

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Caracterização das atividades de PLA₂s Lys49, isoladas de
venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, em preparação
neuromuscular de camundongos e influência de agentes
neutralizadores**

WALTER LUÍS GARRIDO CAVALCANTE

BOTUCATU - SP

2009

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

**Caracterização das atividades de PLA₂s Lys49, isoladas de
venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, em preparação
neuromuscular de camundongos e influência de agentes
neutralizadores**

WALTER LUÍS GARRIDO CAVALCANTE

PROF^a DR^a MÁRCIA GALLACCI

ORIENTADORA

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

BOTUCATU - SP

2009

*Dedico esta tese aos meus pais, Paulo e Vera,
ao meu irmão Renato e a minha avó Guiomar.*

À Profa. Dra. Márcia Gallacci pela dedicação, confiança e oportunidade durante todos esses anos. Obrigado por tudo.

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

À Profa. Dra. Maeli Dal Pae Silva pelo ensino das técnicas histológicas.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares por sua colaboração através do fornecimento das toxinas e extratos vegetais.

Aos amigos, funcionários e docentes da Universidade Estadual Paulista pelo apoio e amizade.

À FAPESP e ao Cnpq pela contribuição para o desenvolvimento deste projeto.

INTRODUÇÃO	39
OBJETIVOS	8
1. Objetivo geral.....	9
2. Objetivos específicos.....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
1. Drogas, Toxinas e Extrato Vegetal.....	11
2. Soluções Nutrientes.....	11
3. Animais.....	11
4. Estudo Funcional	12
4.1 Preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongo.....	12
4.2 Protocolo Experimental do Estudo Funcional	13
5. Estudo Morfológico e Morfométrico	14
6. Estudo Eletrofisiológico	14
7. Análise Estatística.....	15
RESULTADOS	16
1. Estudo Funcional	17
1.1 Influência das PLA ₂ s Lys49 sobre as contrações musculares diretas e indiretas na preparação frênico-diafragma de camundongo	17
1.2 Influência da suramina sobre o efeito da MjTX-II na preparação frênico-diafragma de camundongo.....	19
1.3 Influência do extrato aquoso de <i>Casearia sylvestris</i> sobre a ação das PLA ₂ s Lys49 na preparação frênico-diafragma de camundongo.....	21
2. Estudo Morfológico e Morfométrico	23
3. Estudo Eletrofisiológico	27
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	37
RESUMO	39
ABSTRACT	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de Saúde Pública, principalmente em áreas rurais de regiões tropicais, devido a elevada frequência com que ocorrem e a morbidade e mortalidade que ocasionam (Chippaux, 1998; Pinho & Pereira, 2001).

No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos é causada por serpentes pertencentes à família Viperidae dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (Campbell & Lamar, 1989; de Oliveira et al., 2009). No período de 2000 a 2007 foram registrados 192.703 acidentes ofídicos no país, sendo 87 % botrópicos, com índice de letalidade de 0,4 %, e 9 % crotálicos, com mortalidade de 1,1 % (de Oliveira et al., 2009).

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. Os venenos crotálicos praticamente não produzem reações locais, o envenenamento é caracterizado por três atividades sistêmicas de relevância clínica (Azevedo-Marques et al., 2009). A coagulante, evidenciada por distúrbios da coagulação devido ao consumo de fibrinogênio (Kamiguti & Sano-Martins, 1995); a miotóxica sistêmica que determina rabiólise generalizada, podendo evoluir para insuficiência renal aguda (Azevedo-Marques et al., 1982); e a neurotóxica periférica caracterizada por paralisia flácida da musculatura esquelética que, em casos graves, pode ocasionar insuficiência respiratória (Rosenfeld, 1971). Em contraste, os venenos botrópicos não apresentam manifestações clínicas de neurotoxicidade, mas apresentam sintomas locais proeminentes incluindo dor, edema, mionecrose e hemorragia (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez et al., 1989; Gutiérrez & Ownby 2003; Kini, 2003; Lomonte et al., 2003; França & Malaque, 2009). São observados também efeitos sistêmicos como: alterações cardiovasculares, especialmente hemorragias e choque hipovolêmico (Rosenfeld, 1971; França & Malaque, 2009), desordens da coagulação sanguínea (Rosenfeld, 1971; Bolãnos, 1982; França & Malaque, 2009), e alterações renais, como a necrose renal aguda (Amaral et al., 1985; França & Malaque, 2009).

Deve-se ressaltar que a mionecrose, promovida pelos venenos botrópicos, é um efeito tóxico local severo, podendo levar à perda tecidual permanente, desabilitando o acidentado (Gutiérrez & Lomonte 1995; Otero et al., 2002). A mionecrose é relevante do ponto de vista clínico, tanto pela sintomatologia apresentada no envenenamento, quanto pela dificuldade em neutralizá-la "in vivo". A miotoxicidade dos venenos botrópicos pode ser decorrente da isquemia do tecido muscular causada por fatores

hemorrágicos presentes nestes venenos, ou da presença de miotoxinas que afetam diretamente o tecido muscular (Dos Santos et al., 1992; Gutiérrez & Ownby, 2003).

O método mais eficaz para o tratamento dos envenenamentos ofídicos ainda é a soroterapia. Os princípios da soroterapia, hoje utilizada em todo o mundo, são baseados nos estudos pioneiros de Albert Calmette (Calmette, 1894) e Vital Brazil (Brazil, 1903; 1905). Os soros antiofídicos são produzidos em animais, geralmente cavalos, utilizando-se o veneno bruto como imunógeno. A partir do sangue desses animais é obtido o soro, rico em imunoglobulinas capazes de neutralizar as toxinas presentes nos venenos.

A eficácia dos soros antiofídicos, no entanto, é restrita às espécies de serpentes cujos venenos foram utilizados no processo de imunização, não havendo um soro antiofídico universal. Um outro aspecto a ser considerado é que, devido à toxicidade dos venenos, cerca de 10 % dos animais soroprodutores morrem durante a imunização (Ribeiro et al., 1993), tornando o processo oneroso e pouco produtivo. Ademais, os soros antiofídicos não são capazes de neutralizar alguns efeitos tóxicos dos venenos, causados por componentes pouco imunogênicos como as miotoxinas (Dias da Silva et al., 1989; Moura da Silva et al., 1990). Assim, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de se obter algum progresso no tratamento dos acidentes ofídicos.

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (70 a 90 %), em sua maioria toxinas ou enzimas tóxicas. Ainda podem conter peptídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e componentes inorgânicos (Devi, 1971). A proporção desses componentes é variável nos venenos das diferentes espécies, o que explica a diversidade da sintomatologia dos envenenamentos. Ocorre também uma considerável variação na composição dos venenos dentro da mesma espécie de serpente, em função da estação do ano, da idade do réptil, e de sua distribuição geográfica (Warrell, 1996).

Entre os componentes dos venenos ofídicos, destacam-se as fosfolipases A₂ (PLA₂s) e proteínas homólogas por representarem fração significativa dos venenos brutos e pela ampla variedade de efeitos biológicos que apresentam.

As PLA₂s (EC 3.1.1.4) são enzimas dependentes de cálcio, que hidrolisam glicerofosfolipídeos na posição sn-2 da ligação acil, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos (van Deenen & de Haas, 1963; Burke & Dennis, 2009). Estas proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em tecidos de mamíferos e venenos de artrópodes e répteis (Valentin & Lambeau, 2000). Em mamíferos, as PLA₂s tem sido relacionadas com doenças inflamatórias, além de participarem de vários

processos fisiológicos como a sinalização celular, o metabolismo de membranas e o catabolismo de lipídeos, entre outros (Schaloske & Dennis 2006; Burke & Dennis, 2009). Nos venenos animais, as PLA₂s possivelmente exercem atividades relacionadas à captura e digestão da presa (Valentin & Lambeau, 2000).

As PLA₂s constituem uma superfamília de proteínas classificadas em vários grupos distintos e numerosos subgrupos, com base na seqüência de resíduos de aminoácidos, peso molecular, número de pontes de dissulfeto, requerimento do íon cálcio, entre outras características (Burke & Dennis, 2009). As PLA₂s ofídicas pertencem aos grupos I e II da classificação geral (Davidson & Dennis, 1990; Valentin & Lambeau, 2000; Marcussi et al., 2007; Burke & Dennis, 2009) e são proteínas de baixo peso molecular (aproximadamente 14 kDa) que apresentam diversos efeitos biológicos, tais como neurotóxico, cardiotoxíco, miotóxico, indutor ou inibidor da agregação plaquetária, hemolítico, anticoagulante, convulsivante e hipotensor (Rosenberg, 1989; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Ownby, 1998; Ownby et al., 1999; Kini, 2003). No grupo II, destacam-se as PLA₂s miotóxicas que promovem intensa mionecrose local (Gutiérrez et al., 1986; Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Angulo et al., 1997; Andrião-Escarso et al., 2000; Soares et al., 2000a, b; Lomonte et al., 2003; Gutiérrez et al., 2008). Estas proteínas foram inicialmente subdivididas em dois subgrupos: as miotoxinas que apresentam um resíduo de ácido aspártico conservado na posição 49 e são cataliticamente ativas, denominadas de PLA₂s Asp49 (Kaiser et al., 1990), e as toxinas que apresentam substituição deste resíduo por lisina e são cataliticamente inativas, PLA₂s Lys49, conhecidas como PLA₂s homólogas (Maraganore et al., 1984; Arni & Ward, 1996; Ownby et al., 1999; van den Bergh et al., 1988; Scott et al., 1992; Lee et al., 2001; Ward et al., 2002; Lomonte et al., 2003). Apesar da ausência de atividade enzimática, as PLA₂s Lys49 induzem intensa mionecrose por um mecanismo cálcio-independente (Ownby et al., 1999; Ward et al., 2002; Gutiérrez & Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003). Além do grande grupo das PLA₂s Lys49, outras variantes de PLA₂, com substituições na posição 49, têm sido descritas, tais como: PLA₂ Ser49 (Krizaj et al., 1991; Polgár et al., 1996), PLA₂ Asn49 (Pan et al., 1998; Tsai et al., 2004) e PLA₂ Arg49 (Mebs et al., 2006).

As primeiras PLA₂s Lys49 foram isoladas por Maraganore e colaboradores em 1984 dos venenos da *Agkistrodon piscivorus piscivorus* e *Bothrops atrox*. Por algum tempo, houve divergência na literatura se essas proteínas apresentavam alguma atividade enzimática (Liu et al., 1990; Yoshizumi et al., 1990; Rodrigues-Simioni et al.,

1995; Shimohigashi et al., 1995; Yamaguchi et al., 1997; Soares et al., 2002). No entanto, estudos realizados com PLA₂s Lys49 de alta pureza sugeriram que a baixa atividade enzimática detectada em alguns trabalhos poderia ser devido a contaminação com proteínas PLA₂ Asp49 (van den Bergh et al., 1988; Scott et al., 1992). A disponibilidade de PLA₂s Lys49 recombinantes (Ward et al., 2001; Sá et al., 2004), bem como das técnicas de mutagênese sítio-dirigida (van den Bergh et al., 1988; Scott et al., 1992; Ward et al., 2002) e de cristalografia (Holland et al., 1990; Scott et al., 1992) forneceram as bases moleculares para explicar a ausência de atividade enzimática das PLA₂s Lys49 (ver revisão por Lomonte et al., 2003). Assim, tem sido proposto que a substituição de alguns resíduos de aminoácidos nas PLA₂s homólogas afeta a capacidade dessas proteínas se ligarem ao cofator Ca²⁺ (Ward et al., 2002), necessário para a estabilização do intermediário tetraédrico na reação catalítica (Scott et al., 1990). Como consequência, a atividade enzimática das PLA₂s Lys49 é drasticamente reduzida (Maraganore & Heinrikson, 1986; van den Bergh et al., 1988). De particular importância, são as substituições dos resíduos de Tyr28, Gly32 e Asp49 por Asn28, Leu32 e Lys49 (Maraganore et al., 1984; Francis et al., 1991; Cintra et al., 1993; Arni & Ward, 1996; de Sousa et al., 1998). Alternativamente, estudos cristalográficos sugerem que as PLA₂s Lys49 homólogas podem ser enzimas em que a catálise é interrompida na fase de liberação do substrato (de Azevedo et al., 1999; Lee et al., 2001).

A atividade miotóxica das PLA₂s Lys49 tornou-se evidente com o isolamento e a caracterização de uma série de PLA₂s homólogas básicas dos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* (bothropstoxin-I [BthTX-I]; Homs-Brandeburgo et al., 1988), *Bothrops asper* (miotoxina-II [BaspTX-II]; Lomonte & Gutiérrez, 1989), *Bothrops moojeni* (miotoxina-I e II [MjTX-I e II]; Lomonte et al., 1990) e *Bothrops pirajai* (piratoxina-I [PrTX-I]; Mancuso et al., 1995). A família das PLA₂s Lys49 miotóxicas encontra-se em expansão, com várias outras proteínas sendo identificadas, e suas estruturas cristalográficas determinadas e disponibilizadas no “Protein Data Bank” (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

Embora a mionecrose local seja a atividade biológica *in vivo* melhor caracterizada das PLA₂s Lys49 (Gutiérrez et al., 1986, 1989; Homs-Brandeburgo et al., 1988; Lomonte & Gutiérrez, 1989; Lomonte et al. 1990, 1994a; Angulo et al., 1997, 2000; Soares et al., 1998, 2002; Melo & Ownby, 1999), estudos *in vitro* indicam claramente que estas miotoxinas não afetam somente mioblastos e miotubos, mas também outros tipos celulares, demonstrando o amplo espectro de atividade citolítica

destas toxinas (Brusés et al., 1993; Bultrón et al., 1993; Lomonte et al., 1994a, c, 1999; Incerpi et al., 1995; Rufini et al., 1996; Andrião-Escarso et al., 2000; Angulo et al., 2000; Soares et al., 2002).

Outras atividades tóxicas também foram descritas para as PLA₂s Lys49 *in vivo*, tais como edema, hiperalgesia e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Lomonte et al., 2003). No entanto, não há relatos de neurotoxicidade e, em contraste com as PLA₂s neurotóxicas, estas toxinas exibem baixa potência letal em ensaios de DL₅₀ (Lomonte et al., 1985, 2003; Gutiérrez et al., 1986; Homsí-Brandeburgo et al., 1988). Em vista disto, as PLA₂s Lys49 homólogas tem sido classificadas como miotoxinas não-neurotóxicas (Lomonte et al., 2003). Todavia, uma série de estudos *in vitro* demonstrou que várias PLA₂s Lys49 de venenos botrópicos induzem bloqueio das contrações diretas e indiretas em preparações neuromusculares isoladas de aves, mamíferos e anfíbios (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Heluany et al. 1992, Soares et al., 2000b, 2001; de Oliveira et al., 2003; Oshima-Franco et al., 2004, Rodrigues et al., 2004; Cavalcante et al., 2005, 2007; Gallacci et al., 2006; Stábeli et al., 2006; Borja-Oliveira, 2007; Ponce-Soto et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Randazzo-Moura et al., 2008; Ponce-Soto et al., 2009). Assim, recentemente, tem sido questionado se estas toxinas apresentam alguma neurotoxicidade ou se o efeito paralisante *in vitro* é simplesmente uma manifestação da capacidade citolítica dessas proteínas.

Inúmeras investigações vêm sendo realizadas na expectativa de esclarecer os mecanismos de ação e os sítios determinantes da toxicidade das PLA₂s miotóxicas (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). Neste sentido, demonstrou-se que substâncias polianiónicas como a heparina e a suramina são capazes de neutralizar a atividade miotóxica de venenos que contém PLA₂ Lys49, quando pré-incubadas *in vitro* (Melo & Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al., 1993; Lomonte et al., 1994a, b; Melo & Ownby, 1999, Arruda et al. 2002). Este antagonismo tem sido atribuído à formação de complexos ácido-base inativos entre as miotoxinas e os compostos polianiónicos (Melo & Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al., 1993). Com base nesses estudos sugeriu-se o envolvimento da região C-terminal (115-129, segundo a numeração de Renetseder et al., 1985) na atividade tóxica das PLA₂s Lys49 (Lomonte et al., 1994b; Lomonte et al., 2003; Murakami et al., 2004; 2005).

É importante ressaltar que tanto a suramina como a heparina são capazes de neutralizar simultaneamente as atividades miotóxica e paralisante da BthTX-I em preparações neuromusculares *in vitro*, indicando a existência de uma relação entre essas duas atividades (de Oliveira et al., 2003; Gallacci et al., 2006).

Ainda no sentido de obter substâncias que possam inibir as ações dos venenos ofídicos, a descoberta de inibidores naturais é de substancial importância para o complemento da terapia tradicional, particularmente em relação aos danos teciduais locais. Os extratos vegetais constituem uma fonte rica de compostos farmacologicamente ativos capazes de inibir as atividades de diversos venenos e toxinas animais (Melo et al., 1994; Batina et al., 2000; Borges et al., 2000, 2001; Mahanta & Mukherjee, 2001; Biondo et al., 2003). O uso dessas substâncias como antídotos para venenos de animais é uma opção antiga encontrada em muitas comunidades que não possuem acesso a soroterapia (Borges et al., 2001). O extrato aquoso da *Casearia sylvestris*, cujo nome popular no Brasil é “Guaçatonga”, neutraliza as atividades hemorrágica, coagulante e proteolítica de venenos brutos e de toxinas purificadas de várias serpentes do gênero *Bothrops*, entre elas: *B. asper*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pirajai* (Borges et al., 2000; 2001).

O desenvolvimento de estudos visando a caracterização das atividades biológicas e do mecanismo de ação das PLA₂s miotóxicas, bem como, a pesquisa de possíveis agentes neutralizadores destas toxinas poderá levar a novas estratégias para o tratamento dos acidentes ofídicos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avançar no conhecimento do mecanismo da ação paralisante das PLA₂s Lys49 *in vitro*, considerando que os venenos que contem essas toxinas não apresentam neurotoxicidade sistêmica.

2. Objetivos específicos

Caracterizar as atividades miotóxica e paralisante da MjTX-II, em preparação neuromuscular de camundongos, e comparar seus efeitos com os da PrTX-I e da BthTX-I, através de estudos miográfico, eletrofisiológico e morfológico.

Avaliar a capacidade da suramina e do extrato bruto de *Casearia sylvestris* em neutralizar as ações destas toxinas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Drogas, Toxinas e Extrato Vegetal

- Drogas utilizadas: suramina (Sigma), d-tubocurarina (Abbott, Brasil).
- PLA₂s Lys49 homólogas: miotoxina-II (MjTX-II) isolada do veneno da *Bothrops moojeni*; bothropstoxina-I (BthTX-I) isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*; e piratoxina-I (PrTX-I) isolada do veneno da *Bothrops pirajai*.
- Extrato aquoso liofilizado de folhas de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). A planta foi identificada pelo Dr. Lin Chau Ming, da Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, UNESP. Uma exsicata (n° HPMU 531) foi depositada no Herbário de Plantas Medicinais, UNAERP.

As PLA₂s Lys49 e o extrato vegetal foram cedidos pelo Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto.

2. Soluções Nutrientes

- Ringer (mM): NaCl 135; KCl 5; MgCl₂ 2; NaHCO₃ 15; Na₂HPO₄ 1; CaCl₂ 2; e glicose 11.

3. Animais

Camundongos Swiss (18-22 g), machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro (12/12 horas).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal local, protocolo 027/05-CEEA (2005).

4. Estudo Funcional

4.1 Preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongo

A atividade das PLA₂s Lys49 sobre as contrações musculares foi avaliada através de registros miográficos *in vitro*. O camundongo foi sacrificado por deslocamento cervical e exangüinado por secção dos grandes vasos cervicais. Após toracotomia ampla, a preparação do nervo frênico-músculo diafragma foi removida (Bulbring, 1997). Durante este período a preparação foi umedecida intermitentemente com solução nutriente de Ringer. 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 carbogênio (95 % O₂ e 5 % CO₂). O bordo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro em forma de L. O centro tendíneo do músculo foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03), acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50). Os registros foram efetuados em um computador, através de um sistema de aquisição de dados (Gould Systems, Summit ACQuire e Summit DataViewer).

4.1.1 Registro das contrações musculares evocadas diretamente

O músculo diafragma foi posicionado entre os polos de um eletrodo bipolar de platina, e este foi acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88). A tensão de base de cada uma das preparações foi estabelecida individualmente, de modo a fornecer a tensão máxima em resposta à aplicação de pulsos elétricos retangulares com duração de 5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz. Para evitar alguma contribuição da contração indireta, a d-tubocurarina, um clássico bloqueador de receptores nicotínicos pós-sinápticos, foi adicionada à solução nutriente na concentração de 13,4 µM.

4.1.2 Registro das contrações musculares evocadas indiretamente

Para evocar as contrações musculares através de estímulos indiretos, a extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo de platina “de sucção”, que se encontrava acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88). O eletrodo de referência, constituído por um fio de platina enrolado no suporte de vidro em forma de L, servia também para fixar o músculo. As contrações musculares foram evocadas

indiretamente, por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz.

4.2 Protocolo Experimental do Estudo Funcional

Em todos os experimentos, as preparações foram mantidas a 35 ± 2 °C e submetidas a um período de estabilização de 45 minutos, durante os quais o líquido nutriente foi trocado a cada 15 minutos. A seguir, foram registrados 15 minutos de contrações controle (na ausência de qualquer agente). Subseqüentemente, cada um dos agentes a ser estudado foi adicionado ao banho e avaliou-se o decréscimo percentual das contrações diretas e indiretas após 120 e 90 minutos, respectivamente.

4.2.1 Influência das PLA₂s Lys49 sobre as contrações musculares diretas e indiretas.

Os efeitos da MjTX-II (1,0 µM) foram avaliados sobre as contrações diretas e indiretas, e da BthTX-I e da PrTX-I, na mesma concentração, foram avaliados apenas sobre as contrações indiretas.

4.2.2 Influência da interação da MjTX-II com a suramina sobre as contrações musculares diretas e indiretas.

A MjTX-II (1,0 µM) foi pré-incubada com suramina (10,0 µM) por 15 minutos à temperatura de 35 ± 2 °C, como descrito anteriormente por Arruda et al (2002). A seguir, os efeitos do produto de pré-incubação, bem como da suramina (10,0 µM), foram avaliados sobre as contrações diretas e indiretas.

4.2.3 Influência da interação das PLA₂s Lys49 com o extrato vegetal de *Casearia sylvestris* sobre as contrações musculares diretas e indiretas.

Cada uma das PLA₂ Lys49 (MjTX-II, BthTX-I e PrTX-I) na concentração de 1,0 µM, foi pré-incubada com o extrato de *Casearia sylvestris*, seguindo uma relação peso da toxina/peso do extrato vegetal de 1:1 e 1:5, como previamente descrito (Borges et al., 2000). Subseqüentemente, os efeitos de cada um dos produtos de pré-incubação, bem como do extrato vegetal, isoladamente, foram avaliados sobre as contrações indiretas.

Também foram avaliados os efeitos do produto de pré-incubação da MjTX-II com a *Casearia sylvestris* sobre as contrações diretas.

5. Estudo Morfológico e Morfométrico

Após a realização do estudo funcional, fragmentos do músculo diafragma foram retirados e congelados em nitrogênio líquido. Cortes transversais com 8 µm de espessura foram realizados em criostato (-20 °C) e submetidos a coloração por hematoxilina e eosina (HE), para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares (McManus & Mowry, 1960). Amostras também foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5 %; paraformaldeído 2 %; tampão fosfato Sorensen 0,1 M, pH = 7,4) por 4 horas, e lavadas em tetróxido de ósmio 1 %. Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebidos em resina Epon. Cortes de 1,5 µm foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscopia eletrônica.

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

6. Estudo Eletrofisiológico

A preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongo (hemidiafragma esquerdo) foi removida e montada em cuba revestida com resina de silicone, contendo 5 ml de solução de Ringer (pH = 7,5). A preparação foi mantida na temperatura ambiente e constantemente borbulhada com carbogênio (95 % O₂ e 5 % CO₂). As cubas foram colocadas na platina de um microscópio estereoscópico (Askania, SMC 4) para permitir a manipulação eletrofisiológica da preparação.

A técnica utilizada para os registros biolétricos foi a de Fatt & Katz (1951). Os microeletrodos de vidro foram preparados com o auxílio de um estirador vertical de

micropipetas (D-David Kopf Instruments, 700) e foram preenchidos com KCl (3 M). O eletrodo indiferente consistia em um fio de prata cloretado, mantido no interior de um tubo curvo para adaptação a cuba. Os microeletrodos foram introduzidos intracelularmente nas fibras musculares superficiais, com o auxílio de um micromanipulador (Leitz), para o registro do potencial de repouso e dos potenciais de placa terminal em miniatura. Os sinais captados pelo microeletrodo foram levados a um pré-amplificador com alta impedância de entrada e baixa de saída (World Precision Instruments, Electro 70S), que servia como acoplador de impedâncias. Esta parte do sistema era mantida no interior de uma gaiola de Faraday para reduzir a interferência elétrica. Posteriormente, os sinais eram levados a um sistema de amplificação (Biopac Systems, MP450) e monitorados em um osciloscópio (Tektronix, 2232) de dois canais, um de acoplamento direto (DC), utilizado para a inspeção do potencial de membrana, e outro de acoplamento capacitivo (AC), para a avaliação dos potenciais de placa terminal em miniatura. Os sinais foram registrados “on line”, utilizando-se um microcomputador com sistema de aquisição e análise de dados (AcqKnowledge®, versão 3.8.2).

A medida do potencial de repouso foi realizada na região das placas motoras e, também, aleatoriamente em regiões distantes destas, tanto na ausência como na presença de concentrações únicas de cada uma das PLA₂s Lys49. Os potenciais bioelétricos foram registrados nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de uma das PLA₂s Lys49. O registro dos potenciais de placa terminal em miniatura foi efetuado somente na presença da MjTX-II.

7. Análise Estatística

Os resultados experimentais foram agrupados em média e erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os valores médios foram testadas através de 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 %.

RESULTADOS

1. Estudo Funcional

1.1 Influência das PLA₂s Lys49 sobre as contrações musculares diretas e indiretas na preparação frênico-diafragma de camundongo

A MjTX-II promoveu bloqueio progressivo e tempo-dependente das contrações musculares evocadas diretamente e indiretamente nas preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos (Figura 1 A e B). O tempo médio para a MjTX-II reduzir a amplitude das contrações musculares diretas em 50 % ($t_{1/2}$) foi de $40,4 \pm 3,5$ minutos ($n = 7$) e para as indiretas de $36,1 \pm 2,4$ minutos ($n = 9$), não havendo diferença significativa entre ambos.

Como ilustrado na Figura 2, a BthTX-I e a PrTX-I também promoveram bloqueio das contrações indiretas na preparação frênico-diafragma de camundongos, com $t_{1/2}$ de $40,3 \pm 3,5$ minutos ($n = 8$) e $49,0 \pm 6,9$ ($n = 6$), respectivamente. Não se constatou diferenças significativas entre os $t_{1/2}$ s das três PLA₂s Lys49 para as contrações indiretas.

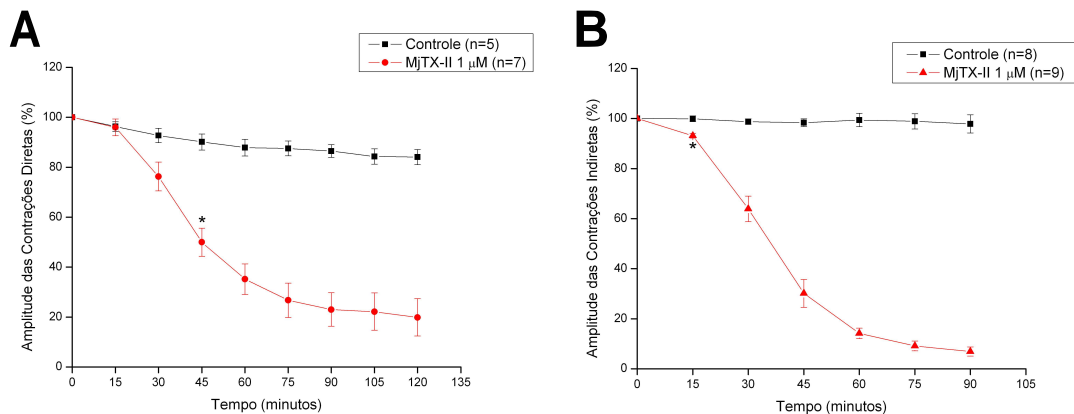


Figura 1 – Efeito da MjTX-II sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas diretamente (A) e indiretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). * indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle.

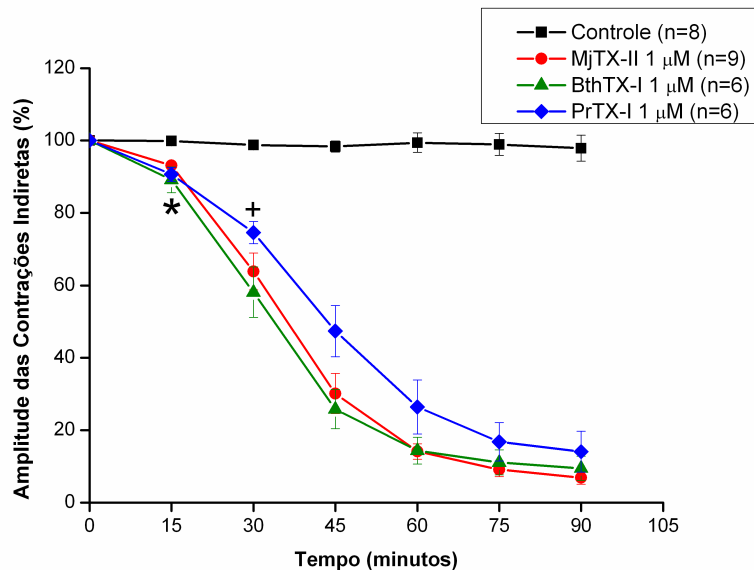


Figura 2 – Efeitos da MjTX-II, BthTX-I e PrTX-I sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). * indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa da MjTX-II e BthTX-I em relação ao controle; + indica diferença significativa da PrTX-I em relação ao controle.

1.2 Influência da suramina sobre o efeito da MjTX-II na preparação frênico-diafragma de camundongo

A pré-incubação com suramina preveniu de forma significativa a paralisia das contrações musculares diretas (Figura 3 A) e indiretas (Figura 3 B) induzidas pela MjTX-II. A suramina, administrada isoladamente, também não promoveu alteração das contrações musculares quando comparada ao controle.

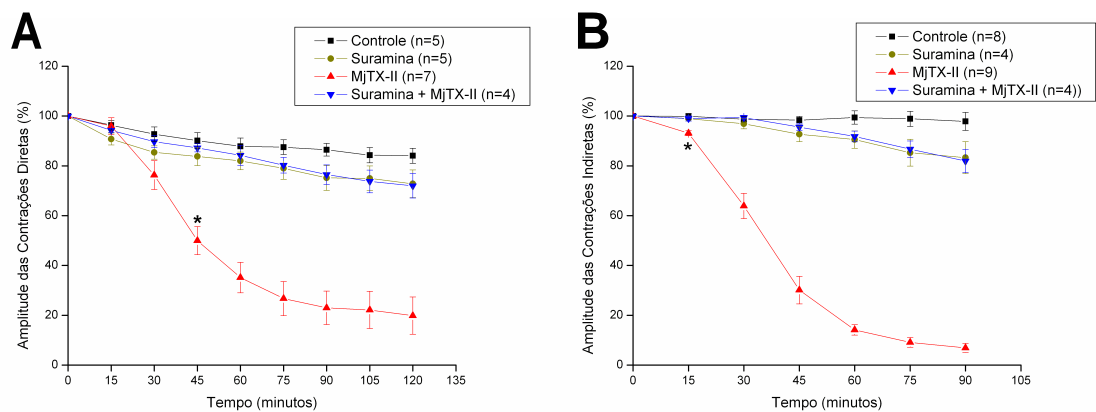


Figura 3 – Efeito da MjTX-II e do produto de sua pré-incubação com a suramina sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas diretamente (A) e indiretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). * indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle.

1.3 Influência do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* sobre a ação das PLA₂s Lys49 na preparação frênico-diafragma de camundongo

O extrato aquoso de *Casearia sylvestris* preveniu a paralisia das contrações musculares diretas e indiretas induzida pela MjTX-II na preparação frênico-diafragma de camundongo (Figura 4 A e B). Isoladamente, o extrato não afetou as contrações musculares.

A Figura 5 mostra a capacidade do extrato aquoso da *Casearia sylvestris* em prevenir a paralisia das contrações musculares indiretas induzida pelas outras PLA₂s Lys49.

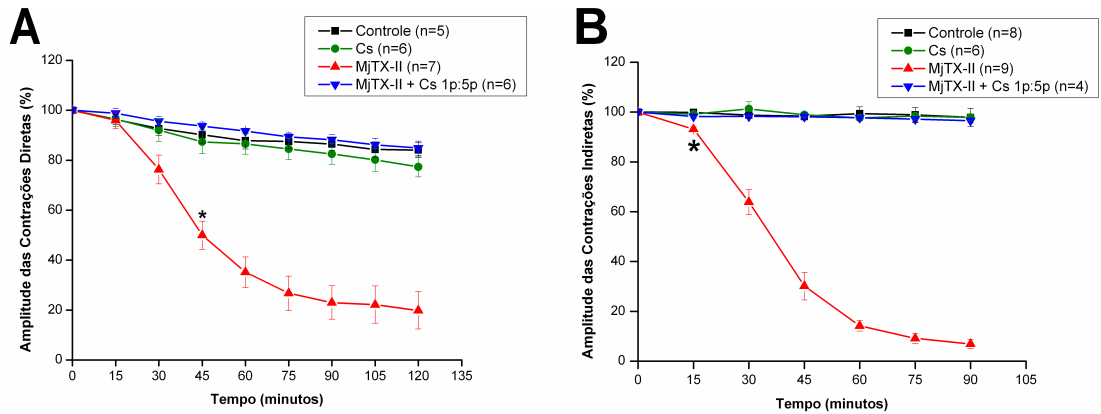


Figura 4 – Efeito da MjTX-II e do produto de sua pré-incubação com o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* (Cs) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas diretamente (A) e indiretamente (B) em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). * indica o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle.

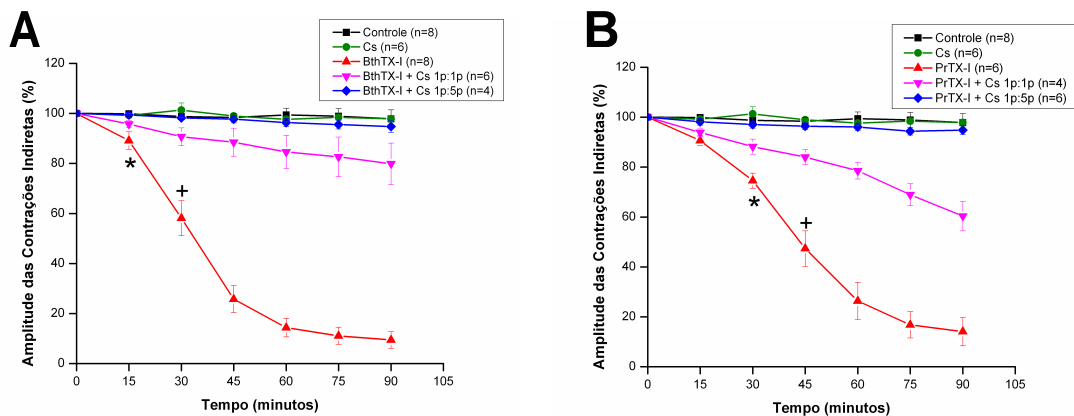


Figura 5 – Efeitos da BthTX-I (A) e da PrTX-I (B), bem como, dos produtos de pré-incubação de cada uma dessas PLA₂s Lys49 com o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* (Cs) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). + e * indicam o ponto a partir do qual ocorreu diferença significativa em relação ao controle nas proporções de 1:1 (peso/peso) e 1:5 (peso/peso), respectivamente.

2. Estudo Morfológico e Morfométrico

A Figura 6 ilustra a microscopia óptica do músculo diafragma de camundongo. Observou-se que os grupos experimentais controle (Figura 6 A) e *Casearia sylvestris* (Figura 6 B) apresentaram a maioria das fibras com formato poligonal, sarcoplasma acidófilo e núcleos localizados na periferia das fibras. As fibras musculares estavam claramente delimitadas por uma delicada camada de tecido conjuntivo (endomísio), e organizadas em fascículos também delimitados por tecido conjuntivo (perimísio). Os músculos expostos as PLA₂s Lys49 apresentaram diferentes graus de danos musculares após 90 minutos de contato com a preparação. As alterações mais evidentes foram fibras arredondas, edema entre as fibras, áreas do citoplasma desprovidas de miofibrilas e núcleo central (Figura 6 C, E e G). Os músculos submetidos à ação da mistura de uma das PLA₂s Lys49 com o extrato de *Casearia sylvestris* apresentaram morfologia semelhante ao controle (Figura 6 D, F e H).

Como ilustrado na Figura 7, os músculos expostos a ação das PLA₂s Lys49 apresentaram aumento significativo do índice de mionecrose, quando comparados ao controle. No entanto, os músculos expostos a mistura de pré-incubação de cada uma das PLA₂s Lys49 com o extrato de *Casearia sylvestris*, bem como, aqueles submetidos a ação do extrato vegetal isoladamente, não apresentaram índices de mionecrose significativos em relação ao controle.

A Figura 8 ilustra a microscopia eletrônica do músculo diafragma. No grupo experimental controle (Figura 8 A), observou-se fibras com aspecto normal, apresentando miofibrilas organizadas em sarcômeros preenchendo todo o sarcoplasma, mitocôndrias com cristas lamelares localizadas nas regiões subsarcolemal e intermiofibrilar, e cisternas de retículo sarcoplasmático entre as miofibrilas. O sarcolema das fibras apresentou um aspecto regular. Sob a ação da *Casearia sylvestris* (Figura 8 B) ou de seu complexo com cada uma das PLA₂s Lys49 (Figura 8 D, F e H), a maioria das fibras musculares manteve o padrão semelhante ao controle. Porém, os músculos submetidos a ação das PLA₂s Lys49 (Figura 8 C, E e G) mostraram fibras com desorganização das miofibrilas, que apareceram hipercontraídas ou em forma de grumos, além da presença de inúmeras áreas sem miofilamentos, principalmente na região periférica. As mitocôndrias apresentaram-se edemaciadas, com dilatação, ruptura ou aumento na eletrodensidade das cristas.

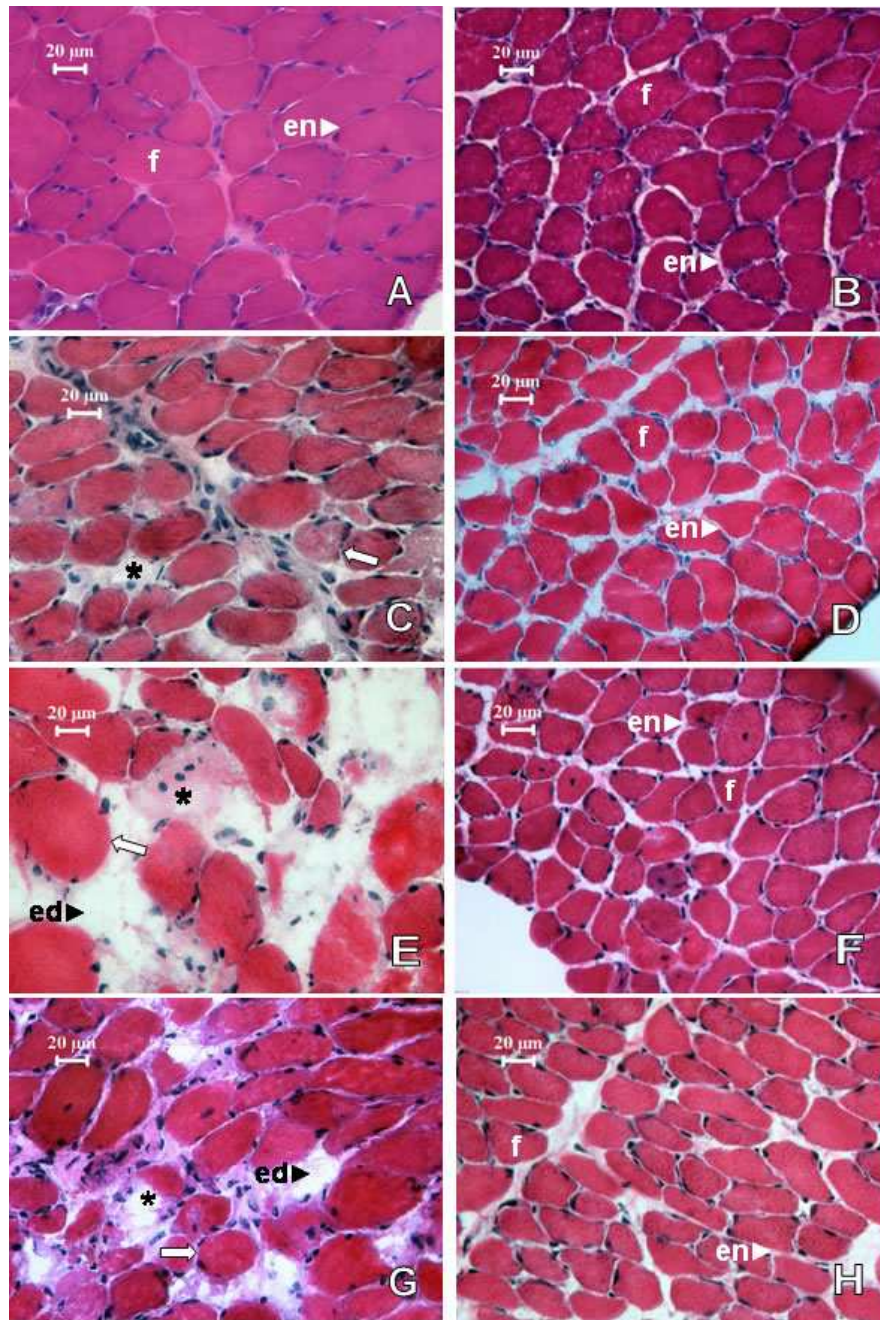


Figura 6 – Microscopia ótica do músculo diafragma de camundongos submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (HE). Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B) Cs, (C) MjTX-II, (D) MjTX-II + Cs (1:5), (E) BthTX-I, (F) BthTX-I + Cs (1:5), (G) PrTX-I, (H) PrTX-I + Cs (1:5); (ed) edema; (en) endomysio; (f) fibras poligonais; (seta) fibras arredondas; (*) perda dos miofilamentos.

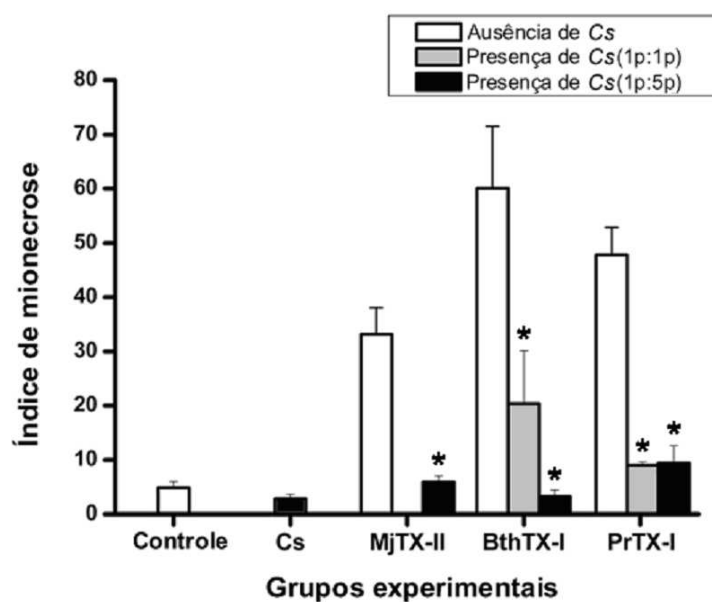


Figura 7 – Efeito do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* (Cs) sobre o índice de mionecrose induzido pela MjTX-II, BthTX-I e PrTX-I em preparações do músculo diafragma de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM de 4–8 experimentos. * indica diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$).

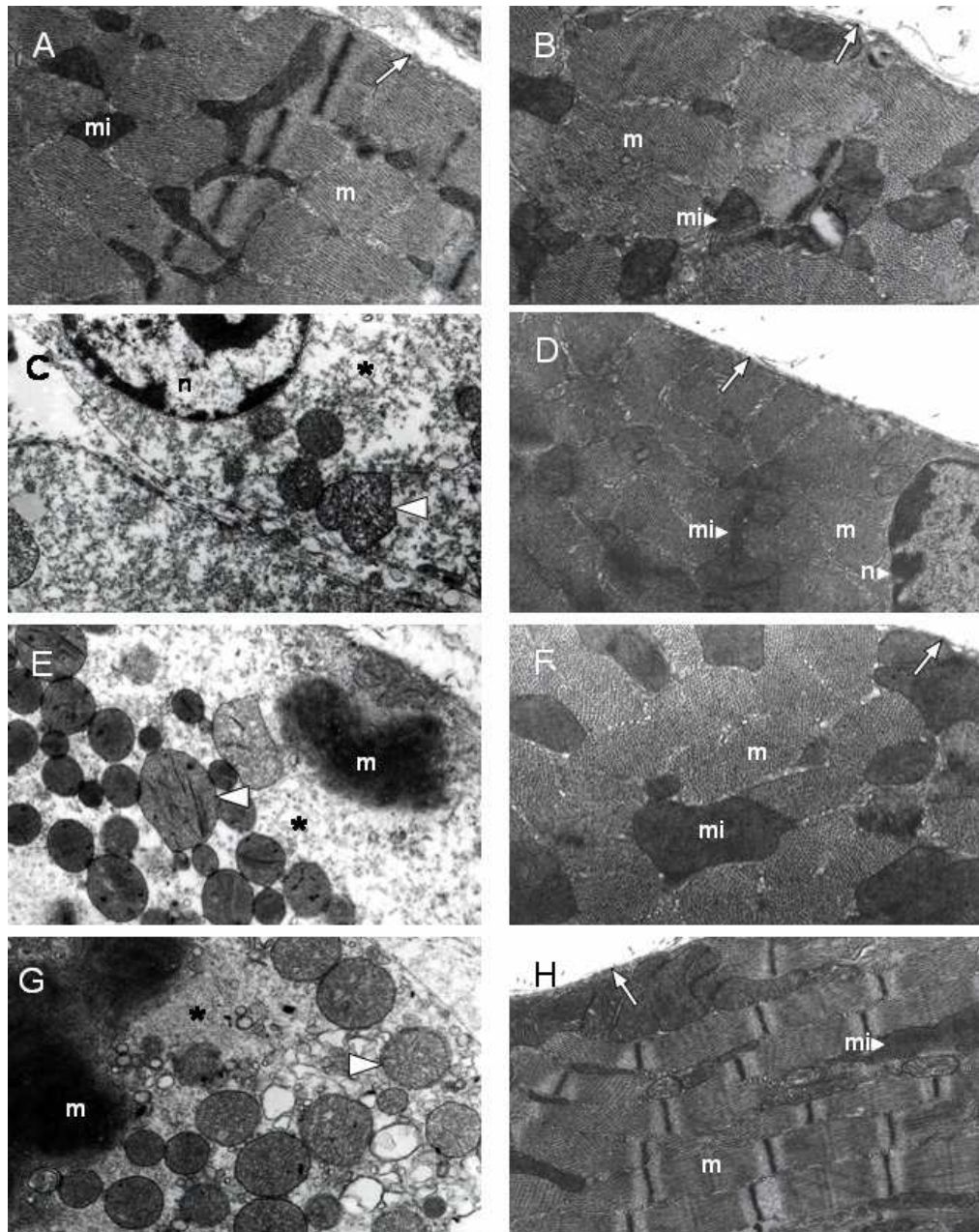


Figura 8 – Microscopia eletrônica do músculo diafragma de camundongo. Detalhes descritos no texto. (A) controle, (B) Cs, (C) MjTX-II, (D) MjTX-II + Cs (1p:5p), (E) BthTX-I, (F) BthTX-I + Cs (1p:5p), (G) PrTX-I, (H) PrTX-I + Cs (1p:5p). (seta) membrana plasmática; (mi) mitocôndrias; (m) miofibrilas; (n) núcleo; (cabeça de seta) mitocôndria edemaciada; (*) áreas desprovidas de miofibrilas.

3. Estudo Eletrofisiológico

A MjTX-II, a BthTX-I e a PrTX-I isoladamente promoveram despolarização das fibras musculares durante o período de 90 minutos de contato com as preparações do músculo diafragma de camundongos (Figura 9). A partir de 5 minutos, observou-se despolarização progressiva e acentuada do potencial de membrana em repouso da fibra muscular em regiões próximas a placa motora terminal (Figura 9 A) e, após 15 minutos, em regiões distantes desta (Figura 9 B).

A Figura 10 ilustra a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura nos músculos diafragma de camundongos no decorrer do tempo. Após 5 minutos da administração da MjTX-II, ocorreu aumento da frequência dos potenciais de placa motora em miniatura. Todavia, esses registros foram comprometidos a partir de 30 minutos de contato da preparação com a toxina, devido à intensa despolarização das fibras musculares.

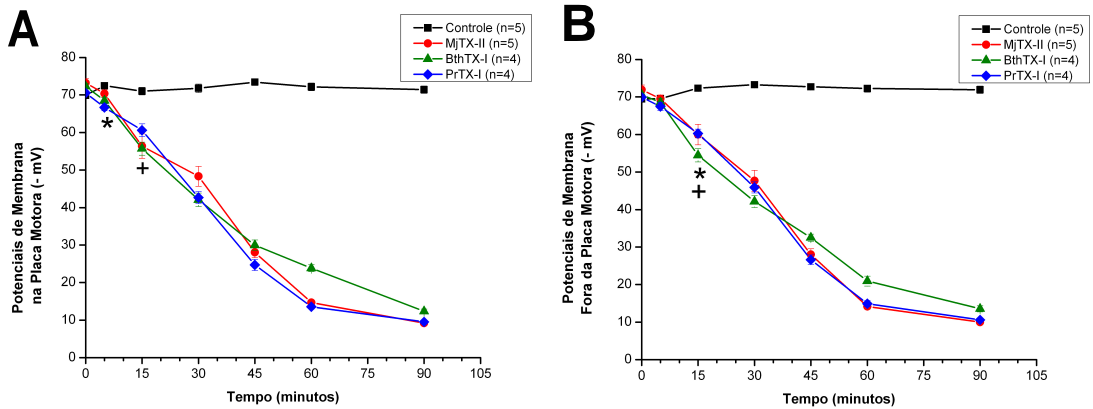


Figure 9 – Decurso temporal dos potenciais de membrana em repouso de preparações do músculo diafragma de camundongos submetidas a ação de PLA₂s Lys49 em regiões próximas a placa motora terminal (A) e distantes (B). Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). + indica o momento a partir do qual ocorreu diferença significativa da MjTX-II em relação ao controle e * indica a diferença da BthTX-I ou PrTX-I em relação ao controle.

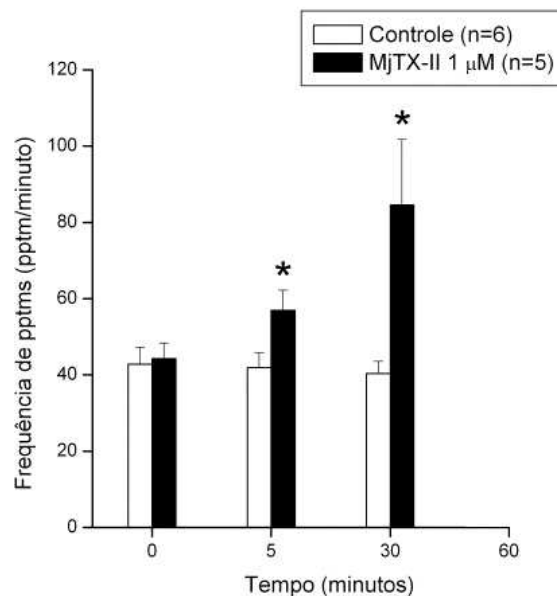


Figure 10 – Frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (ppts) no decorrer do tempo após a administração da MjTX-II em preparações neuromusculares de camundongos. Os dados foram agrupados em média \pm EPM ($P < 0,05$). * indica diferença significativa em relação ao controle.

DISCUSSÃO

As PLA₂s são os componentes mais abundantes dos venenos de serpentes e apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas (Kini, 2003). Entre essas proteínas, destacam-se as PLA₂s Lys49 dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, que apesar de serem destituídas de atividade enzimática, induzem um quadro de mionecrose local severa. Embora os acidentes produzidos por essas serpentes não promovam nenhum sinal clínico de neurotoxicidade, as PLA₂s Lys49 isoladas de vários venenos botrópicos bloqueiam o processo de transmissão neuromuscular *in vitro* (Rodrigues-Simioni et al., 1983, 1995, 2004; Cogo et al., 1993, 1998; Costa et al., 1999; Heluany et al., 1992; Lobo-de-Araujo et al., 2002; Prianti et al., 2003; Zamunér et al., 2004; Cavalcante et al., 2005, 2007; Gallacci et al., 2006; Randazzo-Moura et al., 2008; Ponce-Soto et al., 2009). Assim, compreender os mecanismos da atividade paralisante *in vitro* das PLA₂s Lys49 ainda é uma tarefa desafiadora. Neste sentido, no presente estudo caracterizaram-se as atividades da MjTX-II em preparações neuromusculares de mamífero *in vitro*, e seus efeitos foram comparados com os da PrTX-I e, principalmente, com os da BthTX-I, que tem sido extensivamente investigada em preparações neuromusculares (Rodrigues-Simioni et al., 1995; Oshima-Franco et al., 2001; Soares et al., 2002; de Oliveira et al., 2003; Oshima-Franco et al., 2004; Cavalcante et al., 2005, 2007; Gallacci et al., 2006).

A MjTX-II, isolada do veneno da *Bothrops moojeni*, é uma PLA₂ Lys49, com peso molecular de aproximadamente 13,5 kDa (Lomonte et al., 1990; Soares et al., 1998; 2004; Watanabe et al., 2005). Esta proteína apresenta atividade miotóxica, caracterizada pelo aumento da concentração plasmática de creatina-quinase e por alterações morfológicas em músculos de camundongos *in vivo* (Soares et al., 1998, 2004). Recentemente, Stábeli e colaboradores (2006) demonstraram que a MjTX-II é capaz de induzir bloqueio neuromuscular na preparação frênico-diafragma isolada de camundongos. Todavia, o mecanismo desta atividade paralisante *in vitro*, bem como a sua relação com a atividade miotóxica ainda não estão esclarecidos.

Demonstrou-se, no presente trabalho, que a MjTX-II, da mesma forma que a BthTX-I e a PrTX-I, induz efeitos miotóxico e bloqueador neuromuscular na preparação frênico-diafragma de camundongos. Tais achados são semelhantes aos descritos na literatura para estas e outras miotoxinas PLA₂ Lys49 (Rodrigues-Simioni et al., 1995; Soares et al., 2000b, 2001; de Oliveira et al., 2003; Gallacci et al., 2006; Stábeli et al., 2006; Randazzo-Moura et al., 2008). O efeito miotóxico foi caracterizado por lesões musculares típicas e, no caso da MjTX-II, também pela paralisia irreversível das

contrações musculares evocadas diretamente, que independe do processo de neurotransmissão (Harvey et al., 1994; Ownby et al., 1999). O bloqueio neuromuscular foi evidenciado pela paralisia irreversível das contrações musculares evocadas indiretamente, e apresentou decurso temporal semelhante para as três toxinas.

O estudo eletrofisiológico revelou a atividade despolarizante das PLA₂s Lys49 na membrana da fibra muscular de camundongos, bem como a habilidade da MjTX-II em induzir aumento na frequência dos potenciais de placa motora terminal. Tais achados foram pioneiramente descritos por Rodrigues-Simioni e colaboradores (1983) na preparação neuromuscular de rã submetida a ação de uma fração do veneno da *Bothrops jararacussu*, que posteriormente foi denominada bothropstoxina por Homs-Brandeburgo e colaboradores (1988). Considerando que esta fração não inibia a despolarização do nervo induzida pelo íon K⁺, nem impedia o aumento da liberação quântica espontânea de neurotransmissor, promovida pelo veneno da aranha viúva-negra, Rodrigues-Simioni e colaboradores (1983) sugeriram que a fração do veneno não afeta diretamente o nervo motor. Em trabalho subsequente, Heluany e colaboradores (1992) demonstraram que o bloqueio neuromuscular induzido pela BthTX-I na preparação de camundongos apresenta características similares aos promovidos por bloqueadores neuromusculares do tipo despolarizante, visto que a paralisia não é revertida pela ação de drogas anticolinesterásicas, não há escape das contrações tetânicas (inibição de Wedensky), tampouco facilitação pós-tetânica. Tomados em conjunto, esses resultados são indicativos de que o bloqueio neuromuscular induzido pelas PLA₂s Lys49 possa ser consequência da atividade despolarizante de membrana dessas proteínas.

Observou-se também no presente estudo que a suramina foi capaz de neutralizar simultaneamente as atividades miotóxica e bloqueadora neuromuscular da MjTX-II quando pré-incubada *in vitro*. Achados similares foram previamente descritos quando da pré-incubação da BthTX-I com a suramina ou a heparina (de Oliveira et al., 2003; Gallacci et al., 2006). Esses resultados sugerem a existência de uma relação entre as atividades miotóxica e bloqueadora neuromuscular das PLA₂s Lys49.

Os compostos polianiônicos, como a heparina e a suramina, são valiosos no esclarecimento da relação estrutura-função das PLA₂s homólogas. A interação da heparina com a porção C-terminal da miotoxina-II (BaspTX-II), isolada do veneno da *Bothrops asper*, forneceu a primeira evidência de uma região molecular envolvida na ação tóxica de uma PLA₂ Lys49 (Lomonte et al., 1994b). O mapeamento do sítio de

ligação da heparina com a toxina mostrou que este consiste de uma fita contínua de resíduos de aminoácidos (115-129, segundo a numeração de Renetseder et al., 1985), rica em lisina, que está localizada próxima à região C-terminal da toxina (Lomonte et al., 1994b). Contudo, estudos posteriores utilizando peptídeos sintéticos, constituídos pelos resíduos 115-129, demonstraram que estes peptídeos são capazes de reproduzir os efeitos citotóxicos da BaspTX-II *in vitro*, mas não reproduzem seus efeitos miotóxicos *in vivo*, indicando que, além dos resíduos 115-129, outros determinantes estruturais da proteína são necessários para expressar a miotoxicidade total (Lomonte et al., 1999). Posteriormente, Murakami e colaboradores (2005) relataram que a suramina, além de se ligar a região C-terminal da BaspTX-II, é capaz de interagir com parte da região correspondente ao “loop” de cálcio, promovendo assim, a inibição dos efeitos miotóxicos *in vivo* e *in vitro* da toxina. Uma vez que a BaspTX-II apresenta homologia estrutural com a MjTX-II (de Azevedo et al., 1997), pode-se sugerir que a região C-terminal desta toxina também esteja envolvida em sua atividade miotóxica. Da mesma forma, os resultados deste estudo ainda permitem inferir sobre o envolvimento desta região na atividade bloqueadora neuromuscular *in vitro* da MjTX-II. Esta hipótese é corroborada por estudos que indicam uma relação da região C-terminal das PLA₂s Lys49 com várias outras atividades biológicas dessas proteínas, incluindo desestabilização de lipossomos, citotoxicidade em diversas linhagens celulares, atividades bactericida e de hiperalgesia (Soares et al., 2001; Lomonte et al., 2003).

Similarmente ao descrito para a suramina, a pré-incubação com o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* também inibiu as atividades miotóxica e bloqueadora neuromuscular da MjTX-II, bem como da PrTX-I e da BthTX-I. Tais achados ampliam o espectro da atividade antiofídica desse extrato e reforça a hipótese de que a paralisia e a mionecrose induzidas pelas PLA₂s homólogas estejam estritamente relacionadas. Os mecanismos de ação, bem como, os componentes responsáveis pela atividade antiofídica da *Casearia sylvestris* ainda estão sendo investigados (Cintra-Francischinelli et al., 2008; Da Silva et al., 2008).

A influência da temperatura de incubação em experimentos realizados *in vitro* tem sido uma abordagem utilizada para investigar a ação das PLA₂s homólogas (Lomonte et al., 1994c; Cavalcante et al., 2005). Inicialmente, Lomonte e colaboradores (1994c) observaram que a BaspTX-II não induzia dano celular quando incubada por 30 minutos na temperatura de 2-4 °C, sendo facilmente removida por lavagem. No entanto, o retorno da atividade tóxica ocorria quando a temperatura era elevada para

37 °C. Esses achados indicaram que a força de interação da toxina com seus possíveis alvos na membrana celular é diminuída por baixas temperaturas, sugerindo que a interação baseada apenas na carga elétrica é muito fraca. Sendo assim, seria necessária uma etapa adicional de penetração da toxina na porção lipídica da membrana celular, através de regiões hidrofóbicas da molécula, para a manifestação de sua toxicidade. Esta etapa poderia ser afetada por mudanças na fluidez da membrana promovida pela baixa temperatura (Lomonte et al., 1994c). Posteriormente, Cavalcante e colaboradores (2005) observaram que a baixa temperatura de incubação prevenia tanto o efeito miotóxico quanto o bloqueador neuromuscular da BthTX-I. Assim, sugeriu-se que a ligação e possivelmente também a parcial penetração da toxina na região hidrofóbica da membrana celular é necessária para o estabelecimento de ambos os efeitos, miotóxico e bloqueador neuromuscular, da BthTX-I, fortalecendo a hipótese da existência de uma relação entre essas atividades (Cavalcante et al., 2005).

Entretanto, alguns estudos de relação estrutura-atividade se opõem a hipótese de que os efeitos miotóxico e bloqueador neuromuscular *in vitro* das PLA₂s homólogas estariam relacionados (Ward et al. 1998; Stábile et al. 2006). Com base na comparação de seqüências de aminoácidos, Ward e colaboradores (1998) identificaram resíduos de aminoácidos altamente conservados em algumas PLA₂s Lys49 que poderiam estar teoricamente associados com uma ação pré-sináptica dessas proteínas. Estudos que envolvem a modificação química de resíduos específicos têm sugerido uma dissociação parcial ou uma sobreposição de sítios farmacológicos e tóxicos das PLA₂s Lys49. Por exemplo, as alterações de resíduos de Tyr podem afetar os efeitos de letalidade, miotoxicidade, citotoxicidade e bloqueador neuromuscular destas toxinas (Andrião-Escarso et al. 2000; Soares et al., 2000a, b; Stábile et al., 2006). Por outro lado, a modificação de resíduos de Trp provoca apenas uma discreta redução do efeito miotóxico da MjTX-II, mas induz um enfraquecimento relevante de sua atividade bloqueadora neuromuscular, sugerindo uma dissociação entre estas atividades (Stábile et al., 2006). Embora esses estudos forneçam informações valiosas, devem ser considerados com cautela, uma vez que as modificações podem promover alterações na estrutura tridimensional destas toxinas.

As evidências atuais não permitem excluir a possibilidade de que as miotoxinas PLA₂ homólogas possam apresentar ações específicas na junção neuromuscular. No entanto, em analogia com a ação miotóxica, a atividade bloqueadora neuromuscular das

PLA₂s homólogas *in vitro* também poderia ser explicada com base na sua capacidade de desestabilizar membranas biológicas, como será discutido a seguir.

Estudos anteriores sugerem que as miotoxinas PLA₂ apresentam seu sítio inicial de ação na membrana plasmática da célula muscular (Jonhson & Ownby, 1993; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999). Evidências experimentais indicam uma interação eletrostática entre os sítios catiônicos das toxinas e grupos carregados negativamente da membrana da célula muscular (Mebs & Ownby, 1990; Díaz et al., 1991; Rufini et al., 1992; Jonhson & Ownby, 1993). Após esta ligação inicial, as miotoxinas penetrariam na bicamada lipídica por interação hidrofóbica, mediada por uma região citolítica da molécula, promovendo a desestabilização da membrana celular com conseqüente perda da regulação da permeabilidade a íons e macromoléculas (Gutiérrez & Lomonte, 1995). O caráter dimérico de muitas PLA₂s Lys49 homólogas permite alterações na conformação da estrutura quaternária da molécula que favorece o contato destas proteínas com a membrana e, posteriormente, facilita sua penetração na bicamada lipídica (Da Silva Giotto et al., 1998; Magro et al., 2003). Outra possibilidade a ser considerada é que, sob a forma dimérica, e, portanto, divalente, estas toxinas apresentariam maior avidéz por sítios negativos da membrana celular (Angulo et al., 2005).

A primeira conseqüência da desestabilização de membrana, induzida pelas PLA₂s Lys49 homólogas, é o colapso na regulação da permeabilidade a íons, levando a perda do potencial de membrana, provavelmente devido ao reequilíbrio dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻. A desestruturação da membrana também causa um influxo de Ca²⁺ extracelular, devido ao proeminente gradiente eletroquímico desse cátion que existe através da membrana (Gutiérrez & Ownby, 2003; Villalobos et al., 2007). Além disso, a despolarização induzida pelo influxo de Na⁺ pode promover a liberação de Ca²⁺ de reservas intracelulares (Johnson & Ownby, 1994). Entretanto, independentemente do mecanismo inicial, o aumento da concentração de Ca²⁺ citosólico gera uma série de eventos como a hipercontração de miofilamentos, danos mitocondriais e ativação de proteases e fosfolipases dependentes de cálcio, que amplificam o processo de lesão muscular (Gutiérrez & Ownby, 2003; Montecucco et al., 2008).

Em adição, a despolarização celular poderia ser a causa da paralisia muscular *in vitro* promovido pelas PLA₂s Lys49 homólogas. De fato, níveis baixos e persistentes de despolarização celular poderiam criar áreas de inexcitabilidade na membrana da fibra muscular, devido a inativação de canais de Na⁺ voltagem-dependentes, prejudicando

assim a geração do potencial de ação ao longo da fibra (Figura 11). Além da contratibilidade muscular, a despolarização poderia afetar também o processo de transmissão neuromuscular, que depende da excitabilidade de uma região restrita da membrana da fibra muscular ao redor da placa motora. A inativação de canais de sódio na região periplaca pode elevar o limiar de excitabilidade da fibra muscular e, desta forma, o potencial de placa não é capaz de deflagrar o potencial de ação muscular. A despolarização desta região também pode afetar a terminação nervosa e, conseqüentemente, a liberação de acetilcolina (Figura 11). Realmente, há evidências de que a despolarização parcial da terminação nervosa por uma corrente elétrica catódica ou por um excesso de K^+ promove aumento da liberação espontânea de acetilcolina, isto é, aumenta a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (Bowman & Rand, 1980), como o observado no presente estudo para a MjTX-II.

Como comentado anteriormente, apesar de induzir evidente efeito bloqueador neuromuscular *in vitro*, as PLA₂s Lys49 são desprovidas de neurotoxicidade quando administradas por via intravenosa ou intraperitoneal (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Da mesma forma, essas proteínas também induzem drástica mionecrose local, quando injetadas por via intramuscular, mas são destituídas de atividade miotóxica sistêmica (Gutiérrez & Lomonte, 1995). A ausência de neurotoxicidade e miotoxicidade sistêmica das PLA₂s Lys49 pode estar relacionada a ligação não-específica dessas proteínas com diversos tipos celulares (Bultrón et al., 1993; Lomonte et al., 1994b, 1999), impedindo a orientação destas para sítios farmacológicos distantes, como terminações nervosas ou células musculares (Ponce-Soto et al., 2007). Esta hipótese, que tem sido proposta para diferenciar as ações locais e sistêmicas das PLA₂s homólogas (Ponce-Soto et al., 2007), pode ser estendida para explicar porque estas toxinas apresentam atividade bloqueadora neuromuscular em preparações isoladas, mas não induzem efeito neurotóxico *in vivo*. De fato, quando testadas *in vitro*, estas proteínas são colocadas diretamente em contato com os possíveis alvos de ação no complexo mioneural, não se perdendo por ligações a sítios não-específicos. Assim, independente do mecanismo de ação, o bloqueio da transmissão neuromuscular *in vitro* se estabelece.

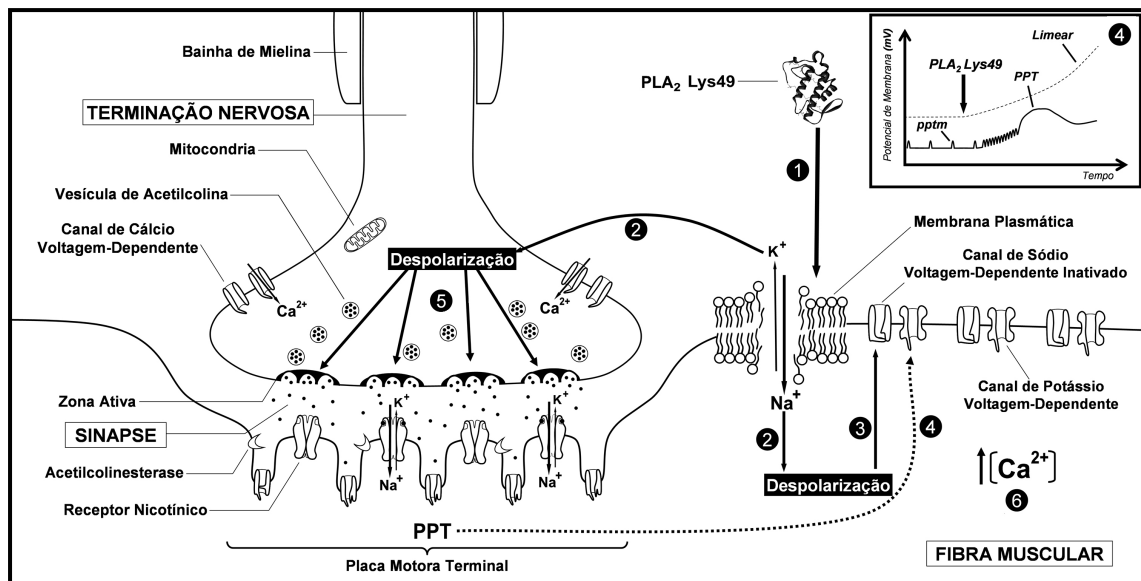


Figura 11 – Hipótese para o mecanismo de bloqueio neuromuscular induzido por PLA₂s Lys49 *in vitro*. (1) Ligação das PLA₂s Lys49 a domínios hidrofóbicos da membrana plasmática das células musculares e alteração não-enzimática da estrutura da membrana. (2) Colapso do gradiente iônico e despolarização da fibra muscular e da terminação nervosa, devido ao reequilíbrio do gradiente de concentração de íons sódio e potássio. (3) Inativação dos canais de sódio voltagem-dependentes na região peri-juncional. (4) Aumento do limiar de excitabilidade da fibra muscular, tornando o PPT subliminar para a geração do potencial de ação muscular, com conseqüente bloqueio da transmissão. (5) Aumento da liberação espontânea de acetilcolina, i.e. da frequência dos pptms (4), devido a despolarização da terminação nervosa. (6) Elevação na concentração citosólica de cálcio, devido a ruptura da membrana da fibra muscular, iniciando uma série complexa de efeitos degenerativos na célula. PPT = potencial de placa motora terminal; pptm = potencial de placa motora terminal em miniatura.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- ✓ A suramina é uma ferramenta importante para o estudo da relação estrutura-atividade das miotoxinas PLA₂s Lys49, indicando o envolvimento das regiões C-terminal e de parte do “loop” de cálcio nas atividades miotóxica e bloqueadora da transmissão neuromuscular *in vitro* destas toxinas;
- ✓ O extrato bruto de *Casearia sylvestris* é um potencial agente neutralizador das PLA₂s Lys49;
- ✓ O bloqueio da transmissão neuromuscular induzido pela MjTX-II, bem como pela BthTX-I e PrTX-I, provavelmente, decorre da despolarização da fibra muscular causada pela ação desestabilizadora de membrana destas toxinas.
- ✓ A falta de atividade neurotóxica sistêmica pode estar relacionada com a ligação não específica das PLA₂s Lys49 com os vários tecidos, impedindo assim a orientação destas toxinas para sítios farmacológicos distantes, como terminações nervosas ou células musculares.

RESUMO

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) que apresentam substituição do resíduo de aspartato pelo de lisina na posição 49, PLA₂s Lys49 homólogas, são importantes componentes miotóxicos dos venenos de serpentes da família Viperidae. Estas proteínas induzem severa mionecrose através de um mecanismo cálcio-independente. Tradicionalmente, as PLA₂s Lys49 são classificadas como miotoxinas não-neurotóxicas, visto que não causam paralisia quando injetadas *in vivo*, mesmo em doses elevadas. No entanto, vários estudos *in vitro* demonstram que as PLA₂s Lys49 dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* induzem bloqueio neuromuscular em preparações isoladas. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avançar no conhecimento do mecanismo da ação paralisante *in vitro* destas toxinas. Para tanto, foram caracterizadas as atividades da MjTX-II, isolada do veneno da *Bothrops moojeni*, em preparações frênico-diafragma de camundongos, através de estudos miográfico, eletrofisiológico e morfológico. Os efeitos desta toxina foram comparados com os da PrTX-I e da BthTX-I, isoladas do veneno da *Bothrops pirajai* e da *Bothrops jararacussu*, respectivamente. Além disto, foi avaliada a capacidade da suramina e do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* em neutralizarem as ações destas toxinas. Os resultados obtidos mostraram que a MjTX-II, da mesma forma que a BthTX-I e a PrTX-I, induziu efeitos miotóxico e bloqueador neuromuscular na preparação frênico-diafragma de camundongos. O estudo eletrofisiológico revelou a atividade despolarizante das três toxinas na membrana da fibra muscular, bem como a habilidade da MjTX-II em induzir aumento na frequência dos potenciais de placa motora terminal em miniatura. A pré-incubação com o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* neutralizou as atividades miotóxica e bloqueadora neuromuscular das três toxinas. De forma similar, a pré-incubação com suramina neutralizou as atividades da MjTX-II. Tomados em conjunto, tais achados sugerem que a despolarização celular pode ser a causa do bloqueio neuromuscular *in vitro* promovida pelas PLA₂s Lys49 homólogas. Ainda, uma possível explicação para a ausência de neurotoxicidade e miotoxicidade sistêmicas das PLA₂s Lys49 foi proposta com base na ligação não-específica dessas proteínas com diversos tipos celulares, que impediriam a orientação destas toxinas para sítios farmacológicos distantes.

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂s) with a lysine substituting for the highly conserved aspartate 49, Lys49 PLA₂ homologues, are important myotoxic components in venoms from snakes of Viperidae family. These proteins induce conspicuous myonecrosis by a catalytically-independent mechanism. Traditionally, the Lys49 PLA₂ homologues are classified as non-neurotoxic myotoxins given their inability to cause paralytic effect when injected *in vivo*, even at relatively high doses. However, a series of *in vitro* studies has shown that several Lys49 PLA₂ homologues from *Bothrops* snake venoms induce neuromuscular blocking activity on nerve-muscle preparations *in vitro*. Therefore, the aim of this work was to advance in the understanding of the mechanisms underlying the *in vitro* paralyzing action of these proteins. Thus, we characterized the activities of MjTX-II, from *Bothrops moojeni* venom, in mice phrenic-diaphragm preparation by means of myographical, electrophysiological and morphological approaches. The effects of this toxin were compared with those of PrTX-I and BthTX-I, from *Bothrops pirajai* and *Bothrops jararacussu* venoms, respectively. Besides this, we evaluated the ability of suramin and the aqueous extract of *Casearia sylvestris* in neutralizing the actions of these toxins. The results showed that the MjTX-II, as well as BthTX-I and PrTX-I, induced myotoxic and neuromuscular blocking activities in phrenic-diaphragm preparation of mice. The electrophysiological study revealed the depolarizing activity of these toxins in the muscle fiber membrane and the ability of MjTX-II to increase the frequency of miniature endplate potentials. The pre-incubation with the aqueous extract of *Casearia sylvestris* neutralized both myotoxic and neuromuscular blocking activities of all toxins. Similarly, the pre-incubation with suramin neutralized the activities of MjTX-II. Taken together, these findings suggest that the cell depolarization may be the cause of the *in vitro* neuromuscular blockade promoted by Lys49 PLA₂s. Therefore, a possible explanation for the lack of both systemic neurotoxicity and myotoxicity of Lys49 PLA₂s was proposed based on the non-specific binding of these proteins with different cell types, which inhibit their orientation to distant pharmacological sites.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. **Philadelphia, 1996. 468p.**

AMARAL, C.F.S.; DA SILVA, O.A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v.23, p.877-885, 1985.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v.82, p.755-763, 2000.

ANGULO, Y.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.D.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.32, p.63, 2000.

ANGULO, Y.; CHAVES, E.; ALAPE, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.339, p.260-267, 1997.

ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**, v.46, p.291-296, 2005.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂: a structural review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.

ARRUDA, E.Z.; SILVA, N.M.V.; MORAES, R.A.M.; MELO, P.A. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalide snake venoms. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.35, p.723-726, 2002.

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.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. Acidente crotálico. 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, 2009. p.108-115.

BATINA, M.D.E.F.; CINTRA, A.C.; VERONESE, E.L.; LAVRADOR, M.A.; 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 of the active components. **Planta Med.**, v.66, n.5, p.424-428, 2000.

BIONDO, R.; PEREIRA, A.M.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v.85, n.10, p.1017-1025, 2003.

BOLÁNOS, R. **Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica**. São José: Editorial Universidad da Costa Rica, 1982. 136p.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v.127, p.21-30, 2000.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v.39, p.1863-1869, 2001.

BORJA-OLIVEIRA, C.R.; KASSAB, B.H.; SOARES, A.M.; TOYAMA, M.H.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; RE, L.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Purification and N-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂ Neuwiedtoxin-I and Neuwiedtoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) venom. **J. Venom. Anim. Toxin. Incl. Trop. Dis.**, v.13, p.103-121, 2007.

BOWMAN, W.C.; RAND, M.J. Striated muscle and neuromuscular transmission. In: _____. **Textbook of pharmacology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980. p.17.1-17.56.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico: tratamento de mordeduras das cobras. **Rev. Med. São Paulo**, v.13, p.265-278, 1903.

BRAZIL, V. **Contribution à l'étude d'origine ophidiene**. Paris: A. Maloine, 1905.

BRUSÉS, J.L.; CAPASO, J.; KATZ, E.; PILAR, G. Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. **J. Neurochem.**, v.60, p.1030-1042, 1993.

- 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 A₂, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon**, v.31, p.217-222, 1993.
- BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **J. Lipid Res.**, v.50, suppl., p.S237-S242, 2009.
- CALMETTE, A. Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Ann. Inst. Pasteur**, v.8, p.275-291, 1894.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **Venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Comstock/Cornell Press, 1989.
- CAVALCANTE, W.L.; SILVA, M.D.; GALLACCI, M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. **Chem. Biol. Interact.**, v.151, p.95-100, 2005.
- CAVALCANTE, W.L.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, p.490-497, 2007.
- CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; AS, J.M.; WARD, R.J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. **Biochem. J.**, v.366, p.971-976, 2002.
- CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull World Health Organ.**, v.76, p.515-524, 1998.
- CINTRA, A.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Protein Chem.**, v.12, p.57-64, 1993.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M.G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; LEITE, G.B.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytother Res.**, v.22, n.6, p.784-790, 2008.

- COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v.31, n.10, p.1237-1247, 1993.
- COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J.R.; CORRADO, A.P.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; DONATO, J.L.; LEITE, G.B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. **Toxicon**, v.36, n.10, p.1323-1332, 1998.
- COSTA, P.D.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**, v.37, n.8, p.1143-1153, 1999.
- DA SILVA GIOTTO, M.T.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.; DE AZEVEDO JUNIOR, W.F.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, v.30, p.442-454, 1998.
- DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**, v.52, n.6, p.655-666, 2008.
- DAVIDSON, F.F.; DENNIS, E.A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. **J. Mol. Evol.**, v.31, p.228-238, 1990.
- DE AZEVEDO JUNIOR, W.F.; WARD, R.J.; LOMBARDI, F.R.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; ARNI, R.K. Crystal structure of myotoxin-II: a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* venom. **Prot. Pept. Lett.**, v.4, p.329-334, 1997.
- DE AZEVEDO JUNIOR, W.F.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Structure of a Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper). **Toxicon**, v.37, p.371-384, 1999.
- DE OLIVEIRA, M.; CAVALCANTE, W.L.; 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, 2009. p.6-21.

DE SOUSA, M.V.; MORHY, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Amino acid sequence of a myotoxic Lys49-phospholipase A₂ homologue from the venom of *Cerrophidion_Bothrops godmani*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1384, p.204-208, 1998.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.; DEULOFEN, V. (Eds.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971.

DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, L.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. Cross reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops species*. **Mem. Inst. Butantan**, v.51, p.153-168, 1989.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1070, p.455-460, 1991.

DOS SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.D. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.37, p.77-83, 1992.

FATT, P.; KATZ, B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. **J. Physiol.**, v.115, p.320-370, 1951.

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.1301-1311, 1996.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. 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, 2009. p.81-95.

FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; KAISER, I.I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.284, p.352-359, 1991.

GALLACCI, M.; OLIVEIRA, M.; DAL PAI-SILVA, M.; CAVALCANTE, W.L.; SPENCER, P.J. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.57, p.239-245, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; GENÉ, J.A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v.27, n.7, p.735-745, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; CHAVES, F.; MORENO, E.; CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v.84, p.159-164, 1986.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v.42, p.915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v.51, p.80-92, 2008.

HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS, J.B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. **Toxicon**, v.32, p.257-265, 1994.

HELUANY, N.F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v.30, p.1203-1210, 1992.

HOLLAND, D.R.; CLANCY, L.L.; MUCHMORE, S.W.; RYDE, T.J.; EINSPHAR, H.M.; FINZEL, B.C.; HEINRIKSON, R.L.; WATENPAUGH, K.D. The crystal structure of a lysine

49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.17649-17656, 1990.

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

INCERPI, S.; DE VITO, P.; LULY, P.; RUFINI, S. Effect of ammodytin L from *Vipera ammodytes* on L-6 cells from rat skeletal muscle. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1268, p.137-142, 1995.

JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. **Toxicon**, v.31, n.3, p.243-255, 1993.

JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. The role of extracellular ions in the pathogenesis of myonecrosis induced by a myotoxin isolated from Broad-Banded copperhead (*Agkistrodon contortrix laticinctus*) venom. **Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v.107, p.359-366, 1994.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.278, p.319-325, 1990.

KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I.S. South American snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v.14, p.359-374, 1995.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v.42, p.827-840, 2003.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A.L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.**, v.202, p.1165-1168, 1991.

LEE, W.H.; DA SILVA GIOTTO, M.T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.; GARRAT, R.C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂—a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v.40, p.28-36, 2001.

- LIU, S.Y.; YOSHIKUNI, K.; ODA, N.; OHNO, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S.; KIHARA, H. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A₂ with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem.**, v.107, p.400-408, 1990.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J.L.; LEITE, G.B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; FONTANA, M.D.; BON, C.; RODRIGUES SIMIONI, L. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. **Toxicon**, v.40, n.9, p.1283-1289, 2002.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MATA, E. Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.23, p.807-813, 1985.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v.27, p.725-733, 1989.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.; OTERO, R.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M.E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v.28, p.1137-1146, 1990.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L.A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem. Pharmacol.**, v.9, p.1509-1518, 1994a.
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; 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.29867-29873, 1994b.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.32, p.1359-1369, 1994c.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J.R.; OHNO, M.; DANIELE, J.J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**, v.37, p.145-158, 1999.

- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, p.885-901, 2003.
- MAGRO, A.J.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.311, p.713-720, 2003.
- MAHANTA, M.; MUKHERJEE, A.K. Neutralisation of lethality, myotoxicity and toxic enzymes of *Naja kaouthia* venom by *Mimosa pudica* root extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v.75, n.1, p.55-60, 2001.
- MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; DE ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, n.5, p.615-626, 1995.
- MARAGANORE, J.M.; HEINRIKSON, R.L. The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A₂. **J. Biol. Chem.**, v.261, p.4797-4804, 1986.
- MARAGANORE, J.M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KÉZDY, F.J.; HEINRIKSON, R.L. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. **J. Biol. Chem.**, v.259, 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.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.7, p.743-756, 2007.
- McMANUS, J.F.A.; MOWRY, R.W. Staining methods: histologic and histochemical medical division. New York: Harper & Brother, 1960. p.283-310.
- MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol. Ther.**, v.48, n.2, p.223-236, 1990.
- MEBS, D.; KUCH, U.; CORONAS, F.I.; BATISTA, C.V.; GUMPRECHT, A.; POSSANI, L.D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhafermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon**, v.47, p.797-811, 2006.

MELO, P.A.; SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscles by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **Toxicon**, v.26, p.87-95, 1988.

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, p.285-291, 1993.

MELO, P.A.; DO NASCIMENTO, M.C.; MORS, W.B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v.32, n.5, p.595-603, 1994.

MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**, v.37, p.199-215, 1999.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.65, p.2897-2912, 2008.

MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, v.28, p.1293-1301, 1990.

MURAKAMI, M.T.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; MARTINEZ, A.B.; CALIL-ELIÁS, 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.

MURAKAMI, M.T.; GAVA, L.M.; ZELA, S.P.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of suramin, a highly charged polysulfonated naphthylurea, complexed with a myotoxic PLA₂ from *Bothrops asper* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1703, n.1, p.83-85, 2004.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; BELO, C.A.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v.95, p.175-182, 2004.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; SILVA, G.H.; CARDOSO, D.F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**, v.39, p.1477-1485, 2001.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; BEATRIZ MESA, M.; DUQUE, E.; RODRIGUEZ, O.; LUIS ARANGO, J.; GOMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; MARIA RODRIGUEZ, L.; CARO, E.; MARTINEZ, J.; CORNEJO, W.; MARIANO GOMEZ, L.; LUIS URIBE, F.; CARDENAS, S.; NUNEZ, V.; DIAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v.40, p.1107-1114, 2002.

OWNBY, C.L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v.17, p.213-238, 1998.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p.411-445, 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 A₂ from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. **Toxicon**, v.36, p.1155-1163, 1998.

PINHO, F.M.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.47, p.24-29, 2001.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E.M.; PLEITSCH, M.C.; WELLS, T.N.C.; CLEMETSON, K.J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-Mr phospholipases A₂: purification, characterization and computer modeling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v.319, p.961-968, 1996.

PONCE-SOTO, L.A.; BARROS, J.C.; MARANGONI, S.; HERNANDEZ, S.; DAL BELO, C.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v.150, n.2, p.291-297, 2009.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1770, p.585-593, 2007.

PRIANTI JUNIOR, A.C.; RIBEIRO, W.; LOPES-MARTINS, R.A.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; LEITE, G.B.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**, v.41, n.5, p.595-603, 2003.

RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A(2) homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein J.**, v.27, n.6, p.355-362, 2008.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipases A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.11627-11636, 1985.

RIBEIRO, L.A.; PIRES DE CAMPOS, M.J.; ALBUQUERQUE, M.J.; TAKAOKA, N.Y. Acidente ofídico no Estado de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.39, p.4-7, 1993.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.50, p.153-165, 2007.

RODRIGUES, V.M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A.L.; MALTANETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.44, p.305-314, 2004.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; ZAMUNÉR, S.R.; COGO, J.C.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; CORRADO, A.P. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, v.43, n.6, p.633-638, 2004.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESSE, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v.10, p.475-489, 1983.

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 Ca²⁺

stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon**, v.33, p.1479-1489, 1995.

ROSENBERG, P. Phospholipases. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. (Eds.). **Handbook of toxinology**. New York: Marcel Dekker, 1989. p.67-277.

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.

RUFINI, S.; CESARONI, M.P.; BALESTRO, N.; LULY, P. Proliferative effect of ammodytin L from the venom of *Vipera ammodytes* on 208F rat fibroblasts in culture. **Biochem. J.**, v.320, p.467-472, 1996.

RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENSEK, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J.Z. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, v.31, p.12424-12430, 1992.

SÁ, J.M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T.L.; DE OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; WARD, R.J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. **Biochem. J.**, v.382, p.191-198, 2004.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1761, n.11, p.1246-1259, 2006.

SCOTT, D.L.; ACHARI, A.; VIDAL, J.C.; SIGLER, P.B. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistridon piscivorus piscivorus*. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.22645-22657, 1992.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, H.G.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v.250, p.1541- 1546, 1990.

SHIMOHIGASHI, Y.; TANI, A.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI, Y. Lysine-49 phospholipases A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. **J. Biochem.**, v.118, p.1037-1044, 1995.

SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; TOYAMA, M.H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-

49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v.36, p.503-514, 1998.

SOARES, A.M.; SESTITO, W.P.; MARCUSSI, S.; STABELI, R.G.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, O.A.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, p.258-270, 2004.

SOARES, A.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.373, p.7-15, 2000a.

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 A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.378, p.201-209, 2000b.

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 A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.387, p.188-196, 2001.

SOARES, A.M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C.A.; LEITE, G.B.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.34, p.668-677, 2002.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; FONTES, M.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v.142, p.371-381, 2006.

TSAI, I.H.; WANG, Y.M.; CHEN, Y.H.; TSAI, T.S.; TU, M.C. Venom phospholipases A₂ of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochem. J.**, v.377, p.215-223, 2004.

- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie**, v.82, p.815-831, 2000.
- VAN DEENEN, L.L.M.; DE HAAS, G.H. The substrate specificity of phospholipase A₂. **Biochim. Biophys. Acta**, v.70, p.538-553, 1963.
- VAN DEN BERGH, C.J.; SLOTBOOM, A.J.; VERHEIJ, H.M.; DE HAAS, G.H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A₂. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A₂ and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49]phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. **Eur. J. Biochem.**, v.176, p.353-357, 1988.
- VILLALOBOS, J.C.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; ANGULO, Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicol. In Vitro**, v.21, p.1382-1389, 2007.
- WARD, R.J.; ALVES, A.R.; RUGGIERO NETO, J.; ARNI, R.K.; CASARI, G. A Sequence space analysis of Lys49 phospholipases A₂: clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. **Protein Eng.**, v.11, p.285-294, 1998.
- WARD, R.J.; DE OLIVEIRA, A.H.; BORTOLETO, R.K.; ROSA, J.C.; FACA, V.M.; GREENE, L.J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Prot. Expr. Purif.**, v.21, p.134-140, 2001.
- WARD, R.J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER, R.; SÁ, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v.362, p.89-96, 2002.
- WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: BON, C.; GOYFFON, M. (Eds.). **Envenomings and their treatments**. Lyon: Fondation Marcel Mérieux, 1996. p.63-76.
- WATANABE, L.; SOARES, A.M.; WARD, R.J.; FONTES, M.R.; ARNI, R.K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v.87, p.161-167, 2005.

YAMAGUCHI, Y.; SHIMOHIGASHI, Y.; CHIWATA, T.; TANI, A.; CHIJIWA, T.; LOMONTE, B.; OHNO, M. Lys-49 phospholipases A₂ as active enzymes for beta-arachidonoyl phospholipid bilayer membranes. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.43, p.19-26, 1997.

YOSHIZUMI, K.; LIU, S.Y.; MIYATA, T.; SAITA, S.; OHNO, M.; IWANAGA, S.; KIHARA, H. Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49 phospholipase A₂ with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). **Toxicon**, v.28, p.43-54, 1990.

ZAMUNÉR, S.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v.44, n.3, p.259-271, 2004.