

YOKO OSHIMA FRANCO

**NOVA ABORDAGEM NO ESTUDO DA
FARMACOLOGIA DA BOTHROPSTOXINA-I
(*Bothrops jararacussu*)**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Doutorado em Farmacologia da Farmacêutica Yoko Oshima Franco.

Campinas, 29 de novembro de 2001.


*Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
- Orientadora -*

YOKO OSHIMA FRANCO

**NOVA ABORDAGEM NO ESTUDO DA
FARMACOLOGIA DA BOTHROPSTOXINA-I
(*Bothrops jararacussu*)**

*Tese de doutorado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.*

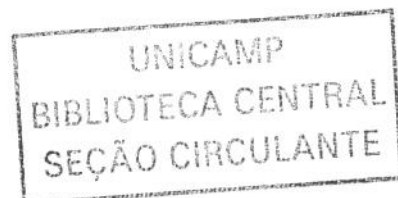
Orientação: Profª. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Co-orientação: Profª. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Campinas

UNICAMP - 2001

iii



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

~~F849n~~
F848n Franco, Yoko Oshima
Nova abordagem no estudo da farmacologia da bothropstoxina -1
(*Bothrops jararacussu*) / Liliâne Aparecida Teixeira Arnaldi.
Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Lea Rodrigues Simioni , Maria Alice da Cruz Höfling
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Manganês. 2. Junção neuromuscular. 3. Eletrofisiologia. 4.
Heparina. I. Lea Rodrigues Simioni. II. Maria Alice da Cruz Höfling.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

UNIDADE	B.P.
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F848n
V	
TOMBO BC.	48568
PROG.	16-837102
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00166899-2

018 ID 238398

Banca Examinadora da Dissertação de Doutorado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado

Prof. Dr. Fábio Bucarechi

Profa. Dra. Adelia Cristina de Oliveira Cintra

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/11/01

Meu pai

Fez nascer em mim meus melhores sentimentos. Conseguia estimular para que eu produzisse o meu melhor. E como eu me sentia bem e feliz tentando convencê-lo de que eu era o máximo! E quantas lições... E quantas lembranças de sua sabedoria. E quantos exemplos dados. Que dom maravilhoso!

Minha mãe

Despertou em mim o querer. Não era fácil atender às necessidades e caprichos juvenis, com sete filhos para cuidar. E, depois da vida, depois de todo o amor a nós dedicados, a grande consequência: ensinou-nos a lutar pelo que queríamos. Obrigada pelo exemplo de luta. Luta pelo querer. Querer que nos impulsionam na vida.

Leno

Meu ancoradouro, forte e seguro, que reserva/conserva o meu lugar, em todos os momentos, tormenta ou calmaria. Refúgio de paz e amor.

André

Meu querido amor! Que presente divino poder ser sua mãe. Às vezes penso não merecer tanto!

Juliana

Minha querida e guerreira filha. Quanto aprendo com você, pura renovação. Estar ao seu lado torna cada dia precioso.

Jacqueline

Costumo dizer que você é o meu anjo. E anjos protegem. Que capacidade é essa de me pedir carinho, tão do seu jeito! Exatamente nos momentos em que eu também estou precisando.

A todos os docentes, meu reconhecimento não apenas pela produção e divulgação do conhecimento, mas acima de tudo, pela nobre função de educadores.

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pela orientação — não apenas acadêmica — mas também de vida. A ética norteia a vida humana, mas o amor é o que verdadeiramente transforma os seres. Obrigada por tudo o que fez por mim!

À Profa. Dra. Maria Alice Cruz Höfling, querida co-orientadora que tanto admiro, obrigada pela valiosa contribuição, pelo sorriso incentivador com que sempre me recebeu. Um exemplo profissional a ser seguido.

À Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi por tão bem cuidar de seus pupilos (no Brasil e no exterior) e contagiar com essa alegria irradiante. Por ser capaz de mostrar que o entusiasmo é um louvor à vida. Fonte inspiradora.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pela valiosa ajuda, em momentos em que quase desanimei! Pura sensibilidade em captar e não permitir que isso acontecesse. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, por orientar e enriquecer todos os trabalhos científicos. I have been learnt a lot with you. Thank you.

Aos Profs. Dr. Nadim F. Heluany, Dra. Léa Rodrigues Simioni, Dra. Gun Birgita Mendes, Dra. Júlia Prado Franceschi, Dra. Nancy A. Teixeira, Dra. Albetiza L. Araújo, Dr. Marcos D. Fontana e Dr. Fábio Bucarechi, pelos convites feitos em alguns momentos para que desse aula. Obrigada pela confiança depositada, mesmo não tendo sido possível atendê-los, às vezes.

Ao Prof. Stephen Anthony Shaw, pela habilidade e paciência em incentivar o aprendizado de uma língua estrangeira. Puro talento. Verdadeira agregação de valor.

Aos meus amigos queridos, que me tornam o ser mais rico, pois os considero verdadeiros tesouros!

Gildo Bernardo Leite, pela amizade preciosa. Sete anos de uma agradável convivência e afinidade. Minha admiração é crescente e sem limites. Quem sabe um dia Deus permite e eu consiga retribuir tudo o que fez por mim.

Caroline Ribeiro Borja de Oliveira, doce Carol, depositária de minha confiança. Como é bom saber que existem pessoas como você no mundo. Todo meu carinho e respeito.

Cháriston André Dal Belo, grande amigo! Sua conduta é exemplo e isso só aumenta a lista de amigos que faz e que, como eu, estarão sempre torcendo por você. Obrigada pela força na eletrofisiologia. Sem o equipamento, sequer teria começado...

Sara Castro Hernandez, nossa impetuosa e carinhosa Sarinha. Que nossas lágrimas e risadas tenham sido aproveitadas com sabedoria. Foi de muito crescimento o nosso convívio. Conte sempre comigo, menininha.

Em algum lugar do universo, Dra. Diva F. Cardoso. Foi muito bom conhecê-la e me sinto honrada de ter um pouco de você neste projeto de doutorado...

Amanda Abdalla Valério e Gustavo Henrique Silva, que Deus os recompense em dobro pela ajuda oferecida. Tomara que vocês encontrem muitas Amandas e Gustavos pela vida afora. Só assim entenderão o que fizeram por mim.

Aos amigos do laboratório, André, Ludmila, Rosany, Daniel, Valdemir, Ricardo, Viviane, Ericleison. Encontramo-nos, cada qual com seu objetivo, mas certamente um em comum: a busca da verdade pelo viés da ciência. Que esta busca seja incessante em nossas vidas, em todos os sentidos!

Saudades das companhias de Stella, Patrícia, Francine, Márcia, Rosana, Rejane.

Pensaram que eu os tivesse esquecido? Impossível, pois sem suas ajudas, Zé Ilton, Adilson e Miguel, desenvolver este trabalho teria sido penoso. Novamente, o meu obrigado, por tudo!

A todos os funcionários e alunos do Departamento de Farmacologia, reitero minhas palavras: obrigada a todos pela convivência madura e agradável de todos estes anos.

Aos funcionários e alunos do Departamento de Histologia e Embriologia, obrigada por contribuírem na minha formação como pesquisadora.

À Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelos excelentes serviços prestados. Destaque aos que mais solicitei durante o doutorado: Wagner, Marcos, Alexandro, Péricles, Mercedes, Mário, Ilsy, Helymar, Silvia. Obrigada!

À UNICAMP, pela oportunidade.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

SENHOR,

Desnecessário externar meus sentimentos, pois que me conheces. Porém, quero agradecer pelas oportunidades concedidas. Por ter encontrado o meu caminho, por querer estar à altura de meus queridos alunos. Por permitir que eu faça uso de minhas faculdades no nobre exercício de educar, pois que já não me sinto apenas, uma professora. Obrigada, Senhor, por permitir que eu faça uso de minha voz, do saber que apreendi e do meu amor, na formação de muitas pessoas. Fortaleça-me Senhor, a cada dia, fazendo-me instrumento de sua vontade, na conscientização das pessoas visando a um mundo melhor, pois que este pode ser melhor e depende apenas de cada um. E ainda que seja apenas um, Senhor, pode ser a diferença.

Trabalhei com suas criaturas, camundongos, pintainhos e coelhos. Ceifei suas vidas, mas cada um que partia eu pensava: quisera eu também ter a sua utilidade. E minha existência já teria tido um sentido. Assim, Senhor, desejo ser tão útil quanto foi cada camundongo, pintainho ou coelho.

Obrigada por me presentear com uma família maravilhosa e amigos tão nobres, no exercício de lapidação de minha alma. Sinto-me tão rica de amor. Continuo tentando acertar com todos, em detrimento de muitas faltas cometidas. Muitas vezes estou ausente, mas meu coração está unido ao coração de cada um, através de muita oração e amor. Por tudo o que me deu, Senhor, obrigada.

RESUMO.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Histórico da Bothropstoxina-I.....	27
2. OBJETIVOS GERAIS.....	31
3. CAPÍTULO 1 — Neutralização da bothropstoxina-I (<i>Bothrops jararacussu</i>) por antiveneno anticrotoxínico (<i>Crotalus durissus terrificus</i>) e heparina.....	35
3.1. Revisão da literatura.....	38
3.1.1. Estudos de neutralização com anticorpos.....	38
3.1.2. Estudos de neutralização com heparina.....	38
3.2. Objetivos.....	42
3.3. Materiais e Métodos.....	43
3.4. Resultados.....	51
3.5. Discussão.....	62
4. CAPÍTULO 2 — Transmissão neuromuscular: influência de íons manganês no estudo da farmacologia da BthTX-I (<i>B. jararacussu</i>).....	67
4.1. Revisão da literatura.....	70
4.1.1. Cálcio (Ca^{2+}).....	70
4.1.2. Manganês (Mn^{2+}).....	71
4.1.3. Metabolismo de Mn^{2+} , Sr^{2+} e Ca^{2+} na terminação nervosa.....	73
4.2. Objetivos.....	74
4.3. Materiais e Métodos.....	75

4.4. Resultados.....	76
4.4.1. Ensaios miográficos com íons Mn^{2+} e BthTX-I.....	76
4.4.2. Conhecendo a ação de íons Mn^{2+} utilizando drogas clássicas da Farmacologia.....	84
Influência de 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) sobre a ação de íons Mn^{2+}	84
Influência do Ca^{2+} sobre a ação de íons Mn^{2+}	85
Influência do dantrolene sobre a ação de íons Mn^{2+}	86
Influência da substituição de Ca^{2+} pelo Sr^{2+} na solução de Tyrode, sobre a ação de íons Mn^{2+}	87
4.4.3. Efeito da BthTX-I em preparações tratadas ou não com íons Mn^{2+}	89
Envolvendo a 3,4-DAP (10 $\mu g/ml$).....	89
Envolvendo a d-tubocurarina (4 $\mu g/ml$).....	89
4.5. Discussão.....	96
5. CAPÍTULO 3 – A contribuição da eletrofisiologia no estudo da farmacologia da BthTX-I (<i>B. jararacussu</i>).....	99
5.1. Revisão da literatura.....	102
5.1.1. Resumo.....	102
5.1.2. Os conceitos que fundamentam a técnica eletrofisiológica.....	102
5.2. Objetivos.....	107
5.3. Materiais e Métodos.....	108
5.4. Resultados.....	111
5.5. Discussão.....	132
6. DISCUSSÃO GERAL.....	135

7. CONCLUSÃO.....	143
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	147
9. SUMMARY.....	151
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
11. ANEXO.....	173
Protocolo 255-1.....	175

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AntiCrTX	Antiveneno crotoxínico (não purificado)
Bjssu	Veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-I	Bothropstoxina-I
BSA	Bovine serum albumin
3,4-DAP	3,4-Diaminopiridina
d-Tc	d-Tubocurarina
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IgG	Imunoglobulina G
IgG-AntiCrTX	Antiveneno crotoxínico purificado
JNM	Junção neuromuscular
m	Conteúdo quântico
NFD	Nervo frênico-diafragma
OPD	ortho-phenylene diamine
PBS	Phosphate-buffered saline
PLA ₂	Fosfolipase(s) A ₂
PM	Potencial(s) da membrana em repouso
ppt	Potencial(s) de placa terminal
pptm	Potencial(s) de placa terminal em miniatura
RE	Retículo endoplasmático
RS	Retículo sarcoplasmático

Tabelas:

1	Medida do Potencial de Membrana em Repouso (-mV) – Controle Tyrode.....	113
2	Medida do Potencial de Membrana em Repouso (-mV) – Mn^{2+} (0.9 mM).....	114
3	Medida do Potencial de Membrana em Repouso (-mV) – BthTX-I (10 µg/ml).....	115
4	Medida do Potencial de Membrana em Repouso (-mV) – BthTX-I (5 µg/ml).....	116
5	Medida do Potencial de Membrana em Repouso (-mV) – Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (5 µg/ml, 120 min).....	117
6	Medida do Potencial de Membrana em Repouso (-mV) – Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min + BthTX-I 120 min).....	118

Figuras:

1	Reatividade dos antivenenos (ELISA).....	55
2	Immunoblotting de BthTX-I frente aos antivenenos IgG-AntiCrTX e AntiCrTX.....	56
3	Curvas da resposta contrátil dos controles e da neutralização da BthTX-I.....	57
4	Morfologia de preparações incubadas com Tyrode, Antivenenos e Heparina....	59
5	Morfologia de preparações incubadas com BthTX-I, BthTX-I + Antivenenos e BthTX-I + Heparina.....	61

6	Curvas da resposta contrátil do Mn^{2+} e da BthTX-I.....	79
7	Registros da força de contração muscular da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob efeito do Mn^{2+} e da BthTX-I (estímulo indireto).....	80
8	Ensaio com Mn^{2+} e BthTX-I.....	81
9	Registros da força de contração muscular de ensaios com Mn^{2+} e BthTX-I.....	82
10	Ensaio entre Mn^{2+} e 3,4-DAP, Ca^{2+} , dantrolene e Sr^{2+}	88
11	Ensaio com 3,4-DAP e BthTX-I.....	90
12	Efeito da BthTX-I em preparações pré-tratadas com Mn^{2+} e 3,4-DAP.....	92
13	Ensaio com d-tubocurarina (d-Tc), BthTX-I e Mn^{2+} , sob estímulos direto (D) e indireto (I).....	95
14	Potenciais da membrana em repouso (diafragma de camundongo).....	119
15	Frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm/min).....	122
16	Registros de pptm de preparação tratada com BthTX-I (10 μ g/ml).....	123
17	Frequência (pptm/min) & amplitude (mV) – Tyrode.....	125
18	Frequência (pptm/min) & amplitude (mV) – Mn^{2+} (0.9 mM).....	126
19	Frequência (pptm/min) & amplitude (mV) – BthTX-I (5 μ g/ml).....	127
20	Registros de pptm de preparação tratada com BthTX-I (5 μ g/ml).....	128
21	Frequência (pptm/min) & amplitude (mV) – $Mn^{2+} \rightarrow$ BthTX-I (5 μ g/ml).....	129
22	Frequência (pptm/min) & amplitude (mV) – $Mn^{2+} \rightarrow$ BthTX-I (10 μ g/ml).....	130
23	Sítios de ligação da BthTX-I, uma proposta do mecanismo de ação.....	142



RESUMO

A bothropstoxina-I (BthTX-I), principal miotoxina do veneno de *Bothrops jararacussu*, tem atividades neurotóxica e miotóxica. Investigou-se a habilidade do antiveneno crotoxinico e da heparina em prevenir as atividades neurotóxica e miotóxica da BthTX-I. Preparações nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongos estimuladas indiretamente (0.2 ms, 0.1 Hz) foram incubadas com BthTX-I (20 µg/ml) ou com BthTX-I pré-incubada com antiveneno ou heparina, por 30 min a 37 °C. BthTX-I (20 µg/ml) produziu 50% de bloqueio neuromuscular em preparações NFD em 31 ± 4 min, com completo bloqueio ocorrendo aos 120 min. O antiveneno crotoxinico e a heparina preveniram significativamente o bloqueio induzido pela BthTX-I ($84 \pm 4\%$ e 100% de proteção, respectivamente). A análise histológica dos músculos, após 120 min de incubação, mostrou que a BthTX-I danificou $48 \pm 6\%$ das fibras. A pré-incubação da toxina com antiveneno reduziu significativamente a extensão do dano (apenas $15 \pm 4\%$ das fibras foram afetadas, 70% de proteção, $P < 0.01$), enquanto a heparina não ofereceu nenhuma proteção ($34 \pm 7\%$ de fibras foram afetadas, $P > 0.05$ comparado à toxina sozinha). Assim, o antiveneno crotoxinico foi mais efetivo que a heparina em neutralizar os efeitos miotóxicos da BthTX-I.

A ação protetora do manganês (Mn^{2+}) contra a atividade neurotóxica da BthTX-I foi estudada em preparações NFD de camundongos. O Mn^{2+} (0.9 mM e 1.8 mM) produziu um rápido bloqueio (50% em tempo < 4 min) que foi espontaneamente reversível na menor concentração e produziu um efeito facilitatório após a lavagem da preparação. O pré-tratamento da preparação com 0.9 mM de Mn^{2+} impediu o bloqueio induzido pela BthTX-I (20 µg/ml), embora o efeito facilitatório visto com o Mn^{2+} sozinho, tenha ocorrido após a lavagem. Quando adicionado após a BthTX-I, o Mn^{2+} produziu seu característico bloqueio e, após a lavagem, a resposta contrátil retornou ao nível anterior à adição de Mn^{2+} . O uso de d-tubocurarina (d-Tc, 4 µg/ml) mostrou que a BthTX-I agiu diretamente sobre membranas da célula muscular e não sobre receptores nicotínicos. A BthTX-I, diferentemente da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP, 10 µg/ml), não bloqueou os canais de K^+ , nem afetou a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, como o dantrolene. Enquanto o Mn^{2+} teve uma ação sobre a membrana da fibra muscular, o mecanismo pelo qual ele protegeu contra o bloqueio neuromuscular induzido pela BthTX-I não ficou esclarecido.

A análise eletrofisiológica foi utilizada para investigar os efeitos da BthTX-I e o papel protetor do Mn^{2+} na junção neuromuscular, em preparações NFD de camundongos. Foram registrados os potenciais da membrana em repouso (PM), a frequência e a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm), de preparações incubadas com solução de Tyrode (controle), Mn^{2+} (0.9 mM), BthTX-I (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$) ou Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) antes da adição de BthTX-I (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$). O Mn^{2+} (0.9 mM) produziu uma imediata diminuição ($P < 0.05$, comparado ao controle) na frequência dos pptm seguido de um aumento drástico a partir dos 120 min ($P < 0.05$ comparado ao controle), sem alteração significativa nos PM. A BthTX-I (5 $\mu\text{g/ml}$) aumentou a amplitude (mas não a frequência) dos pptm por duas vezes ou mais, sem afetar os PM. Em contraste, a BthTX-I (10 $\mu\text{g/ml}$) produziu um efeito variável, com um aumento na frequência de pptm, em algumas fibras empaladas, mas não em outras. Em adição, progressiva despolarização da fibra muscular (-49.5 ± 3 mV, após 60 min) resultou na abolição dos pptm. Os resultados obtidos com baixas concentrações de BthTX-I sugeriram uma precoce ação pré-sináptica para esta toxina. A pré-incubação de preparações com Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) seguida pela BthTX-I (10 $\mu\text{g/ml}$) mostrou que Mn^{2+} realmente protegeu a fibra muscular, contra o dano desta toxina, uma vez que os PM foram de -72.5 ± 6 mV, ao final do experimento. Estes resultados indicaram uma ação do Mn^{2+} sobre a membrana da fibra muscular e reforçaram a ação pré-sináptica deste íon. O Mn^{2+} protegeu contra as atividades neurotóxica e miotóxica da BthTX-I, por agir primeiro como um antagonista do cálcio e posteriormente, como um análogo ao cálcio. No geral, estes achados indicaram que a BthTX-I pode agir via canais de cálcio em membranas, o axolema ou o sarcolema.



1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DA BOTHROPSTOXINA-I

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) foi fracionado através de filtração em gel em Sephadex G-50, por RODRIGUES-SIMIONI, BORGES, CECCARELLI (1983), obtendo-se, deste procedimento, uma fração, “pool IV”, com atividade miotóxica, e equivalente a 30% do conteúdo protéico do veneno total. Esta subfração ativa (“pool IV”), constituída por dois polipeptídios básicos ($S_{III}SP_{IV}$ e $S_{III}SP_{V}$), com peso molecular aproximadamente de 13.000, apresentava atividade hemolítica indireta na presença de íons Ca^{2+} , baixa ação fosfolipásica sobre lecitina de ovo e nenhuma atividade proteolítica. O “pool IV” mostrou-se ainda responsável pela ação bloqueadora do potencial de ação composto de nervo e músculo e das respostas musculares, tanto a estímulos elétricos diretos, como indiretos. Os autores sugeriram, então, que a fração possuía uma ação semelhante à das cardiotoxinas, toxinas presentes nos venenos de algumas serpentes da família Elapidae.

O “pool IV” foi purificado (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988) combinando filtração em gel Sephadex G-75 com cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25. A fração isolada $S_{III}SP_{V}$ foi denominada bothropstoxina-I (BthTX-I). Ao contrário do veneno bruto, que, além de miotóxico também afetava artérias e veias intramusculares podendo levar à trombose, a BthTX-I foi considerada especificamente miotóxica. A fração $S_{III}SP_{IV}$ foi denominada BthTX-II e também exibía uma ação miotóxica (GUTIÉRREZ *et al.*, 1991). Sua sequência de aminoácidos foi posteriormente identificada (PEREIRA *et al.*, 1998) sendo uma fosfolipase (PLA_2) Asp49, com baixa atividade fosfolipásica sobre lecitina de ovo.

Em preparações musculares de camundongos e aves a BthTX-I causava contratura, bloqueio das contrações musculares, despolarização e bloqueio do potencial de ação composto do músculo (HELUANY *et al.*, 1992). Os autores verificaram que a atividade bloqueadora na junção neuromuscular (JNM) não envolvia a participação do receptor nicotínico, nem a ativação dos canais de Na^+ e sugeriram a ação da toxina sobre os sítios de ligação de Ca^{2+} na membrana (sarcolema).

A sequência completa de aminoácidos da BthTX-I (fração S_{III}SP_V), toxina que corresponde a 15% das proteínas do veneno total, foi descrita por CINTRA *et al.* (1993). Tratava-se de uma proteína Lys49, de estrutura homóloga à PLA₂, constituída por uma única cadeia polipeptídica, com 121 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 13.720 e sete pontes dissulfeto.

O antagonismo aos efeitos miotóxicos do veneno de Bjssu e da BthTX-I foi investigado por MELO *et al.* (1993) através do uso de poliânions (heparina, sulfato de dextrana e sulfato de condroitina). A miotoxicidade foi avaliada em camundongos, *in vivo* e *in vitro*, pela determinação enzimática de creatinocinase (CK), proteína presente nas linhas M de células musculares intactas. Os poliânions formam complexos ácido-básicos com as miotoxinas básicas presentes em venenos botrópicos, neutralizando, desta forma, sua miotoxicidade.

A cristalização da miotoxina fosfolipásica Lys49, BthTX-I, foi realizada por ARNI *et al.* (1995). Análises preliminares revelaram a presença de quatro moléculas na unidade assimétrica, em comparação à miotoxina II da *B. asper*, também uma PLA₂ Lys49 mas que contém duas moléculas nesta unidade.

A sequência do código de cDNA da BthTX-I foi realizada por WARD *et al.* (1995), com o objetivo de entender a relação estrutura/função de dano à membrana, causado pela subfamília Lys49-PLA₂. Tal estudo mostrou que a BthTX-I é uma Lys49 e, em comparação com a já conhecida estrutura da miotoxina II da *B. asper*, demonstrou que os aminoácidos envolvidos na formação de uma nova estrutura dimérica na proteína também foram conservados.

A função da atividade fosfolipásica foi investigada por RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1995), em cultura de miócitos, sobre a ação farmacológica da BthTX-I. Os resultados demonstraram que a baixa atividade fosfolipásica da BthTX-I parece não desempenhar papel relevante sobre o efeito bloqueador da atividade contrátil. Dos estudos com dantrolene, droga que impede a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, os autores concluíram que os mecanismos e (ou) “pools” de Ca²⁺, que podem ser antagonizados por este agente, não estão ligados aos efeitos da BthTX-I sobre a contração muscular.

As atividades enzimática e biológica da BthTX-I e da BthTX-II, fosfolipases A₂ homólogas, foram determinadas como sendo atividades dissociadas ou independentes (LANDUCCI *et al.* (1998). Estes autores sugeriram que a hidrólise de fosfolipídios pela PLA₂ não seria essencial para a formação de edema.

Mais recentemente, SILVA GIOTTO *et al.* (1998) caracterizaram a alteração conformacional da BthTX-I, cristalográfica e espectroscopicamente, e relacionaram a possível relevância na transição desta estrutura com a atividade Ca²⁺-independente de dano sobre membrana .

Uma única etapa para a purificação da BthTX-I foi proposta por SPENCER *et al.* (1998) representando, principalmente, em um grande ganho de tempo. A pureza e a identidade foram comprovadas por SDS-PAGE e o seqüenciamento N-terminal resultou em uma banda única, com massa molecular de cerca de 14 kDa e a seqüência esperada dos cinco primeiros resíduos, S-L-F-E-L.

A neutralização dos efeitos neurotóxico e miotóxico do veneno de *B. jararacussu* e da BthTX-I, através de soro antibotrópico comercial foi investigada por OSHIMA-FRANCO *et al.* (2000) em preparações nervo frênico-diafragma e extensor digitorum longus de camundongos. Os autores apontaram para uma baixa eficiência do soro comercial em neutralizar os efeitos miotóxicos, ao contrário de seu efeito protetor contra os efeitos neurotóxicos do veneno bruto e sua principal toxina.

A neutralização dos efeitos neurotóxicos e miotóxicos da BthTX-I continuaram sendo investigados por OSHIMA-FRANCO *et al.* (2001), através de antiveneno produzido em coelhos contra a crotoxina, e os resultados obtidos foram comparados à neutralização exercida pela heparina e são constantes do capítulo 1 deste projeto.

Novos achados bioquímicos foram acrescentados por DE OLIVEIRA *et al.* (2001a) e DE OLIVEIRA *et al.* (2001b). Estes autores referiram ser a BthTX-I uma Lys49-PLA₂ homodimérica, onde se localiza um único resíduo Trp77 na interface do dímero. A forma dimérica da BthTX-I pode ser dissociada em pH=5.0 com a conseqüente exposição do resíduo Trp77 ao solvente aquoso. Verificaram, ainda, em estudos com lipossomos, que o dano à membrana é facilitado quando a BthTX-I encontra-se em sua forma dimérica.



2. OBJETIVOS GERAIS

Este projeto teve como objetivo principal avançar no conhecimento do mecanismo de ação da BthTX-I, a principal miotoxina isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*. Esta intrigante toxina despertou grande interesse na área da Toxinologia devido à sua característica bioquímica (uma PLA₂ Lys49, sem atividade fosfolipásica) e sua ação tóxica (uma elevada miotoxicidade) não decorrente, portanto, de atividade fosfolipásica. Além disso, a fisiopatologia causada pelo envenenamento por esta serpente e o tradicional tratamento adotado em casos considerados graves, a administração de soro anticrotálico em associação ao soro antibotrópico, norteou outro objetivo deste trabalho. Considerando-se o nível do desafio proposto utilizaram-se vários agentes farmacológicos e diferentes recursos analíticos.

Assim, três etapas principais foram traçadas e apresentadas na forma de capítulos (cada um contendo objetivos específicos, resultados e discussão), na tentativa de melhor abordar cada tema, a saber:

- Capítulo 1: intitulado Neutralização da bothropstoxina-I (*B. jararacussu*) por antiveneno crotoxínico (*Crotalus durissus terrificus*) e heparina.
- Capítulo 2: intitulado Transmissão neuromuscular: influência de íons manganês no estudo da farmacologia da BthTX-I (*B. jararacussu*).
- Capítulo 3: intitulado A contribuição da eletrofisiologia no estudo da farmacologia da BthTX-I (*B. jararacussu*).

Uma discussão geral integrou os três capítulos e permitiu apresentar um provável mecanismo de ação da BthTX-I, sobre a junção neuromuscular.



3. CAPÍTULO 1

Neutralização da bothropstoxina-I (*Bothrops jararacussu*) por antiveneno crotoxínico (*Crotalus durissus terrificus*) e heparina

O estudo do veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) teve seu início com VITAL BRAZIL & PESTANA (1909). VITAL BRAZIL (1903) mostrava que o soro anticrotálico revelava-se muito mais ativo que o antibotrópico nos acidentes causados pela Bjssu. Os sinais e sintomas exibidos no envenenamento causado por esta serpente assemelhavam-se, em parte, aos observados no acidente crotálico (VITAL BRAZIL, 1911). GONÇALVES (1956) descreveu que o veneno de Bjssu continha um peptídio semelhante à crotamina ("crotamine-like"), enquanto VITAL BRAZIL (1966) verificou que esta peçonha apresentava, à semelhança da crotoxina do veneno da cascavel sul americana, a propriedade de inibir a contratura causada pela acetilcolina no diafragma desnervado de rato.

O tratamento específico preconizado pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (1998) é a soroterapia que, no caso de acidente causado por venenos botrópicos, requer a administração de soro antibotrópico por via intravenosa, o mais precocemente possível e, na falta deste, de soro antibotrópico-crotálico ou antibotrópico-laquélico.

A maioria dos antivenenos comerciais existentes são de origem eqüina e a imunização é realizada com venenos de um número limitado de espécies do mesmo gênero ou de gênero diferente para aumentar o espectro de neutralização do antiveneno (RUSSELL, 1988). A neutralização de venenos de espécies diferentes daquelas usadas na imunização pode ocorrer devido à reatividade antigênica cruzada. Realmente, os venenos podem estar relacionados entre si, farmacológica e (ou) estruturalmente, o que permite a conseqüente neutralização por antiveneno heterólogo (MÉNEZ, 1985).

Neste estudo, verificou-se a capacidade do antiveneno crotoxínico em neutralizar os efeitos neurotóxico e miotóxico induzidos pela BthTX-I, em preparação nervo frênico-diafragma, usando como referência a capacidade neutralizante da heparina sobre o efeito miotóxico da BthTX-I.

3.1. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1. Estudos de neutralização com anticorpos

Anticorpos policlonais e monoclonais contra miotoxinas botrópicas têm sido usados em estudos de neutralização, para avaliar a contribuição relativa dessas toxinas no dano muscular induzido pelo veneno total (GUTIÉRREZ, OWNBY, ODELL, 1984; LOMONTE, GUTIÉRREZ, MATA, 1985; LOMONTE *et al.*, 1987a; LOMONTE *et al.*, 1990b; LOMONTE *et al.*, 1992; LOMONTE & KAHAN, 1988; MOURA *et al.*, 1991a; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 1999; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2000; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001), para determinar a presença de miotoxinas e sua relação antigênica em diferentes venenos (LOMONTE *et al.*, 1985; LOMONTE, MORENO, GUTIÉRREZ, 1987b; LOMONTE *et al.*, 1990a; LOMONTE *et al.*, 1990b; LOMONTE *et al.*, 1991; MOURA, CARDOSO, TANIZAKI, 1990; MOURA *et al.*, 1991a; MOURA *et al.*, 1991b), para estudar a relação estrutura-função em miotoxinas (YOSHIZUMI *et al.*, 1990; LOMONTE *et al.*, 1992; NIKAI *et al.*, 1993), para visualizar a miotoxina ligada a secções de músculo *in vitro* (BRENES, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1987; MÉNEZ *et al.*, 1992), para avaliar a distribuição de miotoxinas e anticorpos *in vivo*, em modelos animais (ROVIRA, CARMONA, LOMONTE, 1992) e para avaliar a eficácia de antivenenos, em estudos clínicos (DOS-SANTOS *et al.*, 1992; JORGE *et al.*, 1995), ou experimentais (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 1999; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2000; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001).

3.1.2. Estudos de neutralização com heparina

A heparina, uma substância com ação anticoagulante, é uma glicosaminoglicana altamente sulfatada que é produzida e armazenada exclusivamente nos grânulos secretores dos mastócitos.

Glicosaminoglicanas são mucopolissacarídeos que consistem de complexas cadeias de carboidratos caracterizadas por seu teor em aminoaçúcares (glicosaminas) e ácidos urônicos (glicurônico). Como constituintes da substância fundamental ou da matriz

extracelular, estão associadas aos elementos estruturais dos tecidos conjuntivos propriamente ditos, a elastina e o colágeno, ou de tecidos conjuntivos especializados, como o osso e a cartilagem. Suas propriedades de reter grande quantidade de água e ocupar espaço, assim protegendo ou lubrificando outras estruturas, estão associadas com o grande número de grupos -OH e cargas negativas na molécula, as quais, por repulsão afastam cadeias de carboidratos.

Exemplos de glicosaminoglicanas são o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina e a heparina. Esta última, é sintetizada pelos mastócitos a partir de açúcares precursores de uridinodifosfato como um polímero de resíduos alternantes de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina (BOURIN & LINDAHL, 1993). É comumente extraída de mastócitos da mucosa intestinal suína e do pulmão bovino. Há diferenças na composição de heparinas comerciais, mas suas atividades biológicas são semelhantes. A heparina é comercializada como sal sódico ou solução e a última é usada para a estocagem de sangue. A heparina tem ação direta e imediata, daí ser a droga de escolha para produzir um efeito anticoagulante rápido. É administrada por via parenteral. Por via oral ou sublingual, é inativa. Ela não atravessa a barreira placentária.

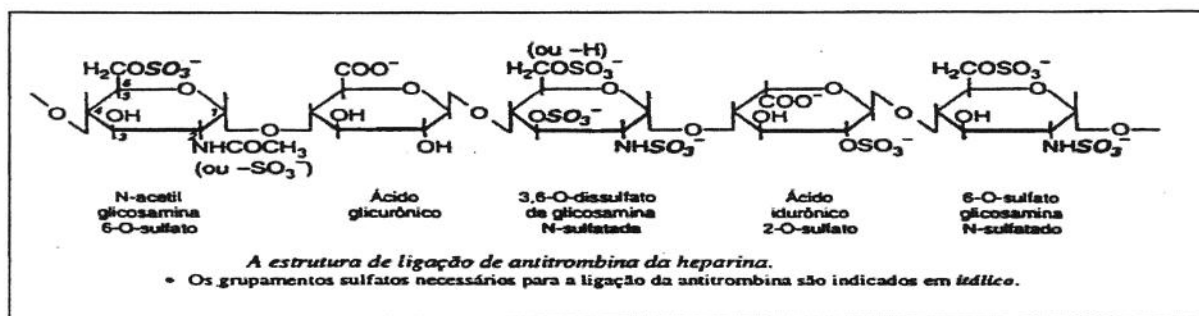
Outras glicosaminoglicanas relacionadas à heparina são os sulfatos de heparan e dermatan. O sulfato de heparan é encontrado na superfície da maioria das células eucarióticas e na matriz extracelular. Sofre menos modificações do polímero que a heparina e produz um efeito anticoagulante *in vitro* quando acrescentado ao plasma. As moléculas de sulfato de heparan, na superfície das células endoteliais vasculares ou na matriz extracelular subendotelial, interagem com a antitrombina circulante para fornecer um mecanismo antitrombótico natural.

O sulfato de dermatan também é um componente da superfície celular e da matriz extracelular e também produz efeito anticoagulante *in vitro*.

A heparina é encontrada nos grânulos secretores dos mastócitos ao redor de vasos, em órgãos e tecidos ricos nessas células (pulmões, músculos, fígado, sangue). Ao ser liberada pelos grânulos secretores, a heparina é rapidamente fagocitada e destruída pelos macrófagos. Sob condições normais a heparina não é detectada no plasma.

Em 1939, BRINKHOUS *et al.** descobriram que o efeito anticoagulante da heparina era mediado por um componente endógeno do plasma, denominado co-fator da heparina. Trinta anos depois, a antitrombina foi purificada do plasma e descobriu-se que atuava como co-fator da heparina. A antitrombina é um peptídeo glicosilado de cadeia única, com uma massa de 58 kDa, que inibe rapidamente a trombina, apenas em presença de heparina (OLSON & BJÖRK, 1992). A proteína é homóloga à família $\alpha 1$ -antitripsina de inibidores da protease, batizadas de *serpinas*, ou inibidores da serina proteinase. A antitrombina é sintetizada no fígado e circula em concentrações plasmáticas aproximadas de 2.6 μ M. Inibe os fatores de coagulação ativados das vias comuns intrínsecas, inclusive a trombina, aos fatores IXa, Xa, XIa, XIIa e calicreína. Entretanto, tem uma atividade relativamente pequena contra o fator VIIa. A antitrombina é um 'substrato suicida' dessas proteases; a inibição ocorre quando a protease ataca uma ligação peptídica Arg-Ser específica no sítio reativo da antitrombina e fica presa como um complexo 1:1 estável.

A heparina aumenta a reação trombina-antitrombina em pelo menos 1.000 vezes, por atuar como um molde catalítico ao qual se ligam tanto o inibidor quanto a protease. A ligação da heparina induz ainda alteração de conformação na antitrombina, que torna o sítio reativo mais acessível à protease. Quando a trombina se liga à antitrombina, a molécula de heparina é liberada do complexo. O sítio de ligação para a antitrombina na heparina é uma sequência pentassacarídica específica que contém um resíduo de glicosamina 3-O-sulfatado, conforme ilustração abaixo (Fonte: BOURIN & LINDAHL (1993):



* BRINKHOUS *et al.* (1939) *apud* Majerus, P. W., Broze Jr., G. J., Miletich, J. P., Tollefsen, D. M.- Fármacos anticoagulantes, trombolíticos e antiplaquetários. In: Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G., eds. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México, McGraw Hill, p. 992-993.

Esta estrutura ocorre em cerca de 30% das moléculas de heparina e é menos abundante no sulfato de heparan. Outras glicosaminoglicanas (sulfato de dermatan, 4- e 6-sulfato de condroitina) carecem da estrutura de ligação de antitrombina e não estimulam a antitrombina. As moléculas de heparina que contêm menos de 18 unidades de monossacarídeos (3 a 4 kDa) não catalisam a inibição da trombina pela antitrombina. Moléculas com esse comprimento ou mais são necessárias para ligar a trombina e a antitrombina simultaneamente. O pentassacarídeo acima ilustrado, pelo contrário, catalisa a inibição do fator Xa pela antitrombina. Neste caso, a catálise ocorre unicamente pela indução de uma alteração de conformação na antitrombina, o que facilita a reação com a protease. As heparinas de baixa massa molecular, que têm um comprimento insuficiente para catalisar a inibição da trombina, produzem um efeito anticoagulante, principalmente pela inibição do fator Xa pela antitrombina. A membrana celular é impermeável à heparina e inibe o canal de cálcio que é ativado pelo inositol trifosfato (IP₃) do retículo endoplasmático (GOSH *et al.*, 1988; BIRD, BURGESS, PUTNEY, 1993).

Resumidamente, o mecanismo de ação da heparina é potencializar a ação da antitrombina III e assim inativar a trombina; prevenir a conversão de fibrinogênio à fibrina e estimular a liberação de lipoproteína lipase, que hidrolisa triglicérides a glicerol e ácidos graxos livres (LEIKIN & PALOUCZEK, 1996-97).

A utilização de heparina como fator terapêutico nos distúrbios da coagulação provocados por picadas de serpentes é antiga (AHUYA, VEERARAGHAVAN, MENON, 1946) e é muito utilizada em acidentes causados pela serpente africana *Echis carinatus* (WARREL, POPE, PRENTICE, 1976; TENG, MA, OUYANG, 1985; SCHAEFFER *et al.*, 1986; SEIGNOT *et al.*, 1992). Recentemente foi demonstrado que a heparina pode ser eficaz contra a miotoxicidade de alguns venenos botrópicos (MELO & SUAREZ-KURTZ, 1988b; MELO & OWNBY, 1999). A heparina e outras glicosaminoglicanas e poliânions, devido ao seu caráter ácido, formam complexos com miotoxinas fosfolipásicas isoladas de venenos de *B. jararacussu* (MELO *et al.*, 1993) e *B. asper* (LOMONTE *et al.*, 1994a; LOMONTE *et al.*, 1994b), que possuem caráter básico, neutralizando suas atividades tóxicas quando pré-incubadas *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS

Utilizando-se um modelo de preparações isoladas nervo frênico-diafragma de camundongos, este estudo teve como objetivos:

a) Verificar a capacidade neutralizante aos efeitos neurotóxico e miotóxico da BthTX-I, principal fração isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, por antiveneno produzido em coelhos, a partir de imunização sucessiva com crotoxina, principal fração isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

b) Comparar os resultados obtidos acima, com protocolos similares realizados com misturas toxina:heparina.

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

- **Animais**

Coelhos machos New Zealand, adquiridos de produtor e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e camundongos Swiss, fornecidos pela Central de Bioterismo (UNICAMP). Este projeto, sob o protocolo nº 255-1 (Anexo, p. 164), foi integralmente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa-IB-UNICAMP).

- **Toxinas**

A BthTX-I foi fornecida pelo Dr. J. R. Giglio, Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo USP, Ribeirão Preto (SP). A crotoxina (CrTX) foi fornecida pelo Dr. Stephen Hyslop, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. IgG-AntiBjssu (antiveneno produzido em coelhos contra veneno total de *B. jararacussu*) foi fornecido pela Dra. Diva F. Cardoso, Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantã, São Paulo (SP).

- **Reagentes**

Os reagentes adjuvante completo de Freund H₃₇ Ra DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA), adjuvante incompleto Óleo Mineral, lote 709279 (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu Guaçu, SP), Historesin Embedding Kit (Leika Instruments GmbH, NuBloch/Heidelberg, Alemanha), Heparin® heparina sódica 5.000 U.I. L97111616, (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP) mais a solução nutritiva utilizada nas preparações biológicas: Solução de Tyrode (pH 7,0) — composição em mM — NaCl 137; KCl 2.7; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 0.49; NaH₂PO₄ 0.42; NaHCO₃ 11.9 e glicose 11.1 foram, assim, obtidos.

- **Imunização Direta**

Os coelhos, mantidos em gaiolas individuais, receberam ração e água *ad libitum*. A primeira sangria, antes de qualquer tratamento, representou a condição- controle. A dose do antígeno (crotoxina), definida para ser injetada nos coelhos, através da via s.c., foi de duas vezes a DL50 via i.v. para camundongos (MIDDLEBROOK & KAISER, 1989). A primeira imunização foi realizada com adjuvante completo de Freund. Após intervalo de 2 semanas, foram realizadas imunizações semanais com adjuvante incompleto (óleo mineral). A produção de anticorpos foi monitorada pelo método de imunodifusão dupla (OUCHTERLONY, 1949). Após 3 meses e meio, o animal foi exsanguinado via carótida. O soro foi separado, aliquotado e armazenado em freezer, a -25°C. Em parte do sangue adicionou-se anticoagulante para a obtenção de plasma e posterior purificação do antiveneno.

- **Imunodifusão dupla**

Este método foi descrito por OUCHTERLONY (1949) e consiste em se depositar o antígeno (crotoxina, 1 mg/ml) e o anticorpo (soro, 20 µl) em pontos diferentes (orifícios de 3 mm de diâmetro) de uma camada de gel (4 ml de ágar 1.2% em phosphate-buffered saline (PBS) posta em posição horizontal sobre uma lâmina de microscopia. Antígeno e anticorpo difundem-se um contra o outro, formando o precipitado. Na mesma lâmina foram testados o soro do animal sem qualquer tratamento (o que representou a condição-controle) e o soro obtido após imunização. Após 48 horas e lavagem por 3 dias, as lâminas foram envolvidas em papel de filtro umedecido, deixadas secar à temperatura ambiente e posteriormente coradas. O acompanhamento da produção de anticorpos era realizado até que a linha de precipitação se tornasse intensa, sinalizando a interrupção do processo de imunização e posterior sacrifício do animal.

• Dosagem de proteínas

Foi utilizado o método proposto por PETERSON (1977) baseado em uma curva padrão de proteínas ("linear log-log"). As amostras (soro e plasma) foram diluídas 1:100 em água destilada. Na sequência, alíquotas de 20 µl foram novamente diluídas em 480 µl de água destilada. Foram adicionados 500 µl da solução de trabalho A. Os tubos foram agitados em vórtex e deixados em repouso, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Foram adicionados 250 µl da solução de trabalho B, agitando em vórtex e aguardando-se 40 minutos à temperatura ambiente, para leitura das absorvâncias, em espectrofotômetro, a 700 nm, contra água destilada. Um branco de reativos, com o mesmo tratamento, foi utilizado, substituindo-se a amostra por água destilada. O conteúdo de proteínas (mg/ml) foi quantificado pela extrapolação da curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), processada paralelamente às amostras biológicas, em função das leituras de absorvâncias obtidas.

Soluções usadas na dosagem de proteínas:

Reativo I:

Sulfato cúprico pentahidratado	0.2 g
Tartarato de sódio e potássio	0.4 g
Bicarbonato de sódio	20.0 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

Preparo do reativo I:

- 1) Dissolver o bicarbonato de sódio em 50 ml de água destilada.
- 2) Dissolver o tartarato de sódio e potássio nos 50 ml de água destilada restantes e adicionar o sulfato cúprico pentahidratado, sob agitação.
- 3) Misturar a solução 1 com a solução 2, agitando.

Reativo II: Solução SDS ("sodium dodecyl sulfate") 10%

Reativo III: Hidróxido de Sódio, 0.8 N

Reativo IV: Reagente para fenol de Folin Ciocalteau, 2 N

Padrão: BSA 1 mg/ml

Preparo das soluções de trabalho A e B:

A: misturar nas proporções (1:1:1:1) o reativo I: reativo III: água destilada: reativo II. B: misturar na proporção (1:2) o reativo IV: água destilada. Preparar no momento do uso.

Preparo da Curva-padrão de BSA: a solução-mãe (1 mg/ml) foi diluída em água destilada até atingir as concentrações finais de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml.

• Purificação de IgG de coelho AntiCrTX por cromatografia de afinidade (Sepharese-Proteína G) usando sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

De uma parte do sangue do coelho colhido com anticoagulante (plasma) retirou-se os lipídios presentes e dialisou-se por 16 h em 50 mM de Tris/HCl pH 7.5 (tampão A). Seis alíquotas individuais de 0.5 ml foram diluídas no tampão A (v/v) e submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharese-Proteína G de 5 ml, previamente equilibrada com o mesmo tampão, usando o sistema FPLC (Pharmacia). Após a lavagem de proteínas não aderidas à proteína G, a fração IgG foi eluída utilizando-se 0.2 M de glicina/HCl, pH 2.8, contendo 0.5 M de NaCl. Frações de 1 ml foram coletadas em tubos contendo 60 µl de Tris, 1 M, e a eluição foi monitorada pela leitura da absorbância no comprimento de onda a 280 nm. Os tubos correspondentes à fração IgG foram reunidos e o material foi dialisado em 50 mM de Tris, pH 7.5. Após a diálise, a fração IgG foi concentrada por pressão positiva (sistema Amicon). A absorbância do material foi obtida em 280 nm e a concentração protéica foi determinada (3.3 mg/ml) usando-se o coeficiente

de extinção para IgG de coelho. A fração IgG foi então aliquotada e estocada a -20 °C até o momento do uso.

• **ELISA: avaliação da reatividade dos antivenenos AntiCrTX (não-purificado) ou de IgG-AntiCrTX (purificado) frente ao veneno total ou à BthTX-I:**

Placas de microtitulação (Corning, New York) foram sensibilizadas por 2 h a 37°C com 100 µl/cavidade de uma solução de PBS contendo a toxina ou o veneno total (15 µg/ml). Após a sensibilização, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com tampão de lavagem (PBS contendo 0.05% de Tween 20) e em seguida, incubadas por 1 h a 37 °C com solução saturante (PBS contendo 2% de gelatina). Após novo ciclo de 4 lavagens as placas foram incubadas por 1 h a 37°C com antivenenos produzidos por imunização de coelhos, IgG-AntiCrTX (purificado) ou com IgG-AntiBjssu (a partir de 200 µg/ml) ou ainda, com diferentes diluições de antiveneno AntiCrTX (não purificado) ou soro normal (a partir de 1:200), diluídos em tampão de incubação (PBS contendo 0.5% de gelatina). Após este período, as placas foram lavadas e incubadas por mais 1 h a 3 °C com o conjugado imunoenzimático (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído 5000 vezes em tampão de incubação contendo 0.05% de Tween 20). Ao fim deste período, as placas foram submetidas a um novo ciclo de lavagem e a reação foi revelada pela adição de 100 µl da solução cromógeno/substrato (0.5 mg/ml de OPD, ortho-phenylene diamine, dissolvido em tampão citrato 0.15 M, pH 5.0 contendo 15 µl de peróxido de hidrogênio/10 ml de solução cromogênica). Após 5 minutos a reação foi bloqueada pela adição de 50 µl/cavidade de H₂SO₄ a 30% e as placas foram lidas em espectrofotômetro (Titertek Multiskan) usando filtro de absorbância para 492 nm.

• **Immunoblotting**

BthTX-I (15 µg) foi separada através de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 12.5% utilizando o sistema padrão Laemmli

(LAEMMLI, 1970). As proteínas separadas foram transferidas eletroforéticamente para as membranas nitrocell (Pharmacia Biotech., código 80622079). As tiras foram bloqueadas à temperatura ambiente, com BSA 3%, dissolvido em PBS (p/v) durante 3 h. As membranas foram incubadas durante a noite com diferentes concentrações de IgG-AntiCrTX (purificado) ou com AntiCrTX (não purificado), diluído em 1% de PBS-BSA. Depois de lavar com PBS-Tween 0.5%, os anticorpos foram detectados com IgG de cabra anticeelho conjugado com peroxidase recoberta com anticorpo de cavalo (BioRad, cat. 172.1019). O “blot” foi lavado e revelado com 4-cloro-1-naftol (Serva, Alemanha).

• Preparação Nervo Frênico-Diafragma

Após anestesia com hidrato de cloral (300 mg/kg), os camundongos foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais. O diafragma com o nervo frênico foi cuidadosamente retirado pelo método de BÜLBRING (1946) modificado para camundongo, colocado em cuba contendo 5 ml de solução de Tyrode e preso, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂).

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos supramaximais, foi realizado através de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400.

O músculo foi submetido à tensão constante de 5 g/cm e à estimulação indireta (nervo frênico), com pulsos supramaximais, gerados por estimulador S48F (Grass Instruments), de 0.2 ms de duração e 0.1 Hz de frequência, por um período de 20 minutos para estabilização. Findo este período, o músculo recebeu vários tratamentos, descritos abaixo.

- **Neutralização cruzada da atividade bloqueadora induzida pela BthTX-I**

Em todos os experimentos foram utilizadas concentrações de 20 µg/ml de BthTX-I. A escolha desta dose foi baseada em resultados anteriormente obtidos com 10 µg/ml (não mostrado) e 20 µg/ml de toxina (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2000).

Misturas toxina-heparina ou toxina-antiveneno, na proporção 1:3, foram pré-incubadas a 37°C, por 30 minutos e, posteriormente, adicionadas à cuba contendo a preparação nervo frênico-diafragma, para determinar a capacidade neutralizante da heparina ou dos antivenenos crototóxicos — AntiCrTX ou IgG-AntiCrTX. A escolha desta proporção foi baseada em ensaios preliminares com o antiveneno, que se mostrou efetiva em conter o efeito bloqueador da BthTX-I. Cada experimento teve duração de 120 minutos. Ao final deste período, as preparações foram fixadas em solução de Bouin e reservadas para processamento histológico. As preparações incubadas com solução de Tyrode representaram os controles. Em alguns experimentos a preparação foi incubada com heparina ou com os antivenenos (AntiCrTX ou IgG-AntiCrTX) sozinhos.

- **Microscopia óptica: análise histológica**

A preparação nervo frênico-diafragma incubada com — BthTX-I (20 µg/ml) ou com as misturas (1:3) toxina-antiveneno ou toxina-heparina ou apenas com solução de Tyrode ou os antivenenos (60 µl/ml), AntiCrTX ou IgG-AntiCrTX, foi fixada em solução de Bouin, após o término do experimento (120 minutos) e processada para posterior análise histológica. Após fixação, os diafragmas foram desidratados e incluídos em historesina LKB (Bromma, Suécia); em seguida, foram confeccionados os blocos. Estes foram cortados em micrótomo Leica RM 2035 e as secções (2 µm de espessura) foram montadas em lâminas e coradas com uma mistura de azul de toluidina 0.5% (Vetec, São Paulo) e Borax 5% (Quimesp, São Paulo). O dano morfológico (índice de mionecrose) foi quantificado pela contagem do número de células lesadas e expresso como porcentagem do número total de células em três áreas não superpostas, não adjacentes de cada músculo (índice de mionecrose = [(número de células lesadas : número total de células) X 100].

Foram consideradas células lesadas as que apresentavam alterações leves (algumas regiões da fibra muscular com rupturas de membrana, sem nenhum comprometimento no mecanismo contrátil, pelo parâmetro miográfico), moderadas (quando a fibra muscular mostrava-se lesada na sua extensão) e severas (quando a maioria das fibras musculares mostravam-se mionecróticas, caracterizadas por vacúolos, aglutinação condensada de miofibrilas, fibras sem estriações e perda de material nuclear). Este procedimento foi usado em todos os experimentos-controle e preparações tratadas.

- **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não-pareado “*t*-Student”, com valor $P < 0.05$ considerado significativo.

3.4. RESULTADOS

Ensaios realizados com o antiveneno crotoxínico:

- **Dosagem de proteínas**

As concentrações de proteínas do antiveneno AntiCrTX foram de 78.5 mg/ml (soro) e 82.5 mg/ml (plasma), respectivamente. A maior concentração no plasma deve-se ao fato de que neste material biológico estão presentes proteínas que participam da cascata da coagulação, ao passo que o soro, sendo desprovido dessas proteínas exibiu um valor menor. A concentração de proteínas no antiveneno purificado (IgG-AntiCrTX) foi igual a 3.3 mg/ml.

- **ELISA**

A Figura 1 representa a reatividade dos antivenenos, em diferentes concentrações de IgG-AntiCrTX (purificado) ou AntiCrTX (não purificado) ou IgG-AntiBjssu (antiveneno contra o veneno total de *B. jararacussu*). Os diferentes antivenenos foram incubados em placas de microtitulação previamente sensibilizadas com BthTX-I (Fig. 1A) ou com o veneno total de Bjssu (Figura 1B).

- **Immunoblotting**

A Figura 2 ilustra o “immunoblotting” realizado com BthTX-I (15 µg) e revelado com 100 µg de IgG-AntiCrTX (1) ou AntiCrTX diluído 1:100 (2). Note que ambos os antivenenos, o purificado e o não purificado, reconheceram as bandas da BthTX-I.

- **Bloqueio neuromuscular induzido por BthTX-I e sua neutralização**

A BthTX-I (20 µg/ml) produziu 50% de bloqueio neuromuscular em intervalo de tempo de 31 ± 4 min (n=9), ideal para se estudar a capacidade neutralizante dos antivenenos e da heparina. A Figura 3A mostra que o controle Tyrode, bem como as preparações tratadas com os antivenenos (purificado ou não purificado) na proporção 1:3, não alteraram a resposta basal. Entretanto, preparações tratadas apenas com a heparina (1:3) mostraram um inédito efeito facilitador (aumento da amplitude da resposta contrátil), significativamente diferente do controle Tyrode ($P<0.05$).

Os ensaios de neutralização mostraram que o efeito neurotóxico induzido pela BthTX-I foi clara e significativamente antagonizado pelo tratamento com os antivenenos e com a heparina ($P<0.01$, Figura 3B). Os antivenenos (purificado ou não) foram eficientes em neutralizar o bloqueio neuromuscular característico da toxina ($P<0.01$) e não foram significativamente diferentes entre si. Interessante foi o efeito da mistura toxina:heparina (1:3) que, como ocorrido no tratamento com a heparina sozinha, induziu o mesmo efeito facilitador, mostrando a eficiência deste polianion em impedir a ação neurotóxica da miotoxina, representada pelo bloqueio neuromuscular. Compare a semelhança dos perfis miográficos das preparações incubadas com heparina com a da mistura toxina:heparina (Figura 3A, B).

- **Alterações morfológicas induzidas pela BthTX-I e sua neutralização**

A Figura 4 ilustra secções longitudinais de preparações nervo frênico-diafragma após 120 min de incubação, sob estimulação elétrica indireta. A Figura 4A mostra a aparência histológica do músculo, incubado com solução nutritiva Tyrode (controle). Foi observado que $17.5 \pm 5\%$ das fibras apresentavam alterações consideradas leves ao longo de sua extensão (flechas), enquanto as demais mostravam-se bem organizadas. Nestas, observam-se núcleos (N) arranjados periféricamente, o que possibilita visualizar suas estriações e sua aparência normal.

A Figura 4B ilustra uma secção de músculo após o tratamento com heparina, onde algumas fibras assemelham-se ao controle Tyrode, enquanto outras apresentam um aspecto escuro e sem estriações. O tratamento com heparina induziu alterações morfológicas leves e em um pequeno número de fibras com alterações consideradas moderadas. O índice de mionecrose resultante do tratamento com a heparina foi de $27 \pm 9\%$, não significativamente diferente do controle Tyrode.

A Figura 4C ilustra a aparência estrutural de fibras musculares de preparações incubadas com antiveneno AntiCrTX, com $24 \pm 7\%$ de fibras lesadas e sem diferença significativa em relação ao controle Tyrode. Observe que as fibras assumiram uma disposição ondulada ou ficaram contraídas, escurecidas ou interrompidas ao longo de sua extensão (flechas).

A Figura 4D retrata a aparência de uma preparação incubada com IgG-AntiCrTX com fibras onduladas, por vezes descontínuas (flechas) e cujo índice de fibras lesadas, consideradas moderadas, foi de $34.5 \pm 9\%$ no total de experimentos realizados. Não houve diferença significativa em relação às preparações incubadas com Tyrode.

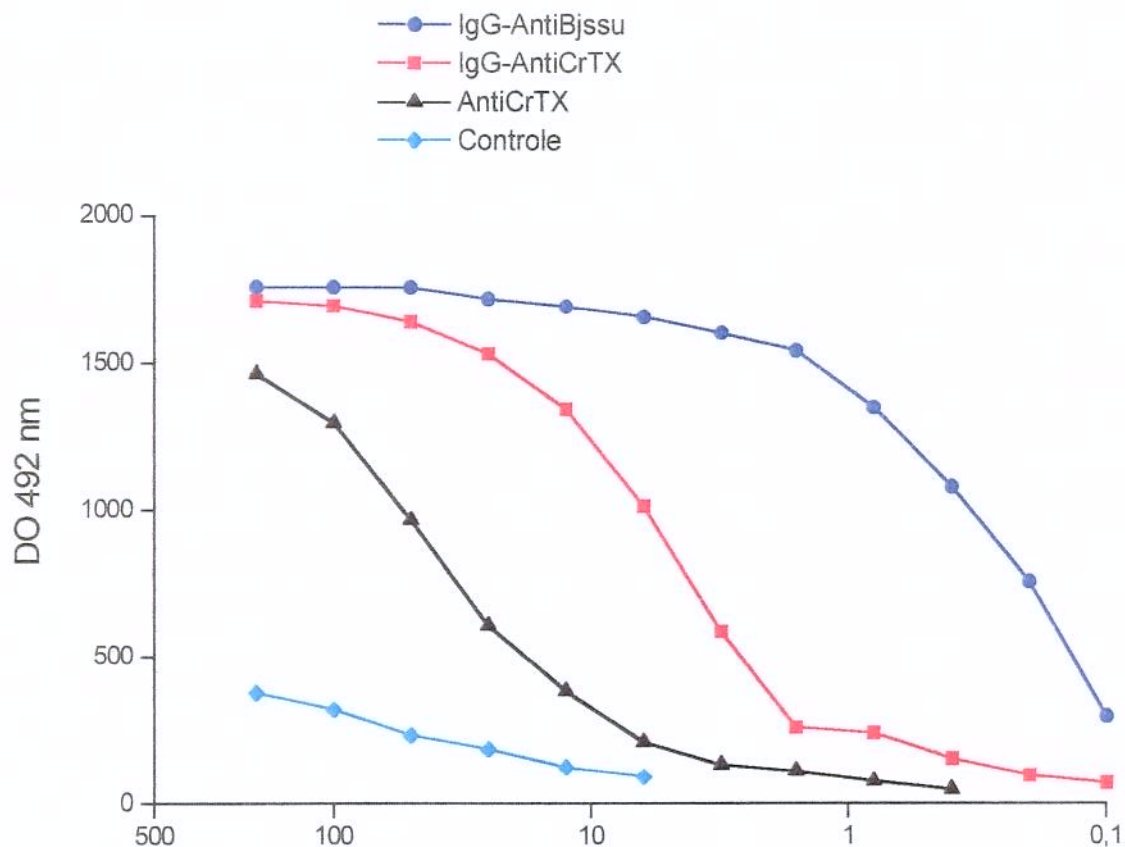
A Figura 5 mostra secções longitudinais de preparações incubadas com BthTX-I (A) ou em mistura toxina:heparina (B) ou com antivenenos, AntiCrTX (C) ou IgG-AntiCrTX (D), sob estimulação elétrica indireta por 120 minutos.

A toxina produziu cerca de $48 \pm 6\%$ de fibras lesadas no total de experimentos realizados. Para ilustrar o tipo de dano produzido pela BthTX-I foi selecionada uma área com alterações consideradas severas (Figura 5A) e caracterizadas por intensa mionecrose, onde as miofibrilas apresentam-se hipercontraídas, escurecidas e densamente agrupadas, em algumas regiões. Há canais e vacúolos (V) correspondentes a áreas citoplasmáticas aparentemente desprovidas de miofibrilas, acompanhado de um escurecimento do núcleo e aparência amorfa das fibras devido à ausência de estriação.

A Figura 5B mostra o efeito da BthTX-I em presença de heparina após 120 min. Neste caso, o número de fibras lesadas (de grau moderado a severo) foi de $34 \pm 7\%$ e não significativamente diferente ao da toxina sozinha.

Quando as preparações foram incubadas com misturas BthTX-I:AntiCrTX houve cerca de 70% de proteção (Figura 5C). O nível de fibras lesadas foi de $15 \pm 4\%$ e significativamente diferente quando comparado a valores de BthTX-I ($P < 0.01$). Por outro lado, IgG-AntiCrTX protegeu cerca de 45% (Figura 5D). Neste tratamento o nível de fibras lesadas foi de $26.5 \pm 6\%$, também significativamente diferente quando comparado aos valores da toxina ($P < 0.05$). Não houve diferença significativa entre os antivenenos, AntiCrTX e IgG-AntiCrTX, quanto à proteção contra os efeitos miotóxicos da toxina.

A



B

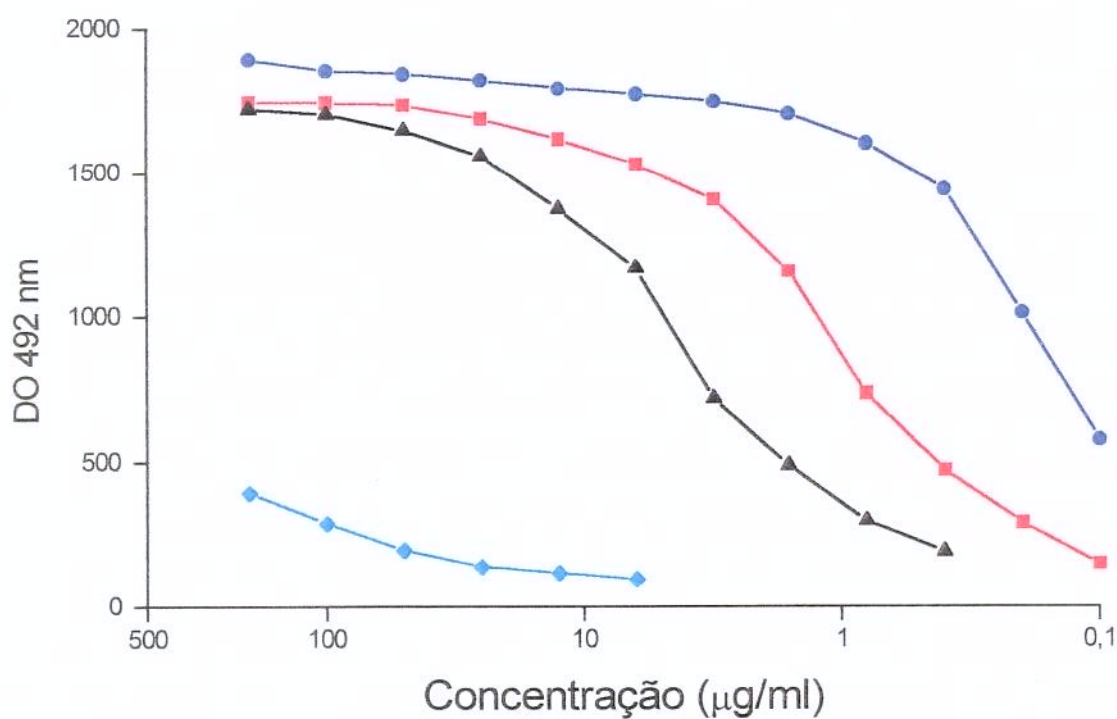


Fig. 1 - Reatividade dos antivenenos (ELISA). Diferentes concentrações de IgG-AntiCrTX, IgG-AntiBjssu e AntiCrTX em relação ao controle (soro normal de coelho). Os diferentes antivenenos foram incubados em placas de microtitulação previamente sensibilizadas com BthTX-I (A) ou Bjssu (B).

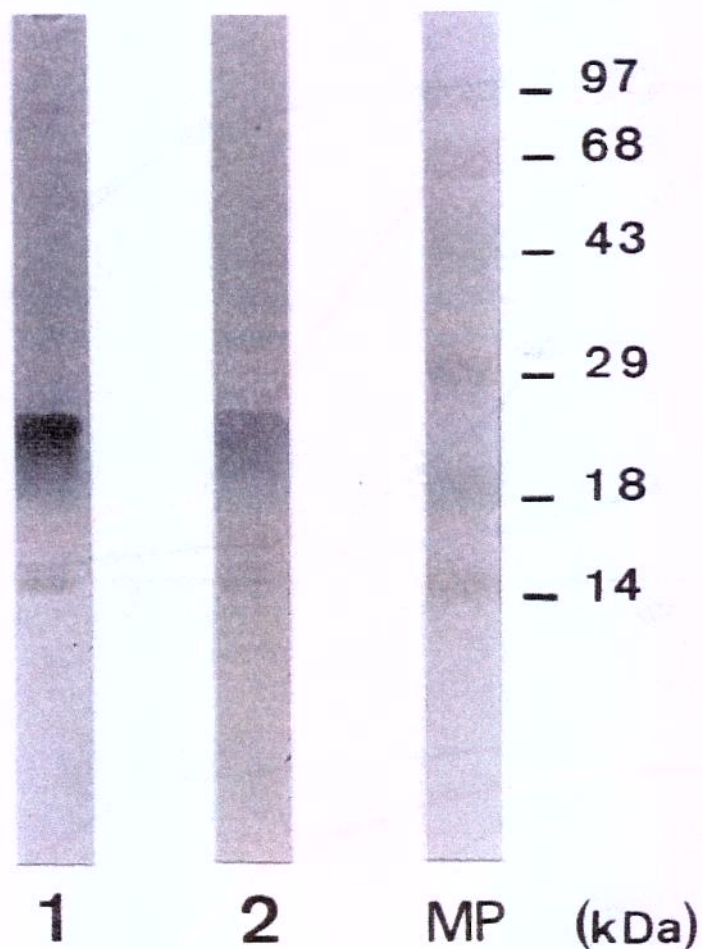
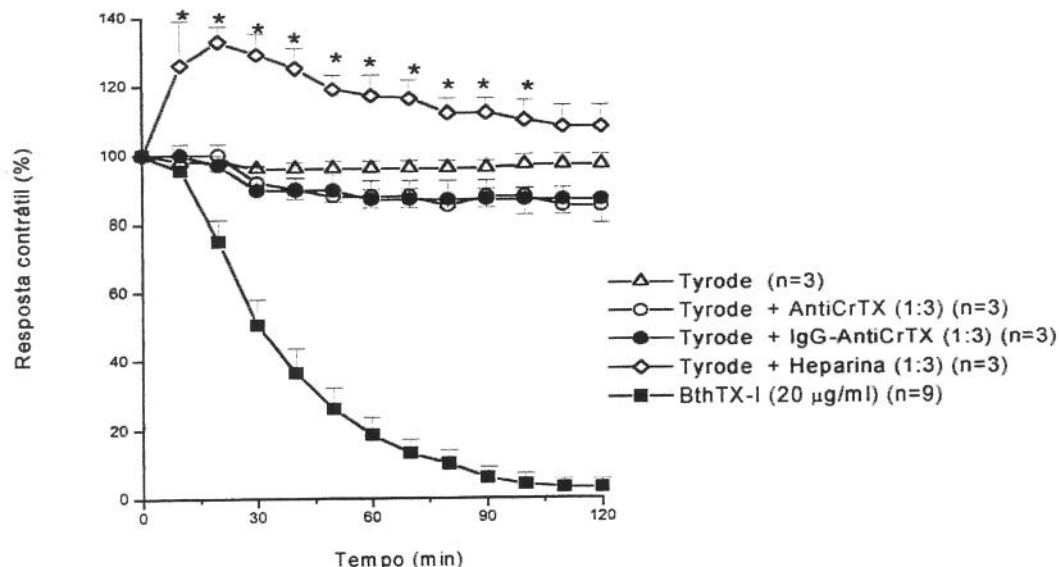


Fig. 2 - Immunoblotting de BthTX-I frente aos antivenenos IgG-AntiCrTx e AntiCrTx. BthTX-I (15 μ g) foi incubada com 100 μ g/ml de IgG-AntiCrTX (1) ou AntiCrTX diluído 1:100 (2) e revelada com conjugado IgG-peroxidase anti-coelho e 4-cloro-1-naftol. MP - marcador de proteínas (em kDa): lisozima –14.3, β -lactoglobulina – 18.3, anidrase carbônica (eritrócitos bovinos) –29.0, ovalbumina –43.0, albumina de soro bovino –68.0 e fosforilase B (músculo de coelho) –97.4.

A



B

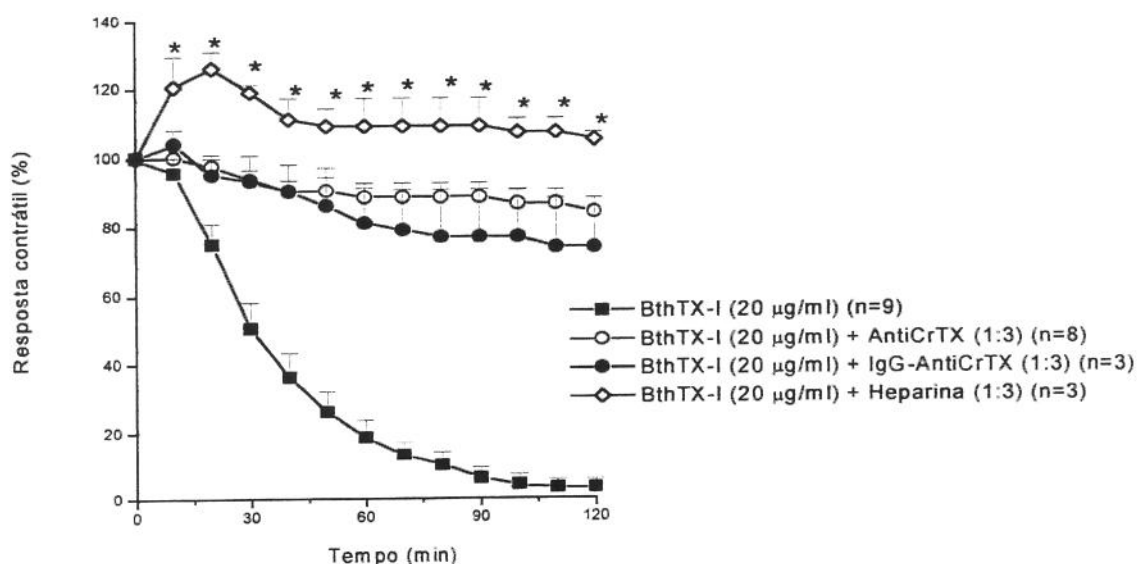


Fig. 3 – Curvas da resposta contrátil dos controles e da neutralização da BthTX-I. (A) Efeitos neuromusculares de preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (estímulo indireto). As preparações foram expostas a solução de Tyrode, AntiCrTX, IgG-AntiCrTX, Heparina e BthTX-I. Note a ação facilitatória da Heparina. * $P < 0.05$, comparado ao controle Tyrode. Os pontos representam a média \pm o erro-padrão do número de experimentos indicados nos parênteses. (B) Neutralização da ação neuromuscular da BthTX-I por AntiCrTX, IgG-AntiCrTX e Heparina. * $P < 0.05$, comparado aos antivenenos. Os pontos representam a média \pm o erro-padrão do número de experimentos indicados nos parênteses.

Fig. 4 – Morfologia de preparações incubadas com Tyrode, antivenenos e heparina - Após 120 min de estimulação elétrica indireta, preparações incubadas em solução de Tyrode (**A**) tiveram pouca alteração sobre a aparência das fibras, com apenas $17.5 \pm 5\%$ de fibras mostrando algum escurecimento e rompimento de membranas (flechas). Os núcleos (N) encontram-se localizados periféricamente e estriações estão presentes no músculo normal. A heparina (**B**) produziu alterações (flechas) semelhantes ao controle Tyrode em $27 \pm 9\%$ das fibras. AntiCrTX (**C**) afetou $24 \pm 7\%$ das fibras, produzindo ruptura nas membranas (flecha) e ondulações. IgG-AntiCrTX (**D**) causou lesões em $34.5 \pm 9\%$ das fibras, principalmente através da ruptura das membranas (flechas). O tipo de alteração observado nas preparações consideradas controles foi considerado de grau leve. Barras = 20 μm .

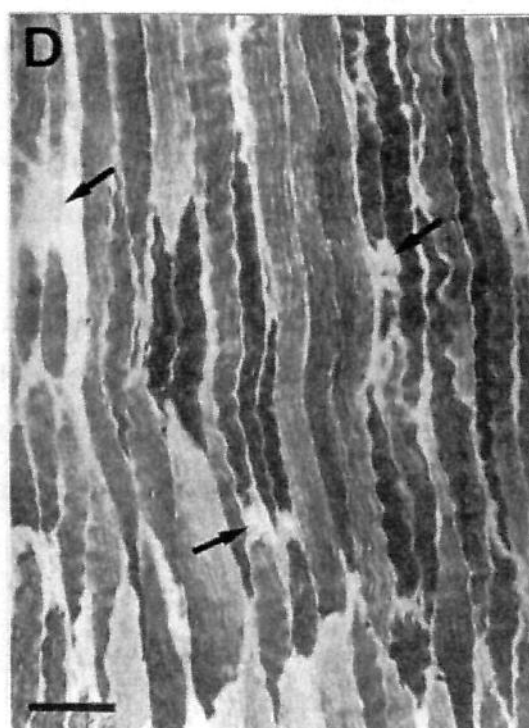
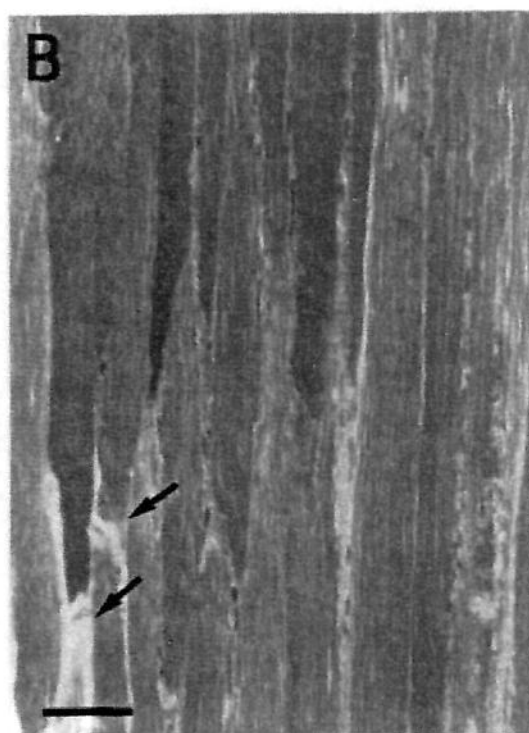
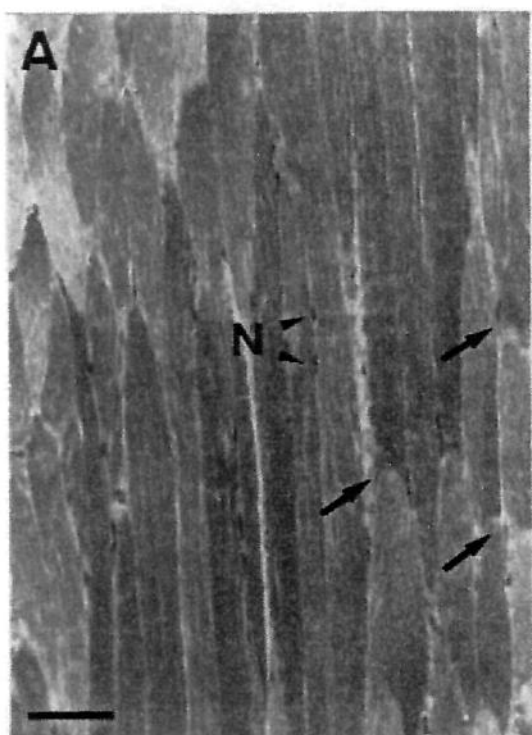
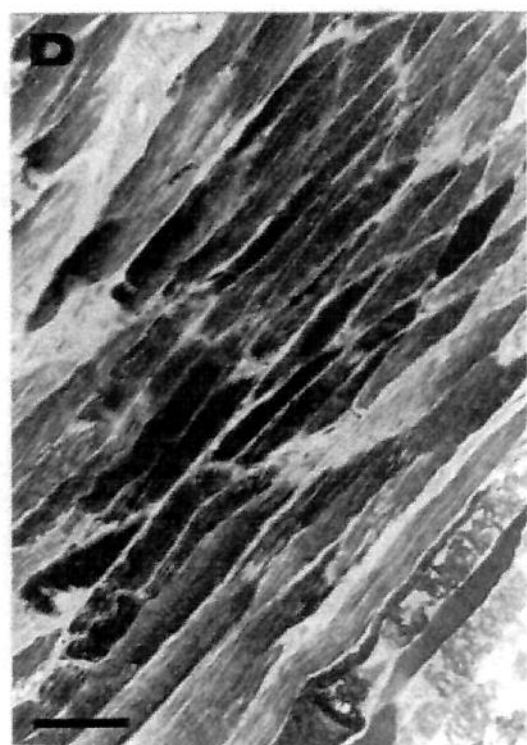
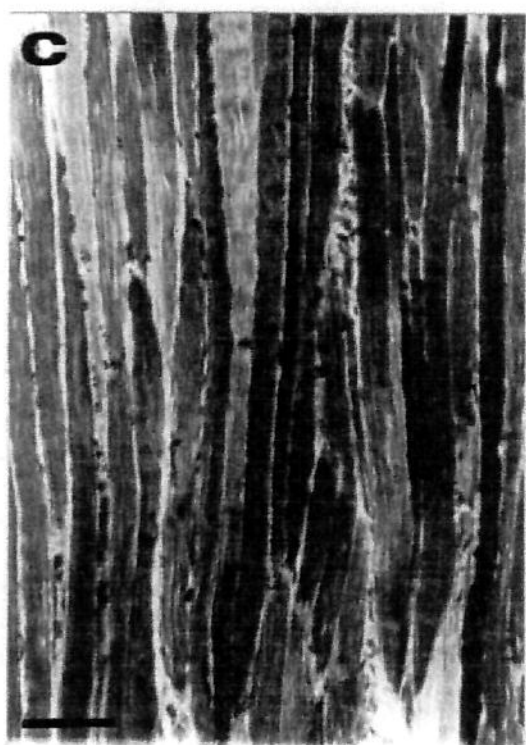
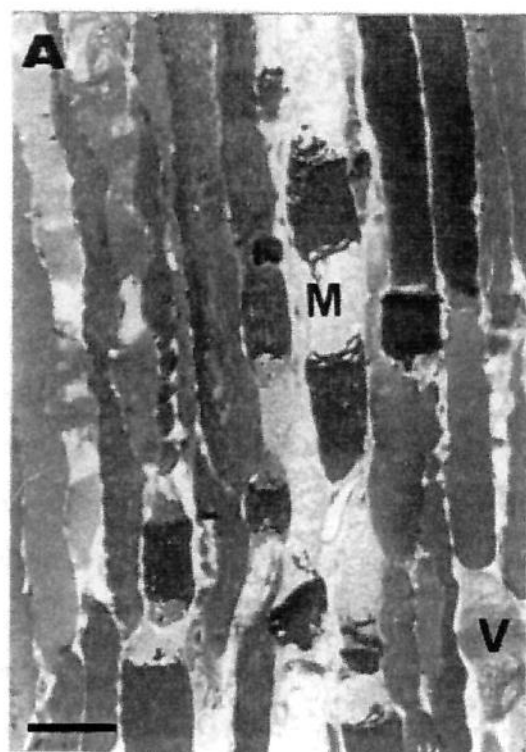


Fig. 5 – Morfologia de preparações incubadas com BthTX-I, BthTX-I + antivenenos e BthTX-I + heparina. Após 120 min de estimulação elétrica indireta as preparações incubadas com (A) BthTX-I (20 $\mu\text{g/ml}$) exibiram áreas de intensa mionecrose, que afetou $48 \pm 6\%$ das fibras musculares. Note fibras com vacúolos (V) e canais entre miofibrilas, aglutinação condensada de miofibrilas (flechas) e fibras sem estriações. Estas alterações nas fibras foram consideradas severas. As ilustrações seguintes, (B) BthTX-I:heparina ou (C) BthTX-I:AntiCrTX ou (D) BthTX-I:IgG-AntiCrTX mostram a proteção oferecida por heparina, AntiCrTX e IgG-AntiCrTX, respectivamente, contra as alterações morfológicas causadas por BthTX-I. A porcentagem de fibras afetadas foi $34 \pm 7\%$, $15 \pm 4\%$ e $26.5 \pm 6\%$ para B, C e D, respectivamente. A severidade das alterações morfológicas e o número de fibras afetadas em A foi maior que em C e D. Barras = 20 μm .



3.5. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se a habilidade do antiveneno contra a crotoxina (a principal toxina presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus*), produzido em coelhos, em neutralizar as ações neuromusculares e miotóxicas da BthTX-I (miotoxina isolada do veneno bruto de *B. jararacussu*). Este antiveneno protegeu efetivamente as preparações nervo frênico-diafragma contra o bloqueio neuromuscular da BthTX-I, dando suporte às observações clínicas de VITAL BRAZIL (1909), que constatou a eficiência do antiveneno anticrotálico nos acidentes causados pela jararacuçu.

O veneno de *B. jararacussu* é um imunógeno pouco eficaz e sua atividade letal não é eficientemente bloqueada pelo antiveneno específico ou por antivenenos de outros venenos botrópicos (DIAS DA SILVA *et al.*, 1989). O veneno bruto contém três proteínas com identidade imunológica para a fração crotoxina (PLA₂) da *C. d. terrificus* (DOS-SANTOS *et al.*, 1992) e, como mostrado na Figura 2, pelo menos uma dessas é a BthTX-I. Ambos os antivenenos contra a crotoxina, purificado e não purificado, neutralizaram os efeitos neuromusculares da BthTX-I.

A heparina também impediu a ação bloqueadora neuromuscular da BthTX-I. A heparina é uma glicosaminoglicana sulfatada, fortemente ácida, capaz de formar complexos ácido-básicos inativos com as miotoxinas básicas de venenos botrópicos (MELO & SUAREZ-KURTZ, 1988a; MELO & SUAREZ-KURTZ 1988b; MELO *et al.*, 1993; LOMONTE *et al.*, 1994a; LOMONTE *et al.*, 1994b). Surpreendentemente, quando testada sozinha na preparação nervo frênico-diafragma, a heparina produziu um efeito facilitatório sobre o músculo, em resposta à estimulação indireta. Este fenômeno pode refletir a capacidade da heparina em solubilizar acetilcolinesterases específicas na região da placa terminal (TORRES & INESTROSA, 1983; TORRES & INESTROSA, 1985; BRANDAN & INESTROSA, 1984; BRANDAN *et al.*, 1985), resultando no acúmulo de neurotransmissores na região sináptica e subsequente facilitação da neurotransmissão. O efeito facilitatório da heparina foi mantido mesmo em presença de BthTX-I. Esta observação sugere duas ações independentes para a heparina, as quais protegem contra o bloqueio induzido pela BthTX-I. Um mecanismo, de ordem (bio)química, fundamenta-se na interação ácido-básica, onde regiões básicas da BthTX-I interagiriam com cargas

acídicas (SO_4^{2-}) da heparina neutralizando, dessa forma, a neurotoxicidade. O outro mecanismo, de ordem farmacológica, envolve um efeito facilitatório, inferido pelo aumento da amplitude da resposta contrátil, acima descrito. A solubilização de acetilcolinesterases específicas levaria a um aumento de acetilcolina na fenda sináptica, capaz de se contrapor aos efeitos da BthTX-I sobre a neurotransmissão. A falta de efeito da BthTX-I, nesta preparação nervo-músculo, indica que a toxina não está disponível para exercer a sua ação neuromuscular. Esta interpretação foi corroborada pelos registros miográficos que mostraram apenas o efeito neuromuscular da heparina, em detrimento da presença da BthTX-I.

Preparações incubadas com BthTX-I (20 $\mu\text{g/ml}$) mostraram lesões mionecróticas típicas em $48 \pm 5\%$ das fibras. Os antivenenos (purificado e não purificado) neutralizaram a ação miotóxica da BthTX-I, enquanto a heparina não teve influência significativa sobre esta atividade. O nível de células lesadas em preparação tratadas com a heparina foi de $27 \pm 9\%$ e não foi significativamente diferente daquela exibida com solução Tyrode apenas ($17 \pm 5\%$), demonstrando que a heparina sozinha não causou mionecrose. Por outro lado, preparações tratadas com mistura de BthTX-I (20 $\mu\text{g/ml}$):heparina (60 $\mu\text{l/ml}$) não foram significativamente diferentes de preparações tratadas apenas com BthTX-I (20 $\mu\text{g/ml}$), sendo os níveis de mionecrose de $34 \pm 7\%$. Este achado foi inesperado considerando a proteção oferecida pela heparina contra o bloqueio neuromuscular da toxina e, também, pelos estudos de MELO & SUAREZ-KURTZ (1988a), MELO & SUAREZ-KURTZ (1988b) e MELO *et al.* (1993), que relataram sobre o efeito protetor da heparina contra os efeitos miotóxicos de venenos botrópicos, sob o parâmetro da quantificação da atividade de CK (*in vitro* e *in vivo*).

Os resultados obtidos sugerem que a BthTX-I pode conter diferentes sítios farmacológicos em sua estrutura e estes sítios variam em sua sensibilidade à ligação com a heparina. Diferentemente destes resultados com a heparina, estudos anteriores realizados com antiveneno crotoxínico, mostraram a sua eficiência contra os efeitos neurotóxico e miotóxico da crotoxina, principal toxina da *C. d. terrificus*. Neste caso, houve uma ação do antiveneno sobre ambos os sítios da crotoxina, sugerindo ser o sítio da atividade catalítica o mesmo da atividade miotóxica (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 1999).

Uma possível explicação para os presentes achados poderia ser uma interação não específica entre complexos toxina:heparina e proteínas envolvidas na extrusão de Ca^{2+} intracelular. Esta interação romperia a homeostase de Ca^{2+} intracelular (RICHTER & KASS, 1991) e levaria à mionecrose, porém, necessita ser comprovada. Uma segunda possibilidade seria uma grande afinidade da heparina pela acetilcolinesterase, maior que pela BthTX-I, deixando esta livre para exercer sua ação miotóxica.

Relatos clínicos têm demonstrado que a injeção subcutânea de heparina pode resultar em reações de pele com subsequente dano muscular (ULRICK & MANOHARAN, 1984; ZIMMERMANN *et al.*, 1984; PHILLIPS *et al.*, 1993). Embora o mecanismo envolvido nesta resposta seja desconhecido, poderia estar associado a uma ação anticolinesterásica da heparina como sugerido acima para o seu efeito sobre a atividade neurotóxica da BthTX-I. A adição de heparina (60 $\mu\text{l/ml}$) em preparações parcialmente curarizadas (d-Tc, 0,3 $\mu\text{g/ml}$) determinou a reversão do bloqueio induzido pela d-Tc (dados não mostrados), constituindo mais uma evidência de sua ação anticolinesterásica. Mionecrose dose-dependente em fibras musculares esqueléticas de ratos foi observada com certos pesticidas, que especificamente inibem a acetilcolinesterase (DETTBARN, 1984). Portanto, estes achados sugerem que a mionecrose causada pela BthTX-I ocorre de forma mais intensa que as alterações na transmissão neuromuscular, uma conclusão que corrobora com a principal ação de venenos botrópicos (CHANG, 1979; GUTIÉRREZ & CHAVES, 1980; MEBS, EHRENFELD, SAMEJIMA, 1983; RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983; QUEIROZ *et al.*, 1985).

Concluindo, a atividade neurotóxica da BthTX-I foi neutralizada por ambos os antivenenos e pela heparina. Contudo, a análise histológica mostrou que o antiveneno ofereceu maior proteção que a heparina contra a ação miotóxica da BthTX-I, sob as condições experimentais utilizadas. O tratamento com heparina sugeriu que a BthTX-I induz seus efeitos neurotóxico e miotóxico por diferentes mecanismos, tendo sido esta variação camuflada pelo antiveneno. Tais achados estão de acordo com os de LOMONTE *et al.* (1994b) que observaram a dissociação das atividades enzimática e miotóxica da miotoxina III da *B. asper*.

Assim como o antiveneno crotálico neutraliza contra o efeito letal do veneno de *B. jararacussu* (VITAL BRAZIL, 1903; VITAL BRAZIL & PESTANA, 1909; DIAS DA SILVA *et al.*, 1989; DOS-SANTOS *et al.*, 1992), o antiveneno crotoxínico mostrou-se mais eficaz em neutralizar as atividades neurotóxica e miotóxica do veneno de *B. jararacussu* e BthTX-I que o antiveneno botrópico comercial (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2000). Do ponto de vista clínico, este trabalho reforça a importância do uso de antiveneno crotálico em associação ao antiveneno botrópico no tratamento dos envenenamentos causados por *B. jararacussu*.



4. CAPÍTULO 2

Transmissão neuromuscular: Influência de íons manganês no estudo da farmacologia da BthTX-I (B. jararacussu).

O veneno de *B. jararacussu* não apresenta um potente efeito neurotóxico *in vivo*, mas inibe rapidamente a contração muscular evocada direta ou indiretamente através do nervo motor, em preparações neuromusculares de camundongos (VITAL BRAZIL, 1966; HELUANY *et al.*, 1992), rãs (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983) e aves (HELUANY *et al.*, 1992). A atividade bloqueadora tem sido atribuída à presença de fosfolipases (VIDAL & STOPPANI, 1971; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995) e miotoxinas (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988).

A BthTX-I, uma miotoxina fosfolipásica Lys49 (CINTRA *et al.*, 1993) do veneno de *B. jararacussu*, desprovida de atividade fosfolipásica, reproduz os efeitos neurotóxicos e miotóxicos deste veneno, em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (HELUANY *et al.*, 1992; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2000; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001).

Por outro lado, íons manganês são agentes bloqueadores da transmissão sináptica na junção neuromuscular e seu principal local de ação é a terminação nervosa motora, onde os íons diminuem a quantidade de transmissor liberado por impulso nervoso, ou seja, diminuem a liberação quântica de acetilcolina. A inibição produzida pelo manganês é reversível (MEIRI & RAHAMIMOFF, 1972).

A forma como os íons Mn^{2+} produzem bloqueio neuromuscular está relacionado aos íons Ca^{2+} , que exercem importante papel em um grande número de processos biológicos (CUTHBERT, 1970). Após a despolarização e abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes de fibras nervosas, há um influxo de íons cálcio para dentro da célula. O influxo de íons cálcio, do ponto de vista farmacológico, pode ser dividido em dois componentes distintos: uma fase precoce que é suprimida pela tetrodotoxina e uma fase posterior que é bloqueada por íons manganês (KATZ & MILEDI, 1967b; BAKER, HODGKIN, RIDGEWAY, 1971).

Os íons manganês reverteram a miotoxicidade cardíaca de uma fosfolipase Asp49 do veneno da *Naja nigricollis* (FLETCHER, YANG, ROSENBERG, 1982), gerando grande interesse em se investigar a ação deste íon contra os efeitos da BthTX-I, pelo fato de ser esta uma fosfolipase Lys49.

É sabido que fosfolipases Asp49 necessitam de Ca^{2+} como co-fator para exercerem atividade catalítica, o que não acontece com fosfolipases Lys49, o que explica o fato de serem estas desprovidas de atividade enzimática. Isto tem levado alguns autores a sugerirem que a BthTX-I exerceria seus efeitos miotóxicos por um mecanismo Ca^{2+} -independente, não completamente compreendido (ARNI *et al.*, 1995; de OLIVEIRA *et al.*, 2001a). Assim, o manganês foi utilizado como a principal ferramenta farmacológica deste estudo, para se avançar no conhecimento do mecanismo de ação da BthTX-I.

4.1. REVISÃO DA LITERATURA

4.1.1 - Cálcio (Ca^{2+})

O cálcio é o principal cátion divalente extracelular. O homem e a mulher (adultos normais) possuem cerca de 1.300 e 1000 g de cálcio, respectivamente, dos quais mais de 99% estão nos ossos. O cálcio está presente em pequenas quantidades nos líquidos extracelulares e, em menor grau, dentro das células, onde sua concentração ionizada sob condições basais é em torno de 0.1 μM . Um aumento temporário no fluxo de cálcio eleva sua concentração para 1 μM em resposta a estímulos hormonais, elétricos ou mecânicos, permitindo interações com proteínas que se ligam especificamente ao Ca^{2+} e assim ativam inúmeros processos dependentes de cálcio. A principal proteína que se liga ao cálcio em todos os organismos é a calmodulina, uma proteína altamente conservada que liga quatro moles de Ca^{2+} por mol de proteína. O cálcio é essencial em muitos processos, incluindo a excitabilidade do neurônio, a liberação do neurotransmissor, a contração muscular, a integridade da membrana e a coagulação do sangue. Além disso, atua como segundo mensageiro para as ações de muitos hormônios. A perda da homeostase do cálcio, levando ao seu acúmulo intracelular desencadeia processos degenerativos na célula ao ativar proteases dependentes de cálcio.

A participação do cálcio na regulação da excitabilidade do tecido não é totalmente compreendida. Acredita-se que a entrada de cálcio nas células se dê por meio da difusão facilitada mediada por um transportador e pela troca de Ca^{2+} por Na^+ . Vários canais

de cálcio nas membranas celulares são regulados por hormônios e neurotransmissores e pelo potencial da membrana. No fígado e no músculo esquelético, a atividade do cálcio é controlada extensivamente pelo retículo endoplasmático (RE) e sarcoplasmático (RS), que sequestram o íon. A mitocôndria também inclui, entre suas importantes funções (geração de calor, de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio e gatilho da morte celular por apoptose), a regulação de Ca^{2+} intracelular (KOWALTOWSKI, 2000).

O cálcio tem participação importante no acoplamento excitação-contração muscular. O potencial de ação desencadeado pela ligação da ACh aos receptores do sarcolema juncional estimula a liberação de cálcio do RS. O cálcio liberado ativa a contração da fibra muscular ao ligar-se à troponina, abolindo o efeito inibidor desta na interação entre actina e miosina. Ocorre relaxamento muscular quando o Ca^{2+} é bombeado ativamente de volta ao RS, normalizando a inibição da troponina.

O cálcio é necessário para processos de exocitose de substâncias intracelulares e, assim, tem participação importante no acoplamento estímulo-secreção em muitas glândulas exócrinas e endócrinas. A liberação de catecolaminas pela medula supra-renal, de neurotransmissores nas sinapses e de certos autacóides (por exemplo, histamina dos mastócitos) requer Ca^{2+} (MARCUS, 1996).

4.1.2 - Manganês (Mn^{2+})

O manganês é um elemento essencial e atua como um co-fator para um grande número de reações enzimáticas, particularmente aquelas envolvidas na fosforilação e na síntese de colesterol e ácidos graxos. O manganês está presente em todos os organismos vivos. Provém do ar, da água e, principalmente, dos alimentos. Os vegetais são ricos em manganês e estão presentes na porção germinativa de grãos, frutas, amendoim, chá e especiarias (UNDERWOOD, 1977; KEEN & LEACH, 1988).

A sua ingestão diária varia entre 2 a 9 mg e exibe uma absorção gastrointestinal menor que 5%. A absorção oral de manganês é aumentada pela deficiência de ferro, que pode contribuir para a variação na susceptibilidade individual (MENA *et al.*, 1969). O

manganês é transportado no plasma ligado à β -globulina, via transferrina e está amplamente distribuído no organismo. Concentra-se na mitocôndria. Portanto, tecidos ricos nestas organelas, incluindo o pâncreas, fígado, rins e intestinos, têm alta concentração de manganês. A sua meia-vida biológica no organismo é de 37 dias (GOYER, 1996).

A concentração de manganês no fluido extracelular humano é da ordem de 1.0 μ M e, se a sensibilidade das várias sinapses humanas é semelhante àquelas da junção neuromuscular de rãs, é improvável que em circunstâncias normais, uma significativa fração de neurotransmissor liberado na fenda sináptica seja inibido por este íon (KIRPEKAR, DIXON, PRAT, 1970). O íon manganês atravessa prontamente a barreira hematoencefálica e sua meia-vida no cérebro é maior que a no organismo. O manganês é eliminado na bile e é reabsorvido no intestino, mas a sua principal via de excreção é através das fezes. Esta via de eliminação aparentemente envolve também o fígado, assim como mecanismos gastrointestinais auxiliares, para excretar o excesso de manganês. Este mecanismo de regulação, além da tendência de doses extremamente altas de sais de manganês causar irritação gastrointestinal, é responsável pela ausência de toxicidade sistêmica após administração oral ou aplicação dermal (GOYER, 1996).

A exposição inalatória aguda leva a uma pneumonite. Alterações patológicas incluem necrose epitelial seguida de proliferação de leucócitos mononucleares. A exposição inalatória crônica ao dióxido de manganês, geralmente por um período acima de 2 anos, afeta o sistema nervoso central. O manganismo (exposição crônica) produz uma desordem neuropsiquiátrica caracterizada por irritabilidade, dificuldade em caminhar, distúrbios na fala e comportamento compulsivo que podem incluir corrida, luta e canto, podendo desenvolver uma síndrome tipo Parkinson (MENA *et al.*, 1967). Além das alterações no comportamento, a cirrose hepática é também frequentemente observada (GOYER, 1996).

4.1.3 - Metabolismo de Mn^{2+} , Sr^{2+} e Ca^{2+} na terminação nervosa

Alguns cátions divalentes afetam a liberação do neurotransmissor de um modo complexo e seus efeitos diferem tanto qualitativa como quantitativamente. Tais efeitos podem ser devidos às ações sobre as vias que regulam a captação de cálcio pelo terminal nervoso, tamponamento intraterminal de cálcio, extrusão de cálcio e/ou sobre o seu próprio processo de liberação.

A entrada de Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} e Mn^{2+} no terminal nervoso é mediado pelo canal de cálcio voltagem-dependente e estes cátions divalentes apresentam a seguinte sequência de permeabilidade: $Ca > Sr > Mn > Ba$ (NACHSHEN & BLAUSTEIN, 1982; DRAPEAU & NACHSHEN, 1984).

RASGADO-FLORES *et al.* (1987) demonstraram a seletividade para seqüestro de cátions divalentes, pela mitocôndria ($Mn \gg Ca \gg Sr \gg Ba$) e pelo retículo endoplasmático liso, ATP-dependente ($Ca \geq Mn \gg Sr \gg Ba$). Esses dados demonstram que a concentração livre de Mn^{2+} , e em menor extensão, de Sr^{2+} , pode ser mantida baixa, como resultado do mecanismo de seqüestro intraterminal, quando esses cátions entram no terminal. Os autores também constataram que o efluxo de Sr^{2+} é, em parte, dependente do Na^+ extracelular (Na_0). Então, como para o cálcio (SANCHES-ARMAS & BLAUSTEIN, 1987), este efluxo seria mediado pelo trocador Na^+/Ca^{2+} . Como o Sr^{2+} é menos efetivamente seqüestrado que o Ca^{2+} , deduz-se que a concentração livre de Sr^{2+} é maior que a de Ca^{2+} , implicando que o trocador Na^+/Ca^{2+} é mais eficiente para carrear o cálcio que o estrôncio. Os íons Sr^{2+} são manipulados de forma semelhante ao Ca^{2+} pelo terminal nervoso. O Sr^{2+} entra durante a despolarização do terminal nervoso, é seqüestrado pelas organelas, liga-se a proteínas citoplasmáticas ligantes de Ca^{2+} , CaBPr (WOLFF, HEUBNER, SIEGEL, 1972), e sua extrusão é imediata pelo trocador Na^+/Ca^{2+} . Assim, o Sr^{2+} é capaz de substituir o Ca^{2+} no processo de liberação do neurotransmissor (MILEDI, 1966; MEIRI & RAHAMIMOFF, 1971; MEIRI, 1975), embora seja um pouco menos efetivo que o cálcio (KATZ & MILEDI, 1969; AUGUSTINE & ECKERT, 1984).

Os íons Mn^{2+} entram no terminal nervoso despolarizado apenas muito lentamente (DRAPEAU & NACHSHEN, 1984), sendo avidamente seqüestrados pela

mitocôndria e RE (RASGADO-FLORES *et al.*, 1987) e ligam-se efetivamente a proteínas ligantes de cálcio (WOLFF *et al.*, 1972). Estudos com marcadores de influxo indicaram que os íons Mn^{2+} também podem ser transportados pelo trocador Na^+/Ca^{2+} (RASGADO-FLORES *et al.*, 1987), uma vez que a captação de Mn^{2+} é aumentada quando o Na_0 é reduzido. Contudo, o efluxo de Mn^{2+} mostrou ser pouco dependente do (Na_0) e isso pode ser explicado pela evidência de que o Mn^{2+} é bem tamponado no citoplasma, é avidamente seqüestrado pela mitocôndria, é acumulado pelo RE e liga-se ao ATP e talvez a outras moléculas. Assim, pouco Mn^{2+} intraterminal estaria disponível para efluxo, permanecendo no terminal por um longo tempo. Uma possível explicação para o efluxo de Mn^{2+} seria em resposta à estimulação de cálcio externo (em meio a baixo sódio): o cálcio internalizado deslocaria o Mn^{2+} do seu sítio de armazenagem intraterminal, liberando concentrações de Mn^{2+} livre e possibilitando a extrusão do Mn^{2+} , talvez via um trocador Ca^{2+}/Mn^{2+} (RASGADO-FLORES *et al.*, 1987). Há controvérsias se o Mn^{2+} pode (KATZ & MILEDI, 1969) ou não (BECHEM, GLITSCH, POTT, 1981) substituir o Ca^{2+} no processo de liberação do transmissor. Contudo, sem levar isto em conta, na presença de Ca^{2+} , o Mn^{2+} afeta o potencial pós-tetânico e produz um longo-durável aumento da liberação, que diminui com meia-vida de 20 minutos (BECHEM *et al.*, 1981).

4.2 - OBJETIVOS

Considerando que íons manganês revertem a miotoxicidade cardíaca de uma fosfolipase Asp49 do veneno da *Naja nigricollis* e o principal local de ação deste íon é o terminal nervoso; que a BthTX-I é uma fosfolipase Lys49 com ação pós-sináptica, o objetivo principal deste estudo foi o de verificar se o manganês protegeria contra os efeitos tóxicos desta toxina, sobre preparações nervo frênico-diafragma de camundongos.

Para isso, foram estabelecidas as seguintes etapas:

1. Realizar ensaios miográficos inicialmente com BthTX-I e com íons manganês isoladamente e, em seguida, pré-incubações com BthTX-I seguidas da adição de manganês ou pré-incubações com manganês seguidas da adição de BthTX-I.

2. Utilizar drogas que comprovadamente atuam na JNM e que interferem com canais de potássio, com o cálcio do retículo sarcoplasmático, com o receptor colinérgico, tais como a 3,4-diaminopiridina, o dantrolene e a d-tubocurarina, respectivamente, em associação ao manganês e/ou BthTX-I, em meios com excesso ou sem cálcio.

4.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

- **Animais**

Camundongos Swiss fornecidos pela Central de Bioterismo (UNICAMP).

- **Toxina**

BthTX-I, fornecida pelo Dr. J. R. Giglio, da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP).

- **Reagentes**

MnCl₂ • 4H₂O PM 197.9, 3,4-diaminopiridina PM 109.13, SrCl₂ • 6H₂O MW 266.6, dantrolene de sódio C₁₄H₉N₄O₅Na MW 336.2 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), d-tubocurarina (Abbot Laboratórios do Brasil, Ltda, São Paulo, Brazil), CaCl₂ • 2 H₂O PM 147.02 (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ). Solução nutritiva de Tyrode (pH 7.0) — composição em mM — NaCl 137; KCl 2.7; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 0.49; NaH₂PO₄ 0.42; NaHCO₃ 11.9 e glicose 11.1.

- **Preparação Nervo Frênico-Diafragma**

Conforme descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 1).

• Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão. Utilizou-se em alguns experimentos, a Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas, pois consideraram-se as várias medidas (amplitude da força de contração) feitas em relação ao tempo (min). Em outros experimentos, a significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não-pareado “*t*-Student”, com valor $P < 0.05$ considerado significativo.

4.4. RESULTADOS

4.4.1- Ensaios miográficos com íons Manganês e BthTX-I

Diferentes concentrações de manganês (0.09, 0.45, 0.9 e 1.8 mM) foram adicionadas à cuba contendo a preparação, obtendo-se uma curva dose-resposta da ação inibitória exercida pelos íons manganês sobre a transmissão neuromuscular (Figura 6A). A magnitude da ação inibitória de íons Mn^{2+} depende da concentração de Ca^{2+} no meio extracelular; com elevadas concentrações de Ca^{2+} , uma maior concentração de Mn^{2+} é necessária para atingir o mesmo nível de inibição. As concentrações de 0.9 e 1.8 mM aboliram completamente, em poucos minutos (10 e 20 minutos, respectivamente), a contração muscular evocada pela estimulação indireta do nervo. Estas concentrações de manganês (0.9 mM e 1.8 mM) não foram significativamente diferentes entre si (conforme a análise estatística, ANOVA, utilizada). Entretanto, a reversão espontânea da resposta contrátil foi constante e homogênea na concentração de 0.9 mM ao passo que, quando a preparação foi tratada com 1.8 mM de Mn^{2+} , a resposta predominante foi a de não reversão (ocorrida em 5 experimentos, de 8 realizados), tornando o erro-padrão elevado devido a este fato. Adotou-se a condição predominante — não reversão — para a concentração de 1.8 mM. De acordo a esta diferença (reversão ou não) as concentrações de Mn^{2+} 0.9 e 1.8 mM foram utilizadas, dependendo dos protocolos experimentais realizados. Foi observado um efeito facilitador (aumento de amplitude da contração muscular) com todas as

concentrações (0.09, 0.45, 0.9 e 1.8 mM) de manganês utilizadas, após a lavagem da preparação. Uma explicação para este efeito pós-lavagem seria a remoção do meio externo dos íons Mn^{2+} que estariam competindo com íons Ca^{2+} por um sítio comum sobre a membrana pré-sináptica.

A ação da BthTX-I (10 e 20 $\mu g/ml$) é ilustrada na Figura 6B e comparada ao controle Tyrode. A concentração de 20 $\mu g/ml$ foi definida em função do efeito bloqueador exercido, ideal para se contrapor à ação do Mn^{2+} . Note que o bloqueio induzido por esta toxina não se reverteu após várias lavagens. A Figura 7 mostra os registros da força de contração muscular induzidos pelo Mn^{2+} 0.9 mM (A) e BthTX-I 20 $\mu g/ml$ (B).

Em seguida, foram realizados dois protocolos:

- adição de BthTX-I (20 $\mu g/ml$) após tratamento da preparação com íons manganês (0.9 mM) e,
- adição de íons manganês (0.9 mM) após tratamento com BthTX-I (20 $\mu g/ml$).

A Figura 8A ilustra graficamente o primeiro protocolo: tratamento da preparação com íons Mn^{2+} (0.9 mM) e BthTX-I (20 $\mu g/ml$), adicionados ao banho, nesta seqüência. O Mn^{2+} , como esperado, aboliu a resposta muscular e, quando a reversão da resposta contrátil atingiu cerca de $78 \pm 6\%$, a BthTX-I foi adicionada. A resposta característica da BthTX-I, ou seja, o seu efeito bloqueador não se manifestou. Após a lavagem da preparação, observou-se um aumento na amplitude da força de contração muscular.

A Figura 8B ilustra o segundo protocolo, ou seja, adicionou-se na seqüência, BthTX-I (20 $\mu g/ml$) até que fosse atingido 50% de bloqueio e, então, íons Mn^{2+} (0.9 mM). O manganês, entretanto, exerceu seu efeito bloqueador característico, ao contrário da BthTX-I (descrito no protocolo acima). Após a lavagem da preparação, observou-se que a resposta contrátil foi recuperada no nível em que a BthTX-I havia agido, evidenciando a ação protetora do Mn^{2+} , mesmo quando adicionado após a miotoxina. A Figura 9 mostra os

registros miográficos das situações acima, referentes ao tratamento seqüencial ($Mn^{2+} \rightarrow$ BthTX-I ou BthTX-I $\rightarrow Mn^{2+}$).

Deve-se esclarecer que as demais concentrações de Mn^{2+} (0.09 e 0.45 mM, resultados não mostrados), cujas inibições da resposta contrátil foram proporcionais às quantidades adicionadas ao banho, protegeram, também proporcionalmente, contra o efeito bloqueador da BthTX-I (20 μ g/ml), quando adicionadas anteriormente à toxina. Mesmo quando protocolos inversos foram realizados, ou seja, pré-incubação da BthTX-I seguidas da adição das referidas concentrações de Mn^{2+} , este íon poupou a progressão do dano causado pela BthTX-I. Isto foi observado após a lavagem da preparação, quando a resposta contrátil retornava aos níveis anteriores à adição de Mn^{2+} .

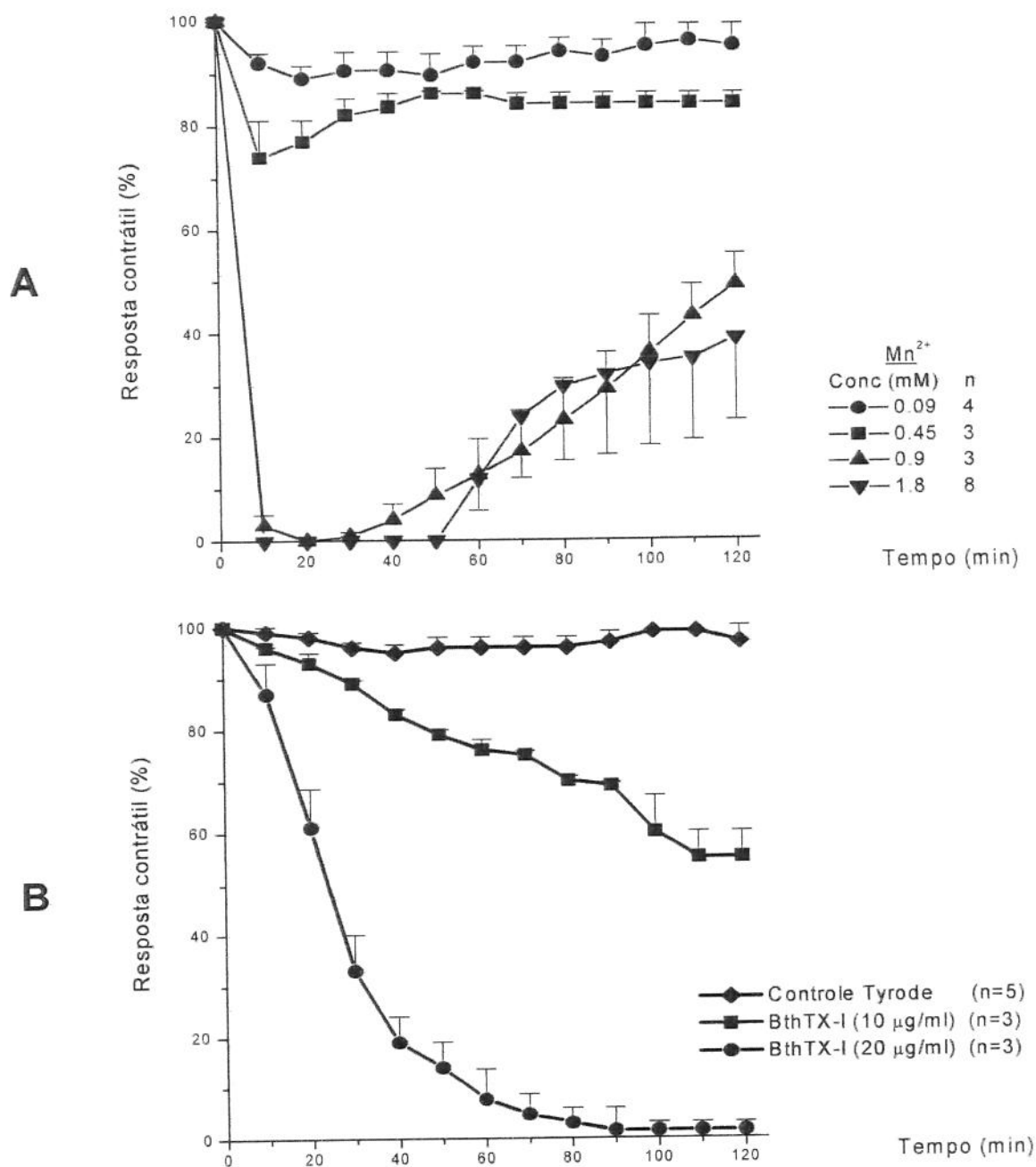


Fig. 6 – Curvas da resposta contrátil do Mn^{2+} e da BthTX-I. Preparações NFD, sob estimulação elétrica indireta, foram incubadas com diferentes concentrações de Mn^{2+} (A) e de BthTX-I (B). Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão.

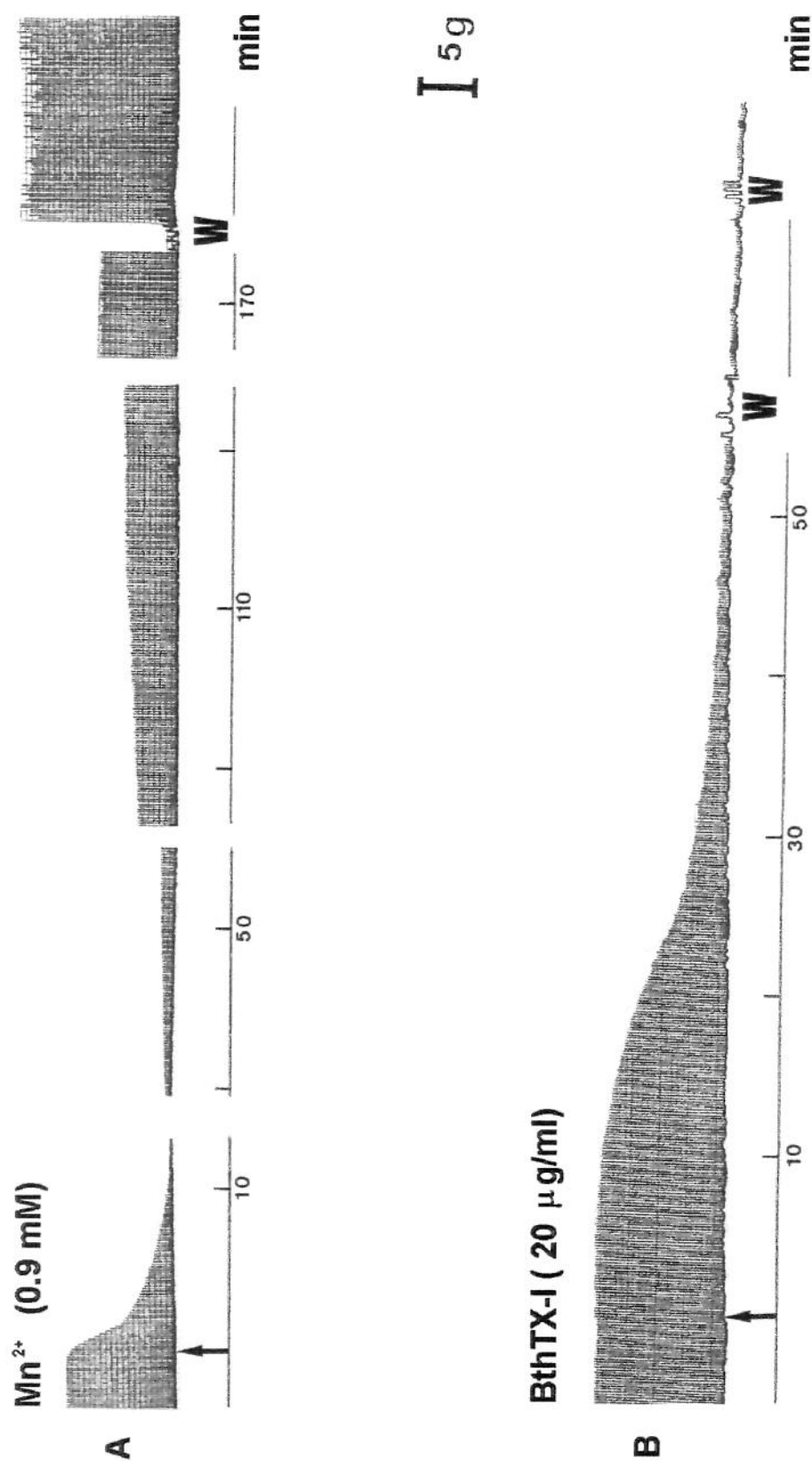


Fig. 7 - Registros da força de contração muscular da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob efeito do Mn^{2+} e da BthTX-I (estímulo indireto). (A) Bloqueio seguido por reversão espontânea da resposta contrátil induzido por íons Mn^{2+} . (B) Bloqueio irreversível, mesmo após a lavagem da preparação). W, lavagem.

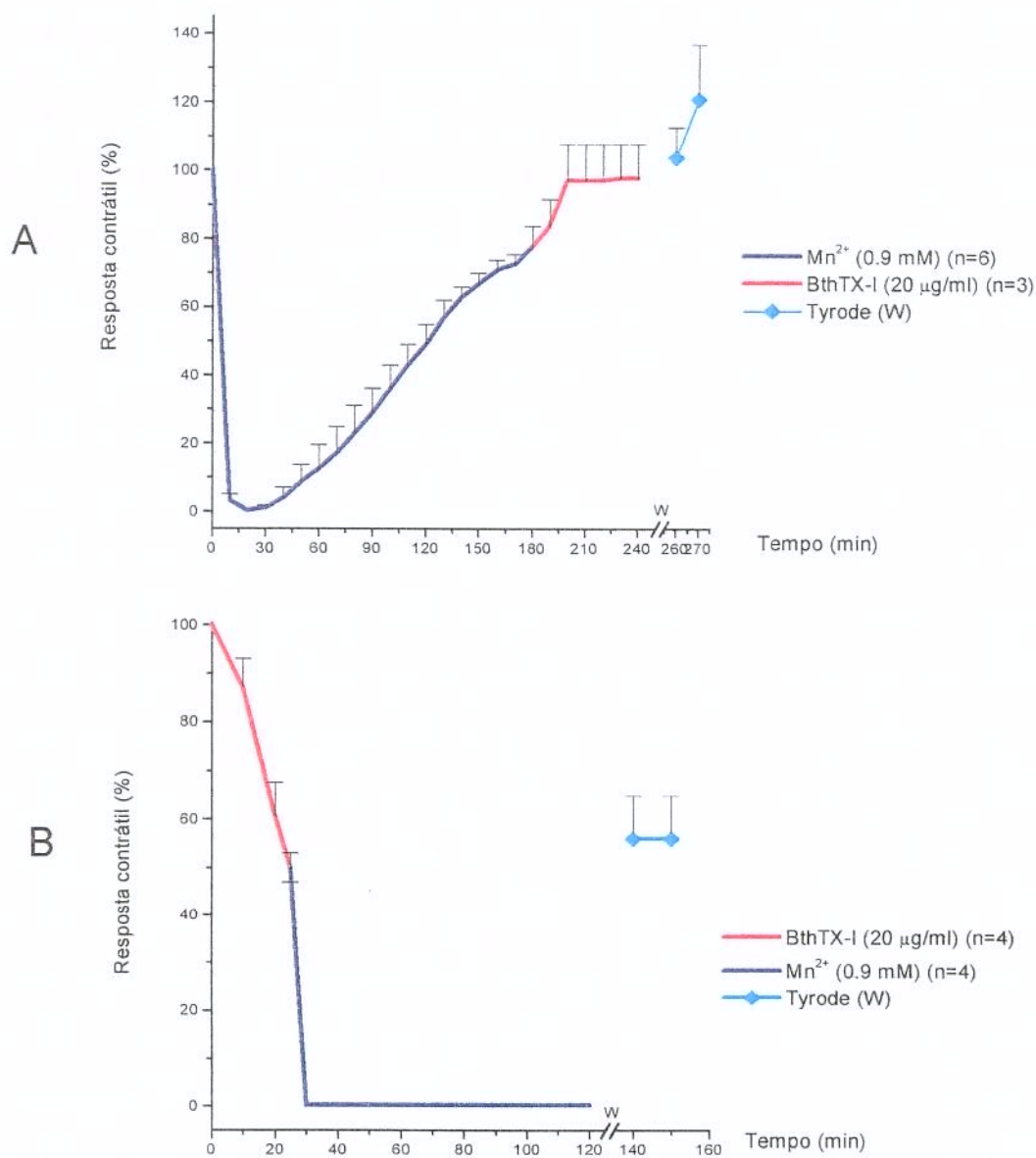


Fig. 8 – Ensaio com Mn^{2+} e BthTX-I. (A) Preparações neuromusculares tratadas com íons Mn^{2+} e posterior adição de BthTX-I. Protocolo inverso em (B), iniciando o tratamento com BthTX-I e, na sequência, adição de íons Mn^{2+} . Note que o nível de recuperação da resposta contrátil, após a lavagem, coincide com o momento de adição do Mn^{2+} , mostrando que este íon impede a progressão do dano causado pela BthTX-I. Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão. W, lavagem.

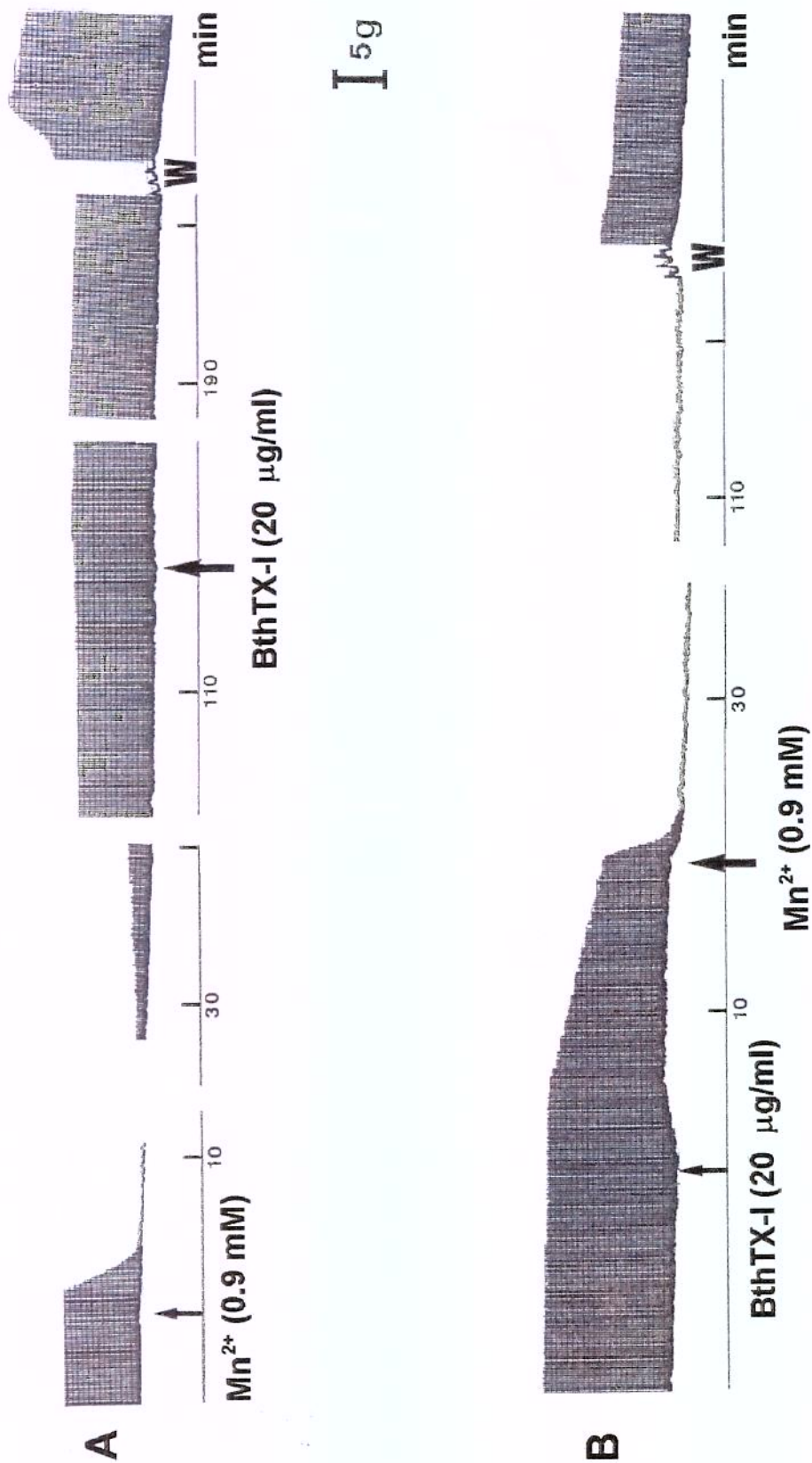
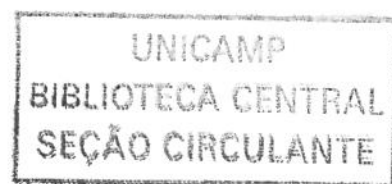


Fig. 9 - Registros da força de contração muscular de ensaios com Mn^{2+} e BthTX-I. Preparação nervo frênico-diafragma (estímulo indireto). (A) Tratamento com íons Mn^{2+} seguido de adição de BthTX-I. Note a proteção exercida pelos íons Mn^{2+} impedindo a ação bloqueadora característica da toxina. A condição pós-lavagem confirma tal proteção. (B) Tratamento com BthTX-I e posterior adição de íons Mn^{2+} . W, lavagem.

Considerando que os íons Mn^{2+} têm uma ação preponderante sobre a porção pré-sináptica da junção neuromuscular e a BthTX-I sobre a membrana pós-sináptica, é concebível a existência de ação inibitória do Mn^{2+} , pois ambos estariam agindo em locais diferentes. Entretanto, como explicar que após a lavagem ocorra recuperação da resposta contrátil, sendo que as preparações tratadas primeiramente com BthTX-I (20 $\mu g/ml$) exibem um bloqueio neuromuscular irreversível, mesmo após a lavagem? Tais resultados remetem a duas hipóteses:

- 1) Os íons Mn^{2+} teriam também uma ação sobre a membrana pós-sináptica e/ou,
- 2) A BthTX-I iniciaria seu efeito neurotóxico por uma ação indiscriminada sobre membranas (seja ela pré ou pós-sináptica).

Uma terceira hipótese, onde a BthTX-I em presença do Mn^{2+} pudesse ligar-se a ele, ligação esta estável mesmo após a lavagem, foi precocemente descartada (resultados não mostrados) quando misturas BthTX-I (20 $\mu g/ml$): Mn^{2+} (0.9 ou 1.8 mM) foram previamente incubadas por 30 min a 37 °C (a exemplo de protocolos de neutralização com antivenenos), e sua adição à preparação não impediu o bloqueio característico do Mn^{2+} , além de que, após a lavagem da preparação houve total recuperação da resposta contrátil. Este resultado foi semelhante àqueles realizados sem prévia incubação da mistura, mostrando que o efeito protetor exercido pelo Mn^{2+} não se dava por uma ligação direta à BthTX-I, e sim, a algo que envolvia a preparação biológica.



4.4.2 - Conhecendo a ação de íons Mn^{2+} utilizando drogas clássicas da Farmacologia

Para responder a algumas questões sobre a influência de íons Mn^{2+} sobre a neurotransmissão foram utilizadas as concentrações de 0.9 e 1.8 mM, representando as condições capazes de reverter ou não espontaneamente a contração muscular (Figura 10, 1A e 1B, respectivamente).

- **Influência da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) sobre a ação de íons Mn^{2+}**

A 3,4-diaminopiridina causa aumento na liberação de neurotransmissor pelo aumento da duração do potencial de ação devido ao bloqueio do canal de potássio (SCHAUF *et al.*, 1976; ULBRICHT & WAGNER, 1976; YEH *et al.*, 1976) e conseqüentemente, pelo maior influxo de íons cálcio durante a despolarização da membrana do terminal nervoso, muito maior do que aquele que normalmente ocorre (ILLES & THESLEFF, 1978).

Pelo parâmetro da miografia este efeito pode ser observado pelo aumento da amplitude da força contrátil, que significa maior liberação da acetilcolina. Uma vez que as quantidades de ACh liberadas dependem do influxo de cálcio, ambos os efeitos contribuem para o elevadíssimo incremento na liberação do neurotransmissor pelos impulsos nervosos sob ação da 3,4-DAP.

A Figura 10, 2A, ilustra o efeito facilitador da 3,4-DAP (10 μ g/ml, n=3). Em 5 minutos houve um aumento na amplitude da força contrátil de 186 ± 19 %. Note que mesmo após a lavagem da preparação, o efeito persistiu. Sabe-se que as aminopiridinas aumentam também a duração do potencial de ação muscular, prolongando, em conseqüência, a despolarização nos túbulos transversos. Este efeito causa aumento na liberação dos íons cálcio das cisternas terminais do retículo sarcoplasmático, o que explica a sua capacidade de antagonizar o efeito muscular produzido pelo dantrolene (HARVEY & MARSHALL, 1977). Isto explicaria o efeito facilitador da 3,4-DAP mesmo após a lavagem (e suposta retirada de 3,4-DAP do meio externo).

Em preparações previamente tratadas com Mn^{2+} (0.9 mM) e quando a reversão espontânea atingia $82 \pm 5\%$ (n=4), a adição de 3,4-DAP (10 $\mu\text{g/ml}$) causou cerca de $24 \pm 2\%$ de aumento na amplitude da resposta contrátil (Figura 10, 2B superior). O fato de 3,4-DAP não ter provocado o seu aumento característico pode ser explicado pela ação de íons Mn^{2+} , que estaria competindo com o cálcio e diminuindo o influxo de Ca^{2+} . Todo o aumento na liberação da ACh (amplitude da resposta contrátil) ocorrido, portanto, poderia ser atribuído à ação da 3,4-DAP sobre a inibição dos canais de K^+ e concomitante menor disponibilidade de cálcio para acoplamento acto-miosina.

Em preparações tratadas com Mn^{2+} (1.8 mM, n=3), a adição de 3,4-DAP (10 $\mu\text{g/ml}$) após o bloqueio induzido pelo Mn^{2+} , antagonizou rapidamente o efeito inibitório deste (Figura 10, 2B inferior). Por outro lado, o manganês também impediu o efeito facilitador completo induzido por 3,4-DAP. Tais resultados são condizentes com os dois mecanismos distintos das aminopiridinas, ou seja, enquanto o manganês impedia o influxo de cálcio, a 3,4-DAP atuava pelo bloqueio dos canais de potássio.

Em ambos os protocolos (preparações previamente tratadas com Mn^{2+} 0.9 e 1.8 mM), a condição pós-lavagem manteve-se semelhante àquele ocorrido com íons Mn^{2+} sozinho. Isto pode ser explicado da seguinte maneira: em meio com Tyrode normal e com ausência de Mn^{2+} do meio externo, houve um grande influxo de cálcio no terminal, resultando em maior liberação de ACh, que por sua vez promoveu a liberação de Ca^{2+} pelo RS.

• Influência do Ca^{2+} sobre a ação de íons Mn^{2+}

O excesso de Ca^{2+} (3.6 mM, n=3) na solução de Tyrode não provocou nenhuma alteração no registro miográfico, nem mesmo após a lavagem da preparação, conforme ilustrado na Figura 10, 3A. Nestas circunstâncias, utilizou-se 1.8 mM de Mn^{2+} cujo efeito não se reverte espontaneamente: em plena vigência do bloqueio, adicionou-se 3.6 mM de Ca^{2+} (Figura 10, 3B, n=3). Esta quantidade foi suficiente para reverter rapidamente o bloqueio induzido pelo Mn^{2+} demonstrando o melhor desempenho do Ca^{2+} no mecanismo

competitivo vigente entre ambos os cátions divalentes sobre os canais de cálcio. Assim, pode-se assumir que a reversão ou não do bloqueio da resposta contrátil causado pelo Mn^{2+} vai depender da quantidade de Mn^{2+} capaz de competir com Ca^{2+} . Pode-se notar, ainda, que 1.8 mM de Mn^{2+} é capaz de impedir o influxo de cálcio externo, lembrando ser exatamente 1.8 mM a concentração de Ca^{2+} na composição da solução de Tyrode. Entretanto, a resposta pós-lavagem, não exibiu o efeito facilitador característico do Mn^{2+} . Pode-se interpretar que houve um tamponamento para regular o nível de Ca^{2+} intracelular, seja por seqüestro pelas organelas ou por extrusão via trocador Na^+/Ca^{2+} . Pode-se supor ainda que, mesmo que o Ca^{2+} tenha deslocado o Mn^{2+} das reservas intracelulares, este não tem a capacidade de substituir tão eficientemente o Ca^{2+} na contração muscular.

- **Influência do dantrolene sobre a ação de íons Mn^{2+}**

O dantrolene age diretamente sobre o músculo esquelético por interferir com a liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; previne ou reduz o aumento da concentração do Ca^{2+} mioplasmático que ativa o processo catabólico agudo associado com hipertermia maligna (BRITT *et al.*, 1984; LANGERON *et al.*, 1999).

A adição de 10 μ M de dantrolene em preparação mantida em solução de Tyrode normal, produziu um bloqueio irreversível de cerca de $70 \pm 5\%$ ($n=3$) da resposta contrátil (Figura 10, 4A). Após a lavagem da preparação, nenhum efeito facilitador foi observado e a resposta contrátil manteve-se no mesmo nível de bloqueio.

A adição de dantrolene (10 μ M, $n=3$) em preparações previamente tratadas com íons Mn^{2+} (0.9 mM, concentração em que há reversão espontânea da resposta contrátil induzida pelo Mn^{2+}) não reverteu a resposta contrátil pelo dantrolene (Figura 10, 4B), mostrando o antagonismo do dantrolene sobre os canais rianodina, impedindo a liberação do cálcio pelo RS. Após a lavagem da preparação, não houve o efeito facilitador normalmente induzido pelo Mn^{2+} . Este resultado dissocia a influência do Mn^{2+} sobre os mecanismos liberadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, quando em presença do dantrolene, indicando que este é estável no seu efeito sobre a liberação de Ca^{2+} do retículo

sarcoplasmático, como já demonstrado pela persistência dos efeitos do dantrolene pós-lavagem.

- **Influência do Sr^{2+} na solução de Tyrode, sobre a ação do Mn^{2+}**

A substituição de Ca^{2+} pelo Sr^{2+} no meio de incubação em nada afetou a resposta contrátil do diafragma como mostrado na Figura 10, 5A (n=3). Após a lavagem, a preparação mostrou integridade funcional.

Em meio 0 Ca^{2+} (Sr^{2+}) Tyrode (solução de Tyrode sem cálcio, sendo este substituído por estrôncio), a adição de Mn^{2+} (0.9 mM) provocou um rápido bloqueio. Porém não houve, na seqüência, a característica reversão induzida por este íon (Figura 10, 5B superior, n=3). Uma explicação para este fato é que, embora o estrôncio substitua o cálcio na liberação do transmissor, o Mn^{2+} impediu o influxo do Sr^{2+} no terminal, além disso Mn^{2+} é avidamente seqüestrado pelo RS e mitocôndria. Assim, sem o cálcio e com o estrôncio do meio externo em quantidades insuficientes para deslocar o Mn^{2+} do terminal nervoso, bem como dos seus sítios de armazenagem intraterminal, o Mn^{2+} agiria por um longo tempo bloqueando a neurotransmissão. Após a lavagem da preparação com solução 0 Ca^{2+} (Sr^{2+}) Tyrode, houve a recuperação da resposta contrátil e, também, a manifestação de uma importante contratura, presente em todos os experimentos. Este fato pode revelar uma menor eficiência do Sr^{2+} em relação ao Ca^{2+} , pois tão logo se substituiu a solução por Tyrode normal, a contratura foi totalmente abolida.

Em meio 0 Ca^{2+} (Sr^{2+}) Tyrode, adicionou-se Mn^{2+} (0.9 mM) e, tão logo ocorrido o bloqueio, adicionou-se 10 μM de dantrolene (Figura 10, 5B inferior, n=3). Não houve reversão da resposta contrátil. Após a lavagem com 0 Ca^{2+} (Sr^{2+}) Tyrode, não houve total recobro da resposta contrátil. Após a lavagem com Tyrode normal, também não houve modificações no padrão de resposta, lembrando, aliás, o resultado ilustrado na Figura 10, 4B e, mostrando, ainda, que o dantrolene é estável na sua ação.

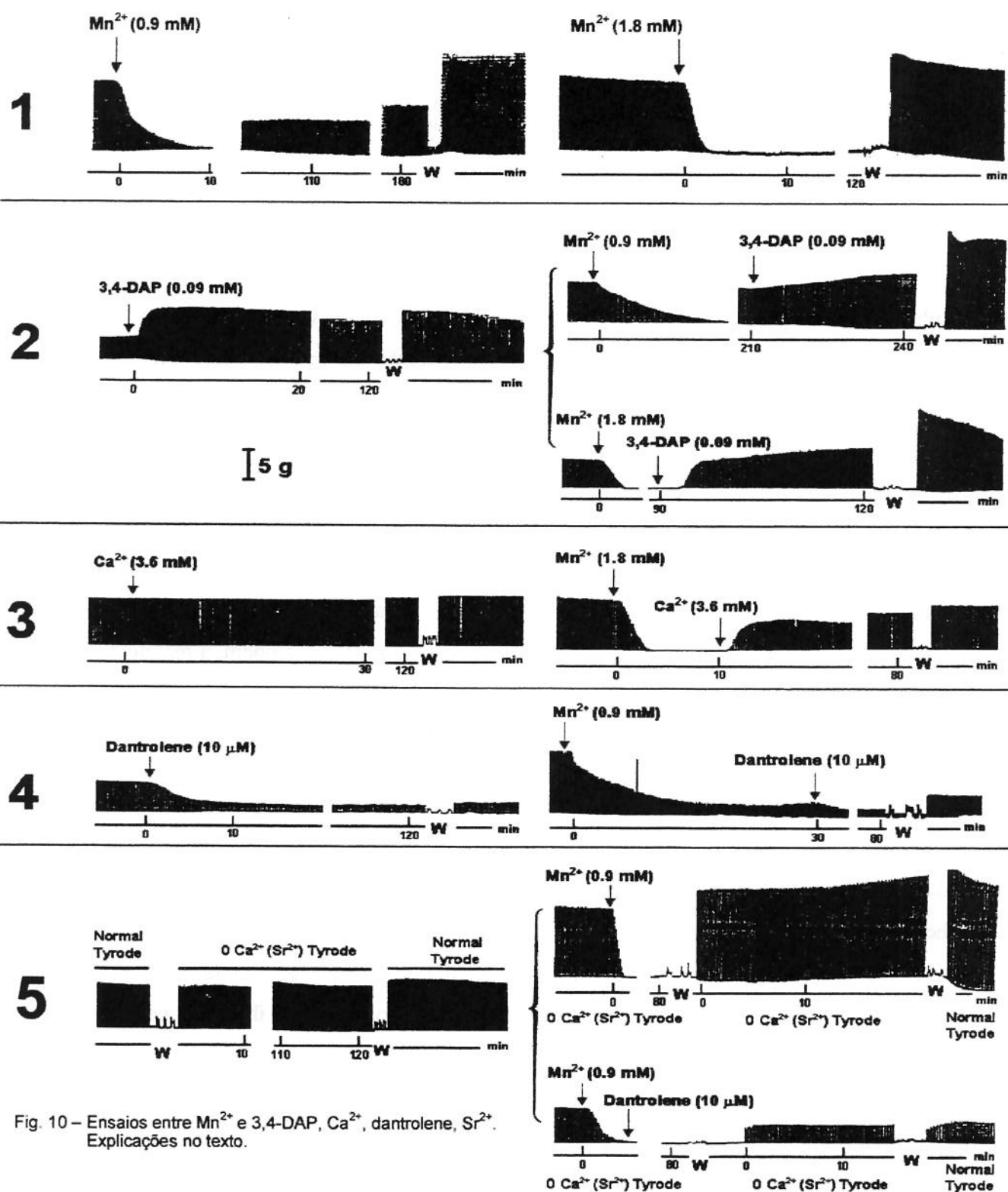
A**B**

Fig. 10 – Ensaios entre Mn^{2+} e 3,4-DAP, Ca^{2+} , dantrolene, Sr^{2+} . Explicações no texto.

4.4.3. Efeito da BthTX-I em preparações tratadas ou não com íons Mn^{2+}

- Envolvendo a 3,4-DAP (10 $\mu g/ml$)
- Preparações não tratadas com íons Mn^{2+}

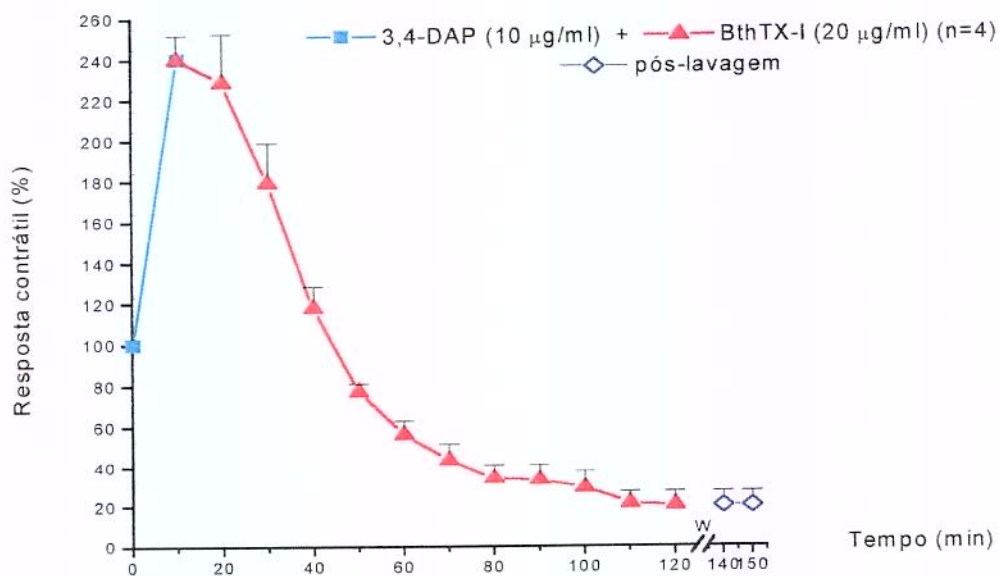
Após a adição de 3,4-DAP ter atingido a facilitação máxima, adicionou-se BthTX-I (20 $\mu g/ml$) (Figura 11A). Observou-se, então, um progressivo bloqueio, no qual apenas $20 \pm 7\%$ ($n=4$) de fibras respondiam após 120 min de incubação. A lavagem da preparação com nova solução de Tyrode não reverteu a resposta contrátil. A maior evidência deste protocolo é que a pré-adicação de 3,4-DAP não protegeu contra o efeito bloqueador da toxina. Além disso, o fato de 3,4-DAP favorecer o influxo de Ca^{2+} , de uma forma indireta, para o terminal não impediu a ação bloqueadora da BthTX-I.

A condição inversa, isto é, o tratamento com 3,4-DAP após a incubação com a toxina foi investigada. As mesmas concentrações foram mantidas (Figura 11B). Após a obtenção de $63 \pm 5\%$ ($n=8$) de bloqueio induzido pela BthTX-I, adicionou-se 3,4-DAP e verificaram-se duas fases:

1) uma interrupção do bloqueio induzido pela toxina e recuperação da resposta contrátil (até atingir $110 \pm 27\%$). Considerando a ação miotóxica da BthTX-I e que as aminopiridinas aumentam a liberação dos íons cálcio do RS, teoricamente este resultado sugere algum envolvimento da BthTX-I com os mecanismos relacionados à homeostase de Ca^{2+} ;

2) um lento e progressivo declínio da resposta contrátil. Aos 120 min de observação a resposta contrátil estava em cerca de $39 \pm 16\%$. Após a lavagem não houve recobro significativo mantendo-se em cerca de $42 \pm 16\%$.

A



B

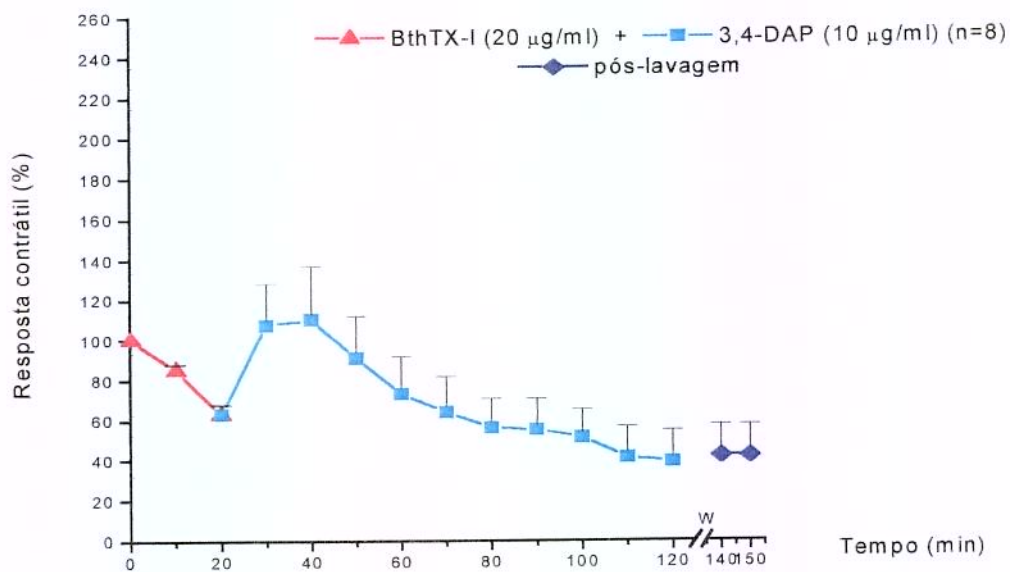


Fig. 11– Ensaio com 3,4-DAP e BthTX-I. (A) Ação neuromuscular da BthTX-I sobre preparações pré-tratadas com 3,4-DAP. (B) Preparações tratadas com BthTX-I seguidas de adição de 3,4-DAP. Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão. W, lavagem.

- **Preparações tratadas com íons Mn^{2+}**

Com o prévio tratamento da preparação com íons Mn^{2+} (1.8 mM), a adição de 3,4-DAP reverteu rapidamente o bloqueio induzido pelo cátion (como já abordado na Figura 10, 2B inferior). Na presença de ambas as drogas e quando o efeito desbloqueador do 3,4-DAP atingiu cerca de $118 \pm 6\%$ da resposta contrátil, adicionou-se BthTX-I (20 $\mu g/ml$) (Figura 12). Como ocorrido quando do pré-tratamento com íons Mn^{2+} mais a toxina, também neste caso, a BthTX-I não foi capaz de exercer o seu efeito bloqueador. Esta proteção pode ser totalmente atribuída à ação de íons Mn^{2+} . Após a lavagem, verificou-se um efeito facilitador como aqueles vistos na Figura 10, 2B superior e inferior.

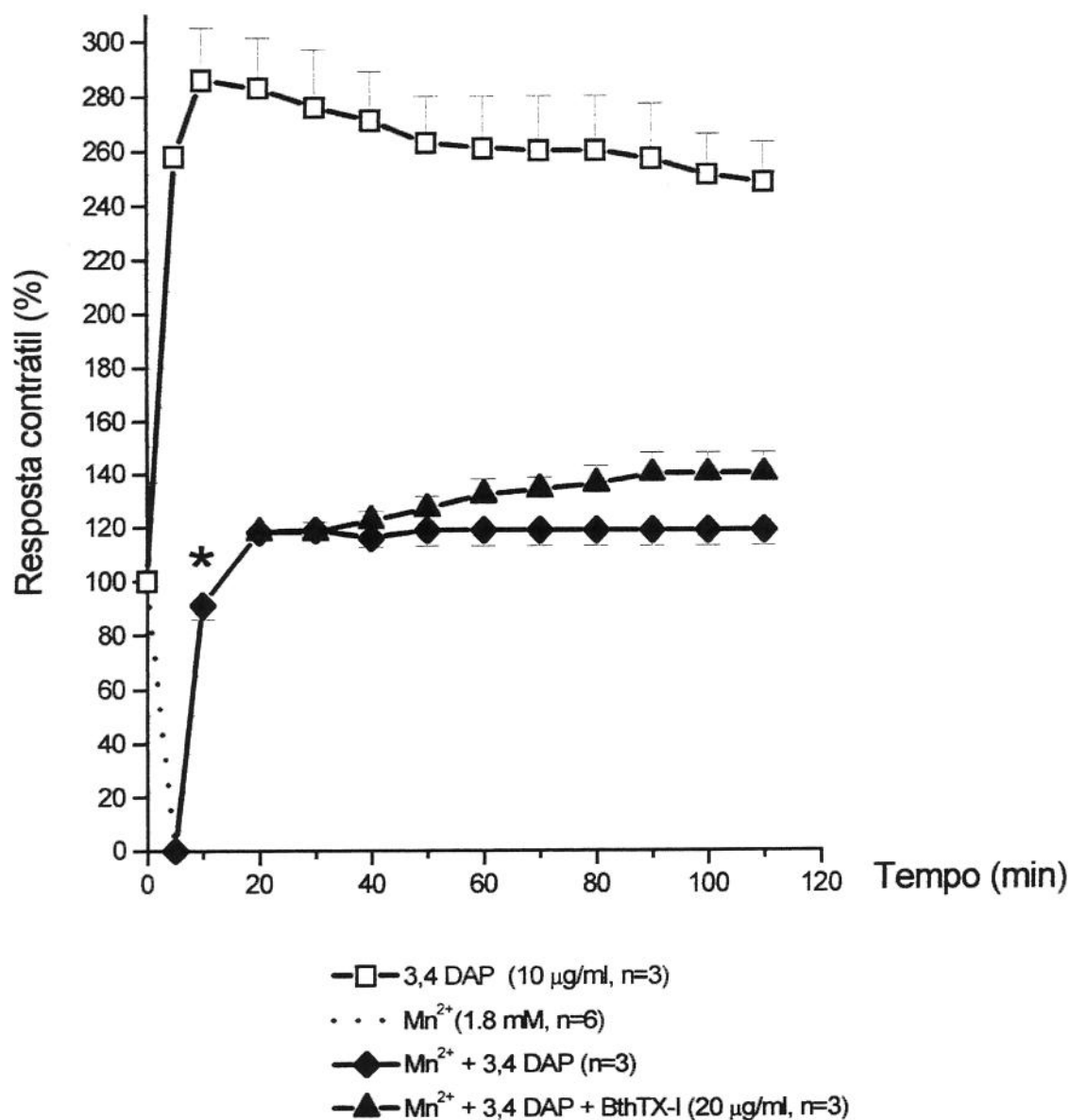


Fig. 12 – Efeito da BthTX-I em preparações pré-tratadas com Mn^{2+} e 3,4-DAP. Note que não houve o bloqueio neuromuscular característico da BthTX-I. Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão. * $P < 0.05$, no ponto indicado e nos demais tempos subsequentes, em relação à 3,4-DAP.

- **Envolvendo a d-tubocurarina (d-Tc, 4 µg/ml)**

O curare e seus alcalóides ativos (d-Tc e a toxiferina) produzem bloqueio neuromuscular por tornarem a membrana sub-sináptica menos sensível à ação despolarizante da ACh. A interrupção que produzem na transmissão dos impulsos nervosos se dá quando o neurotransmissor, cuja liberação permanece inalterada (DALE, FELDBERG, VOGT, 1936), não pode mais originar um potencial de placa terminal de amplitude suficiente para deflagrar a resposta propagada. Estas drogas combinam-se reversivelmente com os receptores para a ACh mas, ao contrário desta substância, não promovem a despolarização da membrana sub-sináptica. Elas se opõem à ação despolarizante do neurotransmissor por competirem com ele nos receptores colinérgicos da placa terminal. Por este motivo, denominou-se competitivo o bloqueio neuromuscular que produzem.

A Figura 13A ilustra a ação da d-Tc: indução do bloqueio neuromuscular sob estimulação elétrica indireta do nervo (I). Quando se estimulou diretamente o músculo (D, 80 mV, 2 ms), na vigência do bloqueio induzido pela d-Tc, houve uma contração muscular fisiológica, demonstrando a atuação da d-Tc em receptores específicos localizados na placa motora, não afetando a condução do estímulo elétrico pela membrana da fibra muscular.

A Figura 13B ilustra a ação bloqueadora da BthTX-I sob estímulos quase simultâneos, direto e indireto. Em 60 min houve um bloqueio total da resposta contrátil, sob estímulo indireto. Neste mesmo intervalo de tempo, a resposta contrátil ficou reduzida para $34 \pm 14\%$ (n=3), sob estímulo direto (o que reforça a idéia que as fibras musculares foram afetadas indelevelmente).

A Figura 13C ilustra a ação da BthTX-I em preparações pré tratadas com d-Tc (4 µg/ml). Enquanto a d-Tc protegia o receptor colinérgico, visualizado pelo bloqueio neuromuscular, sob estímulo indireto, a resposta contrátil era garantida por estímulo direto. Após a adição de BthTX-I instalou-se progressivo bloqueio neuromuscular, não reversível, mesmo após a lavagem da preparação. Isto evidencia uma ação da toxina sobre a região do sarcolema eletricamente excitável.

A Figura 13D ilustra a sequência Mn^{2+} (0.9 mM, com bloqueio seguido de reversibilidade) + d-Tc (4 $\mu\text{g/ml}$) + BthTX-I (20 $\mu\text{g/ml}$). Note que a d-Tc prontamente ocupou o receptor colinérgico impedindo a transmissão neuromuscular (estímulo indireto). Sob estímulo direto adicionou-se a toxina e, ao contrário do que foi relatado no ensaio acima, o prévio tratamento com íons Mn^{2+} impediu a ação bloqueadora da BthTX-I sobre a região do sarcolema voltagem-dependente. Estes resultados evidenciam sítios de ação distintos para íons Mn^{2+} e d-Tc. Também levanta a possibilidade de íons Mn^{2+} agirem sobre regiões inespecíficas (extrajuncionais) da membrana muscular. A condição pós- lavagem reforça o já citado na literatura, do não envolvimento da BthTX-I com o receptor colinérgico (HELUANY *et al.*, 1992), uma vez que a resposta contrátil foi totalmente restabelecida por estimulação indireta. Sob estimulação direta houve uma facilitação, não explicada, que só pode ser atribuída à ação de íons Mn^{2+} , uma vez que isso não acontece em nenhuma das condições A, B e C da Figura 13.

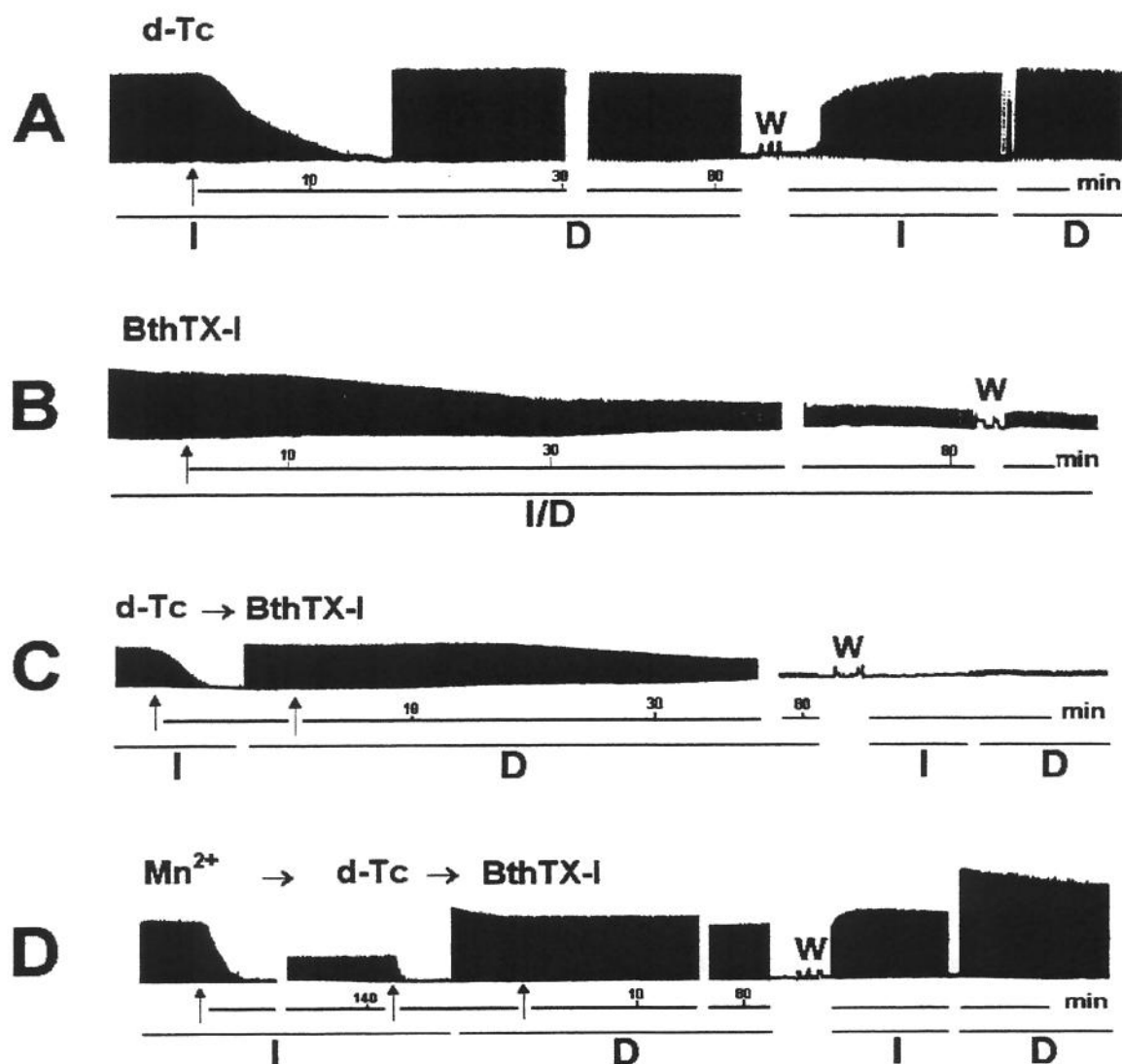


Fig. 13 – Ensaio com d-tubocurarina (d-Tc), BthTX-I e Mn^{2+} , sob estímulos direto (D) e indireto (I). (A) Efeitos neuromusculares de d-Tc, (B) BthTX-I sob estímulos sincronizados, indireto (registro escuro) e direto (registro claro), (C) BthTX-I sob estímulo direto em preparações pré-tratadas com d-Tc, (D) BthTX-I sob estímulo direto em preparações pré-tratadas com Mn^{2+} — bloqueio e reversão da resposta contrátil — seguido de adição de d-Tc. Note o efeito protetor exercido por íons Mn^{2+} . Concentrações: d-Tc 4 $\mu g/ml$, BthTX-I 20 $\mu g/ml$, Mn^{2+} 0.9 mM. As setas indicam os momentos de adição das substâncias ao banho. W, lavagem.

4.5. DISCUSSÃO

Os estudos realizados com cátions divalentes e ressaltando-se o de RASGADO-FLORES *et al.* (1987) sobre o metabolismo de estrôncio, bário e manganês em terminais nervosos isolados, contribuíram sobremaneira para o entendimento do modo de ação de íons Mn^{2+} , permitindo a extrapolação para estes ensaios e facilitando a explicação dos resultados obtidos.

Assim, os resultados sugerem que o tratamento com íons Mn^{2+} , antagonista do Ca^{2+} (MEIRI & RAHAMIMOFF, 1972; BALNAVE & GAGE, 1973), protege a preparação neuromuscular contra os efeitos bloqueadores da BthTX-I.

Dentre os cátions divalentes com efeitos similares aos exercidos pelo cálcio, como captação pelos terminais nervosos, tamponamento intraterminal, extrusão e/ou envolvimento no processo de liberação do neurotransmissor, certamente o manganês evidenciou alguns deles, como por exemplo, o bloqueio da transmissão neuromuscular sugerindo a competição com o influxo de cálcio. Os resultados obtidos mostraram ser este bloqueio do Mn^{2+} dose-dependente.

Diferente da ação do Mg^{2+} , o Mn^{2+} produz um bloqueio reversível. A reversibilidade é possível pelo fato de os íons Mn^{2+} serem avidamente sequestrados pelas organelas tamponadoras do citossol, as mitocôndrias e o retículo endo/sarcoplasmático (RASGADO-FLORES *et al.*, 1987). Assim, a remoção citossólica do Mn^{2+} torna o cálcio novamente disponível no seu sítio de ação e a neurotransmissão é restabelecida. É evidente, portanto, ser esta reversão dependente da presença de cálcio, do contrário ela não se restabelece. O cálcio requerido para a reversão espontânea do Mn^{2+} provém do meio externo (Figura 10, 3B).

A condição pós-lavagem foi considerada em todos os protocolos por causa da facilitação observada no tratamento com o manganês. O fato da preparação responder após a lavagem com a solução de Tyrode (quando supostamente foram retirados agentes externos do banho), leva à observação de que a ação do manganês é persistente. De fato, os

íons Mn^{2+} são bem tamponados no citoplasma e capazes de ligarem-se ao ATP e talvez a outras proteínas de ligação do cálcio (WOLF *et al.* 1972; RASGADO-FLORES *et al.*, 1987). De tal forma que, quando renovado o meio nutritivo, o cálcio contido neste meio teve livre acesso ao terminal, manifestado pela resposta facilitatória. Entretanto, quando se adicionou dantrolene, os resultados pós-lavagem não exibiram a facilitação (nem em meio sem cálcio, nem em Tyrode normal). Tais resultados sugerem diferentes sítios de ação para Mn^{2+} e dantrolene, sendo que o último manteve o seu padrão de resposta. Desta forma, pode-se dissociar a influência do Mn^{2+} sobre os mecanismos liberadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Tal achado corrobora com aqueles de RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1995) que concluíram que os mecanismos e (ou) “pools” de Ca^{2+} que podem ser antagonizados pelo dantrolene não estão ligados aos efeitos de BthTX-I sobre a contração muscular.

Ensaio com 3,4-DAP (agente bloqueador de canais de potássio) dissociaram os efeitos da BthTX-I com os canais de potássio.

A ação de íons Mn^{2+} sobre o sarcolema também foi investigada. Nestes ensaios empregou-se a d-Tubocurarina (d-Tc), agente capaz de ocupar reversivelmente o receptor para a ACh, bloqueando a neurotransmissão (sob estímulo indireto) de forma não despolarizante. A estimulação direta no músculo produz um potencial de ação muscular, que foi bloqueado pela adição de BthTX-I. Íons Mn^{2+} também, nestas condições experimentais, exerceram seu efeito protetor, impedindo a ação bloqueadora da toxina. Observe a condição pós-lavagem e o recobro da resposta contrátil, sob estímulos tanto indireto como direto. Estes resultados mostraram uma ação direta da BthTX-I sobre membranas, uma vez que o receptor nicotínico estava ‘protegido’ pela d-Tc, corroborando os achados de HELUANY *et al.* (1992). Por outro lado, nossos resultados apontam para, talvez possivelmente outra nova ação para íons Mn^{2+} que agiriam não apenas sobre o terminal nervoso mas também sobre o sarcolema extrajuncional, região não especializada da fibra muscular, e/ou, para uma ação pré sináptica da BthTX-I e ainda, para outras não cogitadas.



5. CAPÍTULO 3

A contribuição da eletrofisiologia no estudo da farmacologia da BthTX-I (*B. jararacussu*)

Os resultados obtidos com a técnica miográfica apontaram para uma ação pós-sináptica da BthTX-I sobre o sarcolema extrajuncional e não na região especializada da placa motora (sub-sináptica). O cátion divalente manganês, um bloqueador reversível da neurotransmissão e predominantemente pré-sináptico (MEIRI & RAHAMIMOFF, 1972), mostrou agir também pós-sinapticamente, por conta de sua capacidade em impedir o bloqueio neuromuscular irreversível característico da BthTX-I. O desafio deste capítulo foi tentar esclarecer, através da técnica eletrofisiológica, de que modo um agente com ação pré-sináptica conseguiu impedir o bloqueio neuromuscular de outro agente supostamente com ação pós-sináptica. O presente capítulo compreende os resultados obtidos da técnica eletrofisiológica, através dos registros dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) e dos potenciais da membrana em repouso, utilizando os principais protocolos do estudo miográfico.

5.1. REVISÃO DA LITERATURA

5.1.1. Resumo

O mecanismo pelo qual a chegada do impulso nervoso no sítio pré-sináptico causa a liberação do transmissor foi extensivamente estudado. Em condições experimentais *in vitro* de preparações nervo-músculo, o estímulo para a secreção do neurotransmissor é a despolarização da membrana do terminal pré-sináptico produzida por um impulso central ou por uma corrente artificialmente aplicada. Normalmente ocorre um retardo (cerca de 0.5 ms a 22°C) entre a variação de voltagem que provoca a despolarização e a secreção. Para que a liberação do neurotransmissor ocorra, é necessário que íons cálcio presentes no meio extracelular, entrem no terminal e deflagrem a liberação. Em meio com baixa concentração de cálcio ou alta de Mg^{2+} , a liberação pode ser reduzida ou completamente abolida.

Alterações no potencial de membrana pós-sináptico representam ensaios convenientes para estimar o tempo e a quantidade de transmissor liberado. O transmissor é secretado em pacotes multimoleculares ou quanta, que contêm várias centenas de moléculas de acetilcolina (ACh).

No repouso, o terminal também libera quanta de transmissor espontaneamente, uma ação que dá origem na célula pós-sináptica, aos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm), com amplitude da ordem de 0.5 a 1 mV, a uma frequência de 1/s (FATT & KATZ, 1951). A liberação quântica parece ser um mecanismo geral para a secreção de neurotransmissores nas sinapses do sistema nervoso central e periférico de vertebrados e invertebrados.

5.1.2. Os conceitos que fundamentam a técnica eletrofisiológica

A técnica eletrofisiológica para investigar os fenômenos envolvidos na transmissão neuromuscular através de microeletrodos intracelulares foi introduzida por LING & GERARD (1949) e aperfeiçoada por FATT & KATZ (1951). Estes pesquisadores realizaram um extenso estudo, em preparações curarizadas de músculo de rã, utilizando

microeletrodos de vidro preenchidos com KCl e inseridos na fibra muscular na região da placa terminal motora.

Os experimentos que utilizaram da técnica eletrofisiológica, em associação ao emprego de drogas clássicas da farmacologia, comprovaram toda a teoria fisiológica de liberação química de transmissores, estabeleceram as bases de interpretação desta importante técnica e deram aos seus autores o prêmio Nobel. A seguir, os principais achados serão resumidos:

1. A demonstração de que a liberação do neurotransmissor não é controlada pelo influxo de sódio e nem pelo efluxo de potássio foi feita pelo uso de tetrodotoxina e tetraetilamônio (KATZ & MILEDI, 1967c). A tetrodotoxina, que bloqueia o canal de sódio controlado por voltagem, não bloqueia o influxo de sódio pelos canais nicotínicos ativados por ACh. De modo semelhante, a α -bungarotoxina, uma proteína do veneno de cobra que se fixa aos receptores nicotínicos e bloqueia a ação da ACh, não interfere com os canais de sódio e potássio controlados por voltagem. O tetraetilamônio foi útil para se obter uma prolongada despolarização, só possível com o bloqueio de canais de K^+ . Assim, os autores conseguiram demonstrar que a condutância da membrana ao cálcio é aumentada pela despolarização e que cálcio entra no terminal a cada potencial de ação.

2. A liberação do neurotransmissor é desencadeada pelo influxo de cálcio (DEL CASTILLO & STARK, 1952; KATZ & MILEDI, 1967a). O Ca^{+2} é um elemento essencial no processo de transmissão sináptica. Quando a sua concentração no fluido extracelular é diminuída, a liberação de ACh no terminal nervoso é reduzida e finalmente abolida. Durante a despolarização do terminal pré-sináptico, o Ca^{+2} deve estar presente (KATZ & MILEDI, 1967b). O Ca^{+2} invade o citoplasma do terminal nervoso através de canais de Ca^{+2} sensíveis à voltagem. A liberação do neurotransmissor pode também ser reduzida pela adição de magnésio ao meio. Na maioria das células nervosas que não o axônio gigante da lula, há pelo menos quatro classes de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (T, L, N e P). O canal do tipo T tem um baixo limiar de voltagem de ativação. O canal do tipo L é caracterizada por exibir lenta velocidade de inativação, de modo que estes canais permanecem abertos durante uma despolarização prolongada da membrana. As outras duas

classes incluem os canais do tipo N e P, que são inativados mais rapidamente. Em muitas células, o influxo de Ca^{2+} através dos canais do tipo N e do tipo P contribui mais diretamente para a liberação do transmissor (KANDEL, SCHWARTZ, JESSE, 1997).

3. O neurotransmissor é liberado em unidades quânticas. Em experimentos com junção neuromuscular de rã, FATT & KATZ (1952) demonstraram que a ACh é liberada do terminal em pacotes multimoleculares, que são chamados quanta. Um pacote, ou quantum, simplesmente representa a menor unidade na qual o neurotransmissor é normalmente secretado. Tomando um número arbitrário, liberação quântica significa que apenas 3000, 6000, 9000, etc, moléculas podem ser liberadas, mas não quantidades intermediárias como 2056 ou 3762. Em geral, o número de quanta liberado por despolarização (o conteúdo quântico de uma resposta sináptica) pode variar, mas o número de moléculas em um *quantum* (tamanho quântico) é relativamente fixo.

A primeira evidência para a teoria dos pacotes multimoleculares de ACh ou quanta foi a observação de FATT & KATZ de que, na placa motora, mas não em outro lugar da fibra muscular, despolarizações espontâneas de cerca de 0.5 a 1 mV ocorriam aleatoriamente. Tais potenciais espontâneos diminuía em amplitude e eram finalmente abolidos pelo aumento da concentração de curare na solução do banho e aumentavam em amplitude e tempo de ação por inibidores de acetilcolinesterase, como a prostigmina. Esses dois ensaios farmacológicos sugeriram que os potenciais eram produzidos por liberação espontânea de discretas quantidades de ACh do terminal nervoso. A possibilidade de que os potenciais fossem desencadeados por moléculas individuais de ACh foi descartada por várias razões:

a) O curare e a prostigmina apresentavam efeitos graduais sobre a amplitude (diminuição e aumento, respectivamente) de pptm e não sobre a frequência. Se os eventos dependessem da ação de moléculas individuais, suas amplitudes seriam fixas e as drogas afetariam a frequência de sua ocorrência. A prostigmina, por inibir a hidrólise de ACh e indiretamente por aumentar a sua concentração na fenda sináptica, aumentaria a frequência dos pptm. O curare, por ocupar receptores pós-sinápticos e portanto, diminuir o número disponível para interação com ACh, diminuiria a frequência de pptm.

b) A adição de ACh à solução do banho causava uma despolarização gradual na região da placa terminal, sem aumentar a frequência de pptm. Novamente, se os pptm fossem causados por moléculas individuais, a adição de ACh à solução do banho teria aumentado o número de colisões moleculares com a membrana pós-sináptica e, talvez, aumentado a frequência de pptm. Contudo, com pequenas aplicações de ACh, uma despolarização menor em amplitude do que um pptm pode ser produzido.

FATT & KATZ (1952) observaram, ainda, que a redução de cálcio extracelular reduzia o conteúdo quântico do potencial de placa terminal (ppt) de forma gradual, sem reduzir o tamanho quântico.

Evidências subseqüentes confirmaram, de diferentes modos, que os pptm eram de fato devidos à liberação de ACh pelo terminal nervoso. Por exemplo, a despolarização de terminais nervosos, por passagem de corrente através deles, causava um aumento na frequência da atividade espontânea (DEL CASTILLO & KATZ, 1954c), enquanto a despolarização muscular não tinha efeito sobre a frequência. A toxina botulínica, que bloqueia a liberação de ACh em resposta ao estímulo nervoso, também abolia a atividade espontânea (BROOKS, 1956). Logo após a desnervação do músculo e degeneração de seu nervo motor, os pptm desapareciam (BIRKS, KATZ, MILEDI, 1960), reaparecendo após um período de tempo, provavelmente porque quantidades do neurotransmissor são liberados das células de Schwann após terem fagocitado segmentos degenerados de terminais nervosos repletos com suas vesículas sinápticas.

O grupo de KATZ (FATT & KATZ, 1951; FATT & KATZ, 1952; DEL CASTILLO & KATZ, 1954a; DEL CASTILLO & KATZ, 1954b) notou uma flutuação casual na amplitude do ppt evocado, registrado em solução de Ringer contendo excesso de íons magnésio. O aumento na concentração de magnésio reduzia a transmissão ao nível em que nenhum estímulo nervoso fosse capaz de produzir uma resposta evocada. Contudo, o menor potencial de placa terminal (ppt) registrado tinha a mesma amplitude que o pptm. Os pptm foram então relacionados aos ppt, pela observação de que ocorriam flutuações na amplitude dos ppt em soluções com alto teor de íons magnésio por exatos múltiplos de amplitude dos pptm (DEL CASTILLO & KATZ, 1954a ; DEL CASTILLO & KATZ, 1954b).

Como resultado das observações acima, foi desenvolvida a teoria de que os pptm representavam a liberação da unidade mínima ou *quantum* de ACh e os ppt representavam as múltiplas, liberações simultâneas de quanta de ACh. De acordo com esta idéia, o número de quanta liberado por impulso, o conteúdo quântico (m) é representado, pelo menos em baixos níveis de liberação, pela amplitude do ppt dividida pela amplitude do pptm. O grupo de KATZ também mostrou que, novamente em baixos níveis de liberação e aplicando a estatística de Poisson, a liberação de um *quantum* era um evento estatístico independente, não afetado por prévias liberações. Assim, demonstraram que o conteúdo quântico (m) poderia ser calculado pela variância da amplitude de ppt e também pelo número de falhas de ppt resultantes de uma série de estímulos testes.

$$m = \frac{\text{amplitude do ppt}}{\text{amplitude do pptm}} \quad \text{ou} \quad \frac{(\text{amplitude ppt})^2}{\text{variância da amplitude ppt}} \quad \text{ou} \quad \log_e \frac{n^\circ \text{ de estímulos testes}}{n^\circ \text{ de falhas de ppt}}$$

Resumidamente, estes foram os principais ensaios que fundamentaram a compreensão da eletrofisiologia e constituem os conceitos básicos necessários à interpretação de resultados obtidos através da técnica eletrofisiológica.

5.2. OBJETIVOS

Investigar pela técnica eletrofisiológica, em preparações nervo frênico-diafragma, se o Mn^{2+} teria uma ação pós-sináptica (além da pré-sináptica) ou se a BthTX-I é que teria uma ação pré-sináptica, além da já citada ação pós-sináptica sobre a membrana da fibra muscular.

Para atingir esse objetivo a investigação foi traçada em duas etapas:

1ª etapa:

- Obter os dois parâmetros eletrofisiológicos (potencial de membrana e frequência/amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura) de preparações em solução nutritiva (controle Tyrode) e incubadas com Mn^{2+} (0.9 mM), por um período de 240 minutos de observação.
- Obter os mesmos parâmetros acima descritos para a BthTX-I nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$, por um período máximo de 120 minutos. Determinar qual a melhor concentração de BthTX-I a ser utilizada para realizar a etapa seguinte.

2ª etapa:

Obter os parâmetros eletrofisiológicos como potencial de membrana e potenciais de placa terminal em miniatura em preparações previamente incubadas com Mn^{2+} (0.9 mM: 30, 60 e 120 minutos) seguida da adição de BthTX-I (30, 60 e 120 minutos). Da análise destes ensaios escolher o protocolo definitivo e reproduzir num mínimo de três experimentos.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

- **Animais**

Camundongos Swiss machos (25-30 g) foram fornecidos pela Central de Bioterismo (UNICAMP), mantidos em gaiola e recebendo ração e água *ad libitum*.

- **Toxina**

BthTX-I, extraída de um “pool” de veneno de *B. jararacussu*, conforme descrito por Homsí-Brandeburgo (1988), foi fornecida pelo Dr. J. R. Giglio, da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP).

- **Reagentes**

Conforme descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2).

- **Preparação Nervo Frênico-Diafragma**

Obtida a preparação nervo frênico-diafragma (conforme descrito no Capítulo 1) seguiu-se à sua montagem em cuba perspex “Dow Corning-Sylgard” (3 cm de comprimento, 1.8 cm de largura e 0.8 cm de altura), contendo 3 ml de solução de Tyrode. A preparação foi colocada horizontalmente com a superfície torácica voltada para cima, fixada com alfinetes e aerada com carbogênio. Este conjunto foi fixado na platina do microscópio. Os registros eletrofisiológicos foram obtidos pela introdução de microeletrodos de vidro em fibras musculares (FATT & KATZ, 1951). Em todos os experimentos realizados foram medidos os potenciais da membrana em repouso (PM) e os potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) .

- **Microeletrodos - confecção e medida da resistência**

Os microeletrodos foram preparados com tubos de vidro apropriados (capilares de vidro Clark com microcapilar interno), com o auxílio do "Microelectrode Puller" (modelo 8104, Palmer), preenchidos com 3 M de KCl e mantidos em geladeira. A resistência do microeletrodo era medida mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo no circuito, em paralelo, uma resistência de valor conhecido (20 M Ω). Foram aceitos os valores entre 8 a 20 M Ω .

- **Descrição do circuito**

O microeletrodo foi fixado a um suporte de acrílico, de onde sai um fio de platina unido a um seguidor catódico, através de um fio condutor. A conexão entre o microeletrodo e o fio de platina foi feita através de um vaso comunicante preenchido com 3 M de KCl. Os orifícios do vaso comunicante foram vedados com uma lamínula revestida por uma camada delgada de vaselina sólida. Este conjunto foi fixado ao braço de um micromanipulador Jena (Alemanha) acoplado a um microscópio estereoscópico Zeiss, para aumento de até 40 vezes. Este equipamento permitiu realizar pequenos deslocamentos horizontais e verticais, controlando a introdução do microeletrodo nas fibras musculares. O eletrodo indiferente constituiu-se de um fio de platina, incluído em tubo de vidro submerso em mercúrio líquido, onde colocou-se um tubo de vidro curvo, preenchido com ágar-salina, para adaptação à cuba. A preparação e a aparelhagem descrita permaneceram no interior de uma gaiola de Faraday, montada sobre uma mesa rígida e fixada ao solo para evitar vibrações.

O seguidor catódico foi posicionado próximo ao braço do micromanipulador ao qual foi conectado o canal do osciloscópio (Tektronix 5103N com módulo 5A 22N "Differential Ampl" e 5B 12N "Dual Time Base"). Acoplado ao osciloscópio, através de um cabo, o fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400, registrava os pptm obtidos.

- **Potenciais da membrana em repouso (PM)**

Os potenciais da membrana em repouso das fibras musculares foram obtidos pela inserção do microeletrodo intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio. Foi registrada a deflexão vertical do feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Tal procedimento foi repetido em seis fibras distintas em um período não superior a um minuto, em regiões da placa terminal e distantes dela. Calcularam-se a média aritmética e o erro-padrão das leituras realizadas. O potencial de membrana foi determinado multiplicando-se o valor da média por um fator de correção (fc), que foi estabelecido, aplicando-se ao circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio ($fc=100/\text{deflexão correspondente}$). As preparações foram incubadas com solução de Tyrode (controle) e Mn^{2+} (0.9 mM), por 240 min; BthTX-I (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) por 120 min; e Mn^{2+} (0.9 mM) foi pré-incubado em tempos variáveis e não superior a 120 min antes da adição de BthTX-I (5 ou 10 $\mu\text{g/ml}$, 120 min), até a escolha do melhor tempo de pré-incubação com o Mn^{2+} , que foi o de 30 min.

- **Potenciais de placa terminal em miniatura (pptm)**

Para a captação dos pptm, o microeletrodo foi implantado junto ou o mais próximo possível, da região da placa motora. Os pptm foram captados e registrados em fisiógrafo acoplado ao osciloscópio (sensibilidade 1 mV/cm). Em condição controle ou na vigência de tratamento com drogas, alguns pptm foram fotografados em filme "Polaroid" por meio de uma 'câmera osciloscope' modelo C-5A, principalmente em ocasiões em que se desejava obter o formato da onda do potencial e excluir possíveis artefatos.

- **Análise Estatística**

A significância para as diferenças observadas foi determinada pelo teste não-pareado "t-Student", com valor $P<0.05$ considerado significativo. Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão.

5.4. RESULTADOS

• Potenciais da membrana em repouso (PM)

As medidas dos PM de preparações em solução nutritiva (controle Tyrode) e de preparações incubadas com Mn^{2+} (0.9 mM) foram obtidas nos tempos (t) t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{60} , t_{120} , t_{180} e t_{240} min, na região da placa terminal e distante dela. O longo tempo de observação adotado está relacionado ao tempo de reversão espontânea do bloqueio neuromuscular induzido pelo Mn^{2+} (0.9 mM), na técnica miográfica, que ocorria entre 30 e 90 min.

1. Tyrode (n=3): preparações controle comportaram-se de modo homogêneo mantendo os valores dos PM ao longo de 240 min, dentro do esperado (80 ± 0.5 mV) (Tabela 1).

2. Mn^{2+} (0.9 mM, n=3): as preparações incubadas com Mn^{2+} quando comparadas ao controle Tyrode mostraram alteração significativa nos valores de PM somente a partir de 180 min, em ambas as regiões: placa e fora da placa ($*P<0.01$, Tabela 2). Este fato mostrou que as preparações poderiam ser incubadas com Mn^{2+} (0.9 mM) por mais de 120 min, sem que se observasse nenhuma alteração significativa nos valores do PM.

3. BthTX-I (10 μ g/ml, n=3): quando as preparações foram tratadas com esta concentração de BthTX-I observou-se uma progressiva e acentuada despolarização da membrana a partir dos 30 min ($*P<0.05$, Tabela 3), com valores de -49.5 ± 3 mV e -48 ± 3 mV (t_{60} min, nas regiões da placa e fora, RP e FP, respectivamente) e de -34 ± 3 mV (t_{120} min, em ambas as regiões). Na vigência desses valores de PM não foi possível o registro dos pptm.

4. BthTX-I (5 μ g/ml, n=5): O uso de uma concentração menor foi útil para monitorar as pequenas alterações de PM determinadas por esta toxina sobre as fibras musculares. A ação desta concentração de BthTX-I sobre os PM, só foi significativamente diferente do controle Tyrode aos 120 min, na região fora da placa ($*P<0.01$, Tabela 4).

5. Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (5 μ g/ml, 120 min) (n=3): a análise estatística resultante deste protocolo mostrou valores significativamente diferentes do controle Tyrode (* $P<0.05$) nos seguintes tempos (min): t_{30} , na região fora da placa motora; t_{60} , t_{120} e pós-lavagem em ambas as regiões, placa e fora de placa (Tabela 5). Entretanto, quando os mesmos valores foram comparados aos com BthTX-I (5 μ g/ml) não houve diferença significativa ao longo dos 120 min de observação. Este resultado determinou a escolha da concentração de 10 μ g/ml de BthTX-I para avaliar a ação protetora do Mn^{2+} .

6. Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (10 μ g/ml, 120 min) (n=3): Quando se adicionou BthTX-I às preparações previamente incubadas por 30 min com Mn^{2+} (0.9 mM), os PM puderam ser registrados ao longo de todo o período (Tabela 6, * $P<0.05$ comparado à BthTX-I 10 μ g/ml) de observação (o que não aconteceu quando preparações foram incubadas apenas com a toxina), sendo os valores aos 120 min de -71.8 ± 1.1 mV (região da placa) e -67 ± 1.7 mV (distante da placa). Após a lavagem, as preparações apresentaram alguns potenciais espontâneos com amplitude acima de 1.9 mV e os valores obtidos dos PM foram -72.8 ± 1.9 mV e -72.4 ± 1.9 mV, para as regiões da placa e fora da placa, respectivamente.

A Figura 14A resume as condições acima citadas sobre os PM de preparações submetidas ao controle Tyrode, Mn^{2+} (0.9 mM) e às duas concentrações de BthTX-I (5 e 10 μ g/ml). Assim, pode ser claramente observada a intensa despolarização causada pela maior concentração de toxina usada. A Figura 14B ilustra o notável efeito protetor do Mn^{2+} contra a ação despolarizante da BthTX-I 10 μ g/ml ($P<0.05$, t_{60-120} min). Não foram mostrados os valores de PM da região fora da placa por não ter sido observado diferença significativa entre ambas as regiões.

TABELA 1 – MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV)
CONTROLE TYRODE (N=3)

n	t ₀		t ₁₅		t ₃₀		t ₆₀		t ₁₂₀		t ₁₈₀		t ₂₄₀		W	
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
1	80	70	84	86	84	80	80	88	80	86	84	78	80	80	78	80
	78	88	84	78	82	88	80	80	84	80	80	80	78	78	80	78
	72	80	80	84	82	86	80	74	80	84	80	80	80	80	80	84
	80	80	84	84	80	86	78	80	84	80	80	78	80	78	80	80
	90	80	74	84	86	80	88	84	70	80	80	80	80	78	80	80
	80	80	84	84	82	84	80	84	84	80	80	78	78	78	84	80
2	80	70	78	70	80	60	84	80	84	90	78	84	78	70	84	84
	78	80	78	78	80	60	68	80	84	84	80	90	88	80	68	78
	84	80	78	84	80	84	84	78	84	78	80	90	84	80	80	90
	76	84	72	80	80	80	78	80	90	80	84	68	80	84	78	80
	84	76	70	86	78	80	80	80	68	76	84	70	80	80	78	80
3	70	82	76	70	80	78	70	80	70	74	78	70	80	84	78	80
	84	84	80	80	84	78	80	80	70	70	80	76	78	78	80	88
	84	84	80	80	70	80	74	70	70	76	78	80	78	86	78	86
	84	72	84	70	80	80	78	80	88	84	78	78	84	80	88	86
	80	68	70	78	80	78	70	84	78	70	80	84	78	84	80	84
	70	80	80	84	80	80	80	80	80	76	80	80	80	84	84	80
Σ	135	133	133	136	136	134	133	136	134	134	136	133	136	136	135	139
	4	8	6	0	8	2	2	2	8	8	4	4	4	2	8	6
M	79.	78.	78.	80	80.	79	78.	80	79.	79.	80.	78.	80.	80.	80	82
	6	7	5		5		3		3	3	2	5	2	1		
EP	1.3	1.3	1.2	1.3	0.8	1.8	1.3	0.9	1.7	1.3	0.5	1.3	0.6	0.8	1.0	0.8

t, tempo (min). RP, região de placa. FP, fora de placa. W, lavagem da preparação.

TABELA 2 – MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV) –

 Mn^{2+} (0.9 mM)

n	t ₀		t ₁₅		t ₃₀		t ₆₀		t ₁₂₀		t ₁₈₀		t ₂₄₀		W	
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
1	80	80	84	84	84	80	84	80	84	70	80	70	60	64	50	70
	80	80	84	84	80	80	84	78	80	70	74	78	64	60	50	78
	84	80	80	84	80	80	84	70	84	80	78	68	60	70	60	64
2	80	80	80	80	86	90	70	80	70	80	68	66	68	70	64	78
	86	90	90	80	86	84	70	80	80	80	63	66	70	70	70	74
	80	80	80	90	90	80	80	80	78	80	64	73	70	66	74	78
3	86	82	84	80	82	80	84	80	78	74	80	80	68	60	78	70
	86	84	88	86	82	86	78	90	84	80	84	84	60	68	80	80
	80	80	84	86	88	86	80	90	80	78	80	78	78	80	70	80
Σ	742	736	754	754	758	746	714	728	718	692	671	663	598	608	596	672
M	82.	82	84	84	84	83	79	81	80	77	74.5	74	66.	67.	66	75
	4												5	5		
EP	1	1	1	1	1	1	2	2	1.5	1.5	2.5*	2 *	2 *	2 *	4 *	1.5*

* $P < 0.01$. t, tempo (min). RP, região de placa. FP, fora de placa. W, lavagem da preparação.

TABELA 3 – MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV) -
BTHTX-I (10 µG/ML)

n	t ₀		t ₁₅		t ₃₀		t ₆₀		t ₁₂₀		W	
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
1	84	80	90	70	70	70	50	30	24	40	24	20
	80	70	88	68	78	78	50	30	40	40	20	38
	70	70	80	70	60	70	30	60	28	36	20	30
	80	70	80	78	70	80	40	50	32	42	20	28
	84	90	80	80	60	74	40	50	40	36	26	20
	78	82	78	70	72	68	30	50	20	20	20	30
2	80	90	80	90	90	90	60	60	60	60	20	40
	80	90	80	80	80	90	44	60	40	40	50	40
	85	90	80	90	90	80	64	44	60	60	30	50
	80	90	80	80	90	80	50	60	40	60	40	40
	90	90	80	90	80	90	64	50	50	60	50	40
	90	90	80	90	80	90	80	50	50	60	40	60
3	90	80	60	60	60	60	40	20	56	24	50	24
	90	80	60	60	40	40	56	68	44	28	20	20
	80	80	40	80	60	60	60	40	52	24	30	20
	80	60	60	70	40	60	48	40	36	22	60	24
	80	60	50	60	50	60	48	60	40	20	40	30
	78	60	60	60	50	60	40	40	20	50	50	60
M	82	79	72.5	75	68	72	49.5	48	41	40	34	34
EP	1.2	2.6	3.2	2.5	3.8 *	3.2 *	3.0 *	3.0 *	3.5 *	3.5 *	3.2 *	3.0 *

*P<0.05. t, tempo (min). RP, região de placa. FP, fora de placa. W, lavagem da preparação.

TABELA 4 – MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV) -
BTHTX-I (5 µG/ML)

n	t ₀		t ₁₅		t ₃₀		t ₆₀		t ₁₂₀		W	
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
1	80	78	80	70	70	70	70	70	70	70	70	82
	80	82	80	80	60	64	70	70	70	70	74	70
	70	70	70	70	70	60	70	70	70	70	58	78
	70	70	80	80	74	64	78	70	80	90	82	78
	78	80	80	80	70	60	70	70	60	70	70	86
	80	80	70	68	64	60	70	70	78	70	80	80
2	84	80	80	78	80	70	70	68	78	70	74	90
	88	90	82	70	80	64	68	70	68	70	80	80
	90	80	70	70	90	70	70	80	70	70	70	80
	90	90	80	90	80	70	78	80	68	70	90	90
	70	90	78	70	70	72	80	70	70	70	70	80
	80	70	70	80	78	70	80	78	68	70	90	80
3	80	70	70	70	80	90	84	70	80	60	-	-
	70	90	78	70	70	70	68	78	90	70	-	-
	70	80	78	70	74	72	78	90	70	70	-	-
	84	90	78	78	70	80	68	80	88	70	-	-
	70	78	78	80	70	70	68	90	70	68	-	-
	90	98	78	80	78	84	90	70	70	68	-	-
4	74	82	80	84	90	84	80	70	70	68	72	76
	74	80	86	80	70	80	80	74	70	70	88	78
	84	80	74	82	78	80	78	84	70	76	90	60
	80	80	70	78	78	78	90	80	80	70	80	74
	80	90	78	80	80	84	70	80	70	70	78	82
	80	70	80	74	70	70	70	78	80	80	76	60
5	74	84	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	82	80	82	84	80	78	80	90	78	78	70	80
	78	72	74	78	80	80	80	90	80	80	70	80
	84	84	80	80	78	70	70	80	78	70	80	90
	80	80	90	84	70	78	90	80	74	80	70	84
	78	80	80	80	80	78	80	80	78	80	80	70
Σ	2372	2438	2334	2318	2262	2200	2278	2310	2226	2168	1842	1888
M	79	81	78	77	75.4	73.3	76	77	74.2	72.2	76.5	78.5
EP	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1	1 *	2	2

*P<0.01. t, tempo (min). RP, região de placa. FP, fora de placa. W, lavagem da preparação.

TABELA 5 – MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV) -
 MN^{2+} (0.9 MM, 30 MIN) + BTHTX-I (5 μ G/ML, 120 MIN)

Adição de BthTX-I

n	t_0		t_{15}		t_{30}		t_{60}		t_{120}		W	
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
1	70	80	70	-	80	66	72	72	70	64	68	80
	80	70	70	-	70	60	70	66	70	70	70	80
	80	70	68	-	64	60	66	68	70	80	80	70
	78	70	70	-	70	70	66	70	70	70	80	78
	70	80	70	-	80	78	76	66	70	80	70	76
	68	70	70	-	76	68	68	70	64	70	80	84
2	90	70	78	80	80	70	70	78	78	60	60	60
	70	70	78	70	80	80	80	80	70	60	60	64
	70	70	80	70	80	70	78	78	64	60	60	74
	78	70	70	68	80	70	80	70	70	60	60	60
	70	70	80	80	80	74	64	68	78	78	68	60
	80	80	80	70	70	70	70	78	70	64	70	70
3	90	80	90	80	90	82	80	80	90	80	80	90
	90	80	82	90	90	80	80	90	82	68	84	70
	90	90	90	70	90	80	90	80	78	78	84	74
	78	80	90	70	70	80	80	90	80	90	70	80
	90	90	90	82	78	80	78	80	70	90	70	68
	90	90	90	90	80	80	80	70	78	70	70	80
Σ	1432	1380	1416	920	1408	1318	1318	1348	1322	1292	1214	1318
M	79.5	77	79	77	78	73	73	75	73.5	72	67.5	73
EP	2	1.8	2	2	2	2 *	2 *	2	1.5 *	2 *	4.4 *	2 *

* $P < 0.05$. t, tempo (min). RP, região de placa. FP, fora de placa. W, lavagem da preparação.

TABELA 6 – MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV) -
 MN^{2+} (0.9 MM, 30 MIN) + BHTX-I (10 μ G/ML, 120 MIN)

Adição de BthTX-I

↓

n	0'		15'		30'		60'		120'		W	
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
1	70	80	68	70	64	78	72	70	70	70	70	78
	78	70	70	78	70	66	66	66	70	70	70	80
	80	80	70	80	80	60	70	70	70	80	80	70
	80	70	70	90	76	74	66	68	70	70	80	76
	68	70	70	68	80	66	68	66	70	64	68	76
	70	70	70	80	70	68	76	72	64	70	80	80
2	70	70	80	70	80	70	70	78	64	60	68	74
	80	70	78	80	80	80	80	80	70	60	60	64
	70	80	78	70	70	68	78	70	78	78	76	60
	80	70	70	68	80	70	74	78	70	60	60	60
	85	70	80	70	80	74	64	78	70	60	60	70
	80	70	74	80	80	70	70	68	78	64	70	60
3	70	80	70	70	70	70	80	80	70	70	80	70
	80	80	78	70	85	85	80	60	70	64	90	68
	80	84	90	70	88	90	90	50	80	50	80	90
	80	80	80	85	80	70	80	70	80	78	70	70
	85	80	90	70	90	80	80	90	80	70	70	80
	80	80	80	70	84	90	85	85	70	68	80	78
M	77	75.2	75.8	74.3	78.1	73.8	79.4	72.1	71.8	67	72.8	72.4
EP	1.3 *	1.2	1.6	1.5	1.6 *	1.9	1.6 *	2.1 *	1.1 *	1.7 *	1.9 *	1.9 *

* $P < 0.05$. t, tempo (min). RP, região de placa. FP, fora de placa. W, lavagem da preparação.

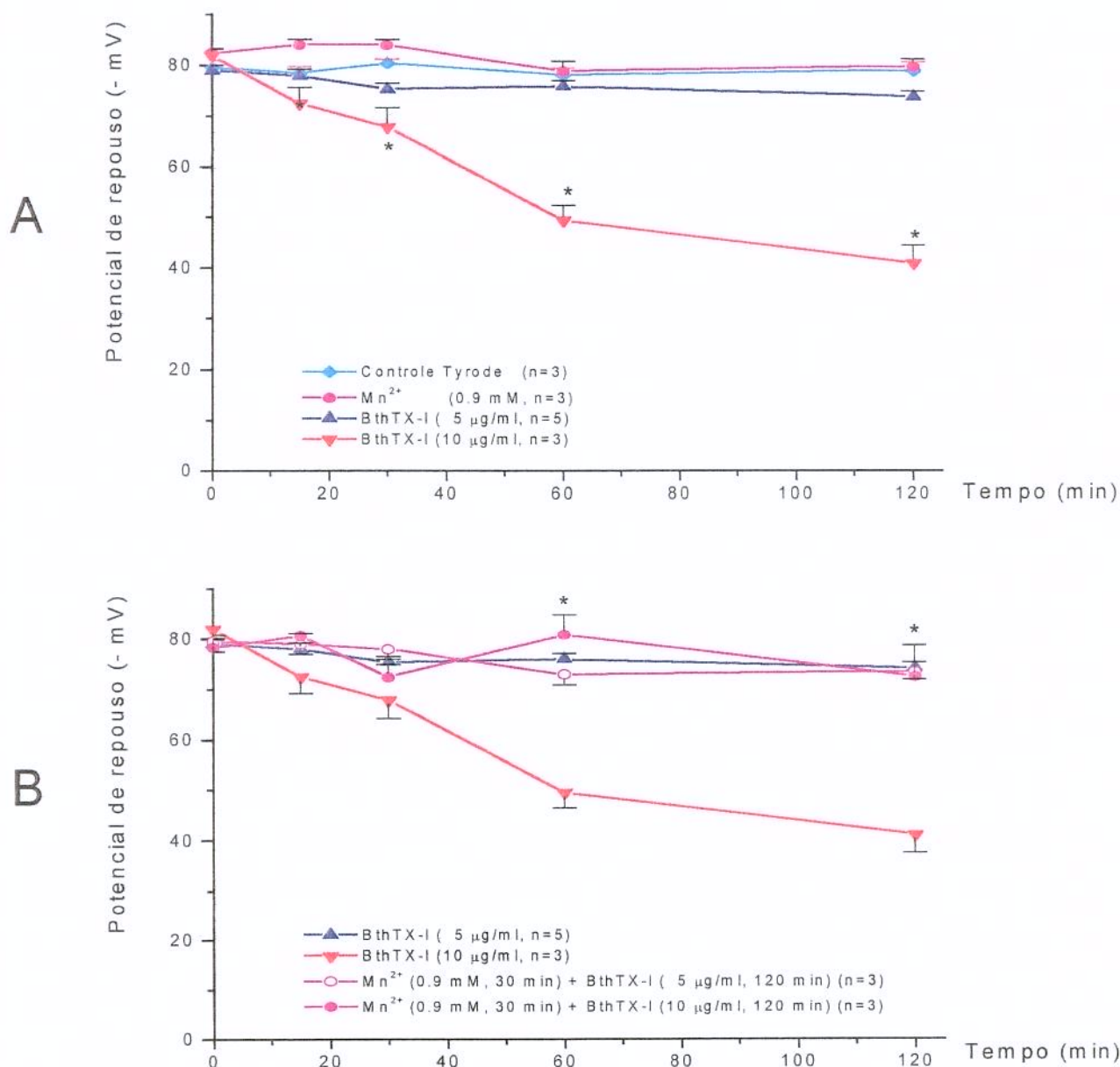


Fig. 14 – Potenciais da membrana em repouso (diafragma de camundongo). (A) Note a espolarização das fibras após exposição à BthTX-I 10 µg/ml, mas não à BthTX-I 5 µg/ml e nem ao Mn^{2+} 0.9 mM. * $P < 0.05$, em relação ao controle Tyrode. (B) Efeitos da BthTX-I após 120 min de exposição em preparações previamente incubadas com Mn^{2+} . Note a proteção exercida pelo Mn^{2+} contra a ação despolarizante da BthTX-I (10 µg/ml).

* $P < 0.05$, em relação à BthTX-I 5 µg/ml. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão.

- **Potenciais de placa terminal em miniatura (pptm)**

Foram obtidas medidas de frequência e de amplitude, nos tempos t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{60} , t_{120} , t_{180} , t_{240} min e também após a lavagem (W) da preparação. Como no protocolo anterior, as preparações incubadas com Mn^{2+} (0.9 mM) e com solução nutritiva de Tyrode foram observadas por 240 min e BthTX-I (5 μ g/ml e 10 μ g/ml) por 120 min.

- **Frequência**

A Figura 15 mostra a frequência dos pptm nos seguintes ensaios (1, 2, 4, 5 e 6), estando 15A representando 1, 2 e 4 e 15B representando 5 e 6:

1. Tyrode (n=3): a frequência dos pptm variou de 38 ± 4 a 61 ± 9.5 (n=3), em preparações controle, ao longo dos 240 min de observação.

2. Mn^{2+} (0.9 mM, n=3): o tratamento das preparações com o manganês mostrou uma oscilação de 15 ± 3 (t_0) a 190.5 ± 12 (t_{120}) na frequência dos pptm. A diminuição da frequência observada no momento da adição de Mn^{2+} ($P < 0.01$) era esperada, devido ao efeito antagonista deste íon sobre o Ca^{2+} . A partir dos 120 min, a frequência desses potenciais aumentou significativamente, de 2 a 3 vezes ($P < 0.05$), só diminuindo após a lavagem da preparação, embora ainda permanecesse aumentada de modo significativamente diferente do controle.

3. BthTX-I (10 μ g/ml, n=5): sob a ação da toxina, algumas fibras apresentaram um aumento imensurável na frequência dos pptm (Figura 16A); enquanto que em outras fibras, a frequência era como aquela do controle ou mesmo abaixo; entretanto, potenciais de maior amplitude ou seja acima de 2 mV, surgiram esporadicamente (Figura 16B). Observou-se também uma intensa fibrilação em algumas fibras musculares, geralmente após 30 min de incubação com a toxina, dificultando gradualmente o empalamento das fibras musculares. Após 60 min de incubação as fibras estavam totalmente despolarizadas (-49.5 ± 3 mV) não sendo mais possível o registro dos pptm.

4. BthTX-I (5 $\mu\text{g/ml}$, $n=4$): as preparações tratadas com esta concentração de toxina não exibiram qualquer diferença significativa em relação à frequência dos pptm dos controles, nem mesmo após a lavagem da preparação.

5. Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (5 $\mu\text{g/ml}$, 120 min) ($n=4$): nestas condições a adição de BthTX-I levou a um aumento significativo na frequência dos pptm ($P<0.05$, comparado à frequência de BthTX-I) já a partir dos 15 min. Resultado semelhante ocorreu apenas após 120 min de incubação com o Mn^{2+} e na ausência de BthTX-I. Após a lavagem da preparação, a frequência retornou a valores não significativamente diferente do controle.

6. Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (10 $\mu\text{g/ml}$, 120 min) ($n=3$): de forma semelhante ao protocolo anterior, aumentando-se a concentração da toxina, houve uma antecipação no tempo de aparecimento do aumento da frequência dos pptm que neste caso ocorreu aos 60 min, após a adição de BthTX-I. A análise estatística foi feita comparada à BthTX-I 5 $\mu\text{g/ml}$, e não 10 $\mu\text{g/ml}$, pela dificuldade encontrada em contar e medir os pptm das preparações tratadas com a concentração maior de BthTX-I.

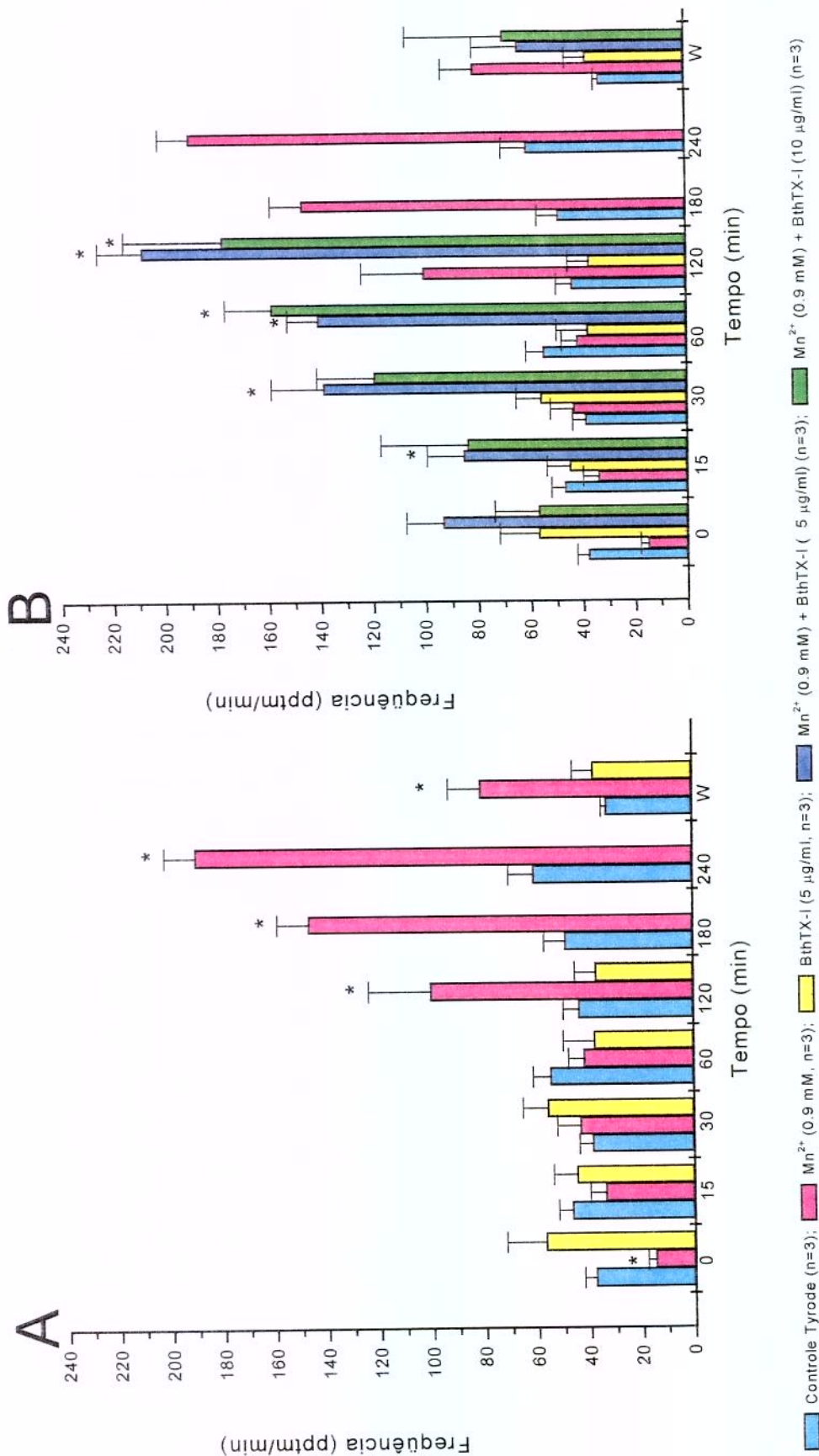


Fig. 15 – Frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm/min). (A) Preparações incubadas com solução nutritiva de Tyrode, Mn^{2+} e BthTX-I. Note a diminuição inicial da frequência (aos 15 min) e o aumento da frequência (a partir dos 120 min) em preparações tratadas com Mn^{2+} (* $P<0.05$, comparado ao controle Tyrode). (B) BthTX-I (5 e 10 μ g/ml) foram adicionadas em preparações pré-tratadas com Mn^{2+} e os resultados plotados sobre A. Note que a adição de BthTX-I antecipou o aumento da frequência, visto para Mn^{2+} sozinho. * $P<0.05$, comparado à BthTX-I (5 μ g/ml). Cada ponto representa a média \pm erro-padrão. W, lavagem da preparação.

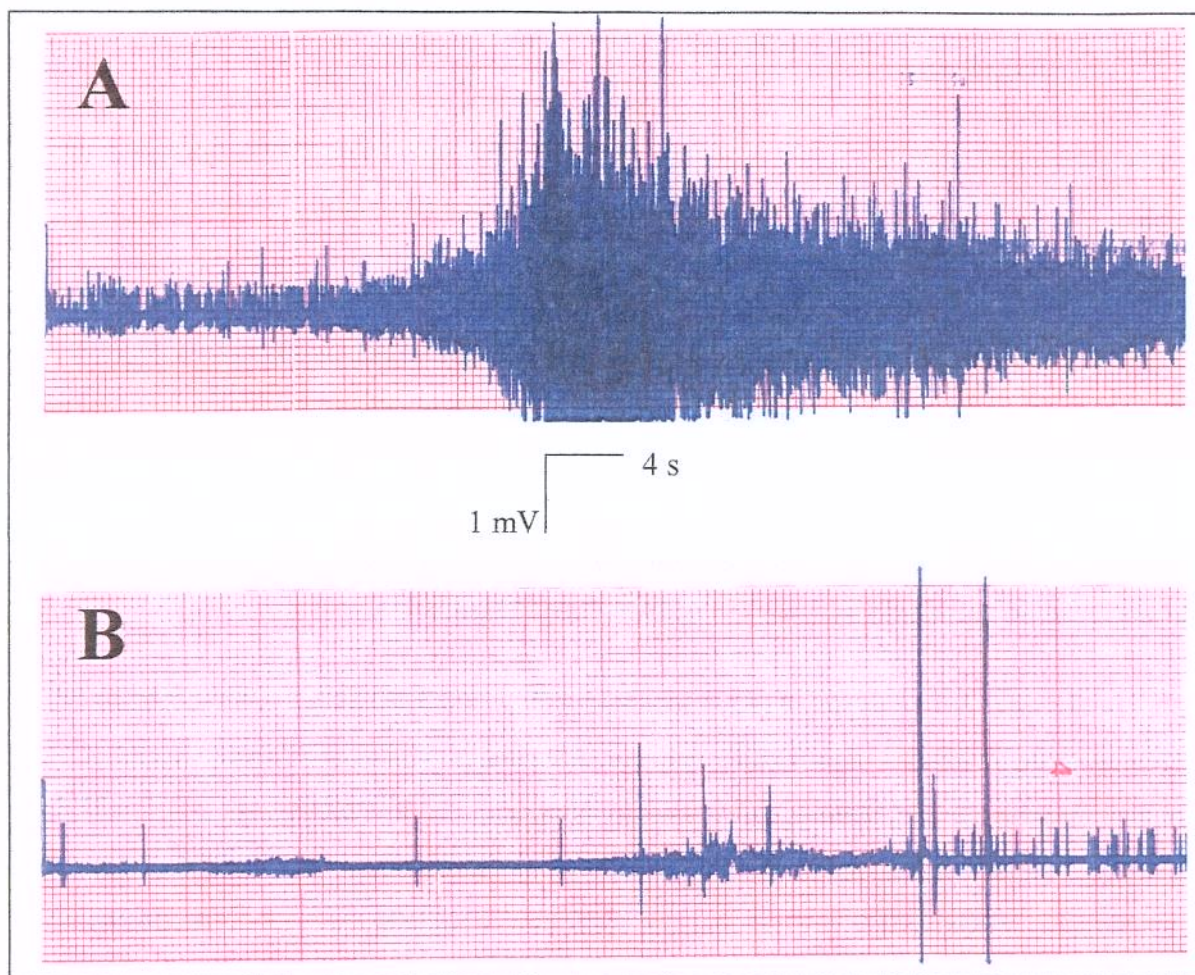


Fig. 16. Registros de pptm de preparação tratada com BthTX-I ($10 \mu\text{g/ml}$). (A) fibra empalada na região da placa terminal e exibindo um aumento imensurável de pptm. Observe a ocorrência de pptm de elevada amplitude. (B) fibra empalada em região próxima da anterior, não mais exibindo o aumento na frequência de pptm, porém mantendo pptm de elevada amplitude.

• Amplitude

Os resultados seguintes mostram as amplitudes (mV) dos pptm nos seguintes intervalos: 0.2 - 0.5, 0.6 - 0.9, 1.0 - 1.4, 1.5 - 1.9 e acima de 1.9.

1. Tyrode (n=3): a análise de pptm do controle Tyrode mostrou ser 0.2 a 0.5 mV a amplitude predominante, seguido por 0.6 a 0.9 mV, em todos os intervalos de tempo observados, de t_0 a t_{240} min e também após a lavagem da preparação (Figura 17).

2. Mn^{2+} (0.9 mM, n=3): as preparações incubadas com o manganês não mostraram alteração significativa na amplitude, exceto no tempo t_{30} min, com o surgimento de potenciais com amplitude de 1.0 a 1.4 mV ($P<0.05$) (Figura 18).

3. BthTX-I (5 μ g/ml, n=4): a incubação da preparação com a toxina (Figura 19) também mostrou diferença significativa quando comparada com experimentos controle, a partir dos tempos t_{30} min, com o aparecimento ocasional de potenciais com amplitude de 1.5 a 1.9 mV ($P<0.05$); t_{60} min com o surgimento de potenciais com amplitude de 1.5 a 1.9 mV ($P<0.05$) e acima de 1.9 mV ($P<0.05$) e t_{120} min, com o aparecimento de potenciais acima de 1.9 mV ($P<0.05$). Um registro típico é mostrado na Figura 20. A concentração de 10 μ g/ml de BthTX-I (n=5) determinou uma variação inconsistente ou seja, algumas fibras ora exibiram muita variação, ora não exibiram qualquer variação na amplitude.

4. Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (5 μ g/ml) (n=4): observou-se um aumento significativo ($P<0.05$) na amplitude dos pptm de 0.2 a 0.5 mV nos tempos t_{15} , t_{60} e t_{120} min (Figura 21). A adição de BthTX-I ao meio, antecipou o disparo de pptm, que ocorria a partir de 120 min com o manganês sozinho.

5. Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (10 μ g/ml) (n=3): nesta concentração a BthTX-I (Figura 22) causou o aumento no número de pptm de amplitude 0.6 a 0.9 mV ($P<0.05$, t_{30} e t_{60} min). Após a lavagem, não mais se observou potenciais espontâneos com amplitude acima de 1.9 mV, como o verificado em preparações incubadas somente com a BthTX-I.

Controle Tyrode (n=3)

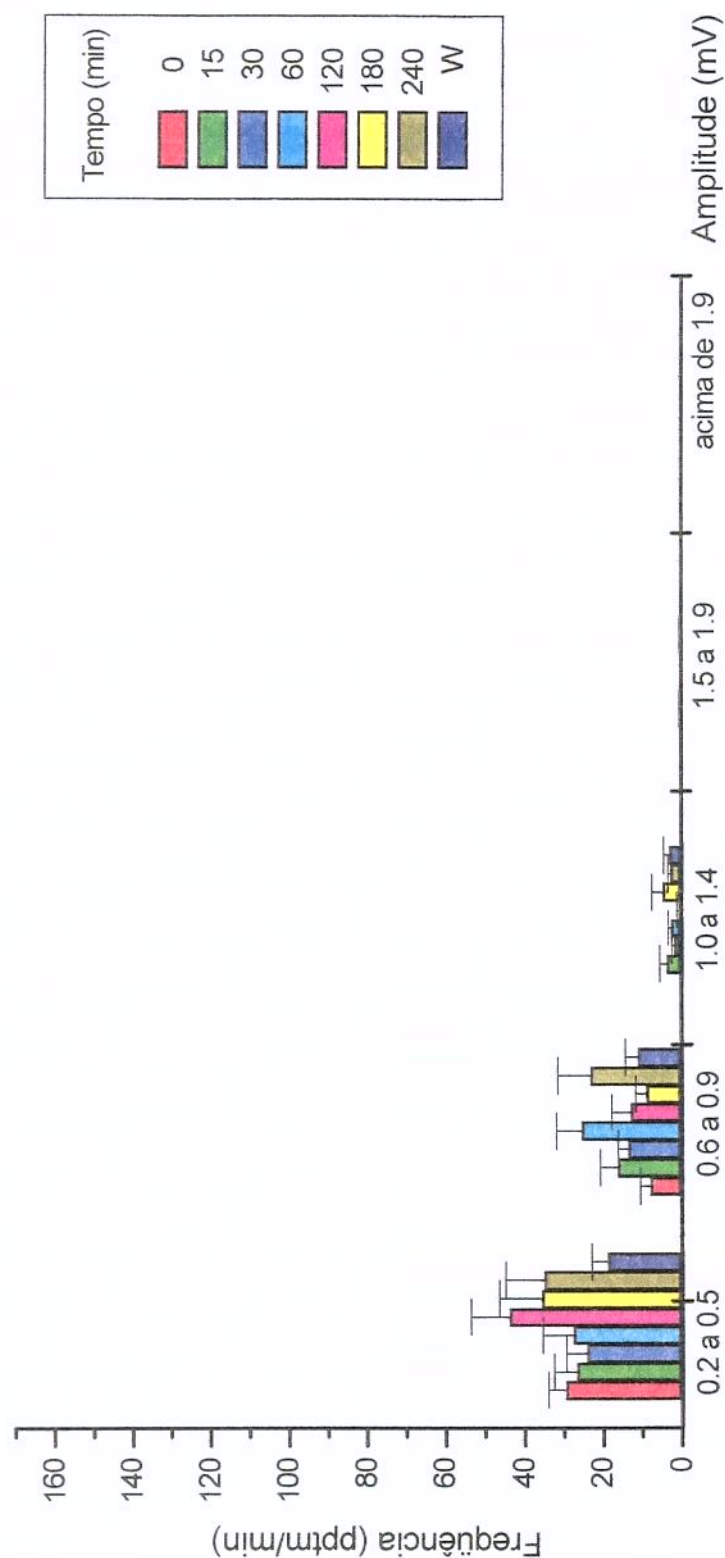


Fig. 17- Frequência (ppts/min) & amplitude (mV) – Tyrode. Potenciais obtidos de preparações incubadas com solução de Tyrode nos tempos indicados na legenda. Note a predominância de pptm com amplitude nos intervalos de 0.2 a 0.9 mV. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão de 3 experimentos. W, lavagem da preparação.

Mn^{2+} (0.9 mM, n=3)

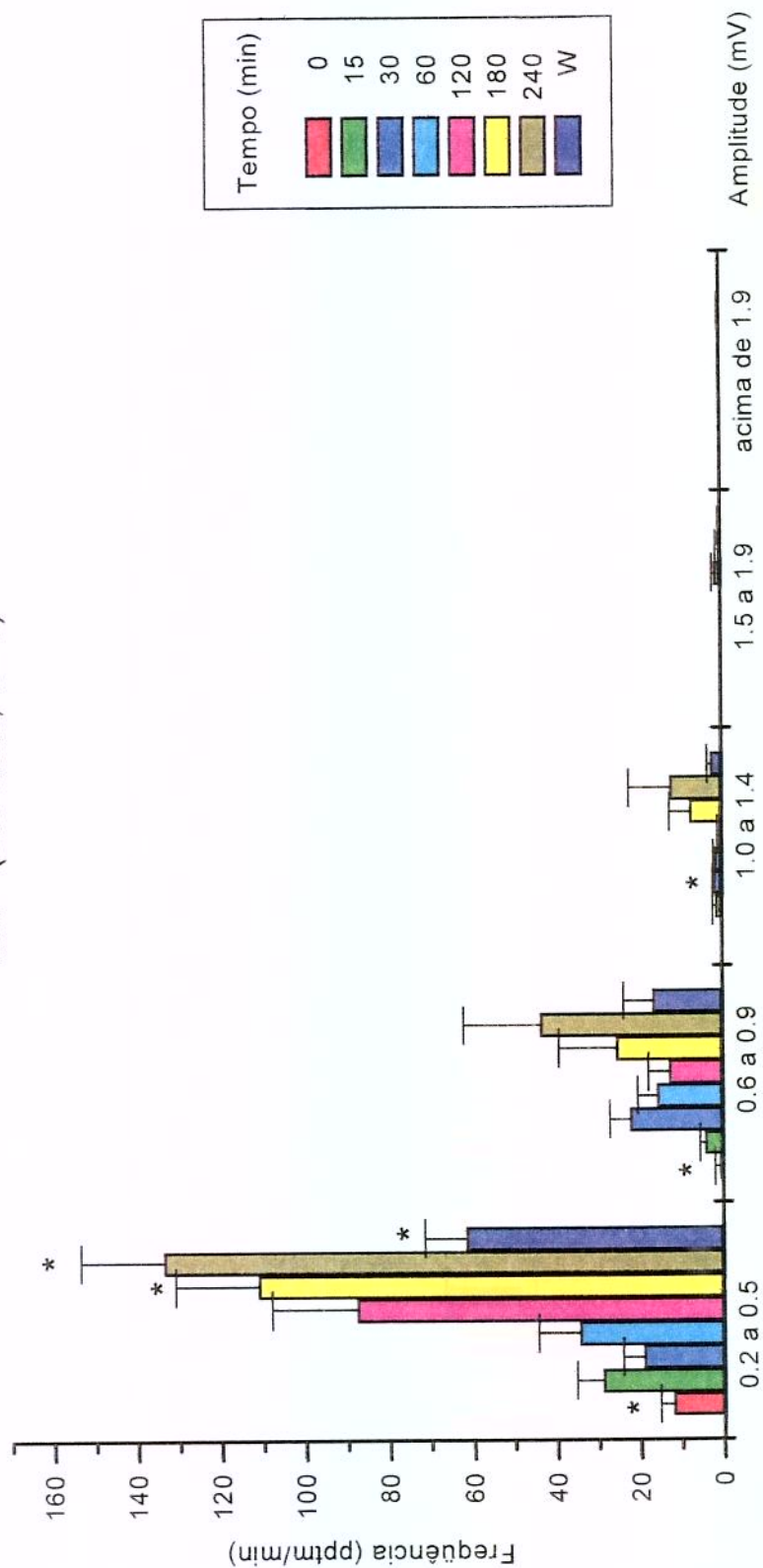


Fig. 18 – Frequência (pptm/min) & amplitude (mV) – Mn^{2+} (0.9 mM). Potenciais obtidos de preparações incubadas com Mn^{2+} nos tempos indicados na legenda. Note os efeitos de diminuição e aumento da frequência em populações de pptm com amplitude de 0.2 a 0.9 mV (* $P < 0.05$). Aumento na amplitude de pptm foi observado aos 30 min (* $P < 0.05$), com pptm de 1.0 a 1.4 mV. Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão. W, lavagem da preparação.

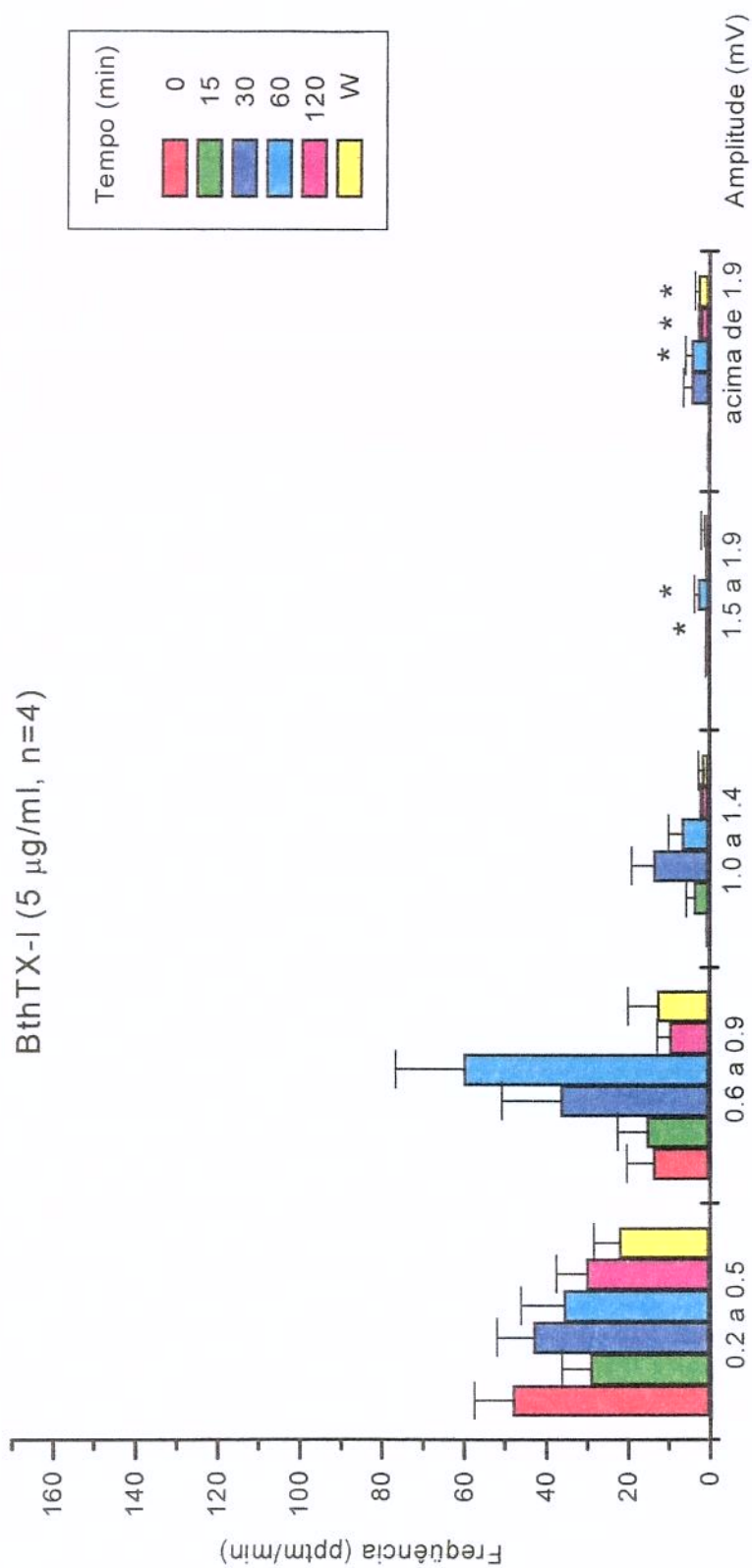


Fig. 19 – Frequência (ppts/min) & amplitude (mV) – BthTX-I (5 µg/ml). Potenciais obtidos de preparações incubadas com BthTX-I, nos tempos indicados na legenda. Note a ocorrência de potenciais de amplitude de 1.5 a 1.9 mV a partir dos 30 min (* $P<0.05$) e também de amplitude acima de 1.9 mV (* $P<0.05$, aos 60 e 120 min e após a lavagem da preparação). Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão. W, lavagem da preparação.

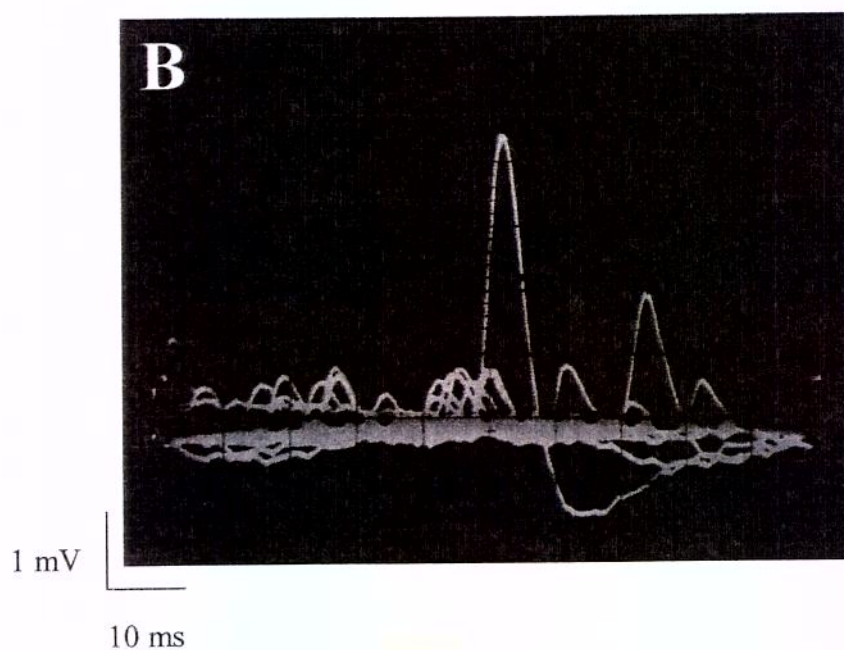
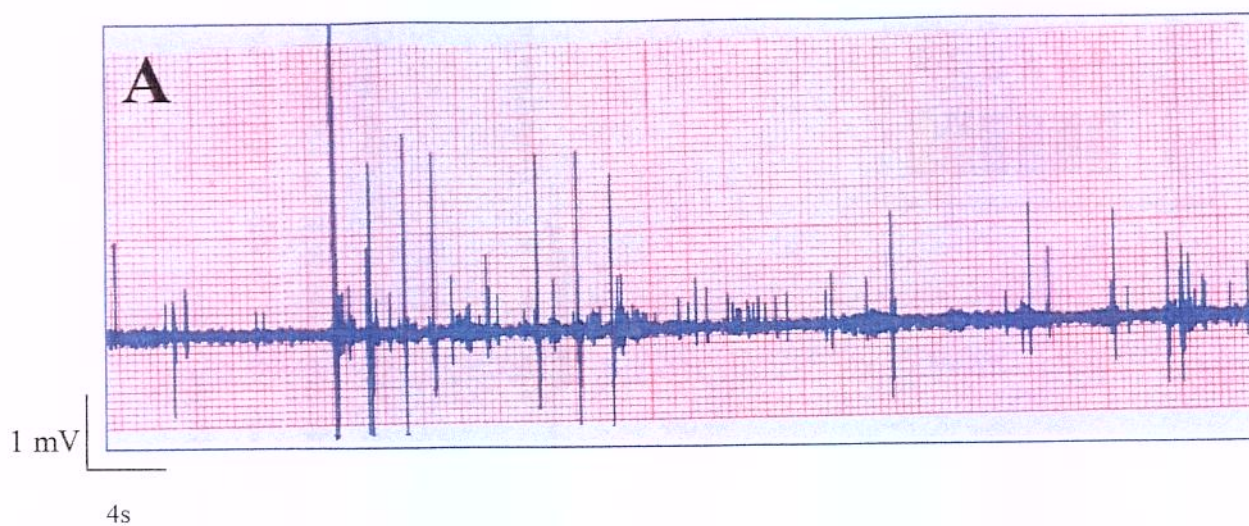


Fig. 20 – Registros de pptm de preparação tratada com BthTX-I ($5 \mu\text{g/ml}$). (A) Potenciais registrados em fisiógrafo (B) Potenciais registrados em osciloscópio e fotografados. Observe a ocorrência de potenciais de elevada amplitude.

Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (5 μ g/ml, 120 min) (n=4)

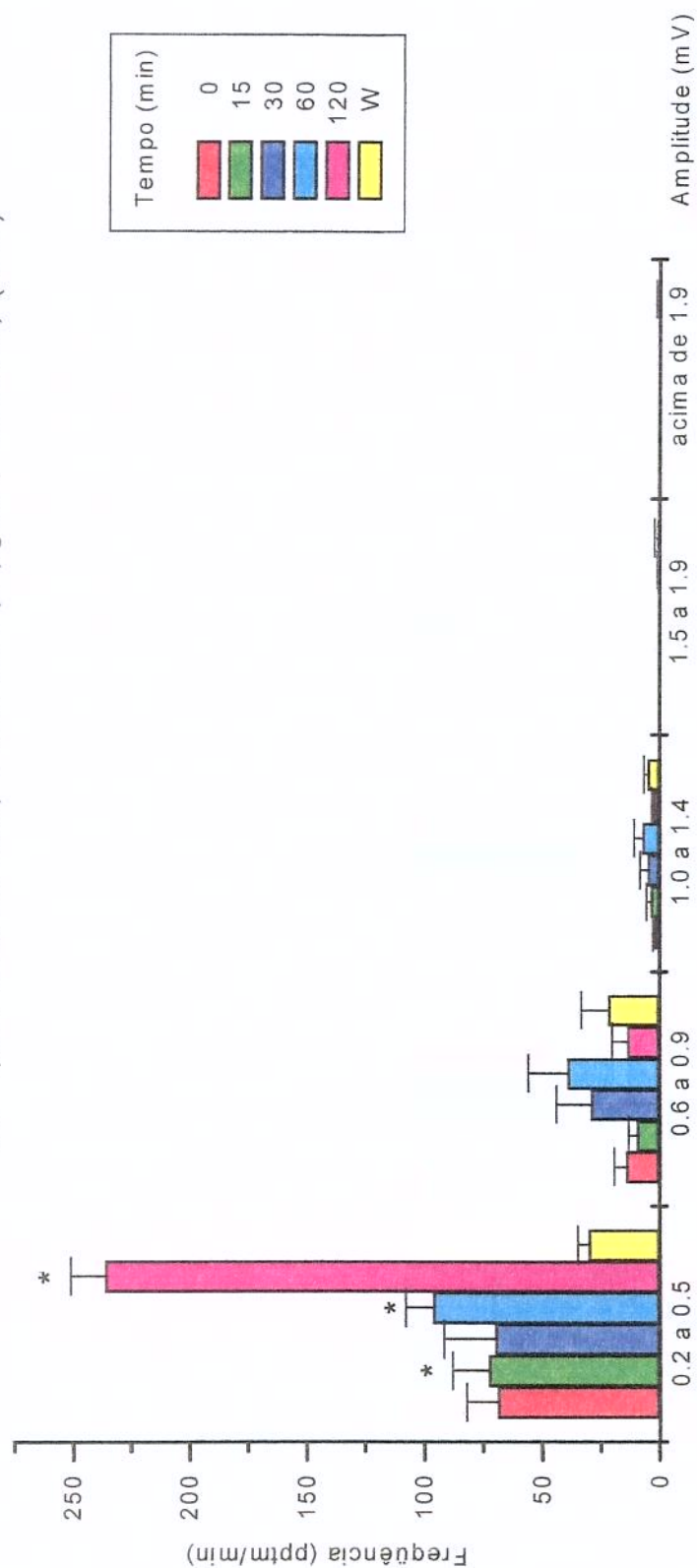


Fig. 21 – Frequência (ppts/min) & amplitude (mV) – $Mn^{2+} \rightarrow$ BthTX-I (5 μ g/ml). Potenciais obtidos de preparações pré-incubadas com Mn^{2+} seguidas da adição de BthTX-I, nos tempos e concentrações indicados na legenda. Note que o aumento da frequência foi antecipado em relação ao tratamento apenas com Mn^{2+} , ocorrendo a partir dos 15 min (* $P < 0.05$, comparado à BthTX-I). Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão. W, lavagem da preparação.

Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) + BthTX-I (10 μ g/ml) (n=3)

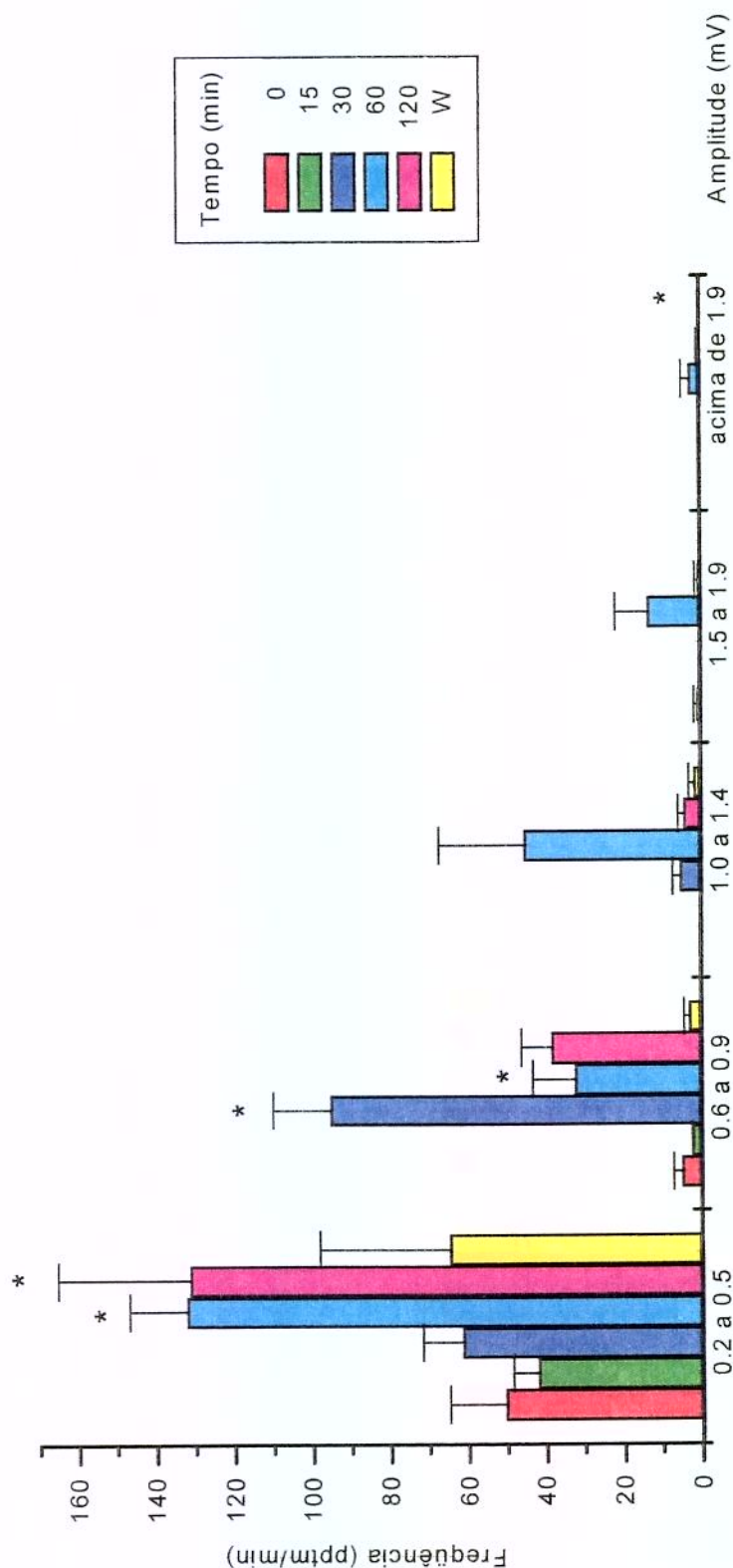


Fig. 22 – Frequência (ppts/min) & amplitude (mV) – $Mn^{2+} \rightarrow$ BthTX-I (10 μ g/ml). Potenciais obtidos de preparações pré-incubadas com Mn^{2+} seguidas da adição de BthTX-I, nos tempos e concentrações indicados na legenda. Note que o aumento da frequência foi antecipado em relação ao tratamento apenas com Mn^{2+} , ocorrendo a partir dos 60 min (* $P < 0.05$, comparado à BthTX-I 5 μ g/ml). Cada ponto representa a média \pm o erro-padrão. W, lavagem da preparação.

5.5. DISCUSSÃO

A técnica eletrofisiológica fornece informações que indicam o sítio de ação de substâncias ou toxinas na JNM. A preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, exibe fibras de pequeno diâmetro o que determina a manutenção de somente um curto período de tempo de empalamento; diferente da fibra de rã, que são grandes (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983), e uma vez empalada mantém-se deste modo até o final do experimento (60 a 120 min ou mais). Na preparação utilizada, esta dificuldade pode ser contornada registrando-se potenciais a partir de uma amostra de 3 a 10 placas motoras.

O estudo detalhado dos dois parâmetros eletrofisiológicos, potencial da membrana em repouso e frequência/amplitude de pptm, em preparações incubadas com Tyrode, Mn^{2+} e BthTX-I, permitiram a interpretação dos resultados posteriores com a BthTX-I, em preparações previamente incubadas com os íons Mn^{2+} .

Os resultados obtidos com os íons Mn^{2+} mostraram uma alteração da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm), inicialmente com sua diminuição no momento da adição do Mn^{2+} ao banho (provavelmente pela competição com o cálcio) e, posteriormente, pelo aumento após os 120 min de pptm (provavelmente pelo tamponamento intraterminal deste íon, conforme referido por RASGADO-FLORES *et al.*, 1987). A variação da frequência é classicamente interpretada como a indicação de ação pré-sináptica. A variação da amplitude deve ser analisada com cuidado, pois tanto pode evidenciar uma ação pós-sináptica, como ocorre com anticolinesterásicos e curare, com aumento e diminuição da amplitude, respectivamente (FATT & KATZ, 1952), como também uma ação pré-sináptica, com a presença de pptm gigantes, como visto para a crotoxina (HAWGOOD, SMITH, STRONG, 1988), toxina botulínica (MOLGO, COMELLA, ANGAUT-PETIT, 1990). No caso do Mn^{2+} , além da ação sobre a frequência de pptm, uma variação na amplitude foi observada aos 30 min, com o aparecimento de potenciais com amplitude de 1.0 a 1.4 mV e significativamente diferente do controle Tyrode ($P < 0.05$). Embora pptm gigantes não tenham sido observados com o Mn^{2+} na concentração estudada e sim pptm com amplitude de 1.0 a 1.4 mV, isto pode ser explicado

pelo fato deste íon ser avidamente sequestrado pelas organelas intraterminais (RASGADO-FLORES *et al.*, 1987).

Dos estudos clássicos realizados com o Mn^{2+} sobre o terminal nervoso podem-se resumir os principais achados: inibe a liberação evocada Ca^{2+} -dependente do neurotransmissor (KATZ & MILEDI, 1969; MEIRI & RAHAMIMOFF, 1972); é capaz de substituir parcialmente o cálcio na manutenção evocada da liberação (DRAPEAU & NACHSHEN, 1984; KITA, NARITA, VAN DER KLOOT, 1981) e desenvolve lentamente e com longa duração o aumento da liberação do neurotransmissor (BECHEM *et al.*, 1981).

Comparando os resultados da eletrofisiologia com aqueles obtidos na miografia, podem-se estabelecer os seguintes elos: a inibição inicial da liberação de ACh, evidenciada pela diminuição da frequência de pptm, pode ser observada na miografia pelo bloqueio fugaz da neurotransmissão (MEIRI & RAHAMIMOFF, 1972). Como o Mn^{2+} é avidamente sequestrado pelas organelas intraterminais (RASGADO-FLORES *et al.*, 1987) o cálcio extracelular volta a ter acesso ao seu sítio e a neurotransmissão se restabelece (reversibilidade espontânea do Mn^{2+} pela técnica miográfica). Isto foi precocemente visualizado pela técnica eletrofisiológica, aos 30 minutos, com a ocorrência de pptm de amplitude aumentada.

Outro fato que corrobora a ação pré-sináptica do Mn^{2+} é o de preparações tratadas com este íon manterem estável o potencial de membrana, por cerca de 120 minutos. Após este período houve alteração significativamente diferente do controle Tyrode ($P < 0.05$), nos valores de PM, embora seja discutível atribuir uma ação despolarizante ao Mn^{2+} , uma vez que pptm foram obtidos ao longo de 240 minutos de observação. O método para medida do PM não é tão fino a ponto de detectar pequenas nuances nos valores de PM e alterações de ± 10 mV é comum.

Experimentos realizados com BthTX-I na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ mostraram-se inviáveis para uma análise mais apurada, uma vez que a ação desta toxina nessa concentração tornou difícil o empalamento das fibras, além da presença de fibrilações que acabavam por interromper o empalamento e inviabilizando o registro dos pptm. Devido a estas dificuldades optou-se por concentrações menores de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de BthTX-I. Com a primeira concentração observaram-se alguns dados relevantes: nenhuma alteração na

freqüência de pptm, porém um inesperado aparecimento de pptm gigantes. Com a segunda concentração, algumas fibras apresentaram um aumento imensurável na freqüência de pptm, enquanto outras localizadas em regiões muito próximas exibiram freqüência normal além de, como na concentração anterior, mostrar também pptm gigantes, com amplitudes acima de 1.9 mV. Esses dados poderiam sugerir alguma ação da BthTX-I sobre o terminal nervoso, além de sua já conhecida ação sobre a membrana pós-sináptica.

Os ensaios seguintes foram realizados com preparações previamente tratadas com Mn^{2+} (30 minutos) seguidas da adição de BthTX-I (5 $\mu g/ml$). Nestas condições experimentais observou-se que o aumento na freqüência dos pptm ocorreu com uma latência menor (15 minutos) quando comparado com o aumento causado pelo Mn^{2+} (120 minutos) na ausência da BthTX-I. Este resultado parece sugerir que a adição de BthTX-I antecipou o efeito farmacológico do Mn^{2+} . Na realidade um outro íon divalente como o Sr^{2+} também estimula a atividade farmacológica da BthTX-I (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1995). Nesta concentração de BthTX-I não houve alteração significativa nos valores de PM. Também foi investigada a ação protetora do Mn^{2+} contra a ação despolarizante da toxina na concentração de 10 $\mu g/ml$. Neste caso o Mn^{2+} foi eficiente em impedir o efeito despolarizante da toxina ($P < 0.05$, t_{60} , t_{120} min e também pós-lavagem), além de também antecipar o efeito farmacológico do Mn^{2+} (aumento na freqüência de pptm).

Assim, os objetivos propostos nesta etapa foram alcançados, uma vez que se confirmou pela técnica eletrofisiológica (através do parâmetro do PM) o efeito protetor do Mn^{2+} contra a ação bloqueadora da BthTX-I, observado pela técnica miográfica convencional. Nova evidência foi encontrada, até então não relatada e sugerindo uma ação pré-sináptica para a BthTX-I, a ocorrência de pptm gigantes, que retrata eventos relacionados à liberação de ACh (HAWGOOD *et al.*, 1988; MOLGO *et al.*, 1990), embora sejam registrados na membrana da fibra, portanto pós-sinápticamente. Além disso, algumas fibras empaladas apresentaram aumento imensurável na freqüência de pptm, tendo sido este fato já observado e relatado, embora não explicado, por RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1983). Finalmente, reforçam-se os dados da literatura para a ação pré-sináptica do Mn^{2+} , e também sobre o seu papel análogo ao Ca^{2+} , competindo com este íon pelos mesmos sítios, seja na membrana do terminal nervoso ou em outro tipo de célula, como por exemplo, a fibra muscular, como observado em nossas condições experimentais.



6. DISCUSSÃO GERAL

No capítulo 1 viu-se que o antiveneno crotoxínico foi eficiente em neutralizar ambos os efeitos, neurotóxico e miotóxico, ao contrário da heparina que se mostrou ineficiente em impedir a mionecrose induzida pela BthTX-I. Como harmonizar estes resultados quando a heparina tem sido relacionada à capacidade neutralizadora dos efeitos miotóxicos de venenos botrópicos?

Tem sido proposto um mecanismo para a ação da heparina contra o efeito miotóxico de venenos botrópicos, incluindo-se o veneno de *B. jararacussu* e a BthTX-I, que envolveria uma interação (bio)química ácido-básica (MELO & SUAREZ-KURTZ, 1988a; MELO & SUAREZ-KURTZ, 1988b; MELO *et al.*, 1993; LOMONTE *et al.*, 1994a; LOMONTE *et al.*, 1994b).

Neste estudo, é sugerido um segundo mecanismo para a heparina, decorrente de um inédito efeito facilitador observado em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos. É tentador associar este efeito como sendo decorrente da solubilização de acetilcolinesterases específicas na região da placa terminal, conforme relatado por alguns autores (TORRES & INESTROSA, 1983; TORRES & INESTROSA, 1985; BRANDAN & INESTROSA, 1984; BRANDAN *et al.*, 1985), resultando em acúmulo de neurotransmissor na região sináptica, o que explicaria a facilitação.

No presente trabalho, a hipótese para a baixa eficiência da heparina sobre o efeito miotóxico da toxina seria a de uma interação inespecífica do complexo toxina-heparina já formado, com proteínas presentes na membrana da fibra muscular, envolvidas na extrusão de Ca^{2+} intracelular. Esta interação romperia a homeostase de Ca^{2+} intracelular (RICHTER & KASS, 1991), uma vez que não mais conseguiria expelir o Ca^{2+} intracelular. Isto levaria ao seu acúmulo e finalmente à mionecrose. Esta sugestão baseia-se no fato de que a própria heparina exibe elevado peso molecular e que, ao formar um complexo com a BthTX-I, tornar-se-ia incapaz de atravessar a membrana. Assim, a ação miotóxica da BthTX-I em presença da heparina ocorreria por inativação de proteínas presentes na membrana, como por exemplo o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

A existência de proteínas de membranas, seja no terminal nervoso, seja no músculo esquelético tem sido extensivamente estudada. Sob condições de repouso, aproximadamente 80% do Ca^{2+} é armazenado no retículo sarcoplasmático via Ca^{2+} -ATPase. Os outros 20% de Ca^{2+} são expelidos do citossol para o espaço extracelular por duas classes de proteínas transportadoras presentes no sarcolema: a Ca^{2+} -ATPase e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A este último tem sido atribuído o mecanismo dominante de extrusão do Ca^{2+} para o espaço extracelular (YASHAR, FRANSUA, FRISHMAN, 1998). Embora o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ tenha sido mais estudado na célula muscular cardíaca, onde tem papel central na regulação da concentração de Ca^{2+} mioplásmico livre, ele também está presente na célula muscular esquelética (BALNAVE & ALLEN, 1998). Há troca de três Na^+ extracelulares (que entram na célula) pela remoção de um Ca^{2+} intracelular (que sai da célula). Ao contrário, em seu modo reverso, um Ca^{2+} entra na célula e três Na^+ são expelidos (DONOSO & HIDALGO, 1989). Este trocador também está presente na membrana mitocondrial. O influxo de Ca^{2+} mitocondrial é mediado pelo Ca^{2+} uniporter (proteína carreadora que transporta um único soluto de um lado da membrana para o outro); o efluxo é promovido pelo $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (KOWALTOWSKI, 2000).

Embora as sugestões apontadas permaneçam no campo das hipóteses, o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(s) a heparina exerce seu efeito, seja bio(químico), seja farmacológico, ou ambos, precisa(m) ser comprovado(s). Muitos estudos recentes têm sido realizados com a heparina, mostrando alguns deles, o seu papel propiciador da angiogênese (NORRBY, 1993). Em geral, os efeitos locais dos venenos ofídicos hemorrágicos associados aos efeitos miolíticos causados por componentes protéicos específicos contidos no veneno são muito graves e de complicada solução. Estudos têm demonstrado o papel da heparina como co-fator crítico do fator de crescimento dos fibroblastos, células importantes na angiogênese e inúmeros fenômenos regenerativos. Aliás, o fator de crescimento dos fibroblastos é um membro da família de polipeptídeos do fator de crescimento dos fibroblastos (ligada à heparina) e é um mitógeno potente para uma variedade de células mesenquimais (de onde originam-se as células musculares esqueléticas) e neuroectodérmicas (de onde originam-se os elementos do tecido nervoso), *in vitro* (BURGESS & MACIAG, 1989). A heparina por si só não representa um fator mitogênico, porém protege o fator de crescimento dos fibroblastos contra os efeitos deletérios do

aquecimento e inativação proteolítica. É possível que um papel multifatorial esteja por trás dos efeitos neuromusculares protetores contra a neurotoxicidade e miotoxicidade da BthTX-I.

No capítulo 2 os resultados obtidos mostraram claramente a eficiência de íons Mn^{2+} em impedir a ação neurobloqueadora da BthTX-I. Estes resultados, aliados a outros dados observados (com 3,4-DAP, estrôncio, cálcio, dantrolene e d-Tc), apontaram para uma ação desta miotoxina sobre a membrana plasmática da fibra muscular, talvez sobre as proteínas ali presentes, tais como canais de cálcio e (ou) o trocador Na^+/Ca^{2+} . A questão é: de que forma o Mn^{2+} , cuja ação é predominantemente pré-sináptica, impediria a ação neurobloqueadora da BthTX-I, se se assumir para esta uma ação pós-sináptica?

Na tentativa de responder a esta questão, recorreu-se à técnica eletrofisiológica, no capítulo 3. Surpreendentemente, uma concentração menor de BthTX-I (5 $\mu g/ml$), nunca antes utilizada por outros autores (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1983, HELUANY *et al.*, 1992) e também não capaz de alterar o potencial da membrana em repouso, revelou uma população de pptm com amplitude de cerca de duas a três vezes maiores que os pptm predominantes nas condições-controle. Estes pptm predominantes correspondem a uma grande população e consiste de pequenos potenciais homogêneos com um rápido “time-to-peak”. A outra, menos numerosa e mais heterogênea, consiste de uma grande amplitude e longo “time-to-peak” mas também de um número de potenciais pequenos e de lenta liberação (SELLIN *et al.*, 1996). Baseado nestes autores, assumiu-se aqueles potenciais com amplitude excedendo duas vezes os valores modais como sendo pptm gigantes, sem qualquer pretensão de se discutir sobre a natureza de tais potenciais, que tem sido profundamente estudada desde 1957 por KATZ & THESLEFF e também por outros (HEUSER, 1974; KRIEBEL, VAUTRIN, HOLSAPPLE, 1990; MOLGO *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1995; SELLIN *et al.*, 1996; VAUTRIN & KRIEBEL, 1997), através de técnicas apropriadas.

Quando concentrações maiores de BthTX-I (10 µg/ml) foram utilizadas observou-se uma ação despolarizante desta toxina sobre a membrana da fibra muscular. Além disso, em algumas fibras houve um aumento imensurável de pptm, também relatado, mas não explicado, por RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1983). Quer-se agora resgatar esses dados e associá-los a uma possível ação pré-sináptica da BthTX-I, baseados nos resultados obtidos com concentrações menores de BthTX-I.

Outro fato interessante ocorre com o próprio Mn^{2+} . O pré-tratamento de preparações com Mn^{2+} seguidos da adição da toxina, preveniram a ação despolarizante desta, além de anteciparem o efeito de disparo de pptm que ocorria aos 120 min, com o Mn^{2+} sozinho. Este resultado corrobora aqueles obtidos da técnica miográfica. Acredita-se que íons metálicos liguem-se a regiões ligantes do cálcio, no poro dos canais iônicos, prevenindo a passagem de Ca^{2+} (NACHSHEN, 1984). Mn^{2+} é um íon que se assemelha quimicamente ao Mg^{2+} (WILLIAMS, 1970) e por isso tem sido substituído com muito sucesso pelo Mg^{2+} em alguns estudos biológicos com sistemas purificados (MILDVAN & COHN, 1970). Entretanto, ele se assemelha mais ao Ca^{2+} que ao Mg^{2+} em sistemas como a célula total (TOISTER & LOYTER, 1973), mitocôndria (MELA & CHANCE, 1968) ou fatores de coagulação (LEWIS, FREYSSINET, HOLBROOK, 1978). Assim, seu movimento dentro e fora das células é similar ao do Ca^{2+} , competindo com o mesmo; segundo, protege as células contra as alterações da membrana plasmática, mediadas por vírus (IMPRAIM, MICKLEM, PASTERNAK, 1979) e terceiro, virtualmente todo o Mn^{2+} que entra na célula se liga a proteínas (GETZ *et al.*, 1979).

Tomando todos esses dados em conjunto aos resultados aqui obtidos, pode-se ressaltar um novo papel ao Mn^{2+} no tocante à junção neuromuscular. Este íon teria uma ação sobre o sarcolema extrajuncional (além da ação já conhecida sobre o terminal nervoso), especificamente sobre as fibras musculares do diafragma de camundongo.

A BthTX-I exerceria seus efeitos neuro e miotóxico por um complexo mecanismo. Dos estudos com antivenenos (comercial e específico) pôde-se observar uma maior eficiência do antiveneno específico sobre ambas as atividades da toxina (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2000). Dos resultados com a heparina (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001)

sugeriu-se que tais atividades pudessem estar dissociadas, uma vez que a atividade neurotóxica induzida pela BthTX-I foi eficientemente impedida pela heparina, mas não a sua miotoxicidade. Entretanto, dos resultados com Mn^{2+} e BthTX-I, um novo mecanismo de ação tóxica para a BthTX-I pode ser delineado, sendo este precocemente desencadeado no terminal nervoso, especificamente sobre os canais de cálcio. Pode-se, ainda, reforçar sobre o antagonismo existente entre Mn^{2+} e Ca^{2+} , não apenas no terminal nervoso, mas também em outro tipo de membrana, como o sarcolema extrajuncional.

Como suporte a estes achados VITAL BRAZIL, em 1903, demonstrou que o soro anticrotálico era muito mais ativo que o antibotrópico sobre a peçonha da *B. jararacussu* e que o acidente causado por esta serpente se assemelhava ao acidente crotálico, que foi corroborado com este trabalho com antiveneno crotoxínico produzido em coelhos (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001). Acredita-se que os resultados obtidos através do estudo com a BthTX-I, a principal toxina presente no veneno bruto de *B. jararacussu*, expliquem tanto os sintomas clínicos citados por VITAL BRASIL (1903), VITAL BRASIL (1911), como também os “bursts” na frequência de pptm descritos por RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1983). Finalmente, pode-se concluir que o efeito neurobloqueador da BthTX-I é desencadeado pela atividade pré-sináptica da toxina, embora o efeito tóxico predominante seja, de fato, a sua ação miotóxica sobre membranas, até porque venenos de serpentes são constituídos por uma mistura complexa de proteínas e induzem efeitos locais importantes.

Quer-se propor, assim, sob as condições experimentais utilizadas, um mecanismo para esta toxina sobre os canais de cálcio, presentes tanto no terminal nervoso como no sarcolema, conforme ilustrado a seguir, numa representação idealizada da JNM.

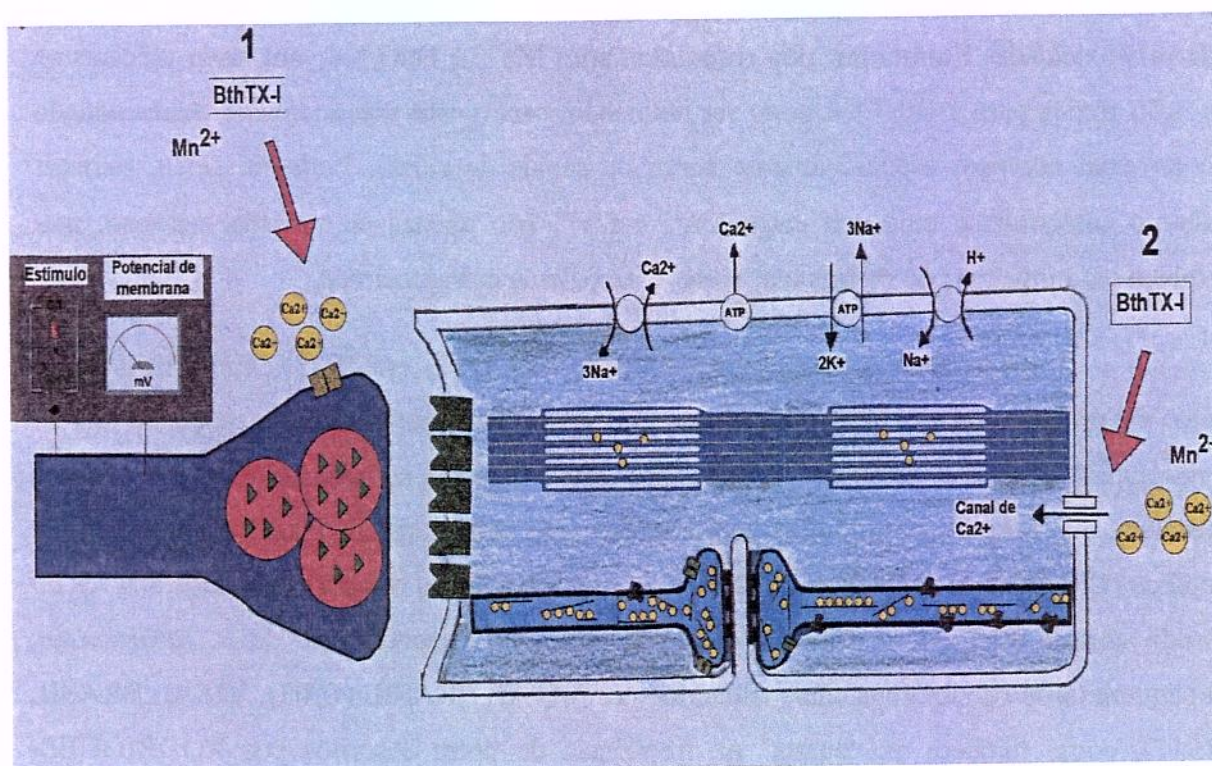


Fig. 23 – Sítios de ligação da BthTX-I, uma proposta do mecanismo de ação.

1) Uma ação primária sobre o terminal nervoso (eficientemente bloqueado pelo Mn^{2+} , pela heparina e pelo antiveneno crotoxínico);

2) Uma ação sobre o sarcolema via proteínas presentes na membrana, especialmente os canais de cálcio (sobre o trocador Na^+/Ca^{2+} , não comprovado), e eficientemente bloqueado pelo Mn^{2+} (confirmado pelas técnicas miográfica e eletrofisiológica), pelo antiveneno crotoxínico e não pela heparina (na concentração utilizada, tanto do veneno quanto da heparina).



7. CONCLUSÃO

Este estudo atingiu aos objetivos propostos, quais sejam:

1) Avançar no conhecimento do mecanismo de ação da BthTX-I:

Fortes evidências foram apresentadas de que a BthTX-I age sobre membranas, tanto do terminal nervoso (axolema) quanto da fibra muscular esquelética (sarcolema), via canais de cálcio.

2) Investigar sobre o espectro de ação do antiveneno crotoxínico e da heparina sobre as atividades neurotóxica e miotóxica da BthTX-I:

O antiveneno crotoxínico revelou-se muito eficiente em se contrapor às atividades neurotóxica e miotóxica da BthTX-I. A prática clínica de se associar antiveneno crotálico com antiveneno botrópico deve ser incentivada, nos acidentes causados por esta serpente.

A heparina protegeu contra a atividade neurotóxica (mas não a miotóxica) da BthTX-I. O efeito facilitador da heparina, primeiramente relatado neste estudo, pode ser atribuído a uma ação anticolinesterásica desta substância, na junção neuromuscular. Sua utilização clínica nos acidentes causados por esta serpente deve ser evitada, até que se esclareça(m) o(s) motivo(s) da baixa eficiência contra a miotoxicidade desta toxina.

3) Utilizar uma nova abordagem no estudo da farmacologia da BthTX-I:

O estudo com o Mn^{2+} trouxe ricas informações no tocante à junção neuromuscular e à BthTX-I. Os resultados obtidos apontaram para novas ações tanto para o Mn^{2+} (ação pós-sináptica) como para a BthTX-I (ação pré-sináptica), valorizando a técnica miográfica pelas informações que fornece.

4) Utilizar a eletrofisiologia no estudo da farmacologia da BthTX-I:

Esta técnica comprovou os indícios oferecidos pela técnica miográfica: a ação do Mn^{2+} sobre o sarcolema extrajuncional (além de sua ação sobre o terminal nervoso), e da

BthTX-I sobre o terminal nervoso (além de sua ação sobre o sarcolema extrajuncional), ambos, via canais de cálcio.

5) Investigar sobre o efeito protetor do Mn^{2+} contra as atividades neurotóxica e miotóxica da BthTX-I:

O Mn^{2+} , cuja principal ação é sobre o terminal nervoso, protegeu contra a atividade neurotóxica da BthTX-I, porque esta toxina apresenta uma ação precoce sobre o terminal nervoso.

Este íon, por exercer um papel análogo ao cálcio, e, portanto, agir na manutenção da integridade da membrana, também protegeu contra a atividade miotóxica da BthTX-I, sua principal ação.



8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A BthTX-I apresentou uma atividade sobre o axolema, antes de iniciar sua ação miotóxica sobre o sarcolema. Resta-nos investigar se a BthTX-I exerce as atividades neurotóxica e miotóxica por diferentes mecanismos ou se o sítio desencadeador de um efeito é o mesmo para o outro.

Este estudo pode ser complementado no seguinte:

a) com a BthTX-I: utilizar baixas concentrações da toxina e obter os dados complementares da técnica eletrofisiológica, os potenciais de placa terminal e conteúdo quântico, parâmetros importantes à confirmação de uma ação pré-sináptica da toxina. Realizar estudos específicos de ligação (“binding”) para confirmar diretamente o sítio de ligação da BthTX-I.

b) com a heparina: utilizar concentrações menores de heparina capaz de impedir a ação neurobloqueadora da BthTX-I (utilizar, em alguns protocolos, proporções menores também da toxina) e avaliar qualitativa e quantitativamente, através da técnica histológica e morfométrica, o nível de proteção contra a BthTX-I. Isto é necessário para verificar se a falta de proteção contra a ação miotóxica da toxina foi devido à concentração de heparina utilizada.

c) com o Mn^{2+} : realizar análises histológicas dos protocolos utilizados com preparações pré-tratadas com Mn^{2+} seguidas da adição de BthTX-I, para a confirmação da proteção exercida pelo manganês.

Medir a quantidade de cálcio intracelular (uso de marcadores fluorescentes, Fura2, etc), nos protocolos com Mn^{2+} e BthTX-I. Usar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) para avaliar possíveis alterações na disponibilidade de compostos energéticos intermediários para o desempenho da fibra.

Realizar ensaios experimentais de toxicidade com formulações farmacotécnicas com este íon, para aplicação tópica em acidentes causados por serpentes com ação proteolítica.



9. SUMMARY

Bothropstoxin-I (BthTX-I), the principal myotoxin of *Bothrops jararacussu* venom, has myotoxic and neurotoxic activities. The ability of crotoxin antiserum and heparin in preventing the myotoxic and neurotoxic effects of BthTX-I was investigated. Mouse phrenic nerve-diaphragm preparations (PND) stimulated indirectly with supramaximal stimuli (0.2 ms, 0.1 Hz) were incubated with BthTX-I (20 µg/ml) alone or with BthTX-I preincubated with antiserum or heparin for 30 min at 37°C prior to testing. BthTX-I (20 µg/ml) produced 50% neuromuscular blockade in PND preparations in 31 ± 4 min, with complete blockade occurring in 120 min. The antiserum and heparin significantly prevented the neuromuscular blockade caused by BthTX-I ($84 \pm 4\%$ and 100% protection, respectively). Histological examination of the muscles after a 120 min incubation showed that BthTX-I damaged $48 \pm 6\%$ of the fibers. Preincubating the toxin with antivenom significantly reduced the extent of this damage (only $15 \pm 4\%$ of fibers were affected, 70% protection, $P < 0.01$) whereas heparin offered no protection ($34 \pm 7\%$ of fibers affected, $P > 0.05$ compared to toxin alone). Thus the antivenom was more effective in neutralizing the myotoxic effects of BthTX-I than was heparin.

The protective action of manganese (Mn^{2+}) against the neurotoxic activity of BthTX-I was studied in mouse PND preparations. Mn^{2+} (0.9 mM and 1.8 mM) produced rapid blockade (50% in <4 min) which was spontaneously reversible at the lower concentration and produced a post-wash facilitatory effect. Pretreating preparations with 0.9 mM Mn^{2+} prevented the blockade by BthTX-I, although the facilitatory effect seen with Mn^{2+} alone occurred after washing. When added after BthTX-I, Mn^{2+} produced its characteristic blockade and, after washing, the twitch tension returned to pre- Mn^{2+} levels. The use of d-tubocurarine (d-Tc, 4 µg/ml) showed that BthTX-I acted directly on muscle cell membranes and not on nicotinic receptors. Unlike 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP, 10 µg/ml), BthTX-I did not block K^+ channels, nor did it affect Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum such as seen with dantrolene (10 µM). While Mn^{2+} may have an possible action on the muscle fiber membrane, the mechanism whereby it protects against neuromuscular blockade induced by BthTX-I remains unclear.

Electrophysiological analysis was used to investigate the effects of BthTX-I and the protective role of Mn^{2+} at the neuromuscular junction in mouse PND preparations. The membrane resting potential (RP), and the frequency and amplitude of miniature end-plate potentials (mepps) were recorded from preparations treated with Tyrode solution (control), Mn^{2+} (0.9 mM), BthTX-I (5 μ g/ml or 10 μ g/ml) or Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) before addition of BthTX-I (5 μ g/ml or 10 μ g/ml). Manganese produced an immediate decrease ($P < 0.05$ compared to control) in the frequency of mepps followed by a drastic increase at 120 min ($P < 0.05$ compared to control), with no change in the RP. BthTX-I (5 μ g/ml) increased the amplitude (but not frequency) by two-fold or more without affecting the RP. In contrast, BthTX-I (10 μ g/ml) produced a variable effect, with an increase in mepps frequency in some fibers but not in others. In addition, progressive depolarization of the fiber membrane (-49.5 ± 3 mV after 60 min) resulted in the abolition of mepps. The results obtained at low BthTX-I concentrations suggested an early presynaptic action for this toxin. Preincubating preparations with Mn^{2+} (0.9 mM, 30 min) followed by BthTX-I (10 μ g/ml) showed that Mn^{2+} did in fact protect muscle fibers against damage by this toxin since the RP at the end of the experiment was -72.5 ± 6 mV. These results indicate an action of Mn^{2+} on muscle fiber membranes, and reinforce the presynaptic action of this ion. Mn^{2+} protected against the neurotoxic and myotoxic activities of BthTX-I by first acting as a Ca^{2+} -antagonist and afterwards as a Ca^{2+} -analog. Overall, these findings indicate that BthTX-I may act via Ca^{2+} channels in membranes, the axolemmal or the sarcolemmal.



10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUYA, M. L.; VEERARAGHAVAN, N.; MENON, I. G. K. - Action of heparin on the venom of *Echis carinatus*. **Nature**, **158**:878, 1946.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R. - Crystallization and preliminary diffraction data of BthTX-I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, **33**:383-386, 1995.
- AUGUSTINE, G. J. & ECKERT, R. - Divalent cations differentially support transmitter release at the squid giant synapse. **J Physiol (Lond)**, **346**:257-271, 1984.
- BAKER, P. F.; HODGKIN, A. L.; RIDGEWAY, E. B. - Depolarization and calcium entry in squid giant axons. **J Physiol**, **218**:709-755, 1971.
- BALNAVE, C. D. & ALLEN, D. G. - Evidence for $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. **Am J Physiol**, **274**:940-946, 1998.
- BALNAVE, R. J. & GAGE, P. W. - The inhibitory effect of manganese on transmitter release at the neuromuscular junction of the toad. **Br J Pharmacol**, **47**:339-352, 1973.
- BECHEM, M.; GLITSCH, H. G.; POTT, L. - Facilitation of acetylcholine release from cardiac parasympathetic nerve endings. Effect of stimulation patterns of Mn ions. **Pfluegers Arch**, **391**:105-111, 1981.
- BIRD, G. S.; BURGESS, G. M.; PUTNEY, J. W. J. - Sulphydryl reagents and cAMP-dependent kinase increase the sensitivity of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor in hepatocytes. **J Biol Chem**, **268**:17917-17923, 1993.
- BIRKS, R.; KATZ, B.; MILEDI, R. - Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction in the course of nerve degeneration. **J Physiol**, **124**:586-604, 1960.
- BOURIN, M. -C. & LINDAHL, U. - Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochem J**, **289**:313-330, 1993.

- BRANDAN, E. & INESTROSA, N. C. - Binding of the asymmetric forms of acetylcholinesterase to heparin. **Biochem J**, **221**:415-422, 1984.
- BRANDAN, E.; MALDONADO, M.; GARRIDO, J.; INESTROSA, N. C. - Anchorage of collagen-tailed acetylcholinesterase to the extracellular matrix is mediated by heparan sulfate proteoglycans. **J Cell Biol**, **101**:985-992, 1985.
- BRENES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. - Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. **Toxicon**, **25**:574-577, 1987.
- BRITT, B. A.; SCOTT, E.; FRODIS, W.; CLEMENTS, M. J.; ENDRENYI, L. - Dantrolene- *in vitro* studies in malignant hyperthermia susceptible (MHS) and normal skeletal muscle. **Can Anaesth Soc J**, **31**:130-154, 1984.
- BROOKS, V. B. - An intracellular study of the action of the repetitive nerve volleys and of botulinum toxin on miniature end-plate potentials. **J Physiol**, **134**:264-277, 1956.
- BÜLBRING, E. - Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br J Pharmac**, **1**:38-61, 1946.
- BURGESS, W. H. & MACIAG, T. - The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Annu Rev Biochem**, **58**:575-606, 1989.
- CHANG, C.C. - The action of snake venoms on nerve and muscle. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin, Springer, 1979, p. 309-376.
- CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. - Bothropstoxin-I: aminoacid sequence and function. **J Prot Chem**, **12**:57-64, 1993.
- CUTHBERT, A. W. Ed. - **Calcium and Cellular Function**. London, Macmillan, 1970, p. 450.
- DALE, H. H.; FELDBERG, W.; VOGT, M. - Release of acetylcholine at voluntary motor nerve-endings. **J Physiol**, **86**:353, 1936.

- DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S.; WARD, R. J. - A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, **40**:6912-6920, 2001a.
- DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; WARD, R. J. - The effect of resonance energy homotransfer on the intrinsic tryptophan fluorescence emission of the bothropstoxin-I dimer. **Biochem Biophys Res Commun**, **284**:1011-1015, 2001b.
- DEL CASTILLO, J. & KATZ, B. -The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. **J Physiol**, **124**:553-559, 1954a.
- DEL CASTILLO, J. & KATZ, B. - Quantal components of the end-plate potential. **J Physiol**, **124**:560-573, 1954b.
- DEL CASTILLO, J. & KATZ, B. - Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. **J Physiol**, **124**:586-604, 1954c.
- DEL CASTILLO, J. & STARK, L. - The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. **J Physiol**, **116**:507-515, 1952.
- DETTBARN, W. D. - Pesticide induced muscle necrosis: mechanisms and prevention. **Fund Appl Toxicol**, **4**:S18-26, 1984.
- DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C. P.; MORAIS, J. F.; LIMA, M. L. S. R.; YAMAGUCHI, I. 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**, **51**:153-168, 1989.
- DONOSO, P. & HIDALGO, C. - Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**, **978**:8-16, 1989.

- DOS-SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R.; FORTES-DIAS, C. L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F. - A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev Inst Med Trop**, **34**:77-83, 1992.
- DRAPEAU, P. & NACHSHEN, D. A. - Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. **J Physiol Lond**, **348**:493-510, 1984.
- FATT, P. & KATZ, B. - Analysis of the end-plate potential with an intracellular electrode. **J Physiol**, **115**:320-370, 1951.
- FATT, P. & KATZ, B. - Spontaneous sub-threshold activity at motor nerve endings. **J Physiol**, **117**:109-128, 1952.
- FLETCHER, J. E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. - Basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* snake venom: phospholipid hydrolysis and effects on electrical and contractile activity of the rat heart. **Toxicol Appl Pharmacol**, **66**:39-54, 1982.
- GETZ, D.; GIBSON, J. F.; SHEPPARD, R. N.; MICKLEM, K. J.; PASTERNAK, C. A. - Manganese as a calcium probe: electron paramagnetic resonance and nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact cells. **J Membrane Biol**, **50**:311-329, 1979.
- GONÇALVES, J. M. - Purification and properties of crotamine. In: (BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V., eds.) **Venomous Animals and their Venoms**. New York, Acad. Press, 1956, p.261-274.
- GOSH, T. K.; EIS, P. S.; MULLANEY, J. M.; EBERT, C. L.; GILL, D. L. - Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-triphosphate-activated calcium release by heparin. **J Biol Chem**, **263**:11075-11079, 1988.
- GOYER, R. A. - Toxic effects of metals. In: (Casarett, L. J., Klaassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J., eds.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5th ed. USA, McGraw-Hill Companies, Inc., 1996, p. 717-718.

- GUTIÉRREZ, J. M. & CHAVES, V. - Proteolytic, hemorrhagic and myonecrotic effects of the venoms of Costa Rican snakes from the genera *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis*. **Toxicon**, **18**:315-321, 1980.
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. - Phospholipase A myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, **33**:1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A. C. O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. - Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp Molec Pathol**, **55**:217-229, 1991.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. - Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, **22**:115-128, 1984.
- HARVEY, A. L. & MARSHALL, I. G. - The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **299**:53-60, 1977.
- HAWGOOD B. J.; SMITH, I. C.; STRONG, P. N. - Early induction by crotoxin of biphasic frequency changes and giant miniature endplate potentials in frog muscle. **Br J Pharmacol**, **94**:765-772, 1988.
- 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**, **30**:1203-1210, 1992.
- HEUSER, J. E. - Proceedings: A possible origin of the 'giant' spontaneous potentials that occur after prolonged transmitter release at frog neuromuscular junctions. **J Physiol**, **239**:106P-108P, 1974.

- 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**, **26**:615-627, 1988.
- ILLES, P. & THESLEFF, S. - 4-Aminopyridine and evoked transmitter release from motor nerve endings. **Br J Pharmacol**, **64**:623-629, 1978.
- IMPRAIM, C. C.; MICKLEM, K. J.; PASTERNAK, C. A. - Calcium, cells and virus: alterations caused by paramyxoviruses. **Biochem Pharmacol**, **28**:1963-1969, 1979.
- JORGE, M. T.; CARDOSO, J. L. C.; CASTRO, S. C. B. A.; RIBEIRO, L. A.; FRANCA, F. O. S.; DE ALMEIDA, M. E.; KAMIGUTI, A. S.; SANTO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L.; MANCAU, J. E. C.; SBROGIO, M. L.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. - A randomised blinded comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brasil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, **89**:111-114, 1995.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (eds.). In: **Fundamentos da Neurociência e do comportamento**. Rio de Janeiro, Prentice-Hall do Brasil, 1997.
- KATZ, B. & MILEDI, R. - The effect of divalent cations on transmission in the squid giant synapse. **Publ Staz Zool Napoli**, **37**:303-310, 1969.
- KATZ, B. & MILEDI, R. - The release of acetylcholine from nerve by graded electric pulses. **Proc R Soc B**, **167**:23-38, 1967a.
- KATZ, B. & MILEDI, R. - A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulse. **J Physiol**, **192**:407-436, 1967b.
- KATZ, B. & MILEDI, R. - Tetrodotoxin and neuromuscular transmission. **Proc R Soc B**, **167**:8-22, 1967c.
- KATZ, B. & THESLEFF, S. - On the factors which determine the amplitude of the "miniature end-plate potential". **J Physiol (Lond)**, **137**:267-278, 1957.

- KEEN, C. L. & LEACH, R. M. - Manganese. In: (Seiler, H. G. and Sigel, H., eds.) **Handbook on toxicity of inorganic compounds**. New York, Marcel Dekker, 1988, p. 405-415.
- KIRPEKAR, S. M.; DIXON, W.; PRAT, J. C. - Inhibitory effect of manganese on norepinefrine release from the splenic nerves of cats. **J Pharmacol Exp Ther**, **174**:72-76, 1970.
- KITA, H.; NARITA, K.; VAN DER KLOOT, W. - Tetanic stimulation increases the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction in Mn^{2+} -, Co^{2+} -, and Ni^{2+} -saline solutions. **Brain Res**, **205**:111-121, 1981.
- KOWALTOWSKI, A. J. - Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Braz J Med Biol Res**, **33**:242-250, 2000.
- KRIEBEL, M. E.; VAUTRIN, J.; HOLSAPPLE, J. - Transmitter release: prepackaging and random mechanism or dynamic and deterministic process. **Brain Res Rev**, **15**:167-178, 1990.
- LAEMMLI, U. K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-685, 1970.
- LANDUCCI, E. C. T.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. - Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur J Pharmacol**, **343**:257-263, 1998.
- LANGERON, O.; COIRAULT, C.; FRATEA, S.; ORLIAGUET, G.; CORIAT, P.; RIOU, B. - The effects of dantrolene on the contraction, relaxation, and energetics of the diaphragm muscle. **Anesth Analg**, **89**:466-471, 1999.
- LEIKIN, J. B. & PALOUCZEK, F. P. - In: (GANS, J. A. & KERSCHER, R. D., eds.) **Poisoning & Toxicology Handbook**. Lexi-Comp., Inc (Hudson, Cleveland), American Pharmaceutical Association, 2nd edition, 1996-97.

- LEWIS, B. A.; FREYSSINET, J.-M.; HOLBROOK, J. J. - An equilibrium study of metal ion binding to human plasma coagulation factor XIII. **Biochem J**, **169**: 397-402, 1978.
- LING, G. & GERARD, R. W. - The normal membrane potential of frog sartorius fibres. **J Cell Physiol**, **34**:383-396, 1949.
- LOMONTE, B. & KAHAN, L. - Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *B. asper* (terciopelo) myotoxin. **Toxicon**, **26**:675-689, 1988.
- LOMONTE, B.; FURTADO, M. F.; ROVIRA, M. E.; CARMONA, E.; ROJAS, G.; AYMERICH, R.; GUTIÉRREZ, J. M. - South American snake venom proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxins. **Braz J Med Biol Res**, **23**:427-435, 1990a.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. - Equine antibodies to *Bothrops asper* myotoxin II: isolation from polyvalent antivenom and neutralizing ability. **Toxicon**, **28**:379-384, 1990b.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MATA, E. - Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, **23**:807-813, 1985.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MORENO, E.; CERDAS, L. - Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *B. asper* (terciopelo). **Toxicon**, **25**:443-449, 1987a.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; RAMÍREZ, M.; DÍAZ, C. - Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. **Toxicon**, **30**:239-245, 1992.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.; ROJAS, G.; CALDERÓN, L. - Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. **Toxicon**, **29**:695-702, 1991.

- LOMONTE, B.; MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J. M. - Detection of proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxin in crotaline snake venoms. **Toxicon**, **25**:947-955, 1987b.
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; Maccarana, M. - Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **J Biol Chem**, **269**:29867-29873, 1994a.
- 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 Pharmac**, **47**:1509-1518, 1994b.
- MARCUS, R. - Fármacos que afetam a calcificação e a renovação do osso: cálcio, fosfato, paratormônio, vitamina D, calcitonina e outros compostos. In: (Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Goodman Gilman, A., eds.) **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ª ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, 1996, p.1126-1130.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. - Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle. Relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, **21**:393-404, 1983.
- MEIRI, U. - **Divalent ions and synaptic transmission at the neuromuscular junction**. Jerusalem, 1975. [Tese - Ph.D. Hebrew University].
- MEIRI, U. & RAHAMIMOFF, R. - Activation of transmitter release by strontium and calcium ions at the neuromuscular junction. **J Physiol**, **215**:709-726, 1971.
- MEIRI, U. & RAHAMIMOFF, R. - Neuromuscular transmission: inhibition by manganese ions. **Science**, **176**:308-309, 1972.
- MELA, L. & CHANCE, B. - Spectrophotometric measurements of the kinetics of Ca⁺⁺ and Mn⁺⁺ accumulation in mitochondria. **Biochemistry**, **7**:4059-4063, 1968.

- 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**, **31**:285-291, 1993.
- 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**, **37**:199-215, 1999.
- MELO, P. A. & SUAREZ-KURTZ, G. - Release of creatine kinase from skeletal muscles by *Bothrops jararacussu* venoms: heparin potentiation of inhibition by antivenim. **Braz J Med Biol Res**, **21**:545-548, 1988a.
- 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**, **26**:87-95, 1988b.
- MENA, I. KAZUKO, H. BURKE, K. COTZIAS, G. C. - Chronic manganese poisoning, individual susceptibility and absorption of iron. **Neurology**, **19**:1000-1006, 1969.
- MENA, I.; MARIN, O.; FUENZALIDA, S.; COTZIAS, G. C. - Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover. **Neurology**, **17**:128-136, 1967.
- MÉNEZ, A. - Molecular immunology of snake toxins. **Pharmac Ther**, **30**:91-113, 1985.
- MÉNEZ, A.; PILLET, L.; LEONETTI, M.; BONTEMPS, F.; MAILLÈRE, B. - Snake toxins as antigens. In: **Structure of Antigens** (Van Regenmortel, M. H., Ed.) Boca Ratón, CRC Press, 1992, p.293-319.
- MIDDLEBROOK, J. L. & KAISER, I. I. - Immunological relationships of phospholipase A₂ neurotoxins from snake venoms. **Toxicon**, **27**:965-977, 1989.
- MILDEVAN, A. S. & COHN, M. - Aspects of enzyme mechanisms studied by nuclear spin relaxation induced by paramagnetic probes. **Adv Enzymol**, **33**:1-70, 1970.

- MILEDI, R. - Strontium as a substitute for calcium in the process of transmitter release at the neuromuscular junction. **Nature (Lond)**, **212**:1233-1234, 1966.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 1998,131p.
- MOLGÓ, J.; COMELLA, J. X.; ANGAUT-PETIT, D.; PECOT-DECHAVASSINE, M.; TABTI, N.; FAILLE, L.; MALLART, A.; THESLEFF, S. - Presynaptic actions of botulinal neurotoxins at vertebrate neuromuscular junctions. **J Physiol (Paris)**, **84**:152-166, 1990.
- MOURA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M. - Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, **28**:1293-1301, 1990.
- MOURA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M.; MOTA, I. - Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. **Toxicon**, **29**:1471-1480, 1991a.
- MOURA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. - Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, **29**:713-723, 1991b.
- NACHSHEN, D. A. - Selectivity of the Ca binding site in synaptosome Ca channels: inhibition of Ca influx by multivalent metal cations. **J Gen Physiol**, **83**:941-967, 1984.
- NACHSHEM, D. A. & BLAUSTEIN, M. P. - The influx of calcium, strontium, and barium in presynaptic nerve endings. **J Gen Physiol**, **79**:1065-1087, 1982.
- NIKAI, T.; KOMORI, Y.; YAGIHASHI, S.; OHARA, A., A.; OHIZUMI, Y.; SUGIHARA, H. - Isolation and characterization of phospholipase A₂ from *Agkistrodon bilineatus* (common cantil) venom. **Int J Biochem**, **25**:879-884, 1993.

- NORRBY, K. - Heparin and angiogenesis: a low -molecular-weight fraction inhibits and a high-molecular-weight fractions stimulates angiogenesis systemically. **Haemostasis**, 23:141-149, 1993.
- OLSON, S. T. & BJÖRK, I. - Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. In: **Thrombin: Structure and Function**. (Berliner, L. J., ed.). New York, Plenum Press, 1992, p. 159-217.
- OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **Muscle Nerve**, 23:1832-1839, 2000.
- OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**, 37:1341-1357, 1999.
- OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; SILVA, G. H.; CARDOSO, D. F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J. R.; 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**, 39:1477-1485, 2001.
- OUCHTERLONY, O. - Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Path Microbiol Scand**, 26:507-515, 1949.
- PEREIRA, M. F.; NOVELLO, J. C.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; LANDUCCI, E. T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. - The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom with low phospholipase A₂ activity. **J Prot Chem**, 17:381-386, 1998.
- PETERSON, G. L. - A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal Biochem**, 83:357-363, 1977.

- PHILLIPS, J. K.; MAJUMDAR, G.; HUNT, B. J.; SAVIDGE, G. F. - Heparin-induced skin reaction due to two different preparations of low molecular weight heparin. **Br J Haematol**, **84**:349-350, 1993.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHE, A. P.; MANDELBAUM, F. R. - Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, **23**:341-345, 1985.
- RASGADO-FLORES, H.; SANCHES-ARMAS, S.; BLAUSTEIN, M. P.; NACHSHEN, D. A. - Strontium, barium, and manganese metabolism in isolated presynaptic nerve terminals. **Amer J Physiol**, **252**:C604-C610, 1987.
- RICHTER, C. & KASS, G.E. - Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca^{2+} homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. **Chem Biol Interact**, **77**:1-23, 1991.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELLI, B. - The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, **10**: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 Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A_2 myotoxin. **Toxicon**, **33**:1479-1489, 1995.
- ROVIRA, M. E.; CARMONA, E.; LOMONTE, B. - Immunoenzymatic quantitation of antibodies to *Bothrops asper* myotoxins after polyvalent antivenom administration in mice. **Braz J Med Biol Res**, **25**:23-33, 1992.
- RUSSEL, F. E. - Snake venom immunology: historical and practical considerations. **J Toxicol - Toxin Rev**, **7**:1-82, 1988.

- SANCHES-ARMAS, S. & BLAUSTEIN, M. P. - Role of sodium-calcium exchange in regulation of intracellular calcium in nerve terminals. **Am J Physiol**, **252**:C595-C603, 1987.
- SCHAEFFER, R. C. JR.; BRISTON, C.; CHILTON, S. M.; CARLSON, R. W. - Disseminated intravascular coagulation following *Echis carinatus* venom in dogs: effects of a synthetic thrombin inhibitor. **J Lab Clin Med**, **107**:488-497, 1986.
- SCHAUF, C. L.; COLTON, C. A.; COLTON, J. S.; DAVIS, F. A. - Aminopyridines and sparteine as inhibitors of membrane potassium conductance: effects on myxicola giant axons and the lobster neuromuscular junction. **J Pharmacol Exper Therap**, **197**:414-425, 1976.
- SEIGNOT, P.; DUCOURAU, J. P.; DUCROT, P.; ANGEL, G.; ROUSSEL, L.; AUBERT, M. - Fatal poisoning caused by African viper's bite (*Echis carinatus*). **Ann Fr Anesth Reanim**, **11**:105-110, 1992.
- SELLIN, L. C.; MOLGÓ, J.; TÖRNQUIST, K.; HANSSON, B.; THESLEFF, S. - On the possible origin of "giant or slow-rising" miniature end-plate potentials at the neuromuscular junction. **Eur J Physiol**, **431**:325-334, 1996.
- SILVA GIOTTO, M. T.; GARRAT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; DE AZEVEDO, W. F. JR.; 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**, **30**:442-454, 1998.
- SPENCER, P. J.; AIRD, S. D.; BONI-MITAKE, M.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J. R. - A single-step purification of bothropstoxin-I. **Braz J Med Biol Res**, **31**:1125-1127, 1998.
- TENG, C. M.; MA, Y. H.; OUYANG, C. H. - Action mechanism of the platelet aggregation inducer and inhibitor from *Echis carinatus* snake venom. **Biochim Biophys Acta**, **841**:8-14, 1985.

- TOISTER, A. & LOYTER, A. - The mechanism of cell fusion. II. Formation of chicken erythrocyte polykaryons. **J Biol Chem**, **248**:422-432, 1973.
- TORRES, J. C. & INESTROSA, N. C. - Heparin solubilizes asymmetric acetylcholinesterase from rat neuromuscular junction. **FEBS Lett**, **154**:265-268, 1983.
- TORRES, J. C. & INESTROSA, N. C. - Interaction of heparin with multimolecular aggregates of acetylcholinesterase. **Cell Mol Neurobiol**, **5**:303-309, 1985.
- ULBRICHT, W. & WAGNER, H. H. - Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. **Pflügers Arch**, **367**:77-87, 1976.
- ULRICK, P. J. & MANOHARAN, A. - Heparin-induced skin reaction. **Med J Aust**, **140**:287-289, 1984.
- UNDERWOOD, E. J. - **Trace elements in human and animal nutrition**. 4th ed. New York, Academic Press, 1977.
- VAUTRIN, J. & KRIEBEL, M. E. Giant and sub-miniature end-plate potentials. **Eur J Physiol**, **433**:669-670, 1997.
- VIDAL, J. C. & STOPPANI, A. O. - Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch Biochem Biophys**, **145**:543-556, 1971.
- VITAL BRAZIL - Contribuição ao estudo do veneno ophidico III. Tratamento das mordeduras de cobras. **Rev Med de São Paulo**, **6**:265, 1903.
- VITAL BRAZIL - **La défense contre l'ophidisme**. 2ed., São Paulo, Pocaí & Weiss, 1911, p.48.
- VITAL BRAZIL & PESTANA, R. - Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. **Rev Med de São Paulo**, **19**, **21** e **22**, 1909.

- VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem Inst Butantan**, **33**:981-992, 1966.
- WARD, R. J.; MONESI, N.; ARNI, R. K.; LARSON, R. E.; PACO-LARSON, M. L. - Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Gene**, **156**:305-306, 1995.
- WARRELL, D. A.; POPE, H. M.; PRENTICE, C. R. - Disseminated intravascular coagulation caused by the carpet viper (*Echis carinatus*): trial of heparin. **Br J Haematol**, **33**:335-342, 1976.
- WILLIAMS, R. J. P. - The biochemistry of sodium, potassium, magnesium and calcium. **Q Rev**, **24**:331, 1970.
- WILSON, H. I.; NICHOLSON, G. M.; TYLER, M. I., HOWDEN, M. E. - Induction of giant miniature end-plate potentials during blockade of neuromuscular transmission by textilotoxin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **352**: 79-87, 1995.
- WOLFF, D. J.; HEUBNER, J. A.; SIEGEL, F. L. - Calcium-binding phosphorylation of pig brain: effects of cations on the calcium binding. **J Neurochem**, **19**:2855-2862, 1972.
- YASHAR, P. R.; FRANSUA, M.; FRISHMAN, W. H. - The sodium-calcium ion membrane exchanger: physiologic significance and pharmacologic implications. **J Clin Pharmacol**, **38**:393-401, 1998.
- YEH, J. Z.; OXFORD, G. S.; WU, C. H.; NARAHASHI, T. - Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. **J Gen Physiol**, **68**:519-535, 1976.
- 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 flavoridis* (habu snake). **Toxicon**, **28**:43-54, 1990.
- ZIMMERMANN, R.; HARENBERG, J.; WEBER, E.; DEVRIES, J. X.; JARASS, W.; SCHIMIDT, W. - Treatment in a heparin-induced skin reaction with a low-molecular heparin analog. **Dtsch. Med. Wochenschr**, **109**:1326-1328, 1984.



11. ANEXO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 255-1 sobre "Nova abordagem no estudo de farmacologia de BthTX-I (B. terrestris)"

sob a responsabilidade de Yoko Oshimo Franco

está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 07/06/01. Este certificado expira em 06/06/02.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 255-1, entitled "

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 07/06/01. This certificate expires on 06/06/02.

Campinas, 07 de junho de 2001.

Prof. Dra. Alba R. M. Souza Brito

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP - 13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima

TELEFONE 55 19 37887116
FAX 55 19 32893124

