmente em cuba para órgão isolado, contendo 15 ml de solução nutriente, constantemente borbulhada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) e mantida a 35 ± 1°C. O bordo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro em forma de “L” e o centro tendinoso do músculo diafragma foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03), o qual foi acoplado a um amplificador (Gould Systems, 13-6615-50). Os sinais foram capturados e armazenados em um computador, através de um sistema de aquisição de dados (Gould Sytems, Summit ACQUIRE e Summit DataViewer) para posterior análise.

##### **3.4.1.1. Registro das contrações musculares evocadas diretamente**

O músculo foi posicionado entre os pólos de um eletrodo bipolar de prata, acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88). As contrações foram evocadas por pulsos elétricos retangulares com duração de 4 milissegundos, intensidade supra-máxima e frequência de 0.2 Hz. Para evitar-se alguma contribuição da contração indireta, o pancurônio (1 µM) foi adicionado à solução nutriente.

#### **3.4.1.2. Registro das contrações musculares evocadas indiretamente**

Para a obtenção das contrações indiretas, a extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo de prata “de sucção”. Outro eletrodo de prata, mergulhado na solução, serviu como eletrodo de referência. As contrações foram evocadas indiretamente, por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 milissegundo, intensidade supra-máxima e frequência de 0.2 Hz.

#### **3.4.2. Protocolo experimental**

A tensão de base de cada uma das preparações foi estabelecida individualmente, de modo a fornecer uma tensão máxima em resposta à aplicação de pulsos elétricos retangulares. A preparação foi submetida a um período de estabilização de 45 minutos, durante o qual foi estimulada na frequência de 0.2 Hz e o líquido nutriente presente na cuba foi trocado a cada 15 minutos. Após a estabilização, foram realizados 15 minutos de registro de contrações controle (na ausência das toxinas). A seguir, as toxinas ou o produto de pré-incubação de cada uma delas com extrato etanólico de *Tabernaemontana catrharinensis* ou com seu alcalóide 12-metoxi-4-metilvoacalotina foi adicionado ao banho. Foram realizados experimentos controles para avaliar o desgaste natural da preparação. O decréscimo percentual da amplitude das contrações musculares diretas e indiretas, respectivamente, em 120 e 90 minutos, e o tempo médio para o decréscimo de 50% da amplitude das contrações ( $t_{1/2}$ ) foram determinados.

### **3.4.3. Condições da pré-incubação das toxinas com extrato de Tc ou com o alcalóide isolado MMV**

BthTX-I (1 $\mu$ M), CTX (0,3 $\mu$ M) e CB (5 $\mu$ M) foram pré-incubadas com extrato etanólico de Tc ou com seu alcalóide MMV por 30 minutos a  $35 \pm 2$  °C, respeitando-se as seguintes proporções (peso:peso):

- BthTX-I + Tc (1:10)
- CTX +Tc (1:10)
- CB + Tc (1:2)
- BthTX-I + MMV (1:2,5)
- CTX + MMV (1:2,5)
- CB + MMV (1:2)

### **3.5. Estudo Morfológico e Morfométrico**

Após a realização do estudo funcional a preparação foi submetida à avaliação histológica no Laboratório de Histoquímica do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu.

Fragmentos do músculo diafragma foram tratados com solução de *Bouin*, que consiste em 7,5mL de ácido pícrico; 2,5mL de formaldeído e 5mL de ácido acético, e fixados em historresina. Cortes transversais de 3 $\mu$ m de espessura foram obtidos em micrótomo e submetidos a coloração hematoxilina e eosina (coloração HE) para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares através do sistema de análise de imagens computadorizado (Qwin, Leica Germany).

### **3.5.1. Análise Morfométrica**

As preparações histológicas coradas com HE foram submetidas à análise semiquantitativa. Em cada músculo foram analisados 3 campos microscópicos diferentes. O número de fibras com lesão foi representado como porcentagem do número total de fibras (normal + lesadas) em cada campo. Este estudo também foi realizado utilizando um sistema de análise de imagens computadorizado (Qwin, Leica Germany).

### **3.5.2. Análise ultra-estrutural**

A avaliação ultra-estrutural foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu. Amostras do músculo diafragma foram fixadas por 4 horas em solução de *Karnovsky* com a seguinte composição: glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, tampão fosfato Sorensen 0,1M, pH = 7,4. Posteriormente foram lavadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebidos em resina Epon. Cortes de 1,5 $\mu$ m de espessura foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscopia eletrônica.

## **3.6. Análise Estatística**

Os resultados dos experimentos realizados no estudo funcional foram agrupados em média e erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise estatística utilizando-se o teste *t Student* (para comparação de duas amostras) e a análise de variância (ANOVA, para a comparação de mais de duas amostras). Neste último caso, a análise foi complementada através do teste de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer*. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

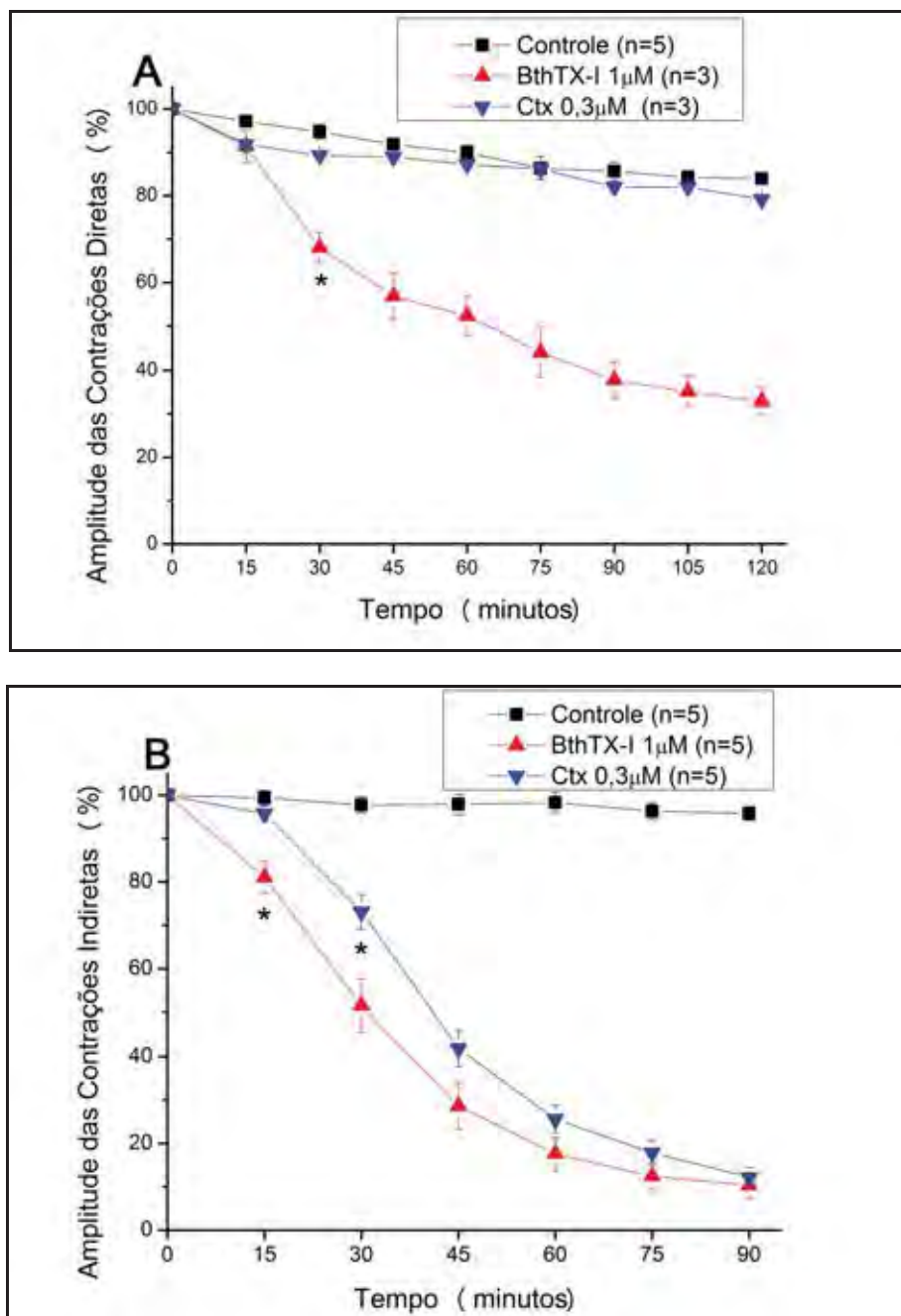
## **4. RESULTADOS**

## **4.1. Estudo Funcional**

### **4.1.1. Efeito da BthTX-I, da CTX e da CB sobre as contrações musculares diretas e indiretas**

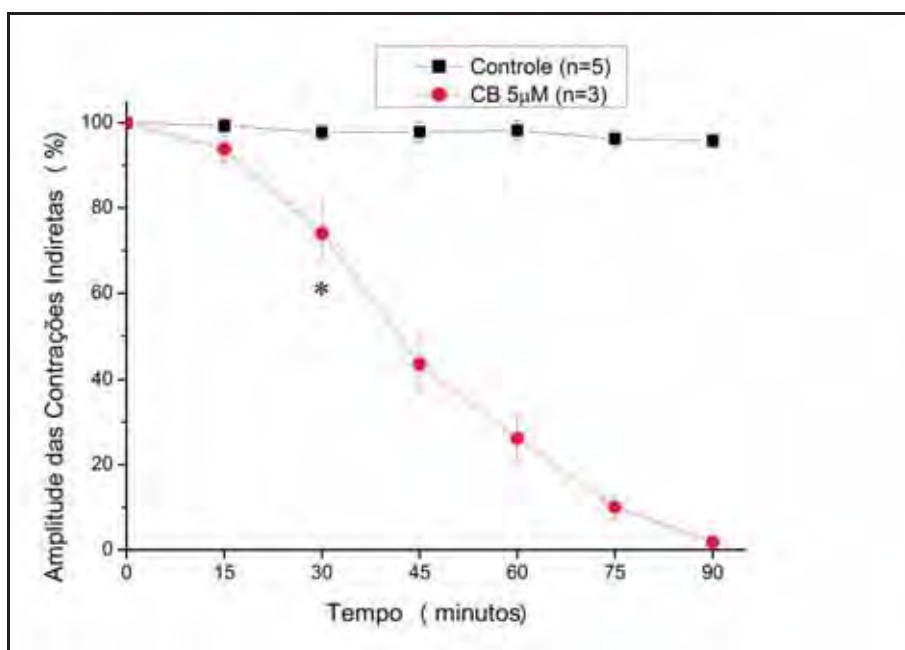
A BthTX-I promoveu bloqueio irreversível e tempo-dependente das contrações musculares evocadas diretamente e indiretamente em preparações neuromusculares de camundongos (Figura 8 A e B). Para as contrações diretas, o  $t_{1/2}$  foi  $61,2 \pm 7,2$  minutos (N=3) e para as indiretas  $34,7 \pm 3,3$  minutos (N=5), havendo diferença significativa entre ambos. Ao final dos períodos experimentais, as contrações diretas foram reduzidas em 61% e as indiretas em 89%.

Em contraste com a BthTX-I, a CTX induziu bloqueio progressivo apenas das contrações evocadas indiretamente nas preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongo (Figura 8 A e B). O  $t_{1/2}$  foi  $41,6 \pm 2,4$  minutos (N=5) e, ao final do período experimental, o bloqueio das contrações foi de 87%.



**Figura 8**– Decurso temporal dos efeitos da BthTX-I e da CTX sobre a amplitude das contrações musculares evocadas diretamente (A) e indiretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ )

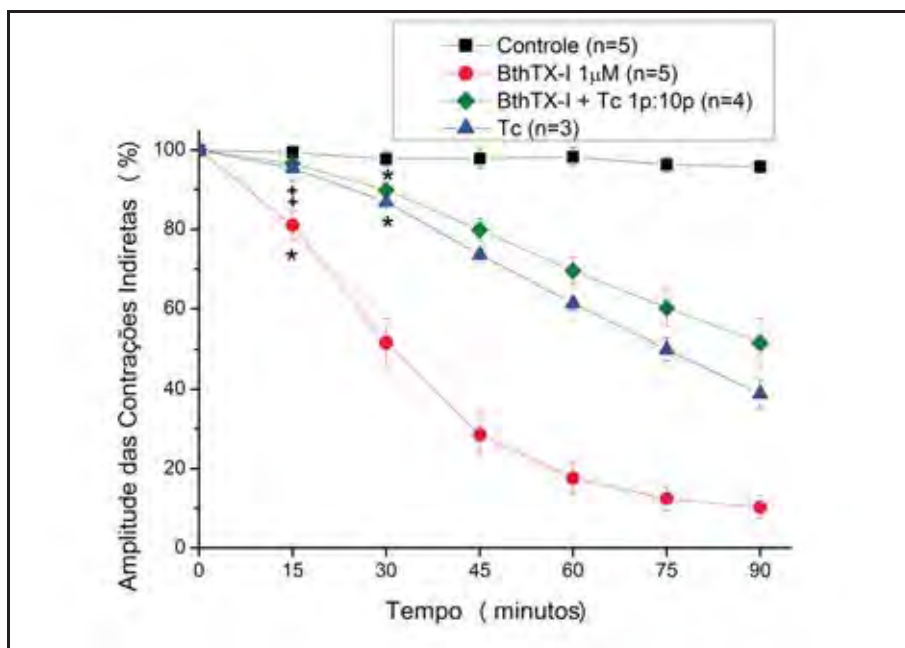
A CB promoveu bloqueio tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongo, (Figura 9). O  $t_{1/2}$  foi  $42,0\% \pm 3,4$  minutos (N=3) e, ao final do período experimental, o bloqueio das contrações musculares foi de 98%.



**Figura 9**– Decurso temporal do efeito da CB sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle

#### **4.1.2. Influência do extrato etanólico de Tc sobre o efeito da BthTX-I nas contrações musculares indiretas**

Como ilustrado na Figura 10, a pré-incubação com extrato etanólico de Tc neutralizou em cerca de 48% o bloqueio das contrações musculares promovido pela BthTX-I. No entanto, o extrato administrado isoladamente reduziu de forma significativa a amplitude das contrações musculares quando comparado ao controle ( $t_{1/2}$  de  $75,57 \pm 3,65$  minutos, N=3).

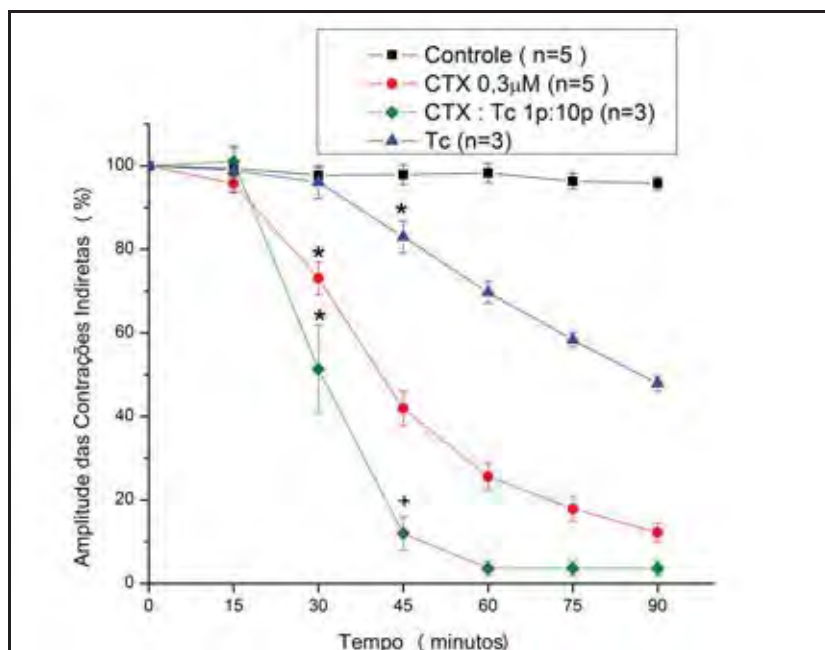


**Figura 10**– Decurso temporal do efeito da BthTX-I e do produto de sua pré-incubação com o extrato etanólico de Tc sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle, e + indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação à toxina

#### 4.1.3. Influência do extrato etanólico de Tc sobre o efeito da CTX nas contrações

##### musculares indiretas

A pré-incubação com o extrato etanólico de Tc não neutralizou o bloqueio neuromuscular induzido pela CTX e, a partir de 45 minutos, intensificou este bloqueio (Figura 11). O produto da pré-incubação de ambos promoveu bloqueio das contrações musculares com  $t_{1/2}$  de  $47,4 \pm 7,1$  minutos ( $N=3$ ), o qual não apresentou diferença significativa em relação ao da CTX ( $41,6 \pm 2,4$  minutos,  $N=5$ ). Administrado isoladamente, o extrato promoveu bloqueio das contrações musculares com  $t_{1/2}$  de  $47,3 \pm 12,4$  minutos ( $N=3$ ).

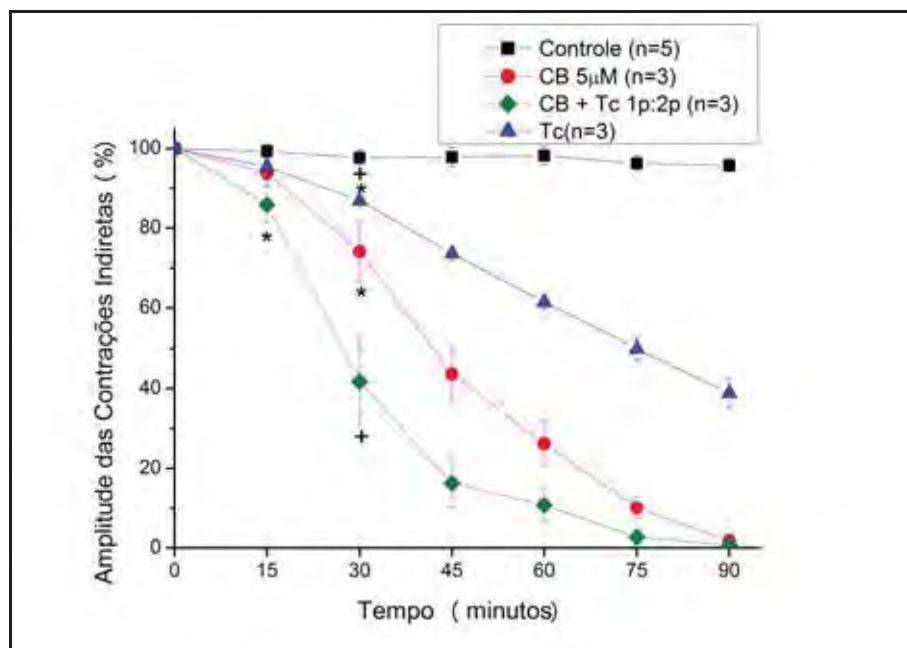


**Figura 11**– Decurso temporal do efeito da CTX e do produto de sua pré-incubação com o extrato etanólico de Tc sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico - músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle, e + indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação à toxina

#### 4.1.4. Influência do extrato etanólico de Tc sobre o efeito da CB nas contrações

##### musculares indiretas

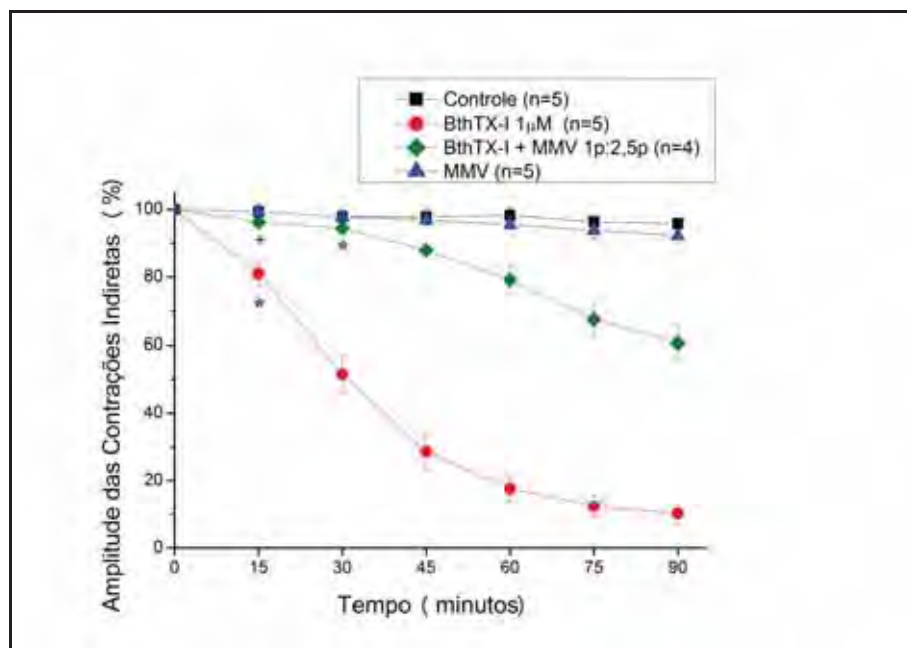
O extrato etanólico de Tc não neutralizou o bloqueio das contrações musculares indiretas promovido pela CB e, a partir de 30 minutos, intensificou este bloqueio (Figura 12). O produto da pré-incubação de ambos induziu bloqueio das contrações musculares com  $t_{1/2}$  de  $28,10 \pm 3,6$  minutos ( $N=3$ ), o qual foi significativamente menor que o da CB ( $42,0\% \pm 3,4$  minutos,  $N=3$ ). O extrato, administrado isoladamente, reduziu de forma significativa a amplitude das contrações musculares quando comparado ao controle ( $t_{1/2}$  de  $75,57 \pm 3,65$  minutos,  $N=3$ ).



**Figura 12-** Decurso temporal do efeito da CB e do produto de sua pré-incubação com o extrato etanólico de Tc sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle, e + indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação à toxina

#### 4.1.5. Influência do alcalóide isolado MMV sobre o efeito da BthTX-I nas contrações musculares indiretas

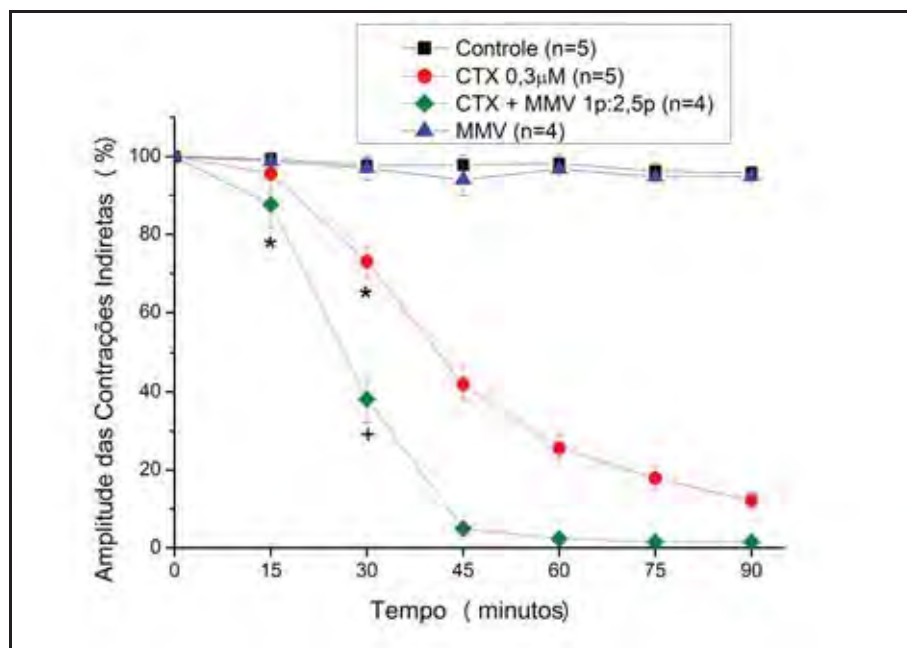
A pré-incubação com o alcalóide MMV neutralizou 59% do bloqueio das contrações musculares promovido pela BthTX-I (Figura 13). Isoladamente, o alcalóide não promoveu alteração na amplitude das contrações musculares quando comparado ao controle.



**Figura 13-** Decurso temporal do efeito da BthTX-I e do produto de sua pré-incubação com o alcalóide MMV sobre o da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle, e + indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação à toxina

#### 4.1.6. Influência do alcalóide MMV sobre o efeito da CTX nas contrações musculares indiretas

O alcalóide MMV não neutralizou o bloqueio neuromuscular induzido pela CTX e, a partir de 30 minutos, intensificou este bloqueio (Figura 14). O produto de pré-incubação de ambos promoveu bloqueio das contrações musculares com  $t_{1/2}$  de  $27,94 \pm 1,97$  minutos ( $N=4$ ), o qual foi significativamente menor que o da CTX ( $41,6 \pm 2,4$  minutos,  $N=5$ ). Isoladamente, o alcalóide não promoveu alteração na amplitude das contrações musculares quando comparado ao controle.

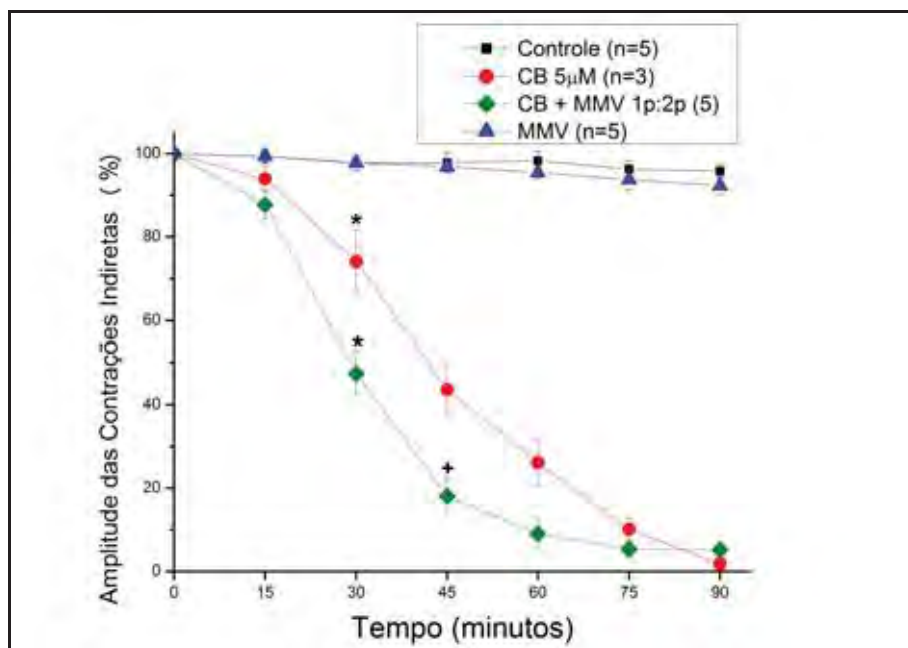


**Figura 14-** Efeito da CTX e do produto de sua pré-incubação com o alcalóide MMV sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle, e + indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação à toxina

#### 4.1.7. Influência do alcalóide MMV sobre o efeito da CB nas contrações musculares

##### indiretas

O alcalóide MMV não neutralizou o bloqueio neuromuscular induzido pela CB e, a partir de 45 minutos intensificou este bloqueio (Figura 15). O produto de pré-incubação de ambos promoveu bloqueio neuromuscular com  $t_{1/2}$  de  $29,57 \pm 1,84$  minutos ( $N=5$ ), desse modo havendo diferença significativa em relação ao da CB ( $42,0\% \pm 3,4$  minutos,  $N=3$ ). Isoladamente, o alcalóide não promoveu alteração na amplitude das contrações musculares.



**Figura 15-** Decurso temporal do efeito da CB e do produto de sua pré – incubação com o alcalóide MMV sobre a amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações do nervo frênico – músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM ( $P < 0,05$ ). \* indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle, e + indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação à toxina

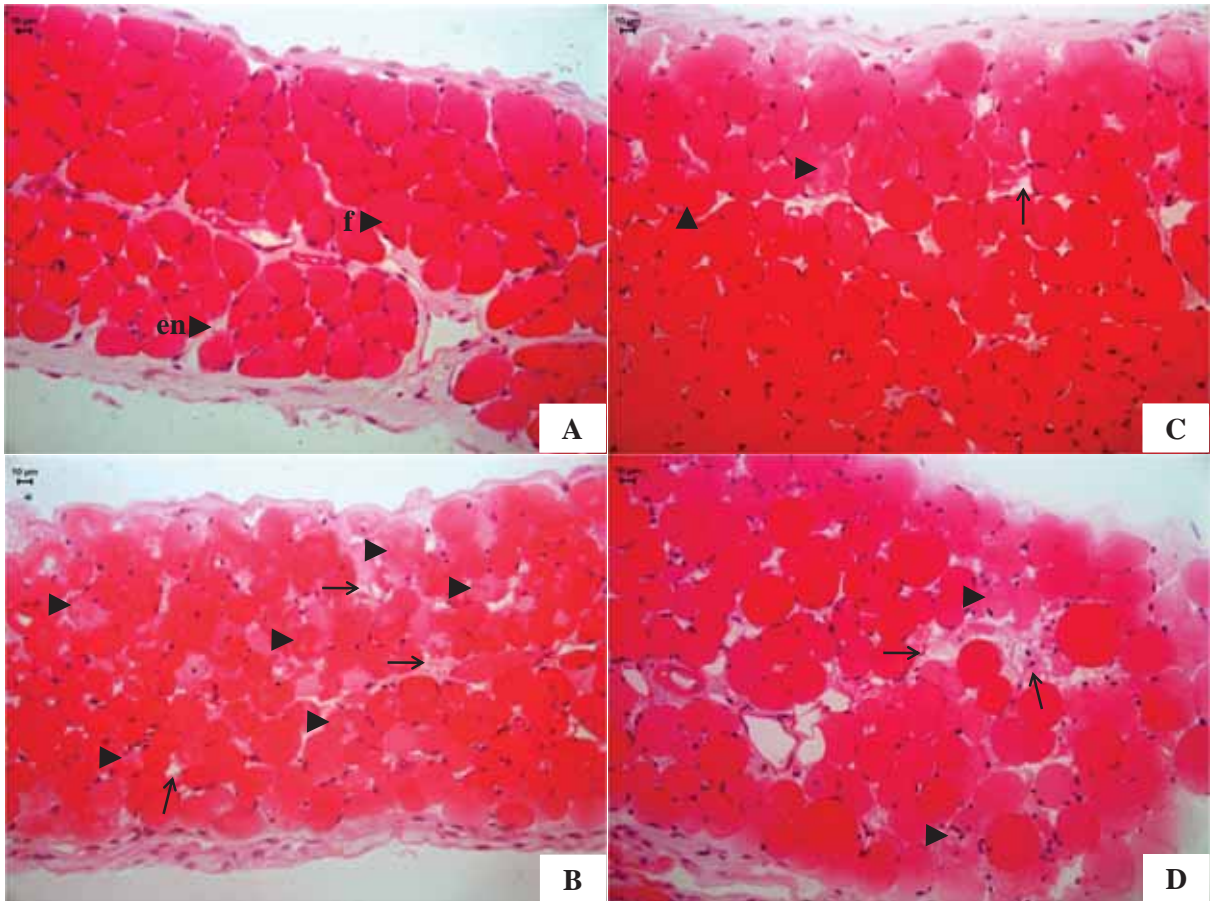
## 4.2. Estudo Morfológico e Morfométrico

O aspecto morfológico dos músculos diafragma de camundongos controle e submetidos à ação da BthTX-I, do extrato etanólico de Tc e do produto de pré-incubação da BthTX-I com extrato etanólico de Tc estão ilustrados na figura 16. Os músculos do grupo controle (Figura 16 A) apresentaram a maioria das fibras com formato poligonal, multinucleadas e os núcleos situados periféricamente. Entre as fibras musculares foi evidenciado tecido conjuntivo frouxo, constituindo o endomísio. Em contraste, os músculos submetidos à ação da BthTX-I (Figura 16 B) apresentaram alterações morfológicas caracterizadas por fibras esféricas de vários tamanhos, áreas de citoplasma com condensação ou ausência de miofibrilas. Observou-se nos músculos expostos ao extrato etanólico de Tc (Figura 16 C) ou ao produto da pré-incubação da BthTX-I com extrato etanólico de Tc (Figura 16 D) muitas fibras arredondadas e várias áreas de citoplasma com condensação ou ausência de miofibrilas. Já, os músculos submetidos à ação do alcalóide MMV ou do produto de pré-incubação da BthTX-I (Figuras 17 C) com o alcalóide MMV (Figuras 17 D) exibiram aspecto morfológico muito similar ao grupo controle. A figura 18 (B) ilustra a microscopia óptica do músculo diafragma de camundongo exposto a ação da CTX. Nota-se que a maioria das fibras apresentou aspecto morfológico semelhante ao grupo controle com fibras poligonais e núcleos periféricos.

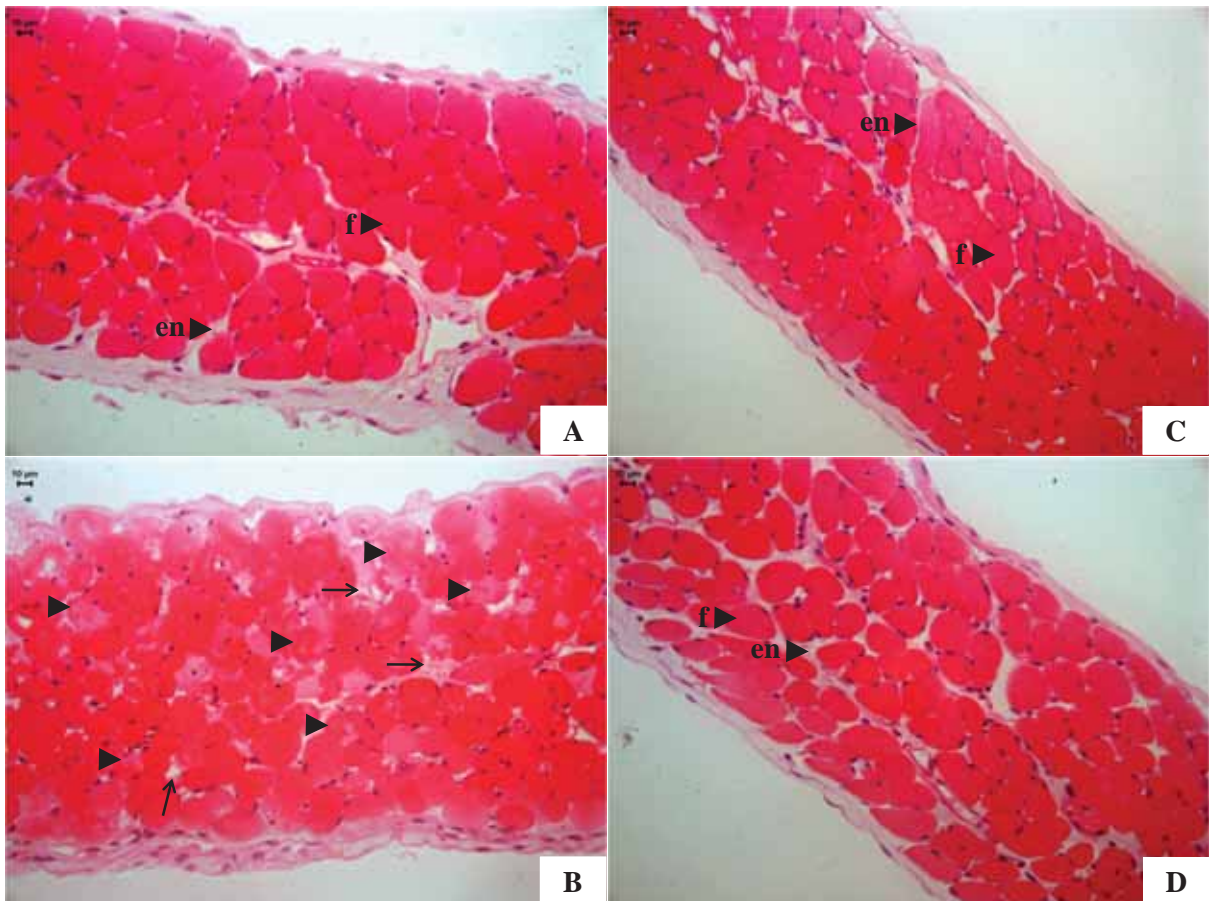
Os resultados da análise morfométrica estão apresentados na figura 19. Observou-se um aumento significativo do número de fibras lesadas apenas nos músculos submetidos à ação da BthTX-I bem como do extrato etanólico de Tc, isoladamente, quando comparados ao grupo controle. Os músculos expostos ao produto de pré-incubação da BthTX-I com o extrato etanólico de Tc não evidenciaram diferenças significativas quando comparados aqueles submetidos à ação toxina isoladamente. Por outro lado, os músculos submetidos ao produto de pré-incubação da BthTX-I com o alcalóide MMV apresentaram número significativamente

menor de fibras lesadas em relação a toxina. Estes resultados indicam que o extrato etanólico de Tc não foi capaz de neutralizar o efeito miotóxico promovido pela BthTX-I, enquanto que o alcalóide MMV neutralizou parcialmente este efeito.

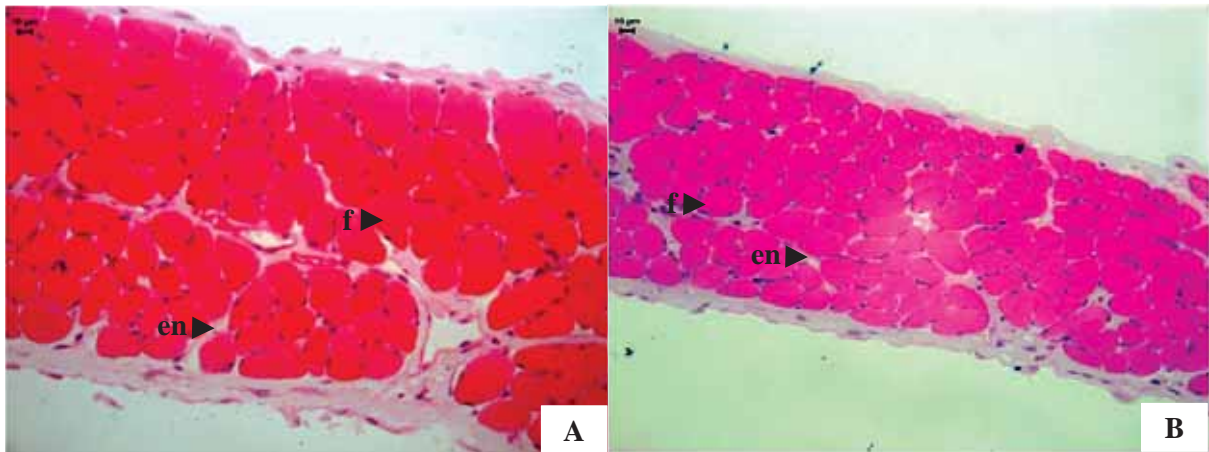
A análise ultra-estrutural dos músculos do grupo controle revelou fibras normais com sarcolema regular, miofibrilas preenchendo todo o sarcoplasma e mitocôndrias intermiofibrilares (Figura 20 A). Em contraste, as fibras dos músculos submetidos à ação da BthTX-I apresentaram miofibrilas hipercontraídas, áreas desprovidas de miofilamentos, mitocôndrias edemaciadas e com ruptura de cristas (Figura 20 B e C). Notou-se nos músculos expostos ao extrato etanólico de Tc (Figura 20 D e E) ou ao produto da pré-incubação da BthTX-I com extrato etanólico de Tc (Figura 20 F) várias áreas de citoplasma com hipercontração de miofibrilas, áreas com ausência de miofilamentos e mitocôndrias edemaciadas com ruptura de cristas. Já, os músculos submetidos à ação do alcalóide MMV (Figuras 21 D e E) ou do produto de pré-incubação da BthTX-I com o alcalóide MMV (Figuras 21 F) exibiram aspecto morfológico muito similar ao grupo controle.



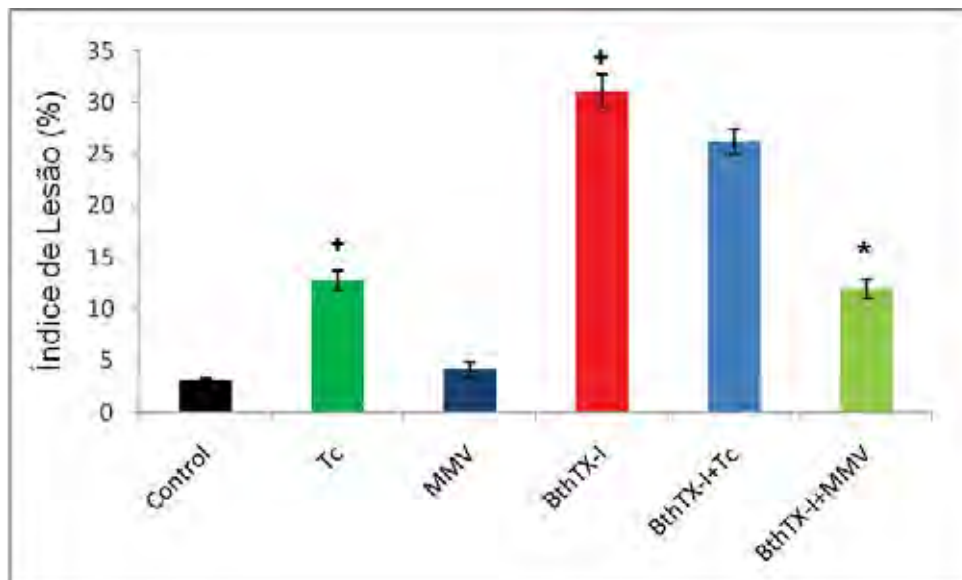
**Figura 16**– Microscopia ótica do músculo diafragma de camundongo submetido à coloração hematoxilina e eosina (HE). Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B) BthTX-I, (C) extrato etanólico de Tc isoladamente e (D) produto de pré-incubação da BthTX-I com extrato etanólico de Tc. (f) fibras musculares; (en) endomísio; cabeça de seta indica miofibrilas condensadas, seta aponta ausência de miofibrilas



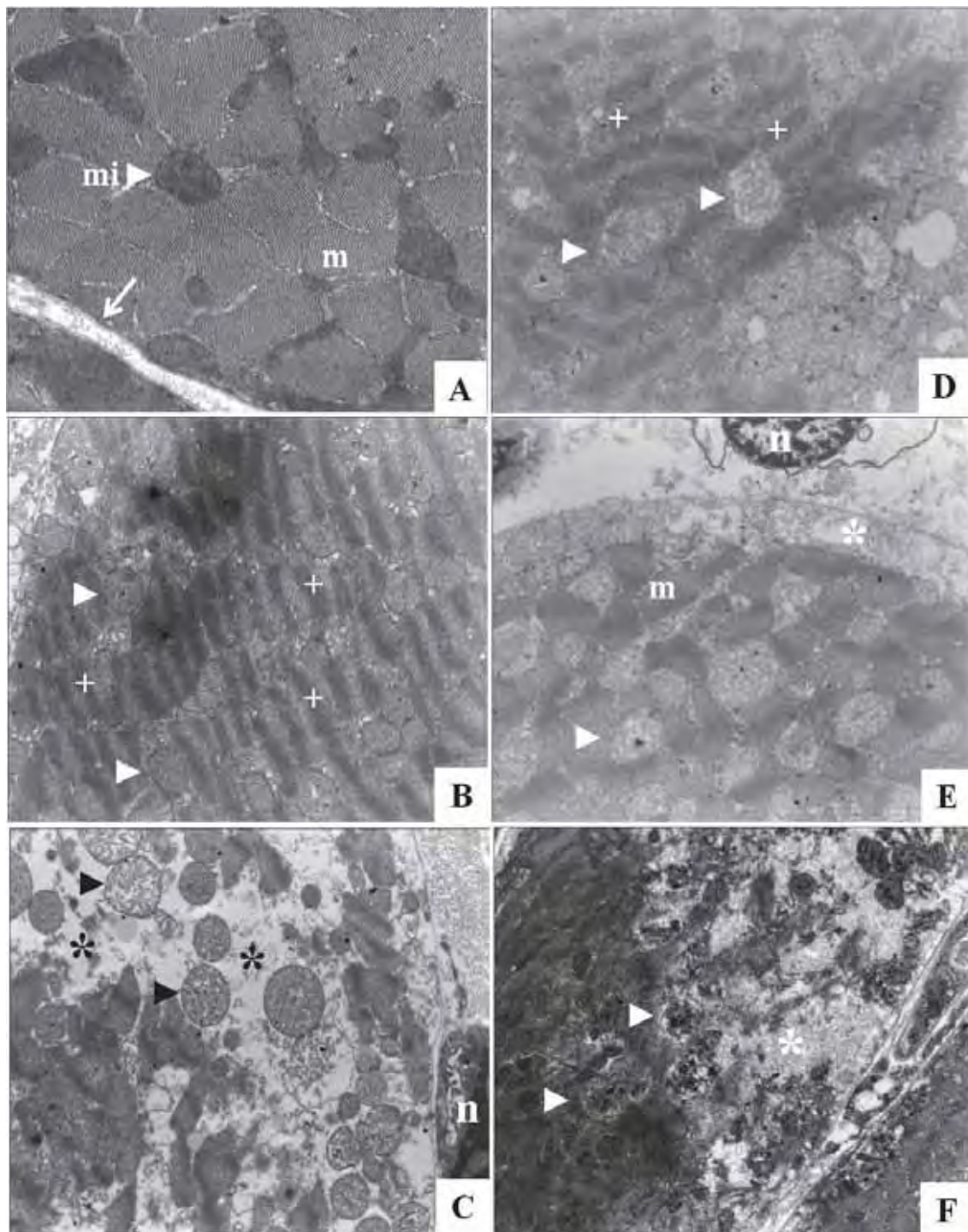
**Figura 17**– Microscopia ótica do músculo diafragma de camundongo submetido à coloração hematoxilina e eosina (HE). Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B) BthTX-I, (C) alcalóide MMV isoladamente e (D) produto de pré-incubação da BthTX-I com alcalóide MMV. (f) fibras musculares; (en) endomísio; cabeça de seta indica miofibrilas condensadas, seta aponta ausência de miofibrilas



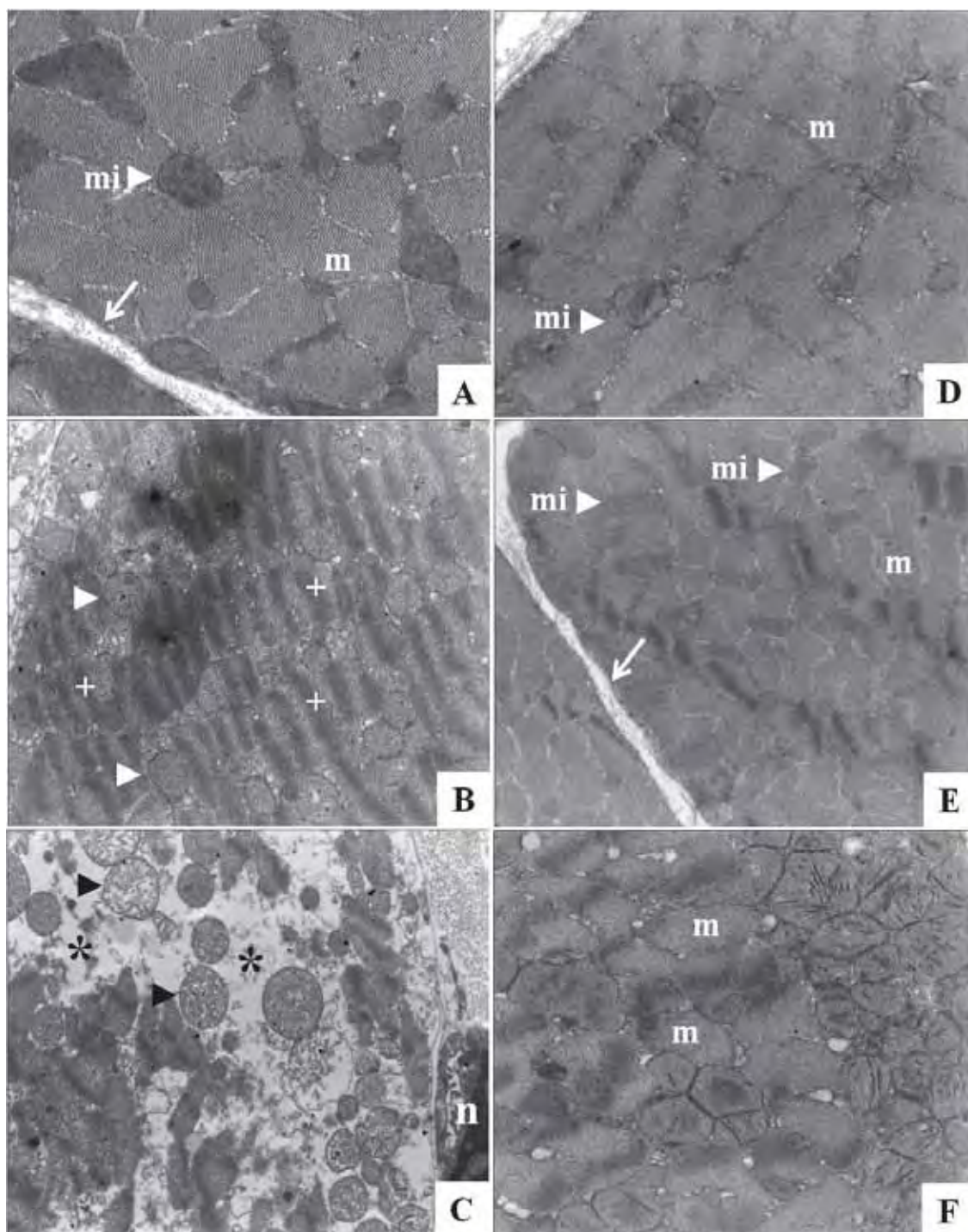
**Figura 18**– Microscopia ótica do músculo diafragma de camundongo submetido à coloração hematoxilina e eosina (HE). Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B) CTX. (f) fibras musculares; (en) endomísio



**Figura 19**- Efeito do extrato etanólico de Tc e do alcalóide isolado MMV sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I em preparações do músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média  $\pm$  EPM de 3 experimentos. (+) indica diferença significativa em relação ao controle e (\*) diferença significativa em relação à BthTX-I ( $P < 0,05$ )



**Figura 20**– Microscopia eletrônica do músculo diafragma de camundongos. Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B e C) BthTX-I, (D e E) extrato etanólico de Tc isoladamente, (F) produto de pré-incubação da BthTX-I com Tc. (m) miofibrilas, (n) núcleo, (mi) mitocôndria, (seta) sarcolema, (cabeça de seta) mitocôndria edemaciada, (+) hipercontração de miofibrilas, (\*) área desprovida de miofibrilas



**Figura 21**– Microscopia eletrônica do músculo diafragma de camundongos. Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B e C) BthTX-I, (D e E) alcalóide isolado MMV, (F) produto de pré-incubação da BthTX-I com MMV. (m) miofibrilas, (n) núcleo, (mi) mitocôndria, (seta) sarcolema, (cabeça de seta) mitocôndria edemaciada, (+) hipercontração de miofibrilas, (\*) área desprovida de miofibrilas

## **5.DISSCUSSÃO**

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde incluiu os acidentes ofídicos na lista das doenças tropicais negligenciadas em virtude da morbidade crônica e elevada mortalidade que ocasionam, resultando em graves conseqüências sociais ([www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/); Gutiérrez, *et al.*, 2010). Dentre as estratégias para enfrentar este problema, o aprimoramento da soroterapia e a ampliação do conhecimento do mecanismo de ação dos componentes dos venenos são de grande relevância (Williams *et al.*, 2010). Considerando que grande parte da toxicidade dos venenos ofídicos é decorrente da atividade de PLA<sub>2</sub>s, o avanço no conhecimento do mecanismo de ação e da relação estrutural-atividade destas proteínas é fundamental (Calvete *et al.*, 2007). Neste sentido, o uso de agentes neutralizadores destas proteínas, torna-se uma ferramenta útil. Além disso, tais neutralizadores podem complementar o tratamento dos envenenamentos e contribuir para o desenvolvimento de potenciais fármacos (Soares *et al.*, 2005; Marcussi *et al.*, 2007). Extratos vegetais são fontes de moléculas biologicamente ativas e muitos destes vêm sendo utilizados na medicina popular como antiofídicos. Assim, avaliou-se neste estudo o potencial do extrato etanólico de *Tabernaemontana catharinensis* e de seu alcalóide 12-metoxi-4-metilvoachalotina em neutralizar os efeitos de PLA<sub>2</sub>s de venenos botrópico (BthTX-I, PLA<sub>2</sub> Lys49) e crotálico (CTX e sua PLA<sub>2</sub> Asp49 isolada) na preparação neuromuscular de camundongos.

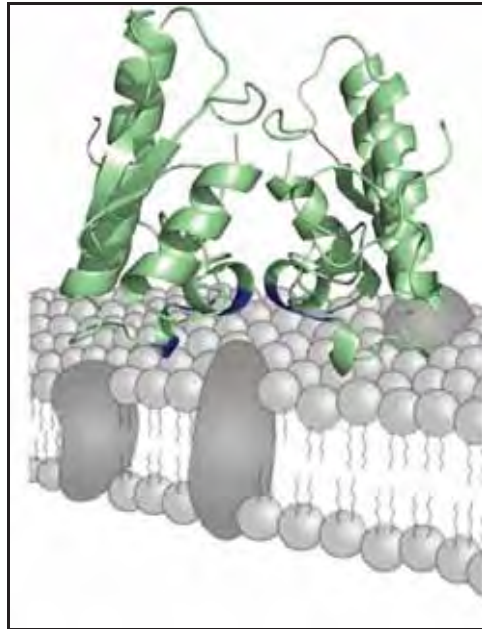
O efeito miotóxico da BthTX-I *in vitro* foi evidenciado diretamente no presente estudo por alterações histológicas como células musculares lesadas, regiões celulares com ausência ou hipercontração de miofilamentos e ruptura de mitocôndrias. Este efeito também foi constatado indiretamente através do bloqueio das contrações musculares diretas, as quais independem do processo de neurotransmissão. Embora seja uma miotoxina não-neurotóxica *in vivo*, observou-se também que a BthTX-I bloqueia as contrações musculares indiretas *in vitro*, as quais dependem do processo de neurotransmissão. Achados semelhantes foram

descritos para esta e outras PLA<sub>2</sub>s Lys49 homólogas (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2000; 2001; Lomonte *et al.*, 2003; Gutiérrez & Owmbly, 2003; Gallacci *et al.*, 2006; Cavalcante *et al.*, 2007).

Evidências experimentais sugerem que o alvo de ação inicial das miotoxinas PLA<sub>2</sub>s Lys49 seja a membrana celular (Owmbly, *et al.*, 1999; Gutiérrez & Owmbly, 2003; Rangel *et al.*, 2011). Várias investigações tem se concentrado na elucidação das bases moleculares da toxicidade das PLA<sub>2</sub>s Lys49. Estudos com peptídeos sintéticos, mapeamento de sítios de interação com agentes neutralizadores e mutagênese sítio-dirigida identificaram um trecho contendo uma combinação de resíduos catiônicos e hidrofóbicos na região C-terminal das PLA<sub>2</sub>s Lys49 como sendo essencial para as suas atividades tóxicas, além do envolvimento da região N-terminal em seu mecanismo de ação (Díaz *et al.*, 1994; Chioato & Ward, 2003; Soares *et al.*, 2000; 2001). As informações recolhidas nestes estudos levaram a um modelo teórico do mecanismo da ação citolítica destas proteínas.

A hipótese mais aceita para o mecanismo de ação das PLA<sub>2</sub>s Lys49 miotóxicas propõe que resíduos de aminoácidos catiônicos presentes nas região C-terminal e N-terminal destas proteínas estabelecem interações eletrostáticas iniciais com sítios aniônicos na membrana da célula. Tal interação seria fortalecida pelo envolvimento posterior de resíduos hidrofóbicos e aromáticos presentes na região C-terminal, os quais penetrariam na bicamada lipídica (Figura 22; Lomonte *et al.*, 2003, Gallacci & Cavalcante *et al.*, 2010). Além disso, o caráter dimérico de muitas PLA<sub>2</sub>s Lys49 homólogas poderia contribuir para seu mecanismo de ação (Lomonte *et al.*, 2003; dos Santos *et al.* 2009). Com base em estudos cristalográfico duas configurações diméricas foram propostas para as PLA<sub>2</sub>s Lys49 (Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2005). Em adição há evidências de que ocorrem alterações no ângulo formado entre os

monômeros (da Silva Giotto *et al.*, 1998; Magro *et al.*, 2003). Assim, a interface dimérica atuaria como uma dobradiça permitindo a alternância entre as conformações “aberta” e “fechada” contribuindo para a desorganização da membrana celular (Lomonte *et al.*, 2003).

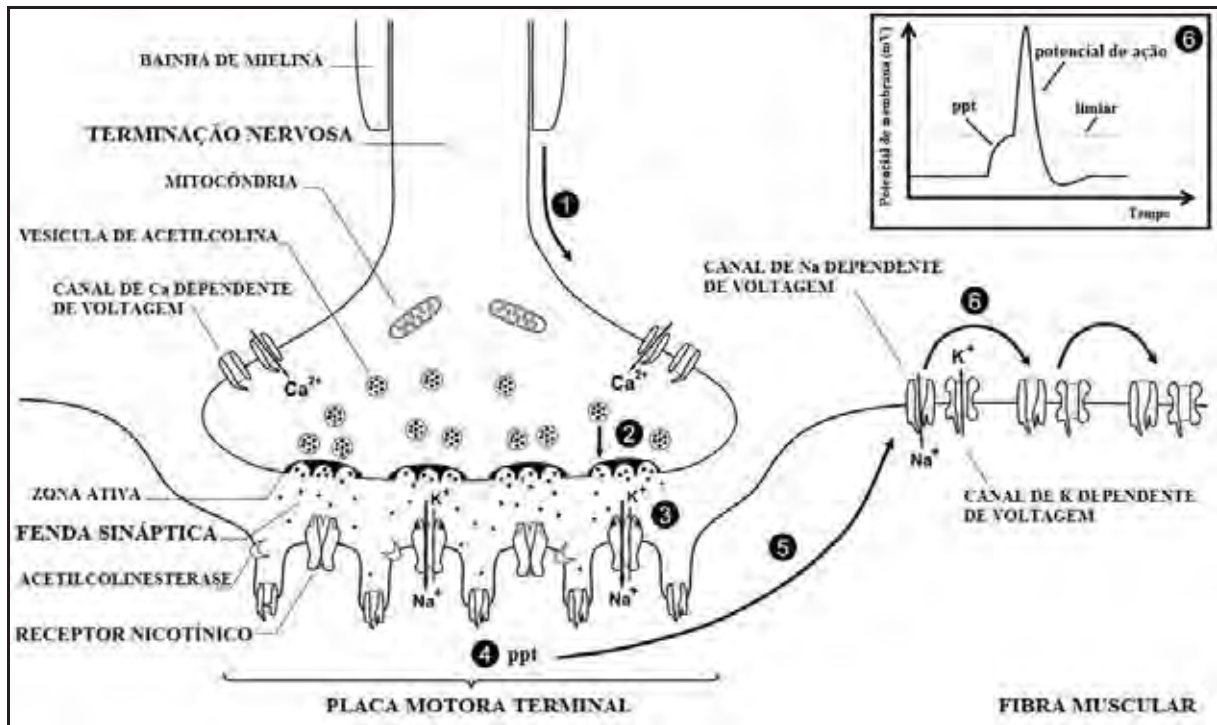


**Figura 22-** Interação de uma PLA<sub>2</sub> Lys49 botrópica dimérica com a membrana (dos Santos *et al.*, 2009, adaptado)

De acordo com esta hipótese, a primeira consequência da perturbação da membrana seria o prejuízo na permeabilidade seletiva resultando em despolarização do sarcolema, provavelmente devido ao reequilíbrio do gradiente de concentração dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. A ação desestabilizadora de membrana também permite rápido e proeminente influxo de Ca<sup>2+</sup> que segue o gradiente existente através da membrana. Além disso, é possível que a despolarização induzida pelo influxo de Na<sup>+</sup> promova a liberação de Ca<sup>2+</sup> de reservas intracelulares. O aumento de Ca<sup>2+</sup> sarcoplasmático inicia uma série de alterações degenerativas em consequência à ativação de proteases e fosfolipases dependentes Ca<sup>2+</sup> (Gutiérrez & Owmy, 2003; Montecucco *et al.*, 2008; Gallacci & Cavalcante, 2010). Recentemente, demonstrou-se a liberação de ATP por miotúbulos submetidos à ação de

PLA<sub>2</sub>s Lys49 de venenos botrópicos (Cintra-Francischinelli, *et al.*, 2010). Com base nestes achados sugeriu-se que o ATP liberado pelas células lesadas se difundiria para regiões distantes e interagiria com receptores purinérgicos do tipo P<sub>2x</sub>, permitindo fluxo de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> de acordo com os gradientes de concentração destes íons. Sendo assim, o dano tecidual causado pelas PLA<sub>2</sub>s Lys49 seria amplificado pelo ATP liberado a partir das células primeiramente atingidas pela toxina.

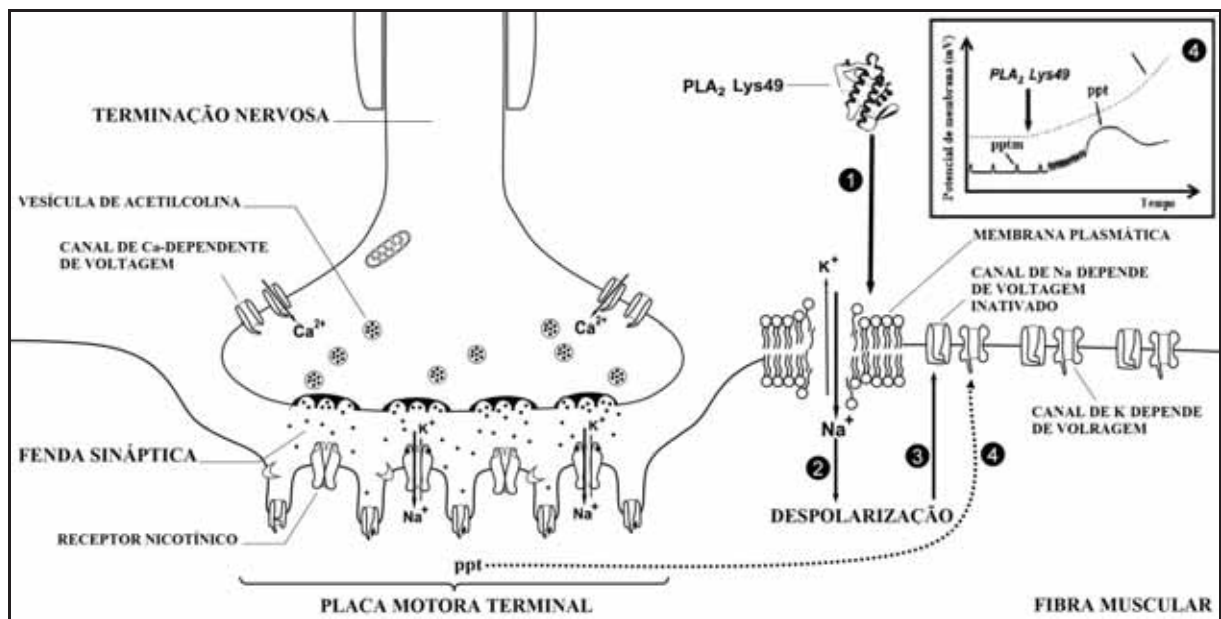
A análise dos dados disponíveis na literatura levou a hipótese de que a atividade desestabilizadora de membrana promovida pelas PLA<sub>2</sub>s Lys49 também desempenharia um papel-chave no estabelecimento da paralisia muscular *in vitro* induzida por estas toxinas (Gallacci & Cavalcante, 2010). No sentido de tornar claro o desenvolvimento desta paralisia muscular será brevemente descrito a seguir as principais etapas do processo de transmissão neuromuscular. A junção neuromuscular é uma sinapse que transmite impulsos elétricos provenientes da terminação nervosa motora para a fibra muscular esquelética. Como ilustrado na figura 23, a chegada do potencial de ação na terminação nervosa promove a abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem, permitindo a influxo deste íon. O aumento da concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup> estimula a fusão das vesículas de ACh com a membrana da terminação nervosa levando a liberação deste neurotransmissor. As moléculas de ACh se difundem pela fenda sináptica e interagem com receptores nicotínicos da região da placa motora, a qual é quimicamente excitável. Os receptores nicotínicos são canais protéicos que mediante a interação com ACh permitem influxo de íons, principalmente Na<sup>+</sup>, levando a despolarização do sarcolema, chamada potencial de placa terminal. Esta despolarização se difunde eletrotônicamente para a região extra-juncional da fibra muscular esquelética, a qual é eletricamente excitável. Assim, se o limiar de excitabilidade da fibra muscular é atingido o potencial de ação é deflagrado iniciando o processo de contração muscular.



**Figura 23-** Representação esquemática da junção neuromuscular com os principais eventos envolvidos no processo de neurotransmissão: (1) chegada do impulso nervoso e ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem; (2) liberação excitotóxica de ACh; (3) interação da ACh com receptor nicotínico e conseqüente fluxo iônico; (4) despolarização da região da placa motora (ppt); (5) difusão eletrotônica do ppt para a região extra-juncional; (6) se o limiar de excitabilidade da fibra for atingido ocorre gênese e propagação do potencial de ação pela fibra muscular promovendo a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos retículos sarcoplasmáticos e contração muscular (Gallacci & Cavalcante, 2010, adaptado)

A despolarização decorrente da ação desestabilizadora de membrana promovida pelas PLA<sub>2</sub>s Lys49 poderia inativar os canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem, presentes na região extra-juncional, criando áreas de inexcitabilidade na fibra muscular. Sendo assim o limiar de excitabilidade da fibra muscular aumentaria de forma que o potencial de ação não seria deflagrado, instalando-se a paralisia muscular (Figura 24). Embora a despolarização possa afetar a contratilidade muscular, o processo de neurotransmissão seria primeiramente bloqueado porque depende da excitabilidade elétrica de uma área muito restrita da membrana próxima a região da placa motora. Esta hipótese poderia explicar porque as contrações musculares indiretas são frequentemente mais susceptíveis a ação das PLA<sub>2</sub>s Lys49 quando

comparadas às diretas (Heluany *et al.*, 1992; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1995; de Oliveira *et al.*, 2003;). Corroborando esta hipótese, os dados deste estudo mostraram que na vigência da BthTX-I o valor médio de  $t_{1/2}$  para as contrações indiretas foi significativamente menor quando comparado ao das contrações diretas.



**Figura 24-** Hipótese para o bloqueio neuromuscular induzido pelas PLA<sub>2</sub>s Lys49 *in vitro*. (1) interação da toxina com a membrana e conseqüente destabilização desta, (2) perda da permeabilidade seletiva resultando em despolarização do sarcolema devido ao reequilíbrio do gradiente de concentração dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, (3) despolarização persistente inativa os canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem presentes na região extra-juncional, (4) o limiar de excitabilidade da fibra muscular aumenta tornando o ppt subliminar para a geração do potencial de ação levando ao bloqueio da transmissão neuromuscular (Gallacci & Cavalcante, 2010; adaptado)

Ademais, há evidências de que a BthTX-I reduz a liberação evocada de ACh pela terminação nervosa motora da preparação frênico-diafragma de ratos (Correa de Sá, *et al.*, 2010). Este efeito também poderia ser conseqüência da despolarização promovida pela ação destabilizadora de membrana das PLA<sub>2</sub>s Lys49, uma vez que a despolarização poderia alcançar a terminação nervosa. Desse modo, a incidência de um potencial de ação sobre a

terminação nervosa parcialmente despolarizada levaria a uma redução da quantidade de neurotransmissor liberada. Além disso, o ATP liberado a partir de células lesadas pela toxina (Cintra-Francischinelli *et al.*, 2010) poderia se difundir e ativar receptores purinérgicos inibitórios do tipo A1, presentes na terminação nervosa (Corrêa de Sá *et al.*, 1996), contribuindo assim para a redução da quantidade de neurotransmissor liberada. Em vista do exposto é válido supor que a desestabilização da membrana da fibra muscular promovida pelas PLA<sub>2</sub>s Lys49 induza paralisia muscular *in vitro* por mecanismos pós e/ou pré-sinápticos.

Embora as PLA<sub>2</sub>s Lys49 não apresentem efeito neurotóxico *in vivo*, tal efeito é observado *in vitro* (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Ademais, estas toxinas promovem mionecrose local intensa, no entanto não são capazes de fazê-lo a níveis sistêmicos (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Isto pode ser consequência da interação inespecífica da PLA<sub>2</sub>s Lys49 a diferentes tecidos (Bultrón *et al.*, 1993; Lomonte *et al.*, 1994, 1999b) a qual impediria o direcionamento desta toxina a outros sítios farmacológicos relevantes como células musculares distantes ou terminações nervosas (Ponce-Soto *et al.*, 2007). Desse modo, no presente estudo a administração da toxina diretamente na preparação neuromuscular de camundongos, preveniu a sua orientação para outros sítios de ação, permitindo assim observar neurotoxicidade.

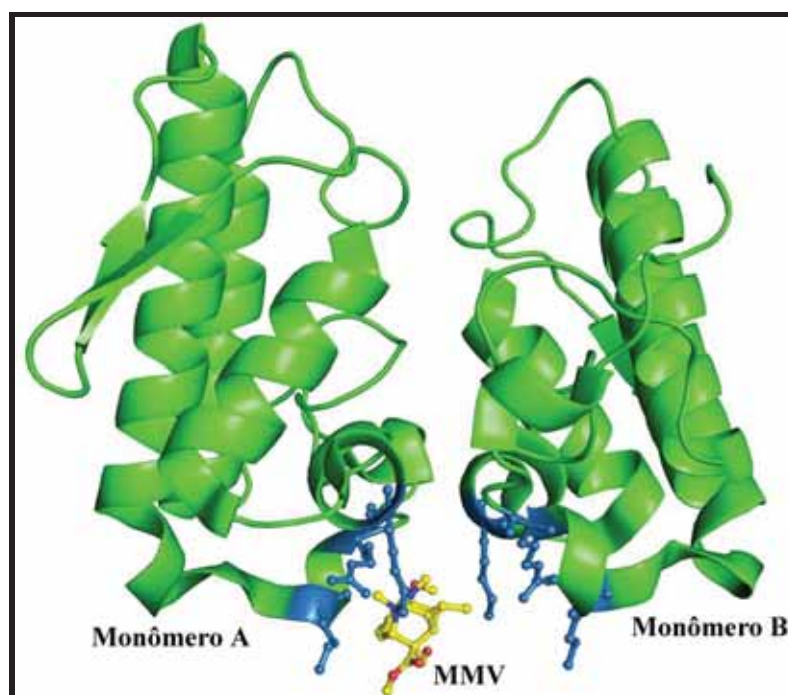
Observou-se ainda neste estudo que a pré-incubação com o extrato etanólico de Tc neutraliza parcialmente o bloqueio neuromuscular *in vitro* promovido pela BthTX-I, embora não afete significativamente o efeito miotóxico. Tais resultados podem ser explicados com base na toxicidade do extrato uma vez que, isoladamente, este promoveu alterações morfológicas e bloqueio das contrações musculares indiretas *in vitro*. De fato, a presença de componentes com atividades citolítica e citotóxica foi observada por de Almeida e

colaboradores (2004) durante o fracionamento do extrato de Tc. Todavia, a neutralização parcial do efeito miotóxico da BthTX-I pelo extrato de Tc foi previamente descrita por Veronese e colaboradores (2005) através da quantificação de creatina quinase liberada da musculatura de ratos *in vivo* e *in vitro*. Deve-se ressaltar, entretanto, que tais resultados foram obtidos por meio de abordagem e modelo experimental distintos dos utilizados no presente estudo, o que poderia explicar a discrepância entre os resultados.

O presente estudo evidenciou ainda que a pré-incubação da toxina com o alcalóide MMV isolado da Tc foi capaz de neutralizar parcialmente tanto o efeito miotóxico quanto o bloqueador neuromuscular promovidos pela BthTX-I *in vitro*. Estes resultados corroboram a hipótese de que ambos os efeitos sejam consequência da ação desestabilizadora de membrana promovida pela BthTX-I. É importante ressaltar que em contraste com o extrato vegetal, isoladamente, o alcalóide MMV não se mostrou tóxico para a preparação neuromuscular de camundongos. Batina e colaboradores (2000) obtiveram 6 diferentes frações a partir do extrato de Tc (A, B, C, D, E e F) das quais a D apresentou elevada atividade antiofídica. Estes autores observaram ainda que o composto isolado desta fração apresentou características químicas semelhantes ao alcalóide indólico 12-metoxi-4-metilvoachalotina (MMV) anteriormente isolado por Braga Reis (1987). Tais achados sugerem que o alcalóide MMV pode ser um dos principais determinantes do potencial neutralizador da Tc, embora a presença de outros componentes com tal potencial não possa ser descartada.

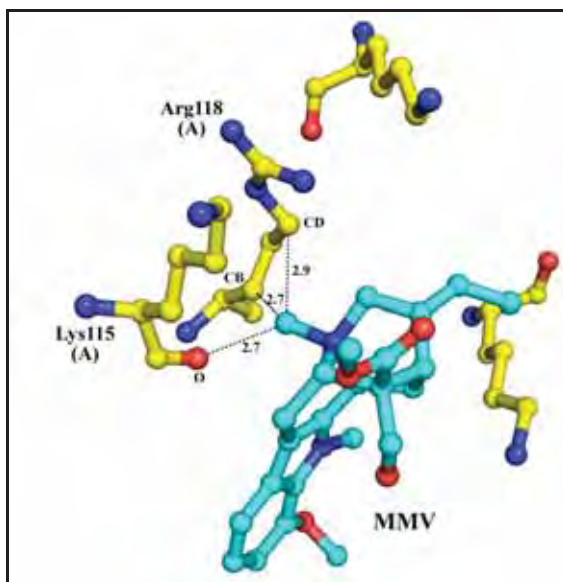
Simulações de *Docking* Molecular entre o modelo cristalográfico da BthTX-I (código PDB 3CXI; Fernandes *et al.*, 2010) e o modelo *in silico* da molécula do alcalóide MMV foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências –UNESP – Campus de Botucatu, pela mestrandia Patrícia Shimabuku e pelo pós-doutorando Angelo José Magro, sob orientação do Prof. Dr.

Marcos Roberto de Mattos Fontes (dados não publicados). Os resultados preliminares deste estudo, ilustrados na figura 25 e 26, sugerem que teoricamente a molécula do alcalóide MMV se aproximaria de resíduos de aminoácidos (Lys115 e Arg118) presentes na região C-terminal da BthTX-I previamente descrita como relevante para a atividade desestabilizadora de membrana desta toxina (Lomonte *et al.*, 1999a; Núñez *et al.*, 2001; Angulo & Lomonte, 2003; Chioato & Ward 2003; Lomonte *et al.*, 2009). No entanto, para avaliar se ocorre a formação de um complexo estável entre a toxina e o alcalóide e identificar os sítios da toxina envolvidos nesta possível interação, outros estudos estruturais envolvendo modelagem molecular e co-cristalização são necessários. Alternativamente, levando em consideração o caráter básico do alcalóide MMV, não se pode descartar a hipótese de que este composto poderia competir com a BthTX-I por sítios de ligação na membrana, impedindo assim que a toxina se ligue e promova a desestabilização da membrana.



**Figura 25-** Ilustração da simulação de *docking* molecular entre a estrutura cristalográfica da BthTX-I e o modelo *in silico* do alcalóide MMV. Os monômeros A e B da BthTX-I estão representados em *cartoon* (verde), a molécula do alcalóide MMV e os resíduos de

aminoácidos da região C-terminal da BthTX-I estão na forma de *sticks* (amarelo e azul, respectivamente)



**Figura 26-** Detalhes da interação entre a BthTX-I e o alcalóide MMV mostrando os resíduos de aminoácidos Arg118 e Lys115 na região C-terminal do monômero A da BthTX-I (átomos de carbono representados em amarelo na forma de *sticks*) e o alcalóide MMV (átomos de carbono representados na forma de sticks em azul)

Em contraste com a BthTX-I, a CTX, na concentração utilizada no presente estudo, promove bloqueio das contrações musculares evocadas indiretamente em preparação neuromuscular de camundongos, porém não afeta as contrações diretas. Estes achados corroboram os dados descritos na literatura para esta toxina (Chang & Lee, 1977; Hawgood & Smith, 1977). Vital Brasil (1966) e Breithaupt (1976) observaram que a CTX leva a morte de animais experimentais por paralisia respiratória devido a bloqueio da transmissão neuromuscular. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que este bloqueio decorre predominantemente da inibição da liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas motoras que se dá em três fases sucessivas: depressão, seguida de facilitação e finalmente inibição irreversível da liberação de acetilcolina (Chang & Lee, 1977; Howgood & Smith,

1977). Em adição, foi evidenciado que esta toxina também promove ação pós-sináptica, estabilizando o receptor nicotínico em estado dessensibilizado (Bon *et al.*, 1979).

Observa-se ainda no presente estudo que a subunidade básica PLA<sub>2</sub> Asp49 isolada da CTX promove bloqueio da transmissão neuromuscular, contudo uma dose maior é necessária para promover a mesma intensidade de efeito que o complexo como um todo (CTX). Sugere-se, que as duas subunidades atuem em sinergismo (Hawgood & Smith, 1977; Bon *et al.*, 1979; Faure & Bon, 1988). Assim, a crotapotina restringiria a ligação da CB a sítios farmacologicamente relevantes como a membrana pré-sináptica e células musculares esqueléticas. Após atingir estes sítios específicos, o complexo se dissociaria e a CB exerceria seu efeito de maneira altamente seletiva (Habermann & Breithaupt, 1978; Bon *et al.*, 1979; Gutiérrez e Owmbly, 2003).

Em adição, há evidências de que a CTX também promove atividade miotóxica local e sistêmica. Tal atividade é caracterizada por lesões musculares *in vivo*, observadas tanto nas proximidades quanto em regiões distantes do sítio de administração da toxina (Salvini *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2004); pelo incremento na atividade da enzima creatina quinase *in vivo* (Gutiérrez, *et al.*, 2008) e *in vitro* (Melo *et al.*, 2004); e pelo bloqueio das contrações diretas *in vitro* (Breithaupt, 1976; Hawgood & Smith, 1977). No presente estudo, não foram evidenciadas alterações celulares e nem tampouco bloqueio das contrações musculares diretas na preparação neuromuscular de camundongos submetida à ação da CTX. Estes achados podem ser atribuídos a baixa concentração de CTX utilizada neste estudo (0,3μM), que foi cerca de 4 a 50 vezes menor quando comparada àquelas utilizadas para induzir bloqueio das contrações diretas em camundongos (Hawgood & Smith, 1977) e ratos (Breithaupt, 1976), respectivamente.

A toxicidade aguda de venenos neurotóxicos tem sido relacionada à presença de neurotoxinas em sua composição (Lomonte *et al.*, 2003; Montecucco *et al.*, 2008). Estudos prévios evidenciam que a letalidade do veneno da *Crotalus durissus terrificus* bem como da CTX é neutralizada pelo extrato de Tc assim como pelo seu alcalóide isolado MMV (Batina *et al.*, 1997, 2000; de Almeida *et al.*, 2004). No entanto, os resultados do presente trabalho mostraram que o bloqueio neuromuscular promovido pela CTX, bem como por sua subunidade básica (CB), na preparação frênico-diafragma de camundongos, não foi neutralizado pelo extrato e nem tampouco pelo alcalóide. Como discutido anteriormente o potencial neutralizador do extrato etanólico de Tc é limitado por sua toxicidade, o que não ocorre com o alcalóide MMV. Embora os resultados do presente estudo *in vitro* não sejam diretamente comparáveis àqueles realizados *in vivo* (Batina *et al.*, 1997; 2000; de Almeida *et al.*, 2004) pode-se sugerir o envolvimento de processos farmacocinéticos nestes últimos que determinariam a capacidade neutralizadora tanto do extrato quanto do alcalóide. Outra hipótese a ser considerada é formação de um complexo tóxico originado a partir da interação da toxina tanto com os compostos do extrato vegetal quanto com o alcalóide, potencializando o bloqueio promovido pela toxina.

Em suma, os resultados obtidos no presente estudo mostram que o potencial neutralizador do extrato de Tc sobre os efeitos induzidos pela BthTX-I, na preparação neuromuscular de camundongos, é limitado por sua toxicidade. Por outro lado, o alcalóide MMV não apresentou toxicidade para a preparação neuromuscular e neutralizou parcialmente tanto o efeito miotóxico quanto o paralisante promovido pela BthTX-I *in vitro*. Estes resultados corroboram a hipótese de que ambos os efeitos induzidos pela toxina são decorrentes de sua atividade desestabilizadora de membrana. As simulações de *docking* molecular indicam a necessidade investigar se ocorre a formação de um complexo entre o alcalóide MMV e a BthTX-I e quais os sítios da toxina envolvidos nesta possível interação.

Em adição, demonstrou-se que tanto o extrato de Tc quanto o alcalóide MMV potencializaram o bloqueio neuromuscular induzido pela CTX bem como por sua subunidade básica (CB) na preparação neuromuscular de camundongos.

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- A avaliação do potencial antiofídico do extrato de Tc é limitada por sua toxicidade sobre a preparação neuromuscular de camundongos.
- O alcalóide MMV isolado deste extrato neutraliza parcialmente os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* de PLA<sub>2</sub> Lys49, mas não o efeito neurotóxico do complexo heterodimérico CTX ou de sua subunidade PLA<sub>2</sub> Asp49 *in vitro*
- A atividade neutralizadora parcial do alcalóide MMV sob ambos os efeitos, miotóxico e paralizante, induzidos pelas PLA<sub>2</sub>s Lys49 corrobora a hipótese de que tais efeitos são decorrentes da atividade desestabilizadora de membrana.
- A simulação de *docking* molecular indica a possibilidade da molécula do alcalóide MMV interagir com a estrutura da BthTX-I em regiões classicamente descritas como relevantes para a atividade desestabilizadora de membrana.

## **7.REFERÊNCIAS**

de ALMEIDA, L.; CINTRA, A.C.; VERONESE, E.L.; NOMIZO, A.; FRANCO, J.J.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v.137, p.19-27, 2004.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochem. Pharmacol.**, v.66, n.10, p.1993-2000, 2003.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A<sub>2</sub> - a structural review. **Toxicon**, v.34, n.8, p.827-841, 1996.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v.23, p.631-636, 1982.

BAO, Y.; BU, P.; JIN, L.; HONGXIA, W.; YANG, Q.; AN, L. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.37, n.3, p.558-565, 2005.

BATINA, M.F.C.; PENÇO, C.C.F. Estudo antropológico e ecológico/botânico do uso de plantas na medicina popular da cidade de Assis-SP. *In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 12, Assis, 1992. Resumos, 223, 1992.

BATINA, M.F.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Methodological care in the evaluation of the LD<sub>50</sub> and of the neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by the plant *Peschiera fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **J. Venom Anim Toxins.**, 3: 23-29, 1997.

BATINA, M.F.C.; CINTRA, A.C.O.; VERONESE, E.L.G.; LAVRADOR, M.A.S.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; DIAS, D.A.; FRANÇA, S.C.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: Identification of one the active components. **Planta Médica**, v.66, p.424–428, 2000.

BINGHAM III C.O.; AUSTEN, K.F. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in eicosanoid generation. **PROC. ASSOC. AM. PHYS.**, v.111, n.6, p.516-524, 1999.

BON, C.; CHANGEAUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, 99: 471-481, 1979.

BRAGA, R.M.; REIS, A.M. Quaternary alkaloids from *Peschiera fuchsiaefolia*. **Phytochemistry**, v.26, p.833-6, 1987.

BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8<sup>a</sup> Edição, Brasília, 2010.

BREITHAPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A<sub>2</sub> and the crotoxin complex. **Toxicon**, v.14, p.221-233, 1976.

BULBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. 1946. **Br. J. Pharmacol.**, v.120, p.3-26, 1997.

BULTRÓN, E.; GUTIÉRREZ, J.M.; THELESTAM, M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A<sub>2</sub>, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon**, v.31, n.2, p.217-222, 1993.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A<sub>2</sub> Biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v.23, n.1, p.49–59, 2009a.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. **J. Lipid. Res.**, v.50, p.237-42, 2009b.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrometry**, v.42, n.1, p.1405-1414, 2007.

CAVALCANTE, W.L.G.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. **Chem. Biological. Interac.**, v.151, p.95–100, 2005.

CAVALCANTE, W.L.G.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M; GALLACCI, M. Neutralization of snake Venom phospholipase toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, p.490-7, 2007.

CHANG, C.C., LEE, D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like b-bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v.296, p.159–168, 1977.

CHERDCHU, C.; SRISURAWAT, K.; RATANABANGKOON, K. Snake neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma sp* (Zingiberaceae). **J. Med. Assoc.**, v.61, p.544–550, 1978.

CHIOATO, L.; WARD, R.J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A<sub>2</sub> by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon.**, v.42, n.8, p.869- 883, 2003.

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

CINTRA-FRACISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; ÂNGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca<sup>2+</sup> influx in C2C12 myotubes. **Toxicon.**, v.44, n.2-3, p.590-6, 2010.

CORREA-DE SÁ, P.; TIMÓTEO, M.A.; RIBEIRO, P.A. Presynaptic A1 inhibitory/A2 facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigma the rat hemidiaphragm. **J. Neurophysiol.**, v.76, n.6, p.3910-3919, 1996.

CORREa-de SÁ, P.; TIMÓTEO, M.A.; NORONHA-MATOS, J.B.; FERREIRINHA, F.; MARQUES, P.; SOARES, A.M.; CARVALHO, C.; CAVALCANTE, W.L.C.; GALLACCI, M. Bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* venom reduces evoked [<sup>3</sup>H]-acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *IN: 10<sup>TH</sup> Meeting of the pan american section of the international society on toxinology*. San José, Costa Rica. Abstracts Book. 2010.

DA SILVA GIOTTO, M.T.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, C.O.; DE AZEVEDO JR, W.F.; ARNI, R.K.; and WARD, R.J. Crystallographic and Spectroscopic Characterization of a Molecular Hinge: Conformational Changes in Bothropstoxin I, a Dimeric Lys49-Phospholipase A<sub>2</sub> Homologue. **Proteins**, v.30, n.4, p.442–454, 1998.

DÍAZ, C.; ALAPE, A.; LOMONTE, B.; OLAMENDI, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Cleavage of the NH<sub>2</sub>-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> reduces its membrane-destabilizing effect. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.312, p.336–339, 1994.

FAURE, G. & BON, C. Crotoxin, a Phospholipase A<sub>2</sub> Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of Several Isoforms and Comparison of Their Molecular Structure and of Their Biological Activities? **Biochemistry**, v.27, p.730-738, 1988.

FERNANDES, C.A.; MACHI-SALVADOR, D.P.; SALVADOR, G.M.; SILVA, M.C.; COSTA, T.R.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxina-I reveals the role of Lys 122 and Ca<sup>2+</sup> - binding. **J. Struct. Biol.**, 2010.

FLETCHER, J.E.; HUBERT, M.; WIELAND, S.J.; GONG, Q.H.; JIANG, M.S. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. **Toxicon**, v.34, p.1301-11, 1996.

GALLACCI, M.; OLIVEIRA, M.; DAL PAI-SILVA, M.; CAVALCANTE, W.L.G.; SPENCER, P.J. Paralyzing and myotoxic effect of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.57, p.39-45, 2006.

GALLACCI, M. and CAVALCANTE, W.L.G. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologues. **Toxicon**, v.55, p.1–11, 2010.

GIJÓN, M.A.; LESLIE, C.C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activation. **J Leukoc. Biol.**, v.65, n.3, p.330-6, 1999.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v.42, n.8, p.915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med.**, v.3, n.6, p.150, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, A.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A<sub>2</sub>: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. **Toxicon**, v.51, p.80-92, 2008.

GUTIÉRREZ, J.M.; WILLIAMS, D.; FAN, W.E.; WARREL, D.A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v.56, n.7p.1223-35, 2010.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biologicals**, v.39, n.3 p.129-42, 2011.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. The crotoxin complex - an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v.16, n.1, p.19-30, 1978.

HAWGOOD, B.J., SMITH, J.W. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A - crotopotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. **Br. J. Pharmacol.**, v.61, p.597-606, 1977.

HELUANY N.F.; HOMSI-BRANDENBURGO, M.I.; GIGLIO J.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom on mouse and chicken muscle preparation. **Toxicon.**, v.30, p.203-210, 1992.

HENDON R.A.; FRANKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.68, p.1560-1563, 1971

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

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v.42, n.8, p.827-840, 2003.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A.L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.** 202 (3): 1165-1168, 1991.

LANDUCCI, E.C.T.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A.C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A.P.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon**, v.32, n.2, p.217-226, 1994.

LEEUEWENBERG, A. J. M. A revision of *Tabernaemontana*. The new world species and Stemmadenia. **The Royal Botanic Gardens: Kew**. 2, 1994.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> of Bothrops asper snake venom. **Toxicon**, v.32, n.11, p.1359-1369, 1994.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; ANGULO, Y.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Tyr→Trp substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its *in vivo* myotoxic effect. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1461, n.1, p.19-26, 1999a.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J.R.; OHNO, M.; DANIELE, J.J.; GEORGHEGAN, P.; GUVREZ, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**. 42 (8): 885-901, 1999b.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**. 42(8): 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. The phospholipase A<sub>2</sub> homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Protein Pept. Lett.**, v.16, n.8, p.860-76, 2009.

LYNCH, K.W. Regulation of alternative splicing by signal transduction pathways. **Adv. Exp. Med. Bio.**, v.623, p.161-174, 2007.

MAGRO, A.J.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A<sub>2</sub>: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.311, p.713-720, 2003.

MARAGANORE, J.M., MERUTKA, G., CHO, W., WELCHES, W., KE'ZDY, F.J., HEINRIKSON, R.L. A new class of phospholipases A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. **J. Biol. Chem.**, v.259, n.22, p.13839-13843, 1984.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STABELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.7, p.743-756, 2007.

MEBS, D.; KUCH, U.; CORONAS, F.I.V.; BATISTA, C.V.F.; GUMPRECHT, A.; POSSANI, L.D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhaovermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin. **Toxicon**, v.47, n.7, p. 797-811, 2006.

MELO, P.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v.31, n.3, p.285-291, 1993

MELO, P.A.; BURNS, C.F.; BLANKEMEYER, J.T.; OWNBY, C.L. Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle. **Toxicon**, v.43, p.111-119, 2004.

MOOLENAR, W.H.; KRANENBURG, O.; POSTMA, F.R.; ZONDAG, G.C. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. **Curr. Opin. Cellular Biol.**, v.9, n.2, p.168-73, 1997.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.65, n.18, p.2897-912, 2008.

MURAKAMI, M.T.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; MARTINEZ, A.B.; CALILELIAS, S.; TOMAZ, M.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **J. Mol. Biol.**, v.350, n.3, p.416-426, 2005.

NAKAGAWA, M.; NAKANISHI, K. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Lett.**, v.23, p.3855–3858, 1982.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger – Principles of Biochemistry**. 5<sup>a</sup> Edição, W.H. Freeman and Company, 2011.

NÚÑEZ, C.E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane damaging activities. **Toxicon**, v.39, n.10, p.1587-1594, 2001.

de OLIVEIRA, M.; CAVALCANTE, W.L.G.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon**, v.42, p.373-379, 2003.

de OLIVEIRA, R.C.; WEN, F.H.; SIFUENTES, D.N. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. *In*: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, S.F.O; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier. p.6-21, 2009.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. **Toxicon**, v.37, p.441-5, 1999.

PAN, H.; LIU, X.L.; OU-YANG, L.L.; YANG, G.Z.; ZHOU, Y.C.; LI, Z.P.; WU, X.F. Diversity of cDNAs encoding phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. **Toxicon**, v.36, n.8, p.1155-1163, 1998.

PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; OLIVEIRA, P.V.A.; BREVES, C.M.S.; PEREIRA, S.I.V. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and *in vitro* cytotoxicity. **Quim. Nova.**, v.31, n.1, p.20-24, 2008.

POLGÁR, J., MAGNENAT, E.M., PEITSCH, M.C., WELLS, T.N.C., CLEMETSON, K.J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-*M<sub>r</sub>* phospholipases A<sub>2</sub>: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub>, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v.319, n.3, p.961-968, 1996.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1770, p.585-593, 2007.

RANGEL, J.; QUESADAS, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B. Membrane cholesterol modulates the cytolytic mechanism of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of *Bothrops asper*. **Cell. Biochem. Funct.**, v.29, n.5, p.365-370, 2011.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v.260, n.21, p.11627-11634, 1985.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T.; IVE, P.RSSON, L.B. Epidemiology of poisonings snake-bites: a study of cases assisted in 1998. **Rev. Saúde Pública.**, v.29, n.5, p.4-7, 1993.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B.; PEREIRA, N.A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente venenos de cobras. **Rev. Bras. Farm.**, v.69, p.82-86, 1988.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; JIANG, M.S.; FLETCHER, J.E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin. **Toxicon**, v.33, p.479-1489, 1995.

ROSENFELD G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. *In*: Bucherl W, Buckley E, Deulofen V, editors. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press. v.2, 1971.

SALVINI, T.F.; AMARAL, A.C.; MIYABARA, E.H.; TURRI, J.A.O.; DANELLA, P.M.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v.39, n.8, p.1141-1149, 2001.

dos SANTOS, J.I.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J. Struct. Biol.**, v.167, p.106-116, 2009.

SIX, E.A. & DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1488, n.1-2, p.1-19, 2000.

SLOTTA, C.H.; FRAENKEL-CONRAT, M. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v.12, p.505-513, 1938.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.378, p.201-209, 2000.

SOARES, A.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.387, p.188-196, 2001.

SOARES, A.M.; TICLI, F.K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v.12, n.22, p. 2625-41, 2005.

VALENTIN, E. & LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie**, v.82, p.815-831, 2000.

VERONESE, E.L.; ESMERALDINO, L.E.; TROMBONE, A.P.; SANTANA, A.E.; BECHARA, G.H.; KETTELHUT, I.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v.12, p.123-30, 2005.

VITAL BRASIL, A. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan Symp. Int.**, v.33, p.981-992, 1966.

WARD, R.J.; de AZEVEDO JR, W.F. and ARNI, R.K. At the interface: crystal structures of phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v.36, n.11, p.1623-1633, 1998.

WHO, **World Health Organization**. Rabies and Envenomings: A Neglected Public Health Issue. Geneva, 2007.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; HARRISON, R.; WARRELL, D.A.; WHITE, J.; WINKEL, K.D; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v.375, p.89-91, 2010.

<http://www.saudeanimal.com.br> acesso em 15/08/2010.

<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/lorars/> acesso em 15/08/2010

[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)