



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MEQUITA FILHO”**

THIAGO MARCHI SACOMAN

**Efeito da interação entre bothropstoxina-I e crotapotina na
junção neuromuscular de camundongos “in vitro”**

Estágio em Iniciação Científica

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas Modalidade Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Gallacci
Co-orientador: Mestre Walter Luis Garrido Cavalcante

**Instituto de Biociências
UNESP - Botucatu
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Sacoman, Thiago Marchi.

Efeito da interação entre Bothropstoxina-I e Crotapotina na junção neuromuscular de camundongos “*in vitro*”: estágio em iniciação científica / Thiago Marchi Sacoman. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Márcia Gallacci

Co-orientadora: Mestre Luis Garrido Cavalcante

1.Toxicologia 2.Farmacologia 3. Serpentes - Veneno

Palavras-chave: Bothrópstoxina-I; Crotapotina; Junção neuromuscular

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio e suporte dado.

À Profa. Dra. Márcia Gallacci, pela oportunidade, atenção e conhecimento transmitido.

Ao Mestre Walter Luis Garrido Cavalcante, pelo apoio e dedicação na transmissão do conhecimento e das técnicas laboratoriais.

À Profa. Dra. Maeli Dal-Pae Silva e Sueli, pelo auxílio oferecido no desenvolvimento das técnicas histológicas.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Farmacologia e do Instituto de Biociências de Botucatu, pelo suporte e amizade.

À preciosa vida dos animais utilizados neste projeto.

Introdução.....	05
Objetivo.....	10
Material e Métodos	
Animais.....	11
Toxinas e Solução Nutriente.....	11
Estudo Funcional.....	11
Estudo Morfológico.....	13
Análise Estatística.....	14
Resultados.....	15
Discussão.....	21
Conclusão.....	25
Resumo.....	26
Referências Bibliográficas.....	28

Os acidentes ofídicos são um problema de saúde mundial, especialmente em regiões tropicais (Alfaro & Boza, 1983; Russel & Dart, 1991; Cheng & Currie, 2004). A maioria dos acidentes na América Latina envolve serpentes da família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, cujos principais gêneros são: *Bothrops* e *Crotalus* (Campbell & Lamar, 1989).

No Brasil, são registrados anualmente cerca de 20.000 acidentes, com letalidade em torno de 0,45% (Brasil - Ministério da Saúde, 2001). Destacam-se as serpentes do gênero *Bothrops*, que representam 85% das notificações, e as do gênero *Crotalus*, pelo elevado índice de letalidade dos acidentes (1,85%), (Pinho & Pereira, 2001; Bochner & Struchiner, 2003).

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (70 a 90%), em sua maioria toxinas ou enzimas tóxicas; podem conter ainda peptídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e componentes inorgânicos (Devi, 1971). As ações tóxicas dos venenos ofídicos podem atingir vários órgãos e sistemas, quer de modo direto, quer indiretamente, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, e incluem atividade *coagulante*, *anticoagulante*, *citotóxica* e *neurotóxica*, entre outras.

Os envenenamentos botrópicos são caracterizados por sintomas locais proeminentes, incluindo mionecrose, hemorragia e edema (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez & Lomonte, 1989). A mionecrose é um efeito tóxico local severo, que pode levar à perda tecidual permanente e à amputação, desabilitando o acidentado (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

O envenenamento crotálico, por sua vez, é caracterizado por manifestações sistêmicas decorrentes das atividades neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes do veneno (Azevedo-Marques et al., 2003). A neurotoxicidade é evidenciada após as primeiras seis horas do acidente por ptose palpebral, diplopia e flacidez da musculatura da face, caracterizando o “fáceis neurotóxico”, descrito por Rosenfeld (1971). Pode ocorrer dificuldade de deglutição e alterações do olfato e do paladar. Há relatos de insuficiência respiratória aguda, interpretada como decorrente de paralisia da musculatura intercostal e/ou diafragmática (Rosenfeld, 1971).

Grande parte da toxicidade dos venenos ofídicos é determinada pela ação de proteínas multifuncionais denominadas toxinas fosfolipases A₂ (PLA₂s). Em geral, as PLA₂s são enzimas dependentes de cálcio que catalisam a hidrólise da ligação éster *sn*-2 dos fosfolípidos de membrana, liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos (Waite, 1988; Rosenberg, 1990; Kudo et al., 1993; Kini, 1997; Núñez et al., 2001; Kini, 2003).

As PLA₂s encontradas nos venenos ofídicos podem ser divididas em dois grupos principais: as PLA₂s Asp49 que apresentam um resíduo de ácido aspártico na posição 49, essencial para a ligação do íon cálcio à proteína; e as PLA₂s Lys49 que apresentam a substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 49 pela lisina, impedindo a ligação do íon cálcio (Scott et al., 1992; Ownby et al., 1999). As PLA₂s Asp49 apresentam elevada atividade catalítica, enquanto que as PLA₂s Lys49 são enzimaticamente inativas.

A brotopstoxina-I (BthTX-I), principal miotoxina isolada do veneno da *Bothrops jararacussu* (Homsí-Brandeburgo et al., 1988), é uma PLA₂ Lys49 (Cintra et al., 1993), que forma homodímeros tanto no estado cristalino quanto em solução (Da Silva Giotto et al., 1998). Esta toxina induz intensa mionecrose, caracterizada por lesões musculares (Homsí-

Brandeburgo et al., 1988; Gutiérrez e Lomonte, 1995; Fletcher et al., 1996; Ownby et al., 1999) e por aumento da liberação de creatina quinase (CK) (Dos-Santos et al., 1992; Melo et al., 1993; Soares et al., 2002). Embora a BthTX-I não apresente efeitos neurotóxicos característicos *in vivo*, promove despolarização das fibras musculares, inibição do potencial de ação e paralisia das contrações musculares, evocadas direta ou indiretamente, em preparações neuromusculares *in vitro* (Heluany et al., 1992; Oshima-Franco et al., 2001; Soares et al., 2002). Os mecanismos desta paralisia muscular, observada apenas em preparações isoladas, e a sua relação com a atividade miotóxica da BthTX-I não se encontram estabelecidos.

A crotóxina (CTX) é a principal fração tóxica do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938). Trata-se de um hetero-dímero de 23.000 daltons composto por uma PLA₂ Asp49 básica e por uma subunidade ácida não-enzimática, denominada crotapotina (Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971; Breithaupt et al., 1974; Breithaupt, 1976). A CTX apresenta potente atividade neurotóxica, promovendo bloqueio da transmissão neuromuscular e morte devido à paralisia respiratória em animais experimentais (Vital Brazil, 1966; Breithaupt et al., 1974). Sua ação é predominantemente pré-sináptica, inibindo a liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas motoras (Chang & Lee, 1977; Hawgood & Smith, 1977). Todavia, também promove ação pós-sináptica, estabilizando o receptor nicotínico em estado dessensibilizado (Bon et al., 1979). Além da ação neurotóxica, a CTX exerce atividades miotóxica (Azevedo-Marques et al., 1982), hemolítica (Rosenfeld, 1971) e agregante plaquetária (Landucci et al., 1994).

Demonstrou-se que as duas subunidades da CTX atuam em sinergismo, visto que, isoladamente, a PLA₂ Asp49 é pouco tóxica, e a crotapotina é atóxica (Rübsamen et al.,

1971; Bon et al., 1979). Sugere-se que a crotapotina atue como um carreador da PLA₂ Asp49, evitando sua ligação a sítios não-específicos, e, portanto, potencializando sua toxicidade (Bon et al., 1979). Após a ligação da CTX a sítios específicos da membrana pré-sináptica e, provavelmente, também do músculo esquelético, o complexo PLA₂-crotapotina se desfaz; a crotapotina é liberada e a PLA₂ Asp49 exerce suas ações neurotóxicas e miotóxicas (Delót & Bon, 1993).

Estudos prévios (Choumet et al., 1993) demonstram que a crotapotina também forma complexos funcionais com β -neurotoxinas de cadeia unitária como a agkistrodotoxina da *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* e a ammodytoxina da *Vipera ammodytes ammodytes*, alterando a potência letal e a neurotoxicidade dessas toxinas. Da mesma forma, Landucci et al, (2000) demonstraram que a interação com a crotapotina poderia inibir ou potencializar a atividade edematogênica de PLA₂s provenientes de diferentes fontes (*Naja naja*, *Naja moçambique moçambique* e *Apis mellifera*). Paralelamente, essa interação também inibiu de forma significativa a atividade enzimática de todas as PLA₂s estudadas, indicando que alteração de suas atividades biológicas independe da atividade catalítica.

Em 2004, Cecchini e cols., observaram que a crotapotina também é capaz de interagir com PLA₂s (Asp-49 e Lys-49) oriundas de diversos venenos botrópicos, tais como BthTX-I e BthTX-II de *Bothrops jararacussu*, PrTX-I e PrTX-III de *Bothrops pirajai* e MjTX-II de *Bothrops moojeni*, reduzindo as atividades edematogênica e mionecrótica dessas toxinas.

Esses achados sugerem que a crotapotina pode ser um importante instrumento farmacológico para o estudo do mecanismo de ação e da relação entre estrutura e a

atividade biológica de toxinas PLA₂. No sentido de avançar no conhecimento dos mecanismos envolvidos nas ações paralisante e miotóxica da BthTX-I, investigou-se a possibilidade da crotapotina atuar como um carreador da BthTX-I, direcionando a sua ligação à sítios específicos na junção neuromuscular, de forma semelhante ao que faz com a PLA₂ Asp49 da CTX. Para tanto, avaliou-se através de técnicas miográfica e morfológica a interação da BthTX-I com a crotapotina em preparação neuromuscular de camundongos.

OBJETIVO

O estudo possuiu como principal objetivo avaliar o efeito da interação entre a crotapotina e BthTX-I, buscando um maior conhecimento da relação entre a estrutura química e a atividade biológica das toxinas PLA₂ ofídicas, bem como da fisiopatologia desses acidentes.

1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (18-22g), 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 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12/12 h).

2. Toxinas e Solução Nutriente

A BthTX-I e a crotapotina, sob forma purificada e liofilizada, foram fornecidas pelo Dr. Andreimar M. Soares, do Departamento de Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A solução nutriente apresentou a seguinte composição (milimoles/litro de água destilada): NaCl - 135; KCl - 5; MgCl₂ - 2; NaHCO₃ -15; Na₂HPO₄ - 1; CaCl₂ - 2; glicose - 11. Todos os reagentes eram de qualidade pró-análise. Para o registro das contrações diretas, foi adicionada à cuba cloreto de d-tubocurarina (Sigma).

3. Estudo Funcional

3.1. *Preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongo.*

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As preparações do nervo frênico-músculo diafragma foram removidas e montadas verticalmente em cuba para órgão

isolado contendo 15 ml de solução nutriente, constantemente borbulhada com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂), de acordo com técnicas descritas anteriormente (Gallacci et al., 1998; 2000). As preparações foram mantidas a 35 ± 1 °C. A região costal do músculo diafragma foi conectada a um suporte de vidro em forma de “L” e o tendão conectado a um transdutor de tensão isométrica.

3.1.1. Registro das Contrações Indiretas

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 provocadas indiretamente, por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 milisegundos e intensidade supra-máxima.

3.1.2 Registro das Contrações Diretas

O músculo foi posicionado entre os pólos de um eletrodo bipolar de platina, acoplado a um estimulador elétrico. As contrações foram evocadas por pulsos elétricos retangulares com duração de 4 milisegundos e intensidade supra-máxima. Para evitar alguma contribuição da contração indireta, foi adicionado à solução nutriente d-tubocurarina (10 µM).

3.1.3. 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. 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, substituído a cada 15 minutos. Após os 45 minutos de estabilização, foram registrados 15 minutos de contrações controle (na ausência das proteínas). A seguir, a BthTX-I (1 μ M), a crotapotina (2 μ M) ou a mistura da BthTX-I com a crotapotina foi adicionada ao banho. Subseqüentemente, foi avaliado o tempo para o estabelecimento do bloqueio total das contrações, ou o decréscimo percentual das contrações indiretas (em 90 minutos) e das diretas (em 120 minutos), A mistura da BthTX-I com a crotapotina, na relação molar de 1:2, foi pré-incubada por um período de 30 minutos a temperatura de 35 ± 1 °C, conforme descrito anteriormente em Cecchini e cols (2004).

4. Estudo Morfológico

Os músculos diafragma de camundongo, utilizados no estudo funcional, tiveram suas características morfológicas avaliadas através de microscopia óptica. Fragmentos do músculo foram retirados e fixados em historresina. Cortes com 3 μ m de espessura foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE), para a avaliação do padrão morfológico. As preparações histológicas coradas com HE foram submetidas à análise quantitativa. Em cada músculo foram analisados cinco campos microscópicos diferentes. O número de fibras lesadas foi representado como porcentagem do número total de fibras (normal + lesadas) em cada campo. Este estudo utilizou um sistema de análise de imagens computadorizado (Qwin, Leica Germany).

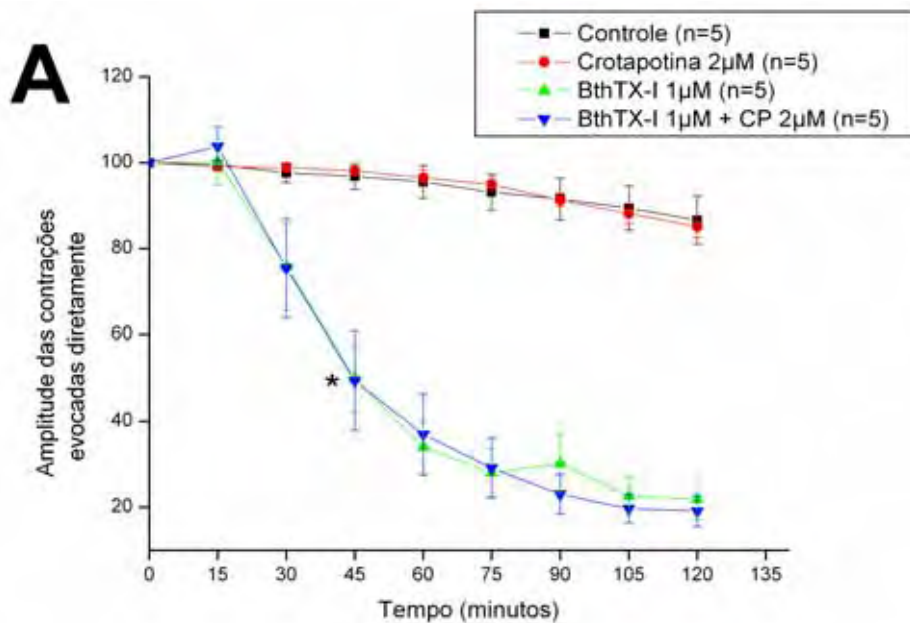
5. Análise Estatística

A maioria das variáveis estudadas no presente trabalho não obedeceu à distribuição normal. Desta forma, a análise estatística foi realizada através de testes não-paramétricos de Mann-Whitney (para comparação de duas amostras) e de Kruskal-Wallis (para comparação de mais de duas amostras), com $p < 0,05$. Apesar da utilização de testes não-paramétricos, para facilitar a visualização dos resultados, estes foram expressos sob a forma de média e erro padrão, tomados respectivamente como medidas de tendência central e de dispersão.

Estudo Funcional

A BthTX-I induziu bloqueio irreversível e tempo-dependente das contrações musculares evocadas direta ou indiretamente nas preparações do músculo diafragma e do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (figuras 1A e 1B). Todavia, o bloqueio das contrações indiretas estabeleceu-se em um intervalo de tempo significativamente menor em relação ao bloqueio das contrações diretas (Tabela 1).

Isoladamente, a crotapotina não apresentou efeitos próprios sobre as contrações musculares evocadas direta e indiretamente. Da mesma forma, a crotapotina não alterou significativamente o bloqueio das contrações diretas e indiretas induzidos pela BthTX-I.



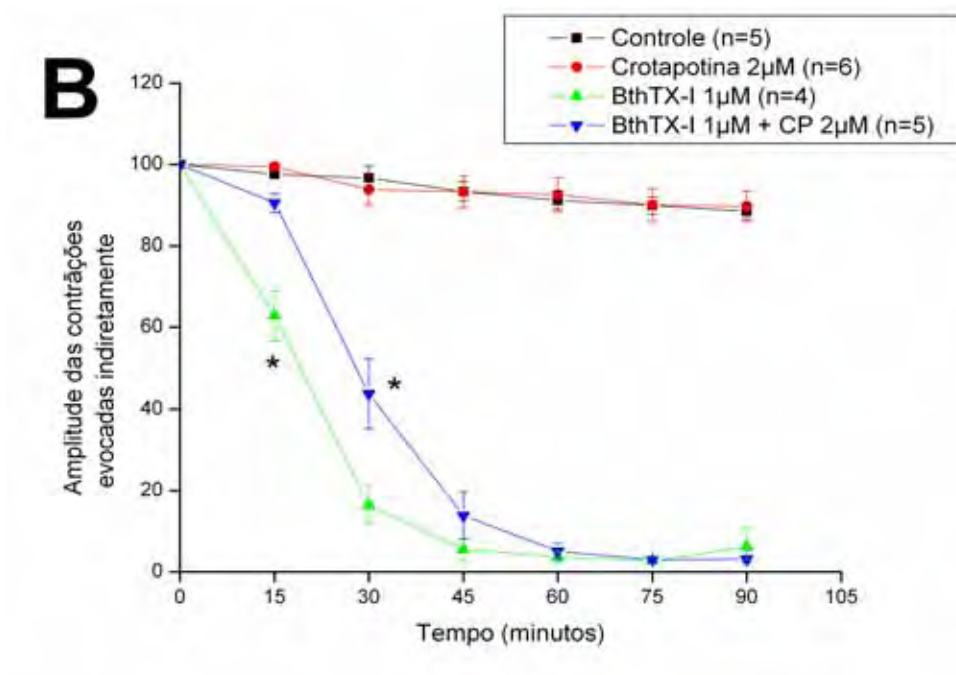


Figura 1 - Efeitos da BthTX-I (1 μ M) e do produto de pré-incubação da BthTX-I (1 μ M) com Crotopotina (2 μ M) em contrações musculares evocadas direta (A) e indiretamente (B) em preparações frênico-diafragma de camundongos. As ordenadas representam a amplitude das contrações (%) em relação à amplitude inicial. As abscissas indicam o tempo (minutos) após a adição das toxinas. As barras verticais representam o e.p.m. *indica o momento a partir do qual se estabelece diferença significativa em relação ao controle. ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Tempo médio ($t_{1/2}$) para o decréscimo de 50% da amplitude das contrações musculares isoladas, evocadas direta ou indiretamente, em preparações frênico-diafragma de camundongos, submetida à ação da BthTX-I.

<i>Toxina / Contrações</i>	<i>Contração direta</i> <i>$t_{1/2}$ (minutos)</i>	<i>Contração indireta</i> <i>$t_{1/2}$ (minutos)</i>
<i>BthTX-I (1,0 μM)</i>	<i>45,966 \pm 5,605 (n = 5)</i>	<i>18,9825 \pm 1,936* (n = 4)</i>

Valores expressos em média \pm erro padrão da média, do número de experimentos indicados em parênteses. * indica diferença significativa em relação à contração direta ($p < 0,05$).

$t_{1/2}$ estimado através de interpolação linear dos resultados apresentados nos gráficos de decurso temporal dos efeitos da BthTX-I sobre as contrações diretas e indiretas.

Estudo Morfológico

A figura 2 mostra, através da microscopia óptica, a aparência do músculo diafragma dos grupos controle e submetidos à ação da crotapotina. A análise mostrou que, em ambas as situações, a maioria das fibras apresentou aspecto normal com formato poligonal, sarcoplasma acidófilo e núcleos localizados na periferia. As fibras musculares apresentavam-se organizadas em fascículos ou feixes delimitadas pelo perimísio, e cada fibra muscular envolta pelo endomísio. Mesmo assim, algumas fibras dos grupos controle ($1,99 \pm 0,39\%$) e crotapotina ($2,97 \pm 0,28\%$) mostraram alguma alteração.

A presença da BthTX-I na preparação promoveu um aumento significativo do índice de mionecrose ($20,71 \pm 3,62\%$). Os músculos apresentaram fibras com aspecto arredondado, mostrando muitas áreas com desintegração ou ausência de miofibrilas e edema entre as fibras musculares (figura 2C). Essas mesmas características foram observadas nas fibras expostas ao produto de pré-incubação da BthTX-I com a crotapotina (figura 2D). Nesta situação também se constatou aumento significativo do índice de mionecrose ($13,17 \pm 0,98\%$) em relação às preparações controles, porém tal índice não diferiu significativamente em relação ao grupo exposto apenas à BthTX-I.

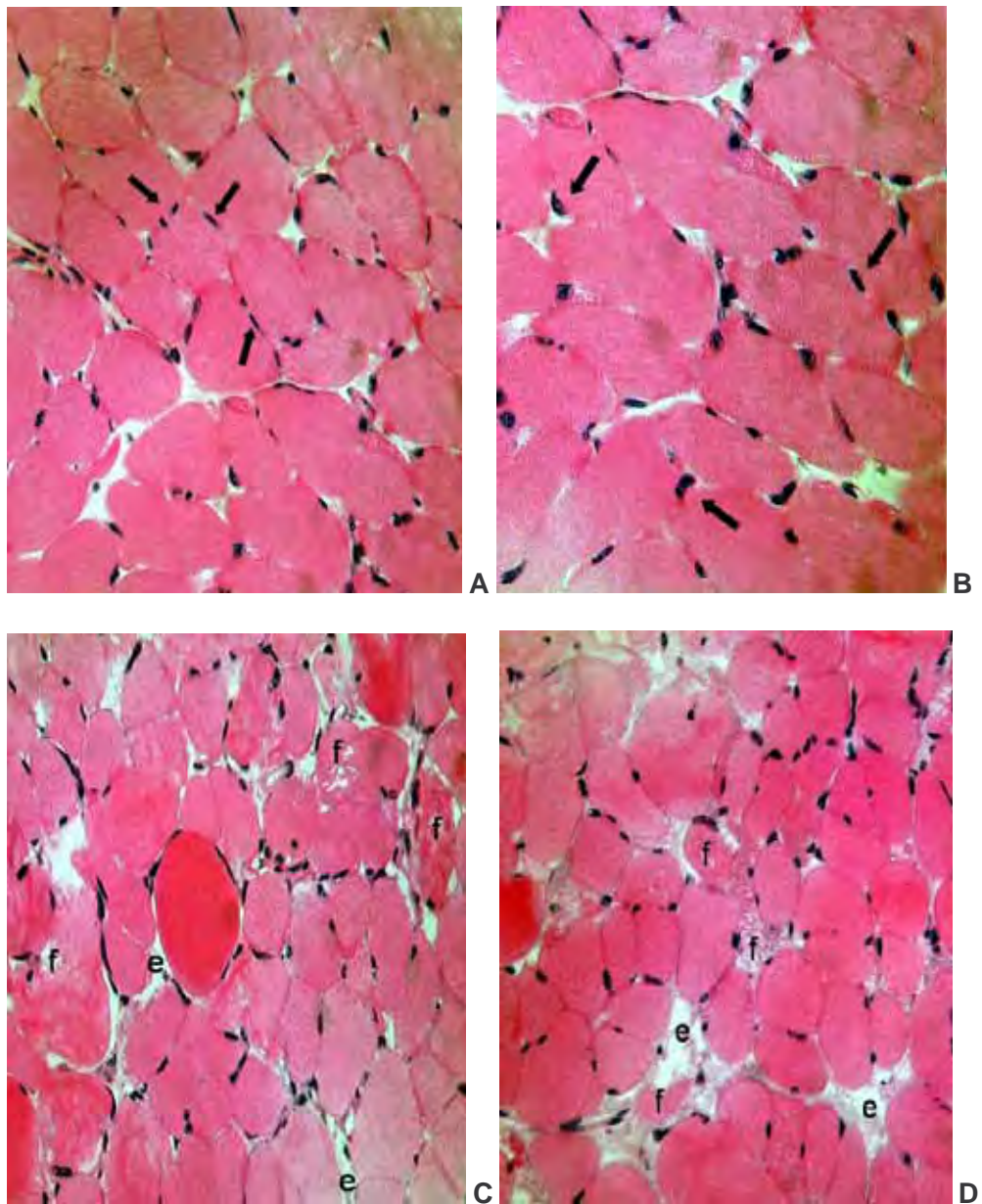


Figura 2 – Microscopia óptica do músculo diafragma de camundongos submetidos à coloração hematoxilina e eosina (HE). Músculos controle (A) e expostos a crotapotina (B) com aparência normal das fibras. Notar o aspecto poligonal das fibras e núcleo periférico (setas). (A) e (B), 80x. (C): músculo exposto a BthTX-I mostrando edema (e) e

fibras arredondadas com perda das miofibrilas (f), 80x. (D): músculo exposto ao produto da pré-incubação da BthTX-I com crotapotina apresentando a maior parte das fibras com aspecto semelhante às do grupo submetido à ação da BthTX-I, 80x.

Um grande número de investigações vem sendo realizado na expectativa de esclarecer os mecanismos de ação e a relação estrutura-atividade das PLA₂ miotóxicas encontradas nos venenos ofídicos, visando o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento destes acidentes (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Heluany et al., 1992; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Rodrigues-Simioni et al., 1995; Fletcher et al., 1996; Ownby et al., 1999, Chioato et al., 2002; Ward et al., 2002). No presente estudo utilizou-se a crotapotina, como instrumento farmacológico, para avaliar a possível relação entre as atividades miotóxica e paralisante da BthTX-I, uma PLA₂Lys49 isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*.

Há um consenso na literatura de que o sítio inicial de ação das miotoxinas PLA₂ Lys49 é a membrana plasmática das células musculares (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999). Evidências experimentais (Mebs & Ownby, 1990; Díaz et al., 1991; Rufini et al., 1992) sugerem que estas miotoxinas se ligam em um sítio, ainda não identificado, na membrana plasmática da célula muscular, que pode ser uma proteína, um domínio fosfolipídico carregado negativamente, ou qualquer outro tipo de componente da membrana (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Propõe-se que a toxina estabeleça, inicialmente, uma interação eletrostática fraca com as porções negativas da membrana, utilizando aminoácidos básicos das regiões C-terminal (115-129) (Lomonte et al., 1994b; Núñez et al., 2001; Chioato et al., 2002; Lomonte et al., 2003) e, também, com possível contribuição dos resíduos da α -hélice N-terminal (Díaz et al., 1994; Kato et al., 1994).

Após esta ligação inicial, as miotoxinas penetrariam na bicamada lipídica por

interação hidrofóbica mediada pela região C-terminal da molécula (Lomonte et al., 1994b, 1999, 2003), promovendo a desestabilização da membrana celular com conseqüente perda da regulação da permeabilidade a íons e macromoléculas (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Estudos paralelos utilizando técnicas de cristalografia de raios-X e espectroscopia de fluorescência revelaram que a BthTX-I é um homodímero, que apresenta alteração conformacional entre formas aberta e fechada. Sugeriu-se, então, que após a ligação da BthTX-I a sítios negativos da membrana celular, a transição entre as formas aberta e fechada do dímero levaria à desorganização da bicamada lipídica, que resultaria no rompimento da membrana celular (Da Silva Giotto et al., 1998). Sugere-se que o evento principal da patogênese do dano celular seria a entrada maciça de íon cálcio, que promoveria alterações citoesqueléticas (hipercontração de miofilamentos), danos mitocondriais, e ativação de proteases e fosfolipases cálcio-dependentes, que ampliariam os danos celulares (Gutiérrez & Lomonte, 1995), determinando o estabelecimento da mionecrose.

Em contraste a ação miotóxica da BthTX-I, que está envolvida na gênese de uma manifestação clínica característica do envenenamento botrópico, a atividade bloqueadora neuromuscular desta toxina se estabelece apenas em preparações isoladas e não tem seu mecanismo de ação totalmente esclarecido. Alguns dados da literatura sugerem uma possível ação pré-sináptica inibitória para esta toxina (Oshima-Franco et al., 2004). Desta forma, o conhecimento dos mecanismos determinantes da ação paralisante da BthTX-I *in vitro*, e a sua relação com a atividade miotóxica são fundamentais para a compreensão da fisiopatologia do envenenamento botrópico.

Entre as neurotoxinas ofídicas, destaca-se a crotoxina, da *Crotalus durissus*

terrificus, cujo efeito neurotóxico é potencializado pela crotapotina, uma subunidade não-enzimática e atóxica. A crotapotina atua como carreadora da PLA₂ Asp49 da crotoxina, direcionando sua ligação a sítios específicos na terminação nervosa motora (Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971; Breithaupt et al., 1974; Breithaupt, 1976; Bon et al., 1979). Assim, investigou-se no presente trabalho, a possibilidade da BthTX-I manifestar algum potencial efeito neurotóxico, ao avaliar sua interação com a crotapotina em preparações neuromusculares isoladas.

A literatura apresenta uma série de evidências de que a crotapotina é capaz de formar complexos e alterar a atividade biológica de PLA₂ proveniente de diversas fontes (Choumet et al, 1993; Landucci et al, 2000; Cecchini et al, 2004). Todavia, o efeito do produto de interação é altamente dependente do tipo de PLA₂, bem como de sua relação molar com a crotapotina. A partir de experimentos estruturais, Cecchini e cols. (2004) apresentaram evidências da formação de complexos entre crotapotina e várias PLA₂s botrópicas na relação molar de 2:1 (crotapotina: PLA₂). Os resultados do presente estudo mostram que nesta mesma relação molar a crotapotina não alterou o efeito paralisante da BthTX-1, sugerindo que o possível complexo formado é destituído de funcionalidade. Sendo assim, este achado pode ser um indicativo de que a BthTX-I não apresenta potencial neurotóxico com padrão semelhante ao da crotoxina. No entanto, não se pode afastar cabalmente a possibilidade de complexo entre a crotapotina e a BthTX-I não ter se formado nas condições experimentais do presente trabalho.

Os resultados deste estudo mostram que, paralelamente, a atividade miotóxica também não foi afetada pela crotapotina, o que sugere uma relação estrita entre as atividades paralisante e miotóxica da BthTX-I. Assim é provável que o bloqueio

neuromuscular, promovido pela BthTX-I em preparações isoladas, seja consequência de sua ação destabilizadora de membrana celular. Desta forma, o colapso do gradiente iônico levaria à despolarização celular, perda da excitabilidade da membrana e paralisia muscular. A observação de que as contrações indiretas foram mais sensíveis ao bloqueio do que as contrações diretas provavelmente se deve a maior susceptibilidade do processo de transmissão neuromuscular à despolarização do que o processo contrátil, como sugerido anteriormente para o veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Souza et al., 2002) e para a BthTX-I (Oliveira et al., 2003; Cavalcante et al., 2005; Gallacci et al., 2006).

Em resumo, os resultados deste trabalho demonstraram que a crotapotina não forma complexo funcional com a BthTX-I nas relações molares estudadas. Os achados de que essas atividades não se dissociaram, ou seja, não houve inibição da atividade paralisante nem da miotóxica, reforçam a hipótese de que estes efeitos são decorrentes do mesmo mecanismo de ação da BthTX-I. Sendo assim, a paralisia muscular induzida por esta toxina, provavelmente, decorre da despolarização da fibra muscular causada por sua ação miotóxica.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que não houve a formação de um complexo funcional entre a crotopotina e a BthTX-I na relação molar de 2:1, sugerindo que a BthTX-I não apresenta potencial neurotóxico com padrão semelhante ao da crotoxina.

A interação com a crotopotina não revelou dissociação das atividades paralisante e miotóxica da BthTX-I.

Os achados deste estudo fortalecem a hipótese de que tanto o efeito paralisante quanto o miotóxico são decorrentes do mesmo mecanismo de ação, sugerindo que a paralisia muscular é consequência da alteração da atividade desestabilizadora da membrana celular da BthTX-I.

A precocidade do bloqueio das contrações indiretas se deve, provavelmente, a elevada sensibilidade do processo de transmissão neuromuscular à despolarização celular.

A bothropstoxina-I (BthTX-I) é uma fosfolipase A₂ (PLA₂) Lys49 miotóxica isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*. Embora seja desprovida de atividade neurotóxica *in vivo*, esta toxina bloqueia a transmissão neuromuscular *in vitro*. A relação entre as atividades miotóxica e paralisante da BthTX-I ainda não está esclarecida. A crotapotina corresponde à subunidade não-enzimática da crotoxina, principal fração tóxica do veneno da *Crotalus durissus terrificus*. Isoladamente a crotapotina é atóxica, porém atua como carreadora da PLA₂ Asp49 da crotoxina, potencializando sua ação neurotóxica. Esta proteína também é capaz de se complexar com outras PLA₂s (Asp49 ou Lys49) de venenos ofídicos, alterando suas toxicidades. Neste trabalho avaliamos a influência da crotapotina sobre o bloqueio neuromuscular e a atividade miotóxica da BthTX-I *in vitro*.

Preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos machos foram montadas em cubas para o registro das contrações musculares evocadas direta e indiretamente. Cortes transversais do músculo foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina para a avaliação do padrão morfológico. A BthTX-I (1 µM) isoladamente, ou pré-incubada com crotapotina (2 µM) à 35 °C por 30 minutos, foram adicionadas às preparações. A análise dos dados foi realizada por testes não paramétricos ($p < 0.05$).

A BthTX-I induziu bloqueio irreversível e tempo-dependente das contrações musculares diretas e indiretas. O tempo para o bloqueio de 50% das contrações indiretas ($18,98 \pm 1,94$ min, $n=4$) foi significativamente menor que o das diretas ($45,97 \pm 5,61$ min, $n=5$). A pré-incubação com a crotapotina não alterou de forma significativa o bloqueio das

contrações diretas ou indiretas induzidos pela BthTX-I. Isoladamente, a crotapotina não afetou as contrações musculares evocadas diretas ou indiretamente. A maioria das fibras musculares controles e expostas à crotapotina apresentaram aspecto normal ($1,99 \pm 0,39\%$, $n=5$ e $2,97 \pm 0,28\%$, $n=6$ de lesões, respectivamente). A BthTX-I e o produto de sua pré-incubação com a crotapotina induziram aumentos significativos das lesões ($20,71 \pm 3,62\%$, $n=5$ e $13,17 \pm 0,98\%$, $n=5$, respectivamente), que não diferiram entre si.

Os resultados indicam que não houve a formação de um complexo funcional entre a BthTX-I e a crotapotina na relação molar de 1:2, visto que nesta relação não houve alterações significativas da paralisia muscular e da mionecrose induzidas pela BthTX-I. Todavia, a interação com a crotapotina não revelou dissociação das atividades paralisante e miotóxica da BthTX-I. Isso sugere que a paralisia muscular é consequência da despolarização celular decorrente da desestabilização da membrana induzida pela BthTX-I. A precocidade do bloqueio das contrações indiretas se deve, provavelmente, a elevada sensibilidade do processo de transmissão neuromuscular à despolarização celular.

REFERÊNCIAS

Alfaro BB, Boza MA. Ofidismo en hospital rural del Pacífico Sur durante 1981. *Acta Med Costarric* 1983; 26: 24-7.

Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Acidente Crotálico. In: Cardoso JLC, França SFO, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editores. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos*. São Paulo: Sarvier; 2003. p.91-98.

Azevedo-Marques MM, Kimachi T, Coimbra TM. Rabdomiólise e Necrose Tubular Aguda (NTA) mioglobínúria após acidente crotálico. XI Congresso Brasileiro de Nefrologia, Guarapará, Anais 1982: 111.

Bochner R, Struchiner CJ. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública* 2003; 19: 7-16.

Bon C, Changeaux JP, Jeng TW, Fraenkel-Conrat H. Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits. *Eur J Biochem* 1979; 99: 471-481.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: MS. 2001. 112p.

Breithaupt H, Rübsamen K, Habermann E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotapotin and the basic *Crotalus* phospholipase A. *Eur J Biochem* 1974; 49: 333-45.

Breithaupt H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A2 and the crotoxin complex. *Toxicon* 1976; 14: 221-233.

Campbell JA, Lamar WW. *Venomous reptiles of Latin America*. New York:

Comstock, 1989. 425 p.

Cavalcante WL, Dal Pai-Silva M, Gallacci M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. *Chem Biol Interact.*, 2005; 151(2): 95-100.

Cecchini AL, Soares AM, Cecchini R, de Oliveira AH, Ward RJ, Giglio JR, Arantes EC. Effect of crotafotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from *Bothrops* snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 138: 429-36.

Cintra ACO, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem* 1993; 12: 57-64.

Chang CC, Lee D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β -bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedebers Arch Pharmacol* 1977; 296: 159-168.

Cheng AC, Currie BJ. Venomous snakebites worldwide with a focus on the Australia-Pacific region: current management and controversies. *J Intensive Care Med* 2004; 19: 259-69.

Chioato L, De Oliveira AH, Ruller R, Sa JM, Ward RJ. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A2. *Biochem J* 2002; 366: 971-76.

Choumet V, Saliou B, Fideler L, Chen YC, Gubensek F, Bon C, Delót E. Snake-venom phospholipase A₂ neurotoxins – Potentiation of a single-chain neurotoxin by the chaperon subunit of a two-component neurotoxin. *Eur. J. Biochem.* 1993; 211: 57 – 62.

Da Silva Giotto MT, Garratt RC, Oliva G, Mascarenhas YP, Giglio JR, Cintra ACO,

Arni RK, Ward RJ. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformation changes in Bothropstoxin-I, a dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologue. *Protein Struct FunctGenet* 1998; 30: 442.

Delót E, Bon C. Model of interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with pre-synaptic membranes. *Biochemistry* 1993; 32: 10708-10713.

Devi A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: Bucherl W, Buckley E, Deulofen V, editors. *Venomous animals and their venoms*. New York: Academic Press; 1971.

Díaz C, Alape A, Lomonte B, Olamendi T, Gutierrez JM. Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane-destabilizing effect. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312: 336-9.

Díaz C, Gutiérrez JM, Lomonte B, Gené JA. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposome: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1070: 455-460.

Dos-Santos MC, Gonçalves LRC, Fortes-Dias CL, Cury Y, Gutiérrez JM, Furtado MFD. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev Inst Med Trop* 1992; 37: 77-83.

Fletcher JE, Hubert M, Wieland SJ, Gong QH, Jiang MS. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon* 1996; 34: 1301-1311.

Gallacci M, Nascimento N, Rogero J, Vassiliev VS. Influence of temperature upon effects of crotoxin and gamma-irradiated crotoxin at rat neuromuscular transmission. *Toxicol Lett* 2000; 114: 77-80.

Gallacci M, Nunes EC, Moreira EG, Nascimento N, Rogero JR, Vassilieff VS. Reduction of crotoxin-induced neuromuscular blockade by gamma radiation. *Toxicon* 1998; 36: 941-945.

Gallacci M, Oliveira M, Dal Pai-Silva M, Cavancante WL, Spencer PJ. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. *Exp Toxicol Pathol.* 2006; 57(3): 239-45.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. *Mem Inst Butantan* 1989; 52: 211-23.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995; 33: 1405-24.

Hawgood BJ, Smith JW. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. *Br J Pharmacol* 1977; 61: 597-606.

Heluany NF, Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon* 1992; 30: 1203-10.

Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 1560-3.

Homsí-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988; 26: 615-627.

Kato T, Lee S, Oishi O, Aoyagi H, Ohno M. Interactions of N-terminal fragments of groups I and II phospholipases A₂ with phospholipid bilayers and their surface recognition

properties. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Mar 3;1211(2):215-20.

Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 2003; 42: 827-40.

Kini RM. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes*, Eds. Wiley, West Sussex; p. 1-28; 321-358, 1997.

Kudo I, Murakami M, Hara S, Inouie K. Mamalian non-pancreatic phospholipase A₂. *Biocim Biophys Acta* 1993; 117: 217-231.

Landucci EC, Toyama M, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, de Nucci G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 2000; 38: 199-208.

Landucci ECT, Condino-Neto A, Perez AC, Hyslop S, Corrado AP, Novello JC, Marangoni S, Oliveira B, Antunes E, Nucci G. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. *Toxicon* 1994; 32: 217-226.

Lomonte B, Angulo Y, Calderon L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*. 2003; 42(8): 885-901.

Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LA, Maccarana M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem*, v.269, p. 29.867, 1994b.

Lomonte B, Pizarro-Cerdá J, Angulo Y, Gorvel JP, Moreno E. Tyr → Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A₂ expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim et Biophys Acta*

1999; 1461: 19.

Mebs D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmac Ther* 1990; 48: 223-36.

Melo PA, Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR, Suarez-Kurtz G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon* 1993; 31: 285-91.

Núñez CE, Angulo Y, Lomonte B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 2001; 39: 1587.

Oliveira M, Cavalcante WL, Arruda EZ, Melo PA, Dal Pai-Silva M, Gallacci M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. *Toxicon* 2003; 42: 373-379.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Belo CA, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cintra AC, Giglio JR, Da Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95(4): 175-82.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Silva GH, Cardoso DF, Hyslop S, Giglio JR, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. *Toxicon* 2001; 39: 1477-85.

Ownby CL, Selistre De Araujo HS, White SP, Fletcher JE. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon* 1999; 37: 441-445.

Pinho FM, Pereira ID. Snake bites. Rev Assoc Méd Bras 2001; 47: 24-9.

Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience 1983; 10(2): 475-89.

Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J, Cintra ACO, Giglio JR, Hang MS, Fletcher JE. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys-49 phospholipase A₂ myotoxin. Toxicon 1995; 33: 1479-1489.

Rosenberg P. Phospholipases. Handbook of Toxicology. New York: Marcel Dekker, p.67, 1990.

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

Rübsamen K, Breithaupt H, Habermann E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol 1971; 270: 274-88.

Rufini S, Cesaroni P, Desideri A, Farias R, Gubensek F, Gutiérrez JM, Luly P, Massoud R, Morero R, Pederson JZ. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. Biochemistry 1992; 31: 12,424.

Russel FE, Dart RC. Toxic effects of animal toxins. New York: Pergamon Press, 1991. p. 753-803.

Scott DL, Achari A, Vidal JC, Sigler PB. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus*

piscivorus. J Biol Chem 1992; 267: 22645-57.

Slotta CH, Fraenkel-Conrat M. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. Mem Inst Butantan 1938; 12: 505-513.

Soares AM, Oshima-Franco Y, Vieira CA, Leite GB, Fletcher JE, Jiang MS, Cintra AC, Giglio JR, Rodrigues-Simioni L. Mn(2+) ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. Int J Biochem Cell Biol 2002; 34: 668-77.

Souza FA, Spencer PJ, Rogero JR, Nascimento N, Dal Pai-Silva M, Gallacci M. ⁶⁰Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. Toxicon 2002; 40(8): 1101-106.

Vital Brazil O. Pharmacology crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. Mem Inst Butantan 1966; 33: 981-992.

Waite M. The Phospholipases: Handbook of Lipid Research. New York: Plenum Press, 1988.

Ward RJ, Chioato L, De Oliveira AHC, Ruller R, Sá JM. Active-site mutagenesis of a Lys 49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. Biochem J 2002; 362: 89.