CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE TOXINAS OBTIDAS DO VENENO DE *Micrurus dumerilii carinicauda*

CAMPINAS

2004

i

CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE TOXINAS OBTIDAS DO VENENO DE *Micrurus dumerilii carinicauda*

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

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Co-orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

CAMPINAS

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

D15i	 Dal Belo, Chariston André Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de toxinas do veneno de micrurus dumerilil carinicauda / Chariston André Dal Belo. Campinas, SP : [s.n.], 2004.
	Orientador : Lea Rodrigues Simioni Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	 Toxinas. 2. *Fosfolipase A₂. 3. Junção neuromuscular. 4. Camundongo. 5. Ave. 6. Eletrofisiologia. I. Lea Rodrigues Simioni. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga Prof. Dr. Antônio Carlos de Oliveira Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

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

Data: 10/08/2004

DEDICATÓRIA

Ao meu pai,

que me apoiou em todas as etapas desde o início dando-me os suportes material e espiritual para que eu não desanimasse diante das adversidades. Com seu amor, conseguiu estimular-me a criatividade necessária para transpor os desafios, transmitindo a sua forma positivista de observar o mundo.

À minha mãe

sempre pronta a me ajudar, ouvindo-me nos momentos de incerteza e transmitindo o seu amor de mãe nos momentos difíceis. Exemplo de luta e coragem, conseguiu fazer com que eu desse o melhor de mim naquilo que me propus a fazer.

À Maira Arais Wodewotzky

sua confiança fez com que eu tivesse a paz de espirito para me doar aos estudos e aos experimentos de laboratório, muitas vezes lhe deixando sozinha. O nosso amor só fez crescer nesse período nos dando a certeza de que estávamos certos daquilo que queríamos. A você meu amor dedico esta Tese.

"Eu digo a verdade. Não tanto quanto sei, tanto porém quanto ouso. E vou ousando mais, à medida que amadureço"

Montaigne

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pelo apoio e orientação que tornaram possível a realização do meu sonho em cursar parte do doutorado no exterior. Serei sempre grato pela oportunidade que me foi dada, sem cobrança por resultados mas com o anseio de fazer brotar em mim o gosto pela ciência.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, idealizador do projeto, pela confiança no desenvolvimento do mesmo. Também pela valiosa ajuda nos momentos mais difíceis, mostrando a solidariedade não só de orientador mas de um verdadeiro amigo. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop. Não conseguiria achar palavras para descrever a valiosa ajuda em todas as etapas do doutorado, como meu co-orientador e também como amigo. Como esquecer a ajuda na elaboração das cartas em inglês. Obrigado, por ter me ajudado a concretizar o sonho do doutorado sanduíche!

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Oliveira. Amigo fiel, sempre pronto a ajudar com seus conselhos tão valiosos, tentando compartilhar toda a experiência de um grande pesquisador. A sua paciência e humildade como professor foram cruciais para o meu crescimento no início da carreira como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Edward G. Rowan, além de ter aberto as portas do seu laboratório para mim, pelo fabuloso empenho em fazer do meu estágio o mais proveitoso possível. Paciência e humildade são as suas principais características!

Ao Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado, pelo incentivo incessante, amizade e estímulo sempre me ajudando através de cursos e novas idéias. Também nunca poderei retribuir a sua grande ajuda. Obrigado Mestrão!

Ao Prof. Dr. Brian Robertson, pela amizade e pelo empenho em contribuir para aumentar a minha experiência na técnica de patch-clamp .

Ao Prof. Dr. Andy Southan, pela amizade e dedicação na ajuda com os experimentos de patch-clamp.

Ao Prof. Dr. Marcos Hicari Toyama, pela importante ajuda na realização dos experimentos bioquímicos. Obrigado, Marcos!

Aos Profs. Dr. Nadim F. Heluany, Dra. Albetiza L. Araújo, Dr. Édson Antunes e Dr. Heitor Moreno Júnior o meu apreço por toda a ajuda espontânea que me foi dada sempre que precisei. Obrigado!

Ao Prof. Stephen Antony Shaw, pelo ensino da língua inglesa de maneira simples e eficiente. Sua maneira polida de se comunicar e ensinar a língua estrangeira também foi responsável pelo meu sucesso no estágio no exterior.

Aos meus grandes amigos, fiéis, que enriquecem o meu dia-a-dia e que me torna um ser abençoado!

Gildo Bernado Leite, pela amizade indescritível. Sete anos de uma convivência repleta de bons momentos. Amigo das horas difíceis, sempre pronto a me aconselhar. Nunca conseguirei retribuir a sua ajuda. Obrigado, amigo!

Yoko Oshima Franco. Que amiga! A conheci no mestrado e foi como um anjo que caiu do céu. Com a sua ajuda e dedicação foi fonte de inspiração para que concretizasse o meu sonho. Você foi a luz que me mostrou o caminho correto sem desviar nas horas de dificuldade. Também nunca poderei lhe retribuir, apenas sendo para sempre seu amigo fiel!

À Caroline Ribeiro de Borja Oliveira, apesar de não termos convivido muito no laboratório no doutorado, sempre nos comunicamos por e-mail. Você com a sua ajuda valorosa no mestrado contribuiu na concretização da base necessária para um doutorado frutífero. Obrigado Carol e que Deus ilumine a sua carreira!

À Sara Castro Hernandez, sempre muito prestativa. Sempre disposta a tornar o ambiente do laboratório mais alegre e humano. Sempre empenhada em ouvir e ajudar os amigos do lab. Obrigado, Sara!

xi

À Priscila Randazzo de Moura pela ajuda durante todo o período em que estive fora do país. Pela compra do veneno e também pela amizade e companheirismo. O seu dinamismo nos contagia e com certeza lhe trará sucesso profissional. Obrigado, Pri!

José Hilton dos Santos, pela ajuda valiosa nos experimentos bioquímicos. A sua amizade e dedicação foram fundamentais ao sucesso do trabalho. Obrigado, Zé!

Paulo Aparecido Baldasso, técnico eficiente. Com o seu profissionalismo conseguiu me ajudar na purificação das toxinas bloqueadoras pós-sinápticas. Obrigado, Paulinho!

À Carol Barnett, pela amizade, companheirismo e ajuda no estágio no exterior. Obrigado Carol e que Deus lhe dê infinitas bênçãos!

Ao Ricardo Sttelati, pela troca de valores. A sua sede de conhecimento e sensibilidade o faz um aluno perspicaz e de futuro promissor. Obrigado!

Aos amigos da bioquímica: Daniela Beghini, Vera Lúcia Bonfim e Daniela Damico sempre alegres compartilhando alguns dos momentos mais importantes de minha vida. Obrigado pela amizade!

À Valéria Frigatto, pela amizade e valiosa ajuda nos experimentos em sistema cardiovascular. Obrigado, Valéria!

Ao Valdemir, a sua humildade tornou a nossa convivência muito agradável. Aprendi muito com você. Obrigado!

Aos amigos Josiane Barros, Emílio e Lílian obrigado pela amizade e pelos bons momentos vividos no laboratório.

Aos amigos que passaram pelo laboratório: Ericleison, Rosany, André, Daniel, Josiane Pattini o meu muito obrigado por terem aumentado o meu rol de amigos e compartilhado momentos de engrandecimento científico.

xiii

Aos amigos Adilson, Miguel, Toninho, obrigado pela ajuda e disposição em todos os momentos. Sem vocês seria muito mais difícil concluir este trabalho.

A todos os funcionários e alunos do Departamento de Farmacologia, obrigado pela convivência madura e agradável de todos estes anos.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho o meu muito obrigado!

À Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelos excelentes serviços prestados.

Ao FAEP, várias vezes requisitamos o auxílio financeiro que foi prontamente atendido, sem o qual não teríamos finalizado o trabalho a contento.

À Unicamp, pela oportunidade

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

PÁG.

RESUMO	xliii
ABSTRACT	xlvii
1- INTRODUÇÃO GERAL	51
1.1- Características gerais dos venenos ofídicos	53
1.2- Fosfolipases	55
1.3- Classificação das fosfolipases A2	56
1.4- Neurotoxinas	60
1.5- Análise dos mecanismos de ação de toxinas ofídicas em nervos,	
músculos e sinapses	61
1.6- As serpentes elapídicas	65
1.7- A serpente elapídica: Micrurus dumerilii carinicauda	68
1.8- Caracteríscticas do veneno das serpentes do gênero Micrurus	70
1.9- Ação neurotóxica dos venenos elapídicos	71
1.10- Neurotoxinas elapídicas pós-sinápticas	72
1.11- Neurotoxinas elapídicas pré-sinápticas	72
2- OBJETIVOS	75
3- CAPÍTULO 1 – Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e	
farmacológica de uma nova PLA2 do veneno de Micrurus dumerilii	
carinicauda	79
3.1- Revisão bibliográfica	81
3.1.1- Atualidades sobre as PLA ₂ neurotóxicas	81

3.1.2- O papel da atividade fosfolipásica A ₂ na expressão da neurotoxicidade
3.1.3- Propriedades estruturais e enzimáticas das PLA ₂ com ação pré-sináptica
3.1.4- A β-neurotoxicidade é um processo mediado por receptor?
3.1.5- Amoditoxinas assemelham-se com outras neurotoxinas em seu modo de ação
3.1.6- Os receptores neuronais para as β-neurotoxinas
3.1.7- O enigma da heterogeneidade dos receptores neuronais para as β-neurotoxinas
3.1.8- Possíveis mecanismos para a facilitação na liberação do neurotransmissor
3.1.9- Possíveis mecanismos para o bloqueio na liberação do neurotransmissor
3.1.10- A eletrofisiologia no estudo da farmacologia das neurotoxinas
3.1.11- Metodologia para registros eletrofisiológicos intracelulares
3.1.12-Registro intracelular do potencial de membrana
3.1.13- Biopotenciais elétricos e o conteúdo quântico
3.1.14- Descrição do potencial de ação do terminal nervoso
3.1.15- A técnica de patch-clamp
3.2- Objetivos específicos
3.3- Material e métodos
3.4- Resultados

3.4.1- Ensaio cromatográfico em HPLC de coluna fase reversa Sephasil Peptide C18
3.4.2- Concentração protéica por Lowry
3.4.3- Ensaio cromatográfico em HPLC de coluna fase reversa C18 de alta eficiência
3.4.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina (SDS-Page)
3.4.5- Análise de aminoácidos
3.4.6- Seqüenciamento completo da PLA ₂ neurotóxica MiDCAI
3.4.7- Comparação da seqüência da toxina MiDCAI com a de outras neurotoxinas fosfolipásicas A ₂
3.4.8- Atividade fosfolipásica
3.4.9- Determinação da atividade enzimática de creatino quinase (CK)
3.4.10- Preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho
3.4.11- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo
3.4.12- Medida e análise do potencial de membrana em repouso (PM)
3.4.13- Medida e análise dos potenciais de placa terminal em miniatura (PsPTM)
3.4.14- Medida e análise dos potenciais de placa terminal (PsPT)
3.4.15- Medida e análise dos potenciais de ação compostos (CAP) em
preparação nervo ciático de camundongo
3.4.16- Experimentos de whole-cell patch-clamp em neurônios DRG
5- Discussão
6- Conclusão

4- CAPÍTULO 2 – Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e	
farmacológica de duas novas isoformas bloqueadoras neuromuscular	
procedentes do veneno de Micrurus dumerilii carinicauda	18
4.1- Revisão bibliográfica	18
4.1.1- Mecanismo de ação das α -neurotoxinas nos receptores	
nicotínicos da placa terminal no orgão elétrico de certos peixes	
e nas terminações neuronais	18
4.1.2- As α-neurotoxinas do tipo três dedos	18
4.2- Objetivos específicos	18
4.3- Material e métodos	18
4.4- Resultados	19
4.4.1- Ensaio cromatográfico em HPLC de coluna fase reversa	
Sephasil Peptide C 18	1
4.4.2- Concentração protéica por Lowry	1
4.4.3- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)	1
4.4.4- Análise de aminoácidos	1
4.4.5- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos	2
4.4.6- Medidas do potencial de membrana em repouso	2
4.5- Discussão	2
4.6- Conclusão	2
5- CONCLUSÃO GERAL	2
6- PERSPECTIVAS FUTURAS	2
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
8- ANEXOS	2

ABS	Absorbância
ACh	Acetilcolina
ACTH	Acetonitrila
α-DTx	α-Dendrotoxina
ATF	Ácido trifluoro acético
ATP	Trifosfato de adenosina
ATx	Amoditoxinas
β-AgTx	β-Agkistrodotoxina
β-BuTx	β-Bungarotoxina
BPB	Bromphenol blue
BSA	Bovine serum albumine
BTx	Batracotoxina
CAP	Potencial de ação composto
CCh	Carbacol
СК	Creatino quinase
Clt	Clostripaina
CNBr	Brometo de cianogêno
CQ	Conteúdo quântico
DLF	Fator lítico direto
DRG	Dorsal root ganglia neuron
3,4-DAP	3,4-Diaminopiridina

4-AP	4-aminopiridina
d-Tc	d-Tubocurarina
EOFA	Anidrido etoxofórmico
EPM	Erro padrão da média
FP	Região de fibra muscular
HPLC	High performance liquid chromatography
K _{Ca}	Canais de potássio-Ca ⁺² -ativados
KCl	Cloreto de potássio
K _d	Constante de dissociação
kDa	Quilo Dalton, 1 kDa é aproximadamente o peso molecular de um átomo de hidrogênio
L	Lavagem
LAO	L-Aminoxidases
M/M	Porcentagem ou proporção massa/massa
NFD	Nervo frênico diafragma
NGF	Fator de crescimento neuronal
NTXs	Neurotoxinas
PI	Ponto isoelétrico
PSA	Persulfato de amônio
PsPT	Potenciais de placa terminal
PsPTM	Potenciais de placa terminal em miniatura
PE	Potencial de equilíbrio
PLA ₂	Fosfolipase A ₂

PM	Potencial de membrana
РРТ	Potencial de placa terminal
PPT'	Potencial de placa terminal corrigido
PPTM	Potencial de placa terminal em miniatura
RP	Região de placa terminal
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STx	Saxitoxina
TEMED	Tetrametilediamina
TQ	Tamanho quântico
TTx	Tetrodotoxina
Vo	Velocidade de reação na razão nanomoles/minuto (massa/tempo)
(nmoles/min)	
VT	Veneno total
V/V	Porcentagem ou proporção volumen/volumen
V	Volts

Lista de abreviações de aminoácidos

Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	Ν

Aspartato/asparagina	Asx	
Cisteína	Cys	С
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato/Glutamina	Glx	
Histidina	His	Н
Isoleucina	Ile	Ι
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	Μ
Prolina	Pro	Р
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	Т
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

PÁG.

Tabela 1-	Composição de aminoácidos da neurotoxina fosfolipásica A ₂ (MiDCAI)	125
Tabela 2-	Lista de abreviações de aminoácidos	127
Tabela 3-	Medida do potencial de membrana em repouso controle Tyrode	142
Tabela 4-	Medida do potencial de membrana em repouso MiDCAI 0.6 μ M	143
Tabela 5-	Medida do potencial de membrana em repouso MiDCAI 1.2 μ M	144
Tabela 6-	Medida do potencial de membrana em repouso MiDCAI 1.2 μ M em Tyrode Ca ⁺² 0.9 mM	145
Tabela 7-	Medida do potencial de membrana em repouso carbacol 8µM	146
Tabela 8-	Medida do potencial de membrana em repouso MiDCAI 0.6 μ M + carbacol 4 μ M	147
Tabela 9-	Medida do potencial de membrana em repouso MiDCAI 1.2 μ M 30 min após TTX 0.2 μ M	148
Tabela 10-	10. Medida do potencial de membrana em repouso MiDCAI 1.2 μ M 15 min após d-Tc 3 μ M	149
Tabela 11-	Efeito do veneno total (VT) e MiDCAI sobre o tamanho quântico e o conteúdo quântico dos PsPT	157
Tabela 12-	Parâmetros eletrofisiológicos extraídos do potencial de ação composto evocado em preparação nervo ciático de camundongo	161
Tabela 13-	Composição de aminoácidos da neurotoxina F6	198
Tabela 14-	Composição de aminoácidos da neurotoxina F7	199

PÁG.

Figura 1-	Sítio de hidrólise das fosfolipases	55
Figura 2-	Representação esquemática do mecanismo de ação proposto para as PLA ₂	58
Figura 3-	Efeitos farmacológicos das enzimas PLA ₂ isoladas do veneno total de serpentes	59
Figura 4-	A serpente Micrurus dumerilii carinicauda	69
Figura 5-	Distribuição geográfica da serpente Micrurus dumerilii carinicauda	70
Figura 6-	Perfil cromatográfico obtido pelo fracionamento do veneno total de <i>M. d. carinicauda</i> em coluna Sephasil Peptide C18	121
Figura 7-	Gráfico da concentração protéica por Lowry	122
Figura 8-	Eletroforese em gel de tricina (10%) em SDS da subfração correspondente ao pico 16	124
Figura 9-	Seqüência completa dos 120 resíduos de aminoácidos da fosfolipase A ₂ MiDCAI	126
Figura 10-	Homologia comparativa da seqüência completa de aminoácidos da MiDCAI com a de outras fosfolipases A ₂	128
Figura 11-	Cinética da atividade fosfolipásica	129
Figura 12-	Liberação de CK induzida pela PLA2 neurotóxica MiDCAI	131
Figura 13-	Efeito da PLA ₂ MiDCAI sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho	133

Figura 14-	Gráfico representativo do efeito da fosfolipase A_2 neurotóxica MiDCAI às respostas aos agonistas acetilcolina (110 μ M), CCh (8 μ M) e KCl (20 mM)	135
Figura 15-	Gráfico representativo do efeito da fosfolipase A ₂ neurotoxica MiDCAI em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho sob estimulação elétrica direta	136
Figura 16-	Efeito induzido pela toxina MiDCAI sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estimulação elétrica indireta	138
Figura 17-	Gráfico representativo do efeito da PLA ₂ MiDCAI em preparação nervo frênico- diafragma de camundongo sob estimulação elétrica direta	139
Figura 18-	Potenciais de membrana em repouso (diafragma de camundongo)	150
Figura 19-	Efeito de tratamentos farmacológicos sob a despolarização induzida pela PLA ₂ MiDCAI	151
Figura 20-	Efeito induzido pela PLA_2 MiDCAI (0.6 μ M) sobre a freqüência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura	154
Figura 21-	Efeito induzido pela PLA_2 MiDCAI (1.2 μ M) sobre a freqüência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura	155
Figura 22-	Efeito de diferentes tratamentos sobre a amplitude do potencial de placa terminal	158
Figura 23-	Efeito de diferentes tratamentos sobre o conteúdo quântico do potencial de placa terminal	153
Figura 24-	Forma de onda típica do potencial de ação composto registrado em preparação nervo ciático de camundongo	162
Figura 25-	Registros representativos do efeito da PLA ₂ (MIDCAI) sobre as correntes de Na ⁺ registradas em células de neurônios DRG	164

Figura 26-	Correntes de potássio representativas do efeito induzido pela PLA ₂	
	MIDCAI sobre as registros feitos em células de neurônios DRG	165
Figura 27-	Perfil cromatográfico obtido do fracionamento do veneno total de	
	M. d. carinicauda	194
Figura 28-	Gráfico da concentração protéica por Lowry	195
Figura 29-	Registro miográfico representativo da incubação das subfrações	
	obtidas do veneno de M. d. carinicauda	196
Figura 30-	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12.5%, na presença de SDS	
	do veneno total e das subfrações F6 e F7	197
Figura 31-	Registros miográficos representativos da incubação das subfrações	
	neurotóxicas F6 e F7 em preparação nervo frênico-diafragma de	
	camundongo	201
Figura 32-	Efeito induzido pelo pool das neurotoxinas F6 e F7 sobre o	
	potencial de membrana	203



O veneno da serpente elapídica *Micrurus dumerilii carinicauda* apresenta uma ação neurotóxica caracterizada por bloqueio da resposta contrátil em preparação de ave e mamíferos *in vitro* (SERAFIM et al., 2002). Através de cromatografia em HPLC de coluna fase reversa o veneno foi fracionado e dentre os 22 picos obtidos foram caracterizados bioquímica e farmacologicamente somente aqueles que exibiram atividade neurotóxica do tipo bloqueadora neuromuscular. Assim, os picos que exibiram atividade neurotóxica foram a PLA₂ MiDCAI correspondente ao pico 16 e duas isoformas (as subfrações F6 e F7) correspondentes aos picos 6 e 7 e que determinaram bloqueio neuromuscular em preparações de camundongo.

A PLA₂ MiDCAI, que possui massa molecular de 15.552 Da e um pI de 7.8 compartilha uma alta homologia com outras PLA₂ neurotóxicas MICNI A (77,68%) e B (73,12%) do veneno da serpente (*Naja nigricollis*). Em preparação músculo *biventer cevicis* de pintainho MiDCAI (2.4 μ M) induziu 50% bloqueio em 30 ± 5 min inibindo completamente a resposta contrátil a estímulos indiretos em 120 min de observação. Além disso, as contraturas determinadas pelo carbacol (8 µM) e KCl (20 mM) em preparação biventer cervicis de pintainho permaneceram inalteradas na vigência do bloqueio neuromuscular completo, sugerindo uma ação do tipo pré-sináptica. Na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo MiDCAI (0.6, 1.2, 2.4 µM) induziu alteração trifásica na resposta contrátil. Além disso, o registro intracelular dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) e potenciais de placa terminal (PPT) mostrou também que a MiDCAI causou uma alteração trifásica na freqüência dos PPTM além de aumentar o conteúdo quântico do controle para $386 \pm 12\%$ aos 10 min de incubação (n=14, p<0.05). O registro extracelular do potencial de ação composto do nervo ciático de camundongo mostrou que esta neurotoxina induz um aumento na amplitude desses potenciais $(30 \pm 9\%, 0.6 \,\mu\text{M}, p < 0.05)$ semelhante ao induzido pela 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) 10 µM. Também ficou claro que o efeito facilitador induzido por esta PLA₂ esteja relacionado ao bloqueio de canais de potássio como demonstrado pelo bloqueio de 31 ± 1% (2.4 µM, p<0.05) das correntes de potássio evocadas em neurônios do gânglio da raiz dorsal usando-se a técnica de patch-clamp.

Já as subfrações ativas F6 e F7 possuem um peso molecular de aproximadamente 14 kDa como ficou demonstrado pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 %. Em preparações neuromusculares de camundongo estas duas isoformas induziram bloqueio neuromuscular irreversível a estímulos elétricos indiretos. Assim, um bloqueio de 50% da resposta contrátil foi obtido em aproximadamente 18 min quando estas toxinas foram ensaiadas a 5 μ g/ml promovendo bloqueio completo em aproximadamente 55 min. Sucessivas lavagens da preparação e a adição de neostigmina (6 μ M) e 3,4-DAP (10 μ M) foram ineficazes em reverter o bloqueio neuromuscular instalado. Também não houve alteração da resposta aos estímulos diretos nem redução da polaridade da membrana da fibra muscular quando estas toxinas foram ensaiadas na concentração de 5 μ g/ml.

Em conclusão, a PLA₂ MiDCAI é uma nova neurotoxina pré-sináptica que induz alteração trifásica em preparações neuromusculares de camundongo promovendo uma facilitação inicial e fugaz possivelmente causada pelo bloqueio de canais de potássio no terminal nervoso motor. Já, as características bioquímicas assim como os efeitos neuromusculares desencadeados pelas subfrações F6 e F7 sugerem se tratar de duas isoformas curaremiméticas ou do tipo α -neurotoxinas, como demonstrado para outros venenos elapídicos.

ABSTRACT

We have isolated a new PLA₂ (MiDCAI) and two curaremimetic isoforms (F6 and F7) from the venom of Micrurus dumerilii carinicauda. With a molecular mass of 15.552 Da, MiDCA1 shared high sequence homology with MICNI A and B from Naja nigricollis venom showing a sequential and structural homology of 77.68 and 73.12%, respectively. Pharmacological tests showed a concentration dependent effect on nerve evoked twitches in both mammal and avian preparations. On mouse phrenic-nerve diaphragm preparation MiDCAI (2.4 μ M; n=6) caused triphasic changes in twitch tension. On chick preparations complete blockade of the twitches occurred after 120 min (2.4 µM; n=6, p<0.05), while contractures elicited by exogenous applied carbachol (8 µM) and KCl (20 mM) remained unaltered. Intracellular recordings of endplate potentials (EPPs) and miniature endplate potentials (MEPPs) from mouse diaphragm preparations revealed that MiDCAI increased quantal content to $386 \pm 12\%$ of control after 10 min, (n=14; p<0.05) and caused a triphasic change in the frequency of MEPPs. Extracellular recordings of mouse sciatic-nerve compound action potentials revealed that MiDCAI increased the amplitude of compound action potentials (30 \pm 9%, 0.6 μ M, p<0.05). Potassium currents elicited in freshly dissociated DRG neurones were significantly blocked by $31 \pm 1\%$ (p<0.05) of control by the addition of $2.4 \,\mu\text{M}$ into the recording chamber.

In addition, isoforms F6 and F7 exhibit a molecular mass of aproximatelly14 kDa demonstrated by polyacrilamide gel electrophoresis. These isoforms (5 μ g/ml) induced 50% blockade of indirect stimulation in phrenic nerve-diaphragm preparation, in approximately 18 min and complete blockade in 55 min. Nor successive washes nor neostigmine (6 μ M) or 3,4-DAP (10 μ M) were able to reverse the blockade. In addition, there is no depolarisation of muscle fibber when these isoforms were assayed at 5 μ g/ml.

In conclusion, MiDCAI is a new presynaptic PLA_2 that produce triphasic alterations in mammal neuromuscular preparations and the falicitatory actions are possibly caused by blockade of an as yet unknown class of nerve-terminal potassium channels. The two isoforms F6 and F7 need further evaluation but the biochemical and pharmacological results obtained suggest certain similarity with other curariform neurotoxins or α -neurotoxins.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VENENOS OFÍDICOS

Cerca de 90% a 95% do peso seco do veneno de serpente é constituído de proteínas que são mais importantes em termos biológicos do que a fração não protéica (TU, 1982).

Os venenos de serpentes apresentam-se como uma mistura heterogênea e complexa de substâncias iônicas simples como o cálcio, que é um importante cofator de ação de algumas enzimas proteolíticas e das fosfolipases A₂, o magnésio e o zinco que também são íons importantes para a ação das principais metaloproteases do veneno, como as hemorraginas, e substâncias complexas como as proteínas, principalmente as enzimas e as neurotoxinas que atuam sinergicamente e que são responsáveis pela atividade tóxica do veneno (TU, 1977; JIA et al., 1996).

Dentro dos compostos simples há várias substâncias orgânicas como aminoácidos livres, peptídeos, nucleotídeos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas, como a bradicinina, histamina, 4-hidroxitriptamina, N-metil-5-hidroxitriptamina, N'- N'- dimetil-5-hidroxitriptamina e serotonina que atuam como mediadores da dor desencadeada pelo veneno das serpentes (FERREIRA et al., 1992).

Do ponto de vista bioquímico são encontradas cinco classes de enzimas nos venenos de serpentes sendo a maior parte delas de natureza hidrolítica:

1) **Oxidoredutases:** responsáveis pelas reações de oxidação, tais como as L-aminoácido-oxidase e a lactato desidrogenase (MEBS, 1970). As L-aminoácido oxidases convertem o aminoácido livre em um α -cetoácido. Muitos venenos de serpentes possuem as L-aminoácido oxidases muito ativas devido à presença de seu cofator, a riboflavina enzima que dá a cor amarela do veneno seco, embora sua atividade biológica ainda não seja conhecida.

As L-amino oxidases (LAO) são capazes, em determinadas condições experimentais, de induzirem agregação plaquetária (LI et al., 1994), e a apoptose em determinadas células (SUHR e KIM, 1996). Além disso, o veneno de algumas serpentes catalisa a conversão do lactato a piruvato (MACLEAN et al., 1971). A presença da lactato

desidrogenase foi demonstrada em vários venenos principalmente nos de serpentes do gênero *Naja* e *Dendroaspis*.

2) **Hidrolases:** são enzimas que hidrolisam ligações fosfomonoéster e fosfodiéster. As mais conhecidas são as fosfodiesteráses que são largamente utilizadas no seqüenciamento ou caracterização de oligonucleotídeos e polinucleotídeos (LASKOWSKI, 1971). A 5-nucleotidase é uma fosfatase específica encontrada na maioria dos venenos de serpentes e é mais instável do que as fosfodiesterases (MEBS, 1970).

Existem também as fosfatases não específicas que são divididas em duas categorias de acordo com o pH ótimo de atividade enzimática: as fosfatases ácidas que possuem um pH ótimo em torno de 5,0 e as fosfatases alcalinas com um pH ótimo em torno de 8,5 (TU e CHUA, 1966). A última classe das fosfatases é a das endonucleases específicas para o RNA (ácido ribonucleico) e para o DNA (ácido desóxiribonucleico). São enzimas relativamente mais estáveis do que as outras fosfatases (WILLIANS et al., 1961).

3) **Glicosidases:** a hialuronidase é uma enzima que catalisa as reações de hidrólise do ácido hialurônico que é um mucopolissacarídeo presente na pele, tecido conjuntivo e nos tendões. Esta enzima tem por função facilitar a difusão das toxinas do veneno para dentro dos tecidos de suas vítimas (MAYER et al., 1960).

4) **Proteases:** as proteases encontradas no veneno das serpentes podem ser agrupadas em dois grandes grupos: as endopeptidases e as exopeptidases (IWANAGA et al., 1976). As proteases presentes no veneno total não são responsáveis pela ação tóxica do veneno relacionado a danos, tais como: as hemorragias e as necroses teciduais. Assim, várias metaloproteases têm sido isoladas de diferentes venenos e caracterizadas como hemorraginas. As metaloproteases são de dois tipos, conforme a especificidade do substrato: enzimas de alta especificidade de substratos que induzem hemorragia quando injetadas em animais (MANDELBAUN et al., 1976; MORI et al., 1987; SANCHES et al., 1987; TU, 1982); e outras proteases que não induzem hemorragia e também não possuem especificidade em relação ao substrato (ASSAKURA et al.,1985; MANDELBAUM et al., 1976; SANCHES et al., 1987; TU, 1982). 5) **Lípases:** são enzimas responsáveis pela degradação de lipídios e são comumente encontradas nos venenos de serpentes. São representantes deste grupo de enzimas as fosfolipases e as acetilcolinesterases, sendo as fosfolipases A_2 (PLA₂), as enzimas mais estudadas.

1.2- FOSFOLIPASES

As fosfolipases são enzimas estereolíticas que catalisam a hidrólise dos glicerofosfolipídeos. Essas enzimas são separadas em várias classes de fosfolipases baseadas no sítio de hidrólise, nomeadas A₁, A₂, B, C e D. As enzimas fosfolipases A₂ (fosfatidil-acil-hidrolase, EC 3.1.1.4) hidrolisam os 3-*sn*-fosfoglicerídeos na posição 2 na ligação acil-éster (Fig. 1) liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Elas estão presentes no pâncreas de mamíferos e em venenos de animais. As enzimas pancreáticas de mamíferos possuem uma função digestiva, enquanto as enzimas PLA₂ de venenos mostram uma grande variedade de efeitos farmacológicos (KINI, 1997).



Figura 1- Sítio de hidrólise das fosfolipases (KINI, 1997).

A reação catalisada pela PLA₂ é dependente de cálcio e proporciona a liberação de ácidos graxos e lisofosfatídeos (HANAHAN, 1971). As PLA₂ são consideradas como modelos nos processos catalíticos que se desenvolvem na interface lipídeo/água, pois atuam preferencialmente em substratos agregados como micelas, bicamadas ou lipoproteínas. Isto explica a ampla distribuição das PLA₂ com participação em inúmeros processos fisiopatológicos e/ou fisiológicos (FLEER et al., 1981).

As fosfolipases A₂ também têm grande importância nos processos de fertilização (FRY et al., 1992); proliferação celular (ARITA et al.,1991); contração da musculatura lisa (NAKAJIMA et al., 1992); hipersensibilização e processos inflamatórios crônicos (VADAS et al., 1986; VADAS et al., 1993).

As enzimas PLA₂ de mamíferos têm um importante papel na manutenção dos depósitos de fosfolipídios e no reparo da membrana plasmática através das vias de deacilação/reacilação (DENNIS et al., 1991, KUDO et al., 1993).

Apesar da gama extensa de atividades farmacológicas desencadeadas pelas PLA₂ do veneno de serpentes, estes efeitos aparentemente não têm correlação direta com a atividade catalítica da enzima e não são correlacionáveis com suas diferenças estruturais, pois se observa uma grande homologia seqüencial destas enzimas, que mostram também grande similaridade estrutural. Desta forma, a correlação estrutural e funcional destas enzimas é extremamente difícil.

1.3- CLASSIFICAÇÃO DAS FOSFOLIPASES A2

Existem várias formas de se classificar as PLA₂. De acordo com o seu peso molecular as PLA₂ podem ser divididas em dois grandes grupos: uma de alto peso molecular e uma de baixo peso molecular. As PLA₂ de alto peso molecular estão bem caracterizadas e podem ser subdivididas do ponto de vista catalítico em dois grandes subgrupos: as que necessitam de cálcio para a sua atividade e as que não necessitam (KINI, 1997). Dentro do grupo de PLA₂ de alto peso molecular pode-se colocar as PLA₂ classe V isoladas do músculo cardíaco de cães, e as PLA₂ da classe IV que engloba as PLA₂ citossólicas de células de mamíferos (DENNIS, 1994; KINI, 1997).

De acordo com KINI (1997) as PLA₂ de baixo peso molecular podem ser subdivididas em quatro grupos. As fosfolipases A₂ do grupo I englobam as isoladas dos venenos elapídicos, hidrofídicos e as isoladas do pâncreas. Estas enzimas contêm cerca de 115-120 resíduos de aminoácidos e sete pontes de dissulfetos. As PLA₂ do grupo II são encontradas no veneno de serpentes crotálicas e viperídicas e em células humanas como as plaquetas. Estas enzimas possuem cerca de 120 a 125 resíduos de aminoácidos e sete pontes de dissulfetos. Fazem parte deste grupo as enzimas PLA₂ miotóxicas, ASP 49 (D49) e Lys 49 (K49), que possuem uma atividade enzimática baixa ou residual. As fosfolipases do grupo I podem ser subdivididas em cinco subgrupos e as do grupo II são divididas em seis subgrupos; estas subdivisões levam em conta basicamente os aspectos particulares de cada subgrupo e a presença de pontes de dissulfeto. As do grupo III englobam aquelas isoladas de abelhas e, diferentemente das outras classes de PLA₂, são glicoproteínas contendo de 130 a 135 resíduos de aminoácidos. Além disso sua homologia com as outras PLA₂ é baixa.

As PLA_2 do grupo IV podem ser consideradas as mais recentes dentro da família das PLA_2 , do ponto de vista estrutural. Estas PLA_2 têm duas cadeias polipeptídicas: uma londa com 77 resíduos de aminoácidos e uma curta com 42 resíduos de aminoácidos ligados por pontes dissulfeto intercadeias. Estas enzimas mostram dependência de Ca⁺² para a sua atividade (MCINTOSH et al., 1995).

A unidade catalítica das PLA_2 é constituída pelos resíduos de aminoácido His-48 (posição 48 da cadeia polipeptídica), Asp-99 e uma molécula de água (Fig.2). No mecanismo de catálise proposto, o próton na posição 3 do anel imidazólico da His-48 está envolvido em uma forte interação com o grupo carboxilato do Asp-99, impedindo que ocorra rotação do anel imidazólico, deixando o nitrogênio na posição 1 deste anel (que está envolvido na catálise) em posição espacial apropriada. Uma molécula de água promove então o ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do substrato e, nesse momento, o anel imidazólico da His-48 recebe um próton da molécula de água, facilitando a reação. Após a hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2 do fosfoglicerídeo (substrato), este próton é doado pelo anel imidazólico para o oxigênio que forma então o grupo álcool do lisofosfolipídeo a ser liberado (VERHEIJ et al., 1980). O mecanismo catalítico das PLA₂ de baixo peso molecular (14 kDa) envolve resíduos que participam da alça de ligação para íons Ca⁺² nas PLA₂ clássicas que são, Tyr-28 (posição 28 na cadeia polipeptídica), Gly-30, Gly-32 e Asp-49. No mecanismo de catálise o cálcio tem dupla função: fixação do grupamento fosfato do fosfolipídeo e estabilização da carga negativa do oxigênio do grupo carbonil da ligação éster da posição *sn*-2 do substrato (YANG, 1994). A amida NH da Gly-30 também foi sugerida como um fator importante na estabilização do estado de transição (VERHEIJ et al., 1980).



Figura 2- Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para as PLA₂ (VERHEIJ et al., 1980).

A PLA₂ é uma enzima digestiva produzida pelas glândulas de veneno da serpente justamente como as produzidas pelas glândulas salivares humanas. As PLA₂ são o componente mais letal do veneno de serpentes. Além de sua atividade específica na digestão de lipídios, elas mostram uma gama variada de ações farmacológicas tais como: neurotoxicidade pré e pós-sináptica, edematogênica, miotoxicidade, atividade anticoagulante (**Fig. 3**) (KINI, 1997; KAISER et al., 1990).

Neurotoxicidade
Neurotoxinas Pré-sinápticas
Neurotoxinas Pós-sinápticas
Miotoxicidade
Mionecrose local
Mionecrose Sistêmica
Cardiotoxicidade
Efeito anticoagulante
Iniciador da agregação plaquetária
Inibidor da agregação plaquetária
Atividade hemolítica
Hemorragia interna
Atividade anti-hemorrágica
Atividade convulsionante
Atividade hipotensiva
Atividade edematogênica
Lesão de órgãos e tecidos



Os feitos farmacológicos observados em decorrência da ação das PLA₂ não são necessariamente causados apenas pela hidrólise de fosfolipídeos de membranas biológicas. As PLA₂ parecem apresentar, além do sítio catalítico característico, sítio(s) farmacológico(s) distintos (s) do catalítico (YANG, 1994). Existe um modelo para explicar os efeitos farmacológicos das PLA₂ que distingue nesta enzima os sítios catalítico e farmacológico. O sítio farmacológico da enzima teria alta ou baixa atividade por determinado sítio-alvo presente na membrana celular. A presença do sítio-alvo distinguiria uma célula-alvo de uma célula não-alvo. Isso determinaria se a ligação da enzima à célula seria específica (presença do sítio alvo, alta especificidade), ou não específica (ausência do sítio alvo, baixa especificidade, ocorre apenas quando há excesso de enzima). Depois da ligação inicial da PLA₂ ao seu alvo específico, a enzima induz vários efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade enzimática (KINI e EVANS, 1989). Não há correlação entre a atividade enzimática e farmacológica. No entanto, nos casos onde os efeitos farmacológicos são independentes da atividade enzimática, a atividade catalítica pode aumentar a potência da atividade farmacológica. A substituição de alguns resíduos de aminoácidos na enzima, como a do radical histidina, pode alterar a eficiência catalítica e então refletir na alteração da potência farmacológica (KINI, 1997).

As PLA₂ de venenos de serpentes e as enzimas PLA₂ que atuam nos processos fisiológicos embora possuam similaridades estruturais e catalíticas, diferem quanto às ações. As de veneno causam destruição por interferir em processos fisiológicos da vítima, induzindo uma variedade de efeitos farmacológicos complexos, ainda não totalmente esclarecidos. Um melhor entendimento poderia contribuir para clarificar este complexo fenômeno.

1.4- NEUROTOXINAS

De acordo com TU (1977) as neurotoxinas podem ser classificadas em dois grupos:

Inibidores da condução axônica: A estimulação do axônio resulta da despolarização da membrana celular e envolve uma mudança na condutância dos íons Na⁺, K⁺ e Ca⁺². Assim, qualquer substância que altere o movimento normal, principalmente dos
íons Na⁺ e K⁺ pode ser considerada como neurotóxica. Como exemplo pode-se citar a tetrodotoxina, que é uma neurotoxina isolada do veneno do baiacu ou "puffer fish", caracterizando-se por bloquear os canais de sódio. (NARAHASHI et al., 1967; HASS et al., 1986).

Inibidores da transmissão sináptica: Além das toxinas que atuam sobre a condução axônica existem aquelas que atuam na transmissão sináptica na região da placa motora da junção neuromuscular, afetando a liberação do neurotransmissor (a acetilcolina) e conseqüentemente impedindo a transmissão do impulso nervoso.

Segundo TU (1977) esta classe de toxinas é dividida em dois grandes grupos: as neurotoxinas pré-sinápticas (β -neurotoxinas) e as neurotoxinas pós-sinápticas (α -neurotoxinas).

Toxinas pré-sinápticas: conhecidas também como β -neurotoxinas , atuam inibindo o processo de liberação da acetilcolina. Sua potência é maior que as da neurotoxinas pós-sinápticas (α -neurotoxinas). Tanto as β quanto as α -neurotoxinas são encontradas em venenos elapídicos, tal como no da *Bungarus multicinctus* (α e β -bungarotoxina).

Toxinas pós-sinápticas: são chamadas de α -neurotoxinas. Ligam-se aos receptores nicotínicos da região subsináptica da placa motora semelhantemente ao curare. As neurotoxinas pós-sinápticas são de baixo peso molecular (7 a 8 kDa) e são desprovidas de atividade enzimática (KARLSSON, 1979).

1.5- ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO DAS TOXINAS OFÍDICAS EM NERVOS, MÚSCULOS E SINAPSES

As toxinas peptídicas como tantas drogas e toxinas de outra natureza podem ser instrumentos valiosos no esclarecimento, principalmente em nível molecular, de fenômenos fisiológicos, farmacológicos e fisiopatológicos. Contudo para a sua utilização com essa finalidade torna-se necessário, pelo menos na maioria das vezes, que os seus mecanismos de ação sejam perfeitamente conhecidos. Por este motivo far-se-á agora uma breve revisão dos mecanismos de ação das toxinas peptídicas no canal de sódio e no de potássio, nas terminações nervosas, nos receptores nicotínicos da placa terminal e do órgão elétrico de certos peixes nos receptores nicotínicos das terminações neuronais, nas colinesterases, na membrana de células excitáveis e não excitáveis.

Mecanismos de ação no canal de sódio e no de potássio

A corrente de sódio através do canal voltagem-dependente deste íon em membranas nervosas ou musculares depende, segundo HODGKIN e HUXLEY (1952), da máxima condutância da membrana ao íon sódio, da diferença entre o potencial de membrana e o de equilíbrio deste cátion e da cinética de dois fatores independentes, m³ representando o decurso temporal sigmóide de ativação, e h, a subseqüente inativação mais lenta [$_{Na}$ = g_{Na} .m³.h(E_m - E_{Na})] (CAHALAN, 1980). Certas toxinas atuam seletivamente nos mecanismos da ativação e inativação, o portão da abertura e fechamento do canal do sódio (CATTERAL, 1979; CATTERAL et al., 1982).

- 1. Bloqueando o canal de sódio
- 2. Retardando sua inativação
- 3. Ativando-o de modo persistente.

Nenhuma toxina peptídica é capaz de bloquear o canal de sódio. Este efeito é causado por toxinas policíclicas de pequeno peso molecular, encontradas na pele e vísceras de certos peixes, salamandras ou rãs (tetrodotoxina), ou elaboradas por certos dinoflagelados, podendo, entretanto, acumular-se no organismo de ostras e mexilhões (saxitoxina) (KAO, 1966; BLANKENSHIP, 1976; CAHALAN, 1980). As toxinas peptídicas atuam ou retardando a inativação ou ativando o canal de sódio.

Já a peçonha da elapínea africana "Eastern green mamba" *Dendroaspis augusticepis*, potencializa a resposta contrátil resultante da estimulação indireta do músculo. Este efeito é causado, em parte, por uma proteína composta de uma única cadeia peptídica interligada por três pontes dissulfídicas, denominada dendrotoxina. A dendrotoxina bloqueia o canal de potássio nas terminações nervosas mas não na membrana das fibras musculares (HARVEY e ANDERSON, 1983). É 500 vezes aproximadamente mais potente do que a 3,4-diaminopiridina na preparação neuromuscular de *biventer cervicis* de pintainho (HARVEY e ANDERSON, 1983).

Mecanismos de ação nas terminações nervosas

Algumas toxinas de peçonhas ofídicas, denominadas toxinas ofídicas pré-sinápticas atuam nas terminações nervosas motoras inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos e aumentando a liberação espontânea desse neurotransmissor. São toxinas das peçonhas da elapídeas asiáticas *Bungarus multicinctus* (β -bungarotoxina) (LEE e CHANG, 1966), B. fasciatus (ceruleotoxina) (HO e LEE, 1983), australianas, Notechis scutatus scutatus (notexina) (KARLSON et al., 1972; DATYMER e GAGE, 1973), Oxyuranus scutellatus scutellatus (taipoxina) (KAMENSKAYA e THESLEFF, 1974; FOHLMAN et al., 1976), microlepidotus (paradoxina) (FOHLMAN, 1979), Pseudonaja textilis (textilitoxina) (SU et al., 1983) e das crotalíneas Crotalus durissus terríficus, C. d. cascavella (crotoxina) (VITAL BRAZIL e EXCELL, 1970), C. scutullatus scuttulatus (mojave-toxina) (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1980). A peconha da elapídea sul-americana, Micrurus corallinus também encerra toxina pré-sináptica. Todas as toxinas pré-sinápticas apresentam atividade fosfolipásica A2, muitas vezes essencial para as suas ações. São constituídas ou de uma única cadeia polipeptíca (notexina) ou de duas subunidades covalentemente ligadas (β-bungarotoxina) ou ainda por duas (crotoxina, mojave toxina, ceruleotoxina) ou três (taipoxina, paradoxina) subunidades não covalentemente ligadas (HARRIS, 1985). Produzem alterações ultraestruturais nas terminações nervosas e, com excessão da β-bungarotoxina e provavelmente da toxina présináptica da peçonha de M. corallinus, exercem ação miotóxica. As toxinas pré-sinápticas são os componentes mais tóxicos dos venenos ofídicos, embora a sua toxicidade seja variável em diferentes espécies animais (VITAL BRAZIL et al., 1966; CHANG, 1979). Os mecanismos pelos quais bloqueiam a liberação da acetilcolina pelos impulsos nervosos ou aumentam a liberação expontânea desse neurotransmissor não se acham esclarecidos, embora algumas hipóteses tenham sido formuladas para explicá-los (WERNICKE et al., 1975; HAWGOOD e SMITH, 1977; VITAL BRAZIL et al., 1979).

Mecanismos de ação nos receptores nicotínicos da placa terminal

As toxinas denominadas de neurotoxinas pós-sinápticas como as α -neurotoxinas ligam-se com grande seletividade aos receptores nicotínicos da placa terminal impedindo a sua interação com o neurotransmissor e demais agonistas (LEE, 1970) (ver Capítulo 2).

Toxinas polipeptídicas anticolinesterásicas

Toxinas ofídicas anticolinesterásicas, denominadas fasciculinas em razão de causarem fasciculações musculares em camundongos, foram isoladas da peçonha de *Dendroaspis augusticepis* (Eastern green mamba). Duas toxinas da peçonha da "black mamba" (*D. polypepis polypepis*) também inibem as colinesterases. As fasciculinas pertencem ao grupo das toxinas elapídicas com 60 aminoácidos e quatro pontes dissulfídicas que incluem as α -neurotoxinas curtas e as cardiotoxinas. As fasciculinas potencializam a dendrotoxina que também se encontra na peçonha da "Eastern green mamba".

Mecanismo de ação das toxinas que atuam em células excitáveis e não excitáveis

As cardiotoxinas, também denominadas fatores líticos diretos, citotoxinas, cobraminas e membrano-toxinas, são como as neurotoxinas pós-sinápticas curtas e as fasciculinas, proteínas básicas de pequeno peso molecular, constituída de uma única cadeia polipeptíca interligadas por quatro pontes dissulfídicas (KARLSSON, 1979; HARVEY, 1985). A sua toxicidade é muito menor que a das neurotoxinas curaremiméticas. As cardiotoxinas são componentes da peçonha das elapíneas do gênero *Naja* e afins (Ophiphagus, Hemachatus). Atuam em uma série de membranas celulares induzindo despolarização, contratura ou lise. Concentrações elevadas de Ca²⁺ (10 mM) inibem completamente a ação das cardiotoxinas, provavelmente impedindo a sua fixação em componente ainda não identificado das membranas celulares (HARVEY, 1985; CHANG, 1979). Outra característica das cardiotoxinas é que as PLA₂ potencializam as suas ações, em particular a sua ação hemolítica.

1.6- AS SERPENTES ELAPÍDICAS

As serpentes elapídicas têm representantes na África, Ásia, Austrália (todos tanatofídeos) e nas Américas. As cobras corais (gêneros *Micrurus* e *Micruroides*) são as serpentes elapídicas deste último continente). As peçonhas elapídicas caracterizam-se por:

- apresentarem elevada toxicidade, regra geral, muito superior às das serpentes da família Viperidae, em especial quando introduzidas pelas vias subcutânea e intramuscular;
- 2) causarem paralisia flácida e em geral morte por paralisia respiratória;
- exercerem apenas pequena atividade proteolítica (VITAL BRAZIL, 1980) em substratos tais como gelatina, caseína e fibrina podendo-se achar ausente a atividade proteásica sobre um ou todos estes substratos;
- 4) não provocarem hemorragias e não coagulam *in vivo* ou *in vitro* o plasma sangüíneo (VITAL BRAZIL, 1980), como fazem , em geral, as peçonhas viperídicas (constituem exceção as peçonhas de alguns dos tanatofídeos australianos (Elapidae).

As paralisias motora e respiratória decorrem da ação inibitória das peçonhas elapídicas sobre a transmissão neuromuscular (VICK et al., 1965). A ação bloqueadora neuromuscular em questão (e consequentemente a paralisia) e a alta toxicidade dessas peçonhas são devidas aos constituintes denominados neurotoxinas.

As neurotoxinas elapídicas (NTXs) também dividem-se em:

1) NTXs pós-sinápticas

2) NTXs pré-sinápticas

As primeiras (NTXs pós-sinápticas) combinam-se com os receptores colinérgicos da placa terminal sem promover despolarização da membrana dessa região da fibra muscular. Atuam portanto de modo semelhante ao curare, mas sua combinação com

os receptores é sempre menos reversível e se processa de modo lento. Quando um número suficiente de receptores se acha ocupado pela NTX, a combinação da acetilcolina (ACh) com aqueles ainda livres não é mais capaz de provocar uma despolarização (potencial de placa terminal) de intensidade suficiente para deflagrar o potencial de ação: a transmissão neuromuscular encontra-se a partir desse momento inibida. NTXs pós-sinápticas ocorrem na peçonha de todas as serpentes elapídicas (e nas Hydrofidae) até o presente estudadas; acham-se ausentes nas das Viperidaes. São proteínas básicas (pH acima de 9) de pequeno peso molecular (entre 7000 e 8000 daltons) desprovidas de atividade enzimática. Constituem-se de uma única cadeia peptídica interligada por pontes dissulfídicas: em um grupo é formada por 61 ou 62 resíduos de 15-16 aminoácidose 4 pontes dissulfídicas (cobrotoxina da peçonha de *Naja naja atra*, toxina da peçonha de *Naja nigrocolis*, etc). Em outro de 71 a 74 resíduos de 17-18 aminoácidos e 5 pontes dissulfídicas (α -bungarotoxina, da peçonha de *Bungarus multicinctus*, toxinas T_3 e T_4 da peçonha de *N. n. naja*, etc.). Em preparações neuromusculares isoladas a ação das do primeiro grupo (cobrotoxina) é reversível, a das do segundo grupo, α -bungarotoxina (irreversível) (LEE et al., 1972). A irreversibilidade acha-se ligada ao maior número de aminoácidos hidrofóbicos nas moléculas das NTXs pós-sinápticas do segundo grupo (LEE et al., 1972). As drogas anticolinesterásicas (v.g. neostigmina, edrofônio) podem antagonizar o bloqueio neuromuscular causado pelas neurotoxinas pós-sinápticas, sendo entretanto necessário para que isto aconteça que a combinação destas com os receptores seja reversível. A peçonha de *M. frontalis* encerra somente neurotoxinas pós-sinápticas, sendo o bloqueio que produz em símios, cães e pombos perfeitamente antagonizado pela neostigmina (VITAL BRAZIL, 1980), edrofônio e outras drogas anticolinesterásicas.

As NTXs pré-sinápticas atuam nas terminações nervosas das placas terminais inibindo a liberação do mediador (ACh) pelos impulsos nervosos (contudo, aumentam às vezes a liberação espontânea, isto é, liberação na ausência de impulsos nervosos). Quando as quantidades de mediador liberadas não são mais capazes de produzir uma despolarização (potencial de placa terminal) da membrana subsináptica de intensidade suficiente para deflagrar o potencial de ação, a transmissão acha-se interrompida. Estas toxinas ocorrem somente nas serpentes *Elapidae* não sendo encontradas nas *Hydrophidae*. São toxinas de

peso molecular variável (β-bungarotoxina 12000 daltons, taipoxina 56000 daltons), básicas ou moderadamente ácidas. Todas encerram atividade fosfolipásica A e evoluíram a partir dessas enzimas (EAKER, 1975), muito freqüentes nas peçonhas ofídicas e regra geral pouco-tóxicas. As neurotoxinas pré-sinápticas são os constituintes mais tóxicos encontrados nos venenos elapídicos (DL₅₀ em camundongos: taipoxina 0.002 mg/kg (i.v.); notexina 0.017 mg/kg (i.v.); β-bungarotoxina (0.02 mg/kg (i.p.). Em preparações isoladas a ação de todas as neurotoxinas pré-sinápticas é irreversível. As drogas anticolinesterásicas não antagonizam o bloqueio produzido pelas NTXs pré-sinápticas. Por encerrar componente desse tipo (VITAL BRAZIL, 1980) o bloqueio (e consequentemente a paralisia) causado pela peçonha de *M. corallinus* não é antagonizado pela neostigmina (VITAL BRAZIL, 1980).

Além das neutoxinas, as peçonhas elapídicas encerram muitos outros constituintes protéicos, alguns atóxicos (v.g. colinesterases (CHANG e LEE, 1963)), outros dotados de certa toxicidade. Dentre estes últimos, salientam-se as toxinas do grupo da cardiotoxina (cobramina A e B, fator lítico direto (DLF), toxina γ , citotoxina (LEE, 1971; LEE, 1972) e as fosfolipases (MELDRUM, 1965). A cardiotoxina atua em várias células do organismo despolarizando suas membranas e, em conseqüência, interferindo com suas funções. Em concentrações elevadas, pode causar destruição (necrose) dos elementos celulares (LAI et al., 1972). É encontrada nas peçonhas das "cobras" (Naja, Ophiophagus, Hemachatus) nas quais pode atingir concentrações muito elevadas (acima de 50%) (LEE, 1971). A cardiotoxina é como as NTXs pós-sinápticas, toxina polipeptídica isto é, apresenta pequeno peso molecular (6.000-9000 daltons), é básica (pH acima de 12) e desprovida de atividade enzimática. As fosfolipases A hidrolisam a ligação éster em posição ß das moléculas dos fosfatídeos, dando lugar à formação de lisofosfatídeos (lisolecitina, ou lisocetina, lisocefalina) e liberação de ácido graxo em geral, não-saturado. Os lisofosfatídeos atuam como detergente na membrana das células, produzem liberação de histamina e de outros autacóides. São responsáveis pela atividade hemolítica indireta das peçonhas ofídicas. As fosfolipases A são a causa ou, pelo menos, contribuem para os efeitos cardiovasculares intensos e imediatos produzidos pela injeção venosa das peçonhas elapídicas.

Clinicamente são idênticos os sinais e sintomas neurotóxicos gerais observados nos acidentes causados pela mordedura das serpentes elapídicas da África, Ásia, Oceania e Américas (VITAL BRAZIL, 1980). São devidos à ação das NTXs acima referidas. Outros efeitos, locais e gerais, podem diferir por vezes, substancialmente (v.g. nos acidentes provocados por serpentes do gênero Naja, Ophiophagus e Hemachatus ("cobras"). Ocorrem lesões locais, caracterizadas por edemas e necrose, podendo haver também depressão cardiovascular importante, nos acidentes causados pelo tanatofideos australianos, hemorragia e hemoglubinúria. Nos acidentes causados pelas serpentes corais, o quadro clínico, em traços gerais, é o seguinte: localmente não há lesão observável. Dor de intensidade variável, imediatamente após a mordedura, e a seguir sensação de dormência na região afetada com tendência à progressão proximal (VITAL BRAZIL, 1980). Logo iniciam-se a ptose palpebral, turvação da vista ou diplopia e parestesia de outros músculos faciais emprestando ao paciente uma fácies ("fácies neurotóxica de Rosenfeld") idêntico ao dos portadores de miastenia grave. Como ocorre nesta doença há também oftalmoplegia. A seguir disfonia, disfagia, diminuição generalizada de força muscular, o que pode condicionar andar cambaleante, semelhante ao do embriagado. Há sialorréia e acúmulo de secreção brônquica. Não se verificam hemólise e alterações na coagulação sangüínea, a urina e a pressão arterial são normais. A perda da força muscular progride e a dificuldade respiratória se instala. Morte por asfixia regra geral dentro de 5 a 6 horas (VITAL BRAZIL, 1980).

1.7- A SERPENTE ELAPÍDICA: Micrurus dumerilii carinicauda

A espécie *Micrurus dumerilii carinicauda* (*M. d. carinicauda*) está distribuída do norte de Santander (região nordeste da Colômbia) até Caracas no estado Miranda na Venezuela (Fig. 4).

As serpentes *M. d. carinicauda* têm como habitat as florestas tropicais úmidas destas regiões; medem aproximadamente 50-70 cm de comprimento, chegando a atingir no máximo, 77,5 cm. As serpentes da espécie *M. d. carinicauda* não são espécies tricoloridas como outras *Micrurus (M. corallinus, M. lemniscatus* e a *M. surinamensis*), sua cabeça tem

coloração preta e possuem de 14 a 27 anéis corporais pretos, não dispostos em tríades (CAMPBELL e LAMAR, 1989).



Figura 4- A serpente Micrurus dumerilii carinicauda (BARROS, 2002)

Em geral os acidentes provocados pelas *Micrurus* são graves, e em sua maioria ocorrem pela manipulação das serpentes sem as devidas precauções e técnica adequadas (CAMPBELL e LAMAR, 1989). Contudo, testes sorológicos mostraram que o anti-soro preparado contra o veneno de *M. d. carinicauda* produz um grau satisfatório de proteção quando injetados em camundongos sendo usado também contra veneno de *M. fulvius fulvius* (Linneaus) (COHEN et al., 1968).



Figura 5- Distribuição geográfica da serpente *M. d. carinicauda* entre a Colômbia e Venezuela (CAMPBELL e LAMAR, 1989).

1.8- CARACTERÍSTICAS DO VENENO DAS SERPENTES DO GÊNERO Micrurus

Estudos realizados com o veneno bruto da serpente elapídica *Micrurus dumerilii carinicauda* mostraram que em geral o veneno exibe baixa atividade proteolítica, muito baixa atividade fosofodiesterásica, baixa atividade de 5´-nucleotidase e moderada à alta atividade fosfolipásica A₂ devido à atividade da arginina éster hidrolase (TAN e PONNUDURAI, 1992). Além disso, venenos de *M. d. carinicauda* exibem muito baixa atividade anticolinesterásica. No entanto, os venenos de serpentes da família *Elapidae* são conhecidos por serem os únicos a exibir potente ação anticolinesterásica (IWANAGA e SUSUKI, 1979). O veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* também exibe grande atividade para a L-aminoácido oxidase e atividade hialuronidásica moderada (TAN e PONNUDURAI, 1992).

A maioria dos venenos de *Micrurus* até agora analisados exibe modelo eletroforético similar, com uma banda muito intensa de proteínas de baixa massa molecular relativa, muito semelhantes a do veneno de *Naja*, também *Elapidadae*. Assim venenos de *Micrurus*, únicos elapídicos na América, exibem propriedades biológicas semelhantes a de outros gêneros da família que são encontrados na Ásia e África. (TAN e PONNUDURAI, 1992).

Como outros venenos de serpentes, os de Micrurus são complexas misturas de proteínas (ALAPE-GIRÓN et al., 1996; ROSSO et al., 1996) e mais de 49 proteínas de baixa massa molecular têm sido identificadas em alguns venenos destas serpentes (PERKINS e TOMER, 1995). Em geral apresentam grande variedade de moléculas de natureza química diversa e com diferentes ações (JIMÉNEZ-PORRAS, 1970; TU, 1977). Dentre os seus componentes, aproximadamente 90% são proteínas dotadas de atividade enzimática e/ou tóxicas tais como fosfolipases, fosfodiesterases. fosfatases. acetilcolinesterase e enzimas proteolíticas. Os 10% restantes são compostos não protéicos como carboidratos, fosfolipídios, aminas biogênicas, peptídeos, nucleotídeos, íons e água (BIERBER, 1979; BERGER e BHATTI, 1989; BJARNASON e FOX, 1994).

Os venenos das serpentes elapídicas apresentam neurotoxinas (NTXs) podendo encerrar NTXs pré e pós-sinápticas (KELLAWAY et al., 1932; LEE et al., 1972) além de muitos outros constituintes tóxicos, dentre os quais podemos salientar as cardiotoxinas e as fosfolipases A₂ (CHANG, 1979; HARVEY, 1990; LAI et al., 1972; VITAL BRAZIL, 1980; VITAL BRAZIL e FONTANA, 1983/84). Embora a atividade hemorrágica tenha sido observada como uma característica dos venenos da família Viperidae, recentemente foi isolada e caracterizada uma hemorragina do veneno de *Ophiophagus hannah* (king cobra) (TAN e SAIFUDDIN, 1989; TAN e PONNUDURAI, 1992).

1.9- AÇÃO NEUROTÓXICA DOS VENENOS ELAPÍDICOS

As serpentes pertencentes às famílias Elapidae (cobras, kraits, mambas serpentes tigre e serpentes corais) e Hydrophydae (serpentes do mar) possuem venenos neurotóxicos típicos, com alto conteúdo de neurotoxinas (VITAL BRAZIL, 1982). As neurotoxinas são os constituintes mais tóxicos dos venenos elapídicos e como já foi dito

encerram duas classes farmacológicas com base no seu sítio de ação, as pré-sinápticas e as pós-sinápticas (IWANAGA e SUSUKI, 1979).

1.10- NEUROTOXINAS ELAPÍDICAS PÓS-SINÁPTICAS

As neurotoxinas elapídicas pós-sinápticas são proteínas básicas de baixa massa molecular relativa. Em virtude de seu baixo peso molecular podem ser rapidamente absorvidas pela circulação sistêmica e difundidas para todos os tecidos, explicando a precocidade dos sintomas do envenenamento (VITAL BRAZIL, 1980). Em geral, são constituídas de cadeia polipeptídica única, interligada por pontes dissulfeto e, em um grupo são formadas por 61-62 resíduos de 15-16 aminoácidos e quatro pontes dissulfídicas (cobratoxina do veneno de Naja naja atra, toxina do veneno de Naja nigricolis, etc.) e em outro, de 71-74 resíduos de 17-18 aminoácidos e cinco pontes dissulfídicas (α -bungarotoxina e toxinas T₃ e T₄ do veneno de *Naja naja naja* etc.). A cobratoxina do primeiro grupo causa bloqueio reversível enquanto a α -bungarotoxina, do segundo grupo, induz bloqueio irreversível da transmissão sináptica de preparações neuromusculares isoladas. Estudos mostram que a irreversibilidade estaria ligada ao maior número de aminoácidos hidrofóbicos, presentes nas moléculas de neurotoxinas pós-sinápticas do segundo grupo (VITAL BRAZIL, 1980). As NTXs elapídicas pós-sinápticas combinam-se com os receptores colinérgicos da placa motora, sem promover despolarização da membrana da fibra muscular. As neurotoxinas elapídicas pós-sinápticas ocorrem nos venenos de todas as serpentes elapídicas estudadas até o momento (inclusive nas Hydrophydae). Drogas anticolinesterásicas (neostigmina, edrofônio) podem antagonizar o bloqueio neuromuscular causado por algumas destas toxinas (VITAL BRAZIL, 1980).

1.11- NEUROTOXINAS ELAPÍDICAS PRÉ-SINÁPTICAS

As NTXs elapídicas pré-sinápticas são proteínas de massa molecular variada (entre 12.e 56 kDa), básicas ou moderadamente ácidas. São os constituintes mais tóxicos encontrados no veneno ofídico e sua ação é irreversível. Elas atuam na terminação nervosa

da placa terminal, inibindo a liberação do mediador (ACh) pelos impulsos nervosos, interrompendo a transmissão neuromuscular (VITAL BRAZIL, 1980). A letalidade das toxinas pré-sinápticas é muito maior que a das neurotoxinas pós-sinápticas, devido a sua relação com as fosfolipases A₂. Além disso são responsáveis pela miotoxicidade de alguns venenos elapídicos, produzindo necrose da fibra muscular (IWANAGA e SUSUKI, 1979).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) têm sido isoladas dos venenos de serpentes das famílias *Crotalidae* e *Elapidae* e têm estrutura muito semelhante às PLA₂ pancreáticas. O grupo I é constituído pelas enzimas pancreáticas e elapídicas, enquanto o grupo II pode ser dividido em dois subgrupos, o 2A com sete pontes dissulfídicas e o 2B com seis pontes dissulfídicas (ROSEMBERG, 1990). Posteriormente ficou estabelecido que o primeiro subgrupo compreendia as PLA₂ Asp 49 e o segundo subgrupo as PLA₂ Lys 49.

As PLA₂ têm estrutura variável com cadeia única, como a notexina, da serpente *Notechis scutatus scutatus* (HARRIS et al., 1975) ou consistem de duas e quatro subunidades como a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984) e a taipoxina da *Oxyuranus scutellatus* (HARRIS e MARTIN, 1982), respectivamente.

2- OBJETIVOS

Os venenos animais são ricas fontes de neurotoxinas polipeptídicas usadas como ferramentas em inúmeros estudos farmacológicos, fisiológicos e no estudo de processos fisiopatológicos. A disponibilização de novas neurotoxinas já caracterizadas tanto bioquímica quanto farmacologicamente aumenta o grupo de substâncias potencialmente empregáveis nesses estudos fisiopatológicos.

Este projeto teve como objetivo principal isolar, purificar e caracterizar farmacologicamente proteínas com atividade neurotóxica provenientes do fracionamento bioquímico do veneno total da serpente *Micrurus dumerilii carinicauda*.

Assim, duas etapas principais foram traçadas e apresentadas na forma de capítulos (cada um contendo objetivos específicos, resultados e discussão), na tentativa de melhor abordar o mecanismo de ação dos diferentes compostos encontrados.

No Capítulo 1 intitulado "Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de uma nova PLA₂ do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*" promoveu-se o isolamento e a caracterização bioquímica e farmacológica de uma nova PLA₂ pré-sináptica nomeada MiDCAI.

No Capítulo 2 intitulado "Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de duas neurotoxinas bloqueadoras do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*" promoveu-se o isolamento e a caracterização bioquímica e farmacológica parcial de duas neurotoxinas de ação adespolarizante denominadas F6 e F7.

Além disso, também houve o intuito de se promover uma revisão da literatura proporcionando a atualização do conhecimento tanto em relação aos venenos animais e suas toxinas como também na descrição das técnicas mais usadas em farmacologia para caracterização desses polipeptídeos.

3- CAPÍTULO 1

Isolamento e caracterização bioquímica e farmacológica de uma nova

PLA₂ neurotóxica do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*

3.1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1- Atualidades sobre as PLA₂ neurotóxicas

As fosfolipases A_2 (PLA₂) são enzimas que hidrolisam o éster ligado na posição sn-2 1,2-diacyl-sn-3-fosfolipídeo liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Esta super família de enzimas abrange, pelo menos, dez diferentes grupos de PLA2 as quais estão localizadas tanto intra como extracelularmente (VALENTIN et al., 1999). Venenos diferentes originários de animais peconhentos são fontes ricas de PLA₂ (ROSEMBERG, 1990). O papel inato das PLA2 no veneno é provavelmente digestivo, mas no decurso da evolução algumas PLA₂ emergiram também com certa atividade fisiopatológica. Dentre as muitas atividades farmacológicas atribuídas às PLA₂ a neurotoxicidade tem atraído particular atenção (KINI, 1997; VALENTIN et al., 1999). Apesar de numerosos esforços terem sido feitos para revelar as bases moleculares da neurotoxicidade pré-sináptica das PLA2 e criar condições nas quais estas toxinas possam ser usadas como ferramentas na pesquisa da neurotransmissão, o processo é ainda pouco entendido.

3.1.2- O papel da atividade fosfolipásica A₂ na expressão da neurotoxicidade

As neurotoxinas que agem pré-sinapticamente por bloquear a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos estão entre as proteínas mais tóxicas dos venenos ofídicos. As quatro toxinas mais estudadas deste grupo são a β -bungarotoxina, a crotoxina, a notexina e a taipoxina, respectivamente secretadas pela krait taiwanesa *Bungarus multicinctus*, pela cascavel sul-americana, pela serpente tigre australiana e pela serpente taipan. As toxinas pré-sinápticas bloqueadoras possuem uma subunidade que contém uma cadeia básica que exibe atividade fosfolipásica A₂. Este é um denominador comum o que tem levado vários grupos de pesquisadores a investigar o papel das fosfolipases A₂ na expressão da atividade neurotóxica.

Até o momento não existe ainda um ensaio biológico padronizado para medir a atividade PLA_2 relacionando-a ao seu efeito neurotóxico. Os ensaios são realizados usandose uma grande variedade de substratos que muitas vezes podem aumentar a atividade fosfolipásica A_2 (STRONG et al., 1976) sem, contudo, aumentar o efeito neurotóxico. Além disso, ainda não se sabe se a hidrólise desses fosfolipídeos ocorre no terminal nervoso motor e se ela é importante para a integridade funcional do terminal.

O método mais preciso para se determinar a relação entre a atividade enzimática e a neurotoxicidade seria fazer comparações diretas usando-se preparações biológicas nas quais a atividade neurotóxica é registrada. No entanto, ainda não é possível isolar os terminais pré-sinápticos dos neurônios motores, apesar de existirem preparações ricas em terminais nervosos como cérebro e sinaptossomas de *Torpedo*.

É conhecido que algumas PLA₂ demonstram diferenças de atividade enzimática dependendo das condições do ensaio (SU e CHANG, 1984). Entretanto, só é possível comparar a atividade farmacológica com a atividade enzimática quando os sistemas de ensaio são os mesmos. Quando isto foi feito (LEE e HO, 1982) empregando-se 10 PLA₂ de venenos ofídicos, não houve correlação entre a atividade enzimática e a potência farmacológica. Por exemplo, uma PLA₂ que mostrou a maior atividade enzimática (a PLA₂ neutra do veneno de *Naja nigrocollis*) foi a menos potente, com uma DL₅₀ i.p. de 10 mg/kg em camundongos. A PLA₂ de maior potência letal, a taipoxina, exibiu uma DL₅₀ de 2 μ g/kg mas somente 50% da atividade enzimática das PLA₂ neutras. Assim, a potência das neurotoxinas não está relacionada diretamente à sua atividade hidrolítica geral.

A descoberta de que atividade enzimática associada com a fosfolipase pancreática poderia ser abolida por modificação de uma simples histidina (His-48) no sítio catalítico BPB (VOLWERK et al., 1974) ofereceu uma maneira de se acessar o papel da atividade PLA₂ quanto à sua neurotoxicidade. Por meio da modificação química com BPB, as PLA₂ dos venenos ofídicos perderam a sua atividade enzimática e também sua toxicidade (HALPERT et al., 1975; CHANG e SU, 1982). Parece no entanto que a atividade hidrolítica é essencial para a neurotoxicidade. CONDREA et al. 1981, 1983a, 1983b, entretanto, sugeriram que a toxicidade das PLA₂s é devida a um efeito direto da toxina, possivelmente pela interação dos resíduos de lisina e influenciado pela histidina no sítio ativo, e não devido a uma atividade hidrolítica da PLA₂ por si só. Entretanto, estes autores também demonstraram que a dissociação entre a atividade hidrolítica e a letalidade não era devida a uma diminuição na ligação da toxina ao substrato teste, isto porque a sua atividade hidrolítica enquanto estiver ligada ao sítio farmacológico ativo permanecerá inalterada.

A atividade PLA2 e a neurotoxidade pode também ser inibida pela substituição do cofator Ca⁺² por Sr⁺ ou Ba⁺ na solução fisiológica (STRONG et al., 1976; SU e CHANG, 1981). Estudos de equilíbrio de gel filtração demonstraram que a PLA₂ porcina tem apenas um sítio de ligação ao Ca⁺² de alta afinidade por molécula de proteína (SLOTBOOM et al., 1978). A ligação do Ca⁺² à PLA₂-porcina induz alterações no espectro ultravioleta da PLA2. A alteração no espectro é descrita como sendo devida à tirosina-28 que se torna mais polar e também devido a uma histidina-48 alterando suas cargas. Estas alterações espectrais são também observadas com Sr⁺² e Ba⁺². Porém, estes cátions não são hábeis em ativar a atividade PLA₂. No entanto, a exigência da estrutura conformacional para ativar o sítio ativo é só parcialmente preenchida por estes cátions (IKEDA e HAYASHI, 1983). Os íons Mg⁺² não induzem qualquer alteração no espectro ultravioleta da fosfolipase nem interferem no aparecimento do efeito induzido por concentrações fisiológicas de íons Ca⁺². Assim, o Mg⁺² (diferentemente do Sr⁺² ou Ba⁺²) é incapaz de ganhar acesso ao sítio ativo da enzima. Todavia, a redução na atividade fosfolipásica observada pela substituição de Ca⁺² por Sr⁺² é devida a remoção do Ca⁺² e não pela adição de Mg⁺² por si.

A atividade bloqueadora neuromuscular das neurotoxinas tipo PLA₂ é suprimida tanto pela modificação do sítio ativo como pela substituição do Ca⁺² pelos cátions inibitórios. Entretanto, muitos pesquisadores têm relatado que após estas modificações as PLA₂ ainda exercem alguma atividade farmacológica a qual é resultado direto da ligação da neurotoxina ao sítio ativo (KELLY et al., 1979, CHANG e SU, 1982; CARATSCH et al., 1981, 1985). A noção de que as PLA₂-neurotóxicas pré-sinápticas podem ter um sítio ativo, que é topograficamente remoto em relação ao sítio catalítico, foi proposta primeiramente por HOWARD e TRUOG (1977). Nos seus experimentos, o tratamento da β-bungarotoxina com anidrido etoxifórmico (EOFA) em presença de Ca⁺² ou de dihexanoilecitina converteu a toxina em uma fosfolipase A₂ sem atividade. A remoção do Ca^{+2} ou dihexanoilecitina da reação resultou em perda de ambas as atividades fosfolipásicas e neurotóxicas. A presença no nervo terminal de um sítio de ligação para a toxina pode responder à questão do por que algumas PLA₂ são tóxicas e outras não; ou seja, somente serão tóxicas as PLA₂ que forem capazes de se ligar a um sítio de ligação específico presente no terminal nervoso.

3.1.3- Propriedades estruturais e enzimáticas das PLA2 com ação pré-sináptica

Como ja foi dito, as fosfolipases A₂ "β-neurotóxicas" ou pré-sinápticas são encontradas entre as PLA₂ dos grupos I, II e III. Estas são enzimas de pequena massa molecular (13-18 kDa) com uma estrutura compacta estabilizada por 5-7 pontes dissulfeto as quais são altamente resistentes à desnaturação. A atividade catalítica que requer Ca⁺² em concentrações de mM é inibida pelos íons Sr⁺², Cd⁺², ou Ba⁺² (CHANG, 1985; RADVANYI et al., 1989). Os grupos I e II das PLA2 estão adaptados para catálises na interface entre as fases aquosas e lipídicas e preferem estruturas fosfolipídicas agregadas como substrato. Em substratos monoméricos sua atividade enzimática é cerca de três vezes menor. As enzimas do grupo III, por outro lado, são relativamente insensíveis ao estado de agregação do substrato e hidrolisam lipídeos dispersos e agregados de maneira similar. Tanto as PLA₂ tóxicas quanto as não-tóxicas mostram preferência significativa pelas cabeças de grupamentos fosfolipídicos (ROSENBERG, 1990). A pregas básicas do grupo I e do grupo II são muito semelhantes. As principais diferenças estruturais entre as enzimas destes dois grupos estão na posição de algumas pontes dissulfeto, no loop pancreático e elapídico (presentes nas PLA₂ do grupo I) e na extensão C-terminal (presente nas PLA₂ do grupo II) (HEINRIKSON et al., 1977; RENETSEDER et al., 1985). O grupo III das PLA₂ é estruturalmente muito distinto compartilhando similaridades com os grupos I e II somente na maquinaria de ligação ao Ca⁺² e no sítio ativo (SCOTT et al., 1990). As PLA₂ neurotóxicas consistem de uma ou mais subunidades e pelo menos uma delas é enzimaticamente ativa. A dupla cadeia da β-bungarotoxina é especial pois suas cadeias constitutivas são ligadas covalentemente por uma ponte dissulfidica.

3.1.4- A β-neurotoxicidade é um processo mediado por receptor ?

Algumas observações têm reforçado a idéia de que a atividade enzimática de uma neurotoxina é de importância crucial para o bloqueio da neurotransmissão; este ponto de vista tem sido largamente compartilhado (HAWGOOD e BON, 1991). Entretanto nenhuma correlação entre PLA₂ e a potência letal das β-neurotoxinas foi relatada (LAMBEAU et al., 1989). Já se sabe que algumas PLA₂ com alta atividade enzimática não são tóxicas, enquanto muitas β -neurotoxinas potentes exibem pouca atividade enzimática. Apesar do fato de que PLA₂ tóxicas e não-tóxicas exibem baixa especificidade para com o substrato, as β -neurotoxinas são farmacologicamente ativas exclusivamente nos terminais nervosos; e a interação específica entre a membrana foi sugerida como sendo essencial para produzir neurotoxicidade. Existem fortes evidências de que há a ação das β -neurotoxinas mediada por receptor através de pares particulares de β -neurotoxinas que mutuamente potenciam seus efeitos neurotóxicos em preparações neuromusculares isoladas (CHANG e SU, 1980). Finalmente, a existência de receptores específicos para as PLA_2 neurotóxicas em membranas pré-sinápticas tem sido demonstrada usando-se uma βneurotoxina radiomarcada, que é uma PLA₂ pré-sináptica isolada do veneno da krait taiwanesa Bungarus multicinctus (REHM e BETZ, 1982; OTHMAN et al., 1982).

3.1.5- Amoditoxinas assemelham-se com outras β-neurotoxinas em seu modo de ação

Amoditoxinas (ATx) são toxinas monoméricas, do grupo IIA PLA₂ isoladas do veneno da vípera de focinho longo (GUBENSEK e KRIZAJ, 1997). Os efeitos patológicos induzidos pela ATx são muito similares aos induzidos por outras fosfolipases A₂ de ação pré-sináptica. Após a administração intravenosa ou intraperitoneal da toxina, os terminais nervosos são paralisados e o animal morre devido à paralisia da musculatura respiratória. A paralisia não é imediata mas ocorre com latência de uma a várias horas, sendo este retardo proporcional à dose de toxina utilizada. O terminal nervoso do camundongo intoxicado passa por dois estágios de alterações morfológicas. Em um primeiro estágio, aumento do

tamanho da mitocôndria no terminal nervoso motor e invaginações do axolema do tipo Ω são observadas. Imediatamente após a parada respiratória, a mitocondria também torna-se vacuolada e o número de vesículas sinápticas diminui substancialmente. A ATx atua seletivamente no sítio pré-sináptico mas sem afetar fibras musculares, fibrócitos, células de Schwann e axônios mielinizados (LEE et al., 1984).

Em preparações neuromusculares de camundongo ATx produz um efeito trifásico na transmissão neuromuscular similar ao induzido por muitas β -neurotoxinas, como por exemplo, a β -bungarotoxina, crotoxina, etc. O efeito se inicia com uma diminuição inicial da força de contração muscular indiretamente elicitada seguido de um aumento transitório e finalmente bloqueio total e irreversível da neurotransmissão. A freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura bem como o conteúdo quântico da placa motora mostram o mesmo perfil trifásico. A amplitude dos potenciais em miniatura não mostra alterações significativas até mesmo na falência da liberação evocada. Os potenciais gigantes e "burts" são freqüentes quando ATx é adicionada à preparação (LEE et al., 1984).

Registros extracelulares em preparação músculo triangular externo de camundongo revelam que ATx, bem como a crotoxina, taipoxina e β -bungarotoxina, exibem um efeito dependente da concentração na segunda deflecção, associado com a corrente do circuito local gerada principalmente pelo movimento de íons K⁺ no terminal nervoso (DREYER e PENNER, 1987; ROWAN e HARVEY, 1988). Isto ocorre entre 5 e 10 min após a exposição e é presumivelmente a razão da fase facilitadora da toxina em preparações neuromusculares (KRIZAJ et al., 1995).

3.1.6- Os receptores neuronais para β-neurotoxinas

Receptores neuronais para β -neurotoxinas podem ser componentes funcionalmente importantes nos terminais nervosos; um conteúdo de informação considerável sobre eles tem sido obtido por investigadores e diferentes PLA₂ neurotóxicas têm sido usadas nestes estudos. Sítios específicos de ligação para a ATx foram encontrados em córtex cerebral de bovinos (KRIZAJ et al., 1995; KRIZAJ et al., 1994). A isoforma mais tóxica A (DL₅₀ via i.p.) demonstrou a mais alta afinidade com uma constante de dissociação (K_d) de 4.13 nM.

Algumas PLA2 neurotóxicas exibem grande potência em inibir a ligação específica e a ligação cruzada do I¹²⁵-ATx em preparação de membrana nervosa, sugerindo que os receptores, identificados pela toxina radioiodada, exercem um papel no mecanismo molecular das PLA_2 pré-sinápticas. A ligação específica é dependente de Ca^{+2} e não é afetada por bloqueadores de canais de K⁺ como por exemplo cloreto de tetraetilamônio, 4-aminopiridina ou pela α -dendrotoxin, (α -Dtx) e β -bungarotoxin (β -Butx). De muitas formas, os receptores para ATx em cérebro bovino se assemelham ao chamado receptor de PLA₂ ou do tipo N encontrado em cérebro de rato usando-se a neurotoxina PLA₂ monomérica do veneno de Taipan (OS₂), como ligante (LAMBEAU et al., 1989). O I¹²⁵-OS₂ com uma DL₁₀₀ intracistérnica de 17 µg/kg em camundungo, liga-se a membranas de cérebro de rato com afinidade extremamente alta (K_d em pM). Esta ligação específica é Ca^{+2} -dependente e insensível a β -bungarotoxina (β -Butx) ou a α -Dtx. Também existe uma boa correlação entre a afinidade das PLA2 do tipo N pela interação com o receptor e a letalidade produzida pelas PLA2. Os receptores de PLA2 do tipo N são presumivelmente proteínas da membrana plasmática associadas. Proteínas de cerca de 50 kDa encontradas em cérebro de rato se assemelham àquelas de ATx marcadas com I¹²⁵ também em cérebro bovino. Uma proteína adicional de cerca de 85-88 kDa foi marcada em preparação de cérebro de rato com I¹²⁵-azido-OS₂. Uma proteína de massa molecular similar liga-se à ATx-C em órgão elétrico de Torpedo marmorata (KRIZAJ et al., 1997).

3.1.7- O enigma da heterogeneidade dos receptores neuronais para β-neurotoxinas

A conecção entre a interação com um receptor particular e a atividade neurotóxica de uma PLA₂ tem sido claramente estabelecida só no caso da β -bungarotoxina e dos canais de potássio voltagem-dependentes (HARVEY e KARLSSON, 1982). Em outros casos a dependência ainda não está muito bem confirmada. A correlação entre a afinidade de uma PLA₂ pelo seu receptor e sua toxicidade é uma boa indicação de que um receptor particular está envolvido no mecanismo molecular desta toxina. Este tipo de relação foi demonstrado para receptores do tipo N-PLA₂ (LAMBEAU et al., 1989). Entretanto, como a β -neurotoxicidade é um processo que aparentemente consiste de vários estágios, incluindo interações proteína-proteína e hidrólise de fosfolipídios, a possível falta de correlação entre a afinidade da PLA₂ para com o seu receptor e sua letalidade não significa necessariamente que a ligação no receptor não seja importante para a neurotoxicidade. Em seguida foi proposto uma explicação para o intrigante fato de que apesar das ações muito próximas em termos eletrofisiológicos e anatomopatológicos, as β -neurotoxinas interagem em sítios neuronais diversos.

O processo celular representa um passo na ação das β -neurotoxinas. A detecção da β -BuTx no interior do terminal nervoso (ESQUERDA et al., 1982), a descoberta dos receptores intracelulares para PLA₂ β -neurotóxicas, bem como a incapacidade de anticorpos em neutralizar as β -neurotoxinas após o tratamento por temperatura ou eletro-estimulação do terminal nervoso exposto à β -neurotoxina (SIMPSON et al. 1993), sugere que estas PLA₂ entram na célula nervosa. O processo celular, no qual diferentes tipos de receptores extracelulares para β -neurotoxinas estão envolvidos, pode ser uma endocitose.

O papel de NP1 na recaptação da taipoxina é implicado pela observação de que sua adição em células culturadas da glia fazem a célula muito mais suceptível à toxina (DODDS et al., 1997). Os padrões sobrepostos de expressão de RNA mensageiro de NP2, NP2 e NPR em cérebro (DODDS et al., 1997) adicionalmente suportam a interação funcional entre estas proteínas.

É provável que, da mesma forma que os receptores para PLA₂ do tipo M, o receptor neuronal para ATx R180 também possua propriedades endocíticas. É tentador especular que o R180 serve como uma janela para a entrada da toxina no neurônio. Em um compartimento endosomal ATx subseqüentemente interage com R25 o qual evita a ligação da proteína ao lisosoma e sua degradação. Ao invés disso, a toxina é direcionada ao seu sítio de ação, o ciclo da vesícula sináptica. Suportando esta idéia um alvo nuclear específico da PLA₂-IB pancreática foi assumido como sendo dependente de linhagens celulares proliferativas de rato do tipo U_{III} em sua ligação no receptor M para PLA₂ na membrana plasmática (FAYARD et al., 1998).

A β -Butx pode entrar na vesícula sináptica diretamente durante a recuperação endocitótica do plasma da membrana fundida da vesícula sináptica na zona ativa do terminal nervoso (CREMONA e DE CAMILLI, 1997) onde os canais de K⁺-voltagem dependentes são abundantes. É muito provável, entretanto, que ela interaja com outra(s) proteína(s) de membrana, ainda desconhecida(s), mas importante(s) para sua internalização (BEHEND et al., 2000). Em um modo similar o efeito inibitório das β-neurotoxinas além da β-Butx nos canais de potássio do terminal poderiam ser também explicados. Foi proposto no entanto que a taipoxina, a ATx e a β-Butx alcançam o compartimento neuronal, onde elas bloqueiam a reciclagem da vesícula sináptica por uma ação fosfolipolítica em três diferentes sentidos. Deve haver também caminhos adicionais para que as PLA₂ neurotóxicas entrem no neurônio, por exemplo caveolae. Caveolae são microdomínios de célula de membrana conhecidos por formar compartimentos únicos endocitóticos e exocitóticos na superfície de muitas células, capazes de importar moléculas e enviá-las aos locais específicos dentro da célula (OKAMOTO et al., 1998; ANDERSON, 1998). Foi demonstrado que as PLA2 do tipo IIA, PLA2 do grupo dos mamíferos a qual é estruturalmente muito similar às PLA2 neurotóxicas, estão funcionalmente associadas ao glipican, glicosifosfatidilinositol-ancorado heparan-sulfato-proteoglicam, em caveolae (MURAKAMI et al., 1999). Estando a PLA₂-IIA dentro de um compartimento subcelular específico, a área perinuclear muito provavelmente procede através de uma endocitose do tipo caveolae-mediada (patocitose) (MURAKAMI et al., 1999).

Por intermédio de estudos de ligação e também eletrofisiológicos torna-se evidente que algumas β -neurotoxinas podem usar mais do que um importante sistema para ganhar entrada ao ciclo da vesícula sináptica. Neste aspecto a ausência de antagonismo da atividade da β -neurotoxina para com substâncias as quais inibem a endocitose mediada pelo receptor, cloreto de amônio e hidrocloreto de metilamina (SIMPSON et al., 1993) é explicada.

Assim assume-se no modelo proposto de ação das β -neurotoxinas que as mesmas poderiam entrar no ciclo da vesícula sináptica por diferentes caminhos. Receptores neuronais diversos são constituintes de diferentes sistemas importados, os quais trariam as β -neurotoxinas para o mesmo sítio no terminal nervoso. Estando lá as β -neurotoxinas impediriam o ciclo das vesículas sinápticas por hidrólise de fosfolipídeos resultando no mesmo processo de envenenamento para diferentes β -neurotoxinas (KRIZAJ e GUBENSEK, 2000).

3.1.8- Possíveis mecanismos para a facilitação da liberação do neurotransmissor

Vários mecanismos têm sido postulados para se interpretar a facilitação inicial induzida pelas toxinas-PLA₂ em sistemas neuromusculares. A facilitação poderia ser devido a uma redução da recaptação de Ca^{+2} dentro do terminal nervoso seguida de um desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria (WAGNER et al., 1974), até a um aumento da permeabilidade da membrana do terminal nervoso a íons e um aumento na liberação dos neurotransmissores (MASUKAWA e LIVENGOOD, 1982; HALLIWELL et al., 1982, RUGOLO et al., 1986); aumento da probabilidade da fusão das vesículas sinápticas (STRONG et al., 1976); aumento na sensibilidade no mecanismo de liberação do Ca^{+2} ou um aumento na entrada de Ca^{+2} durante os potenciais de ação (SU e CHANG, 1984).

As mitocôndrias são consideradas importantes no processo de acumulação de Ca^{+2} (DIAMOND e GOLDBERG, 1971) e qualquer distúrbio no processo de acúmulo e remoção do Ca^{+2} do citoplasma poderia resultar em um aumento na atividade dos sistemas Ca^{+2} -dependentes na célula (liberação do neurotransmissor por exemplo). A β -bungarotoxina é conhecida por ser um poderoso inibidor do acúmulo de Ca^{+2} pelas mitocôndrias de cérebro de rato (WAGNER et al., 1974). Porém, em experimentos de "binding" realizados por TSENG e LIN-SHIAU (2003) descobriu-se que a β -bungarotoxina é capaz de se ligar diretamente a receptores NMDA de cultura de neurônios de cérebro de rato, mecanismo que poderia ter a sua similaridade em terminais nervosos motores.

O desacoplamento mitocondrial pode causar a quebra dos gradientes de concentração dependentes de energia os quais, no caso das mitocôndrias, resultariam em uma diminuição nos gradientes de concentração do Ca⁺² dentro do cistoplasma da célula. O resultado deste fenômeno seria um aumento nos níveis citoplasmáticos do Ca⁺², o qual

poderia resultar no aumento da liberação espontânea. Apesar da β -bungarotoxina ser capaz de desacoplar a mitocôndria isolada (HOWARD, 1975), é improvável que a β -Butx seja internalizada para exercer esses efeitos. HOWARD e WU (1976) mostraram que a β -Butx liga-se covalentemente à agarose, o que poderia prevenir a internalização da toxina porém, mesmo ligada, a toxina ainda exibia os seu efeitos. WERNICK et al. (1975) e NICHOLS et al. (1985) sugerem que o desacoplamento é devido a ácidos graxos que foram liberados pela hidrólise da membrana plasmática pelo componente fosfolipásico da toxina. No entanto, foi sugerido que a β -Butx age na membrana plasmática de sinaptosomas (e presumivelmente nos terminais nervosos) e que provavelmente os ácidos graxos liberados pela atividade fosfolipásica A₂ entram no citoplasma tanto por difusão quanto por recaptação endocitótica, mecanismo de desacoplamento da mitocôndria. Entretanto, estes efeitos na mitocôndria não podem explicar totalmente as atividades das neurotoxinas fosfolipásicas no terminal nervoso porque a fase facilitadora é independente da atividade fosfolipásica (ver CHANG, 1985). Entretanto as alterações na respiração mitocondrial recaem sobre a atividade catalítica da toxina, por exemplo produzindo ácidos graxos.

Foi observado que a adição de β -Butx causa um aumento geral na permeabilidade da membrana plasmática para íons e neurotransmissores (RUGOLO et al. 1986). Isto resulta em um aumento fosfolipase-dependente na liberação de acetilcolina, glutamato e gama-aminoglobutirato dos neurônios centrais. Entretanto, na junção neuromuscular, a facilitação induzida pelas neurotoxinas fosfolipásicas é independente de atividade hidrolítica. Assim, as ações relatadas por RUGOLO et al. (1986) não são consistentes com os efeitos das neurotoxinas fosfolipásicas na junção neuromuscular.

HALLIWELL et al. (1982) e NICHOLS et al. (1985) reportaram que a β -Butx causa uma despolarização da membrana plasmática. Esta despolarização não é conhecida por ser devido ao movimento dos íons Na⁺ já que este efeito não é sensível à tetrodotoxina. Sugeriu-se então que poderia ser devido a um decaimento da bomba iônica dependente de energia devido a um desacoplamento mitocondrial. Entretanto seria improvável que a despolarização geral dos terminais pudesse ser responsável pela natureza fásica das alterações da liberação do neurotransmissor induzida pelas neurotoxinas não estando associada com o aumento no conteúdo quântico que é visto na junção neuromuscular.

Mais informação sobre a ação das fosfolipases neurotóxicas foi adquirida de trabalhos usando-se membranas lipossômicas. O efeito da β -Butx nas membranas lipossômicas foi estudado por STRONG e KELLY (1977). Eles sugeriram que a β-Butx preferentemente hidrolisa a membrana de fosfatidilcolina na fase de transição dos lipossomas. A fase de transição é conhecida por ocorrer na interface entre a proteína de membrana integral e os fosfolipídeos que a circundam, por exemplo nas zonas ativas do terminal nervoso. Foi sugerido também que uma vez que a proteína se liga à membrana plasmática a atividade enzimática aumenta o nível de ácidos graxos e lisofosfolipídeos de membrana os quais aumentam a probabilidade de fusão com a membrana para liberar o neurotransmissor. A presença de colesterol nos lipossomas de fosfatidilcolina marcadamente reduz a taxa de hidrólise. Além disso, membranas com um alto conteúdo de colesterol são relativamente resistentes a atividade hidrolítica da toxina, um exemplo são as células de Schwann. Portanto a especificidade da ação das toxinas pode resultar de um único conteúdo lipídico da membrana. Entretanto, isto sugeriu que uma atividade para a PLA₂ quanto à probabilidade de fusão da vesícula sináptica como uma razão para o aumento da liberação do neurotransmissor em preparações de mamíferos seria insatisfatória. Isto porque o aumento na liberação do neurotransmissor é observado em condições em que a atividade PLA₂ é reduzida (por exemplo em presença de cátions inibitórios) e um aumento no nível de ácidos graxos livres não poderia interferir neste efeito. Entretanto, a ação fosfolipásica A2-depedente observada em preparações de rã poderia ser explicada por este efeito.

Foi também sugerido que o aumento na liberação do neurotransmissor pode ser devido a aumento na sensibilidade ao Ca^{+2} do mecanismo de liberação ou, devido a um aumento na entrada de Ca^{+2} durante o potencial de ação (SU e CHANG, 1984). Durante a facilitação da liberação do neurotransmissor tanto pela β -Butx como pela taipoxina, a curva de concentração em resposta ao Ca^{+2} não é alterada para a esquerda em concentrações normais de Ca^{+2} . Assim, a sensibilidade aumentada ao Ca^{+2} não exerce papel fundamental na facilitação da liberação do neurotransmissor. Ainda não está claro se a facilitação é devida a um aumento no influxo de Ca^{+2} durante o potencial de ação, agindo a toxina em ambos os canais de Ca^{+2} per se, ou se atua por meio de um mecanismo indireto.

3.1.9- Possíveis mecanismos para o bloqueio da liberação do neurotransmissor

É comumente conhecido que o bloqueio irreversível da liberação do neurotransmissor é devido à atividade hidrolítica das toxinas fosfolipásicas A_2 , já que a atividade bloqueadora é grandemente atenuada pelos inibidores catiônicos de PLA₂ e por modificação química do sítio ativo da enzima (KARLSON, 1979). Vários mecanismos foram propostos para os efeitos irreversíveis das neurotoxinas fosfolipásicas na liberação do neurotransmissor. Estes devem ter sido baseados em medidas eletrofisiológicas indiretas da atividade do terminal nervoso e em estudos bioquímicos de membranas do terminal nervoso. Estes mecanismos correspondem à depleção dos estoques de energia resultando de um desacoplamento da fosforilação oxidativa pela mitocôndria (NICHOLS et al., 1985), uma inibição da recaptação de colina de alta afinidade (DOWDALL et al., 1977), uma diminuição no influxo de Ca⁺² ou uma diminuição na eficácia do Ca⁺² em promover a liberação (SU e CHANG, 1984).

Os efeitos na mitocôndria foram duvidosos já que eletromicrografias mostraram evidências de danos morfológicos da mitocôndria após envenenamento com a PLA₂ (LULLMANN-RAUCH e THESLEFF, 1979) apesar do fato de que os cientistas tinham ainda demonstrado a presença de moléculas de toxinas dentro do terminal nervoso. HOWARD e WU (1976) submeteram a β-Butx a uma ligação covalente com largas bandas de agarose para impedir a possibilidade da molécula da toxina de entrar na preparação de sinaptossoma. Nestas condições, a β-Butx ainda exibiu atividade farmacológica. HOWARD (1975) propôs que as mitocôndrias são desacopladas por um fator difusor (que é conhecido por ser livre de ácidos graxos) produzido pela atividade hidrolítica da toxina na membrana do terminal nervoso. Entretanto, a toxina não teria que cruzar a membrana plasmática do terminal nervoso para exercer o seu efeito. ANDERSON e PARSONS (1986) também sugeriram que a β-Butx danifica a membrana da vesícula de um modo dependente da fosfolipase, e isto resulta no desacoplamento da ATPase e dos sistemas de transporte de acetilcolina. Todavia, desacopladores mitocondriais conhecidos causam alterações na liberação do neurotransmissor que são diferentes do padrão das neurotoxinas (GLASGOLEVA et al., 1970), dados que sugerem que outros mecanismos podem estar envolvidos no bloqueio da liberação do neurotransmissor. A β -bungarotoxina e outras

 PLA_2 neurotóxicas também bloqueiam o transporte de colina de alta afinidade em eletroplacas de órgão elétrico de torpedo (DOWDALL et al., 1977) em sinaptossomas de cérebro de rato (SEN et al., 1976; FLETCHER e MIDDLEBROOK, 1986) e este bloqueio resulta da depleção das vesículas de acetilcolina. O bloqueio da recaptação de colina pode ser reduzido pela modificação da toxina com BPB ou substituindo-se o Ca⁺² pelo Sr⁺². Isto é consistente com o bloqueio da liberação do neurotransmissor pelas fosfolipase A₂ através de sua atividade hidrolítica. Entretanto, o bloqueio do sistema de transporte de colina de alta afinidade com hemicolínio não resulta na redução imediata da freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura (ELMQVIST e QUASTEL, 1965a) que é observado com as neurotoxinas PLA₂, em discordância com os efeitos do bloqueio da recaptação de colina observados *in vivo*.

A β -bungarotoxina é conhecida por estimular a síntese e o armazenamento de acetilcolina em preparações nervo-músculo, no entanto a notexina tem um efeito oposto sobre a estocagem do neurotransmissor, já que ela diminui o volume de ACh no diafragma de rato (GUNDERSEN et al., 1980). Assim, as ações das neurotoxinas PLA₂ na junção neuromuscular não são consistentes com um efeito na recaptação de colina. O fato de que altas concentrações de K⁺ ou sucrose hipertônica ainda aumentem a liberação do neurotransmissor suporta esta idéia (CHANG e LEE, 1977).

Foi sugerido que o bloqueio da liberação do neurotransmissor é devido a um excessivo acúmulo de Ca^{2+} ou a uma diminuição na entrada de Ca^{+2} ou até mesmo a uma diminuição da eficácia do Ca^{2+} em promover a liberação (SU e CHANG, 1984). Durante a fase bloqueadora quando o conteúdo quântico é reduzido, o mesmo pode ser parcialmente restabelecido com 3,4-diaminopiridina (SU e CHANG, 1984). Isto sugere que o bloqueio da liberação do neurotransmissor não é devido ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} ou ao acúmulo excessivo de Ca^{2+} dentro do terminal nervoso; outros mecanismos devem estar envolvidos nestes efeitos. SU e CHANG (1984) sugerem que a hidrólise do axolema promove um distúrbio dos sítios ativos, que resulta no bloqueio irreversível da liberação de acetilcolina.

Recentemente, foi possível registrar precisamente os potenciais de ação de terminais nervosos. Estes potenciais de terminais nervosos podem ser registrados usando-se microeletrodos colocados dentro da bainha perineural próxima ao terminal nervoso (BRIGANT e MALLART, 1982). Assim é possível determinar se os efeitos facilitatórios e bloqueadores das neurotoxinas PLA₂ na junção neuromuscular poderiam ser uma conseqüência de alterações dos potenciais relativos ao terminal nervoso motor. Além disso, juntamente com a técnica de patch-clamp, o efeito de toxinas PLA₂ nos terminais nervosos pode ser melhor compreendido em relação às alterações promovidas por estas toxinas diretamente nos canais iônicos.

3.1.10- A eletrofisiologia no estudo da farmacologia das neurotoxinas

Pode se dizer que a experimentação eletrofisiológica tenha começado no final do século XVIII quando o italiano Luigi Galvani notou que a aplicação de um potencial elétrico em nervos crurais de rã evocava a contração dos músculos da perna do animal. Em meados do século XVI tornou-se possível observar o sinal elétrico associado à atividade do nervo ou músculo usando-se um galvanômetro de mercúrio. Em 1902, Berstain propôs os fundamentos da eletrofisiologia moderna com sua hipótese de uma membrana celular permeável aos íons K⁺ para explicar o impulso nervoso (DEMPSTER, 1988).

Antes da introdução de técnicas de registro intracelular por microeletrodos em 1949 por LING e GERARD (1949), os eventos elétricos em tecidos excitáveis eram medidos por meio de registros extracelulares ou, no caso de neurônios de grande diâmetro como o do axônio gigante de lula, um eletrodo de metal era inserido no axoplasma. Em 1951, FATT e KATZ fizeram um amplo estudo eletrofisiológico do terminal nervoso motor registrando os potenciais de placa terminal usando para isso um microeletrodo inserido na região da placa motora do músculo sartório de rã curarizado. Para tal, utilizaram um microeletrodo de vidro preenchido com KC1 inserido através da fibra muscular na região da placa motora. Este aparato experimental revolucionou o estudo da transmissão química em sinapses e em junções neuroefetoras levando a descobertas fundamentais relacionadas à fisiologia da transmissão neurohumoral. Desde então as técnicas eletrofisiológicas por microeletrodo vêm sendo utilizadas pelos farmacologistas para entender os mecanismos de ação de drogas que agem na junção neuromuscular. Já que a junção neuromuscular esquelética é um sítio prontamente acessível da transmissão neurohumoral, tem sido amplamente estudada e por isso é a mais entendida. Entretanto, existem muitas drogas desenvolvidas para atuar primeiramente na junção neuromuscular, mas que também atuam em outros sistemas parecendo possuir múltiplos sítios de atuação. Assim, uma questão muito comum feita pelos farmacologistas é "a droga x" exerce uma ação primária/secundária na liberação do neurotransmissor no terminal nervoso, ou diretamente no canal iônico da região pós-juncional ?". Para responder a esta e a outras perguntas tornou-se imprescindível o uso de técnicas eletrofisiológicas que permitem desde um simples estudo do potencial de membrana muscular até a visualização dos mecanismos envolvidos em canais iônicos (PRIOR et al., 1993).

3.1.11- Metodologia para registros elétrofisiológicos intracelulares

Apesar do impulso nervoso estar acompanhado de efeitos que, sobre condições extremamente favoráveis, podem ser detectados através de marcadores radioativos, os métodos de registros de biopotenciais elétricos normalmente proporcionam uma maior sensibilidade e conveniência na análise dos efeitos induzidos por drogas neuroativas. Desta forma, a diferença de potencial entre dois pontos na membrana pode ser medida conectando-se eletrodos a um amplificador acoplado a um sistema de registro. No entanto, se o alvo da investigação é o potencial de ação, fios de tungstênio ou platina de pequeno diâmetro podem servir como eletrodos. Porém, qualquer superfície de metal desprotegida possui a desvantagem de tornar-se polarizada pela passagem da corrente elétrica dentro ou fora da solução com a qual está em contato. Quando se procura medir a magnitude de um potencial constante, como o potencial de membrana, eletrodos não-polarizados ou reversíveis devem ser utilizados. O tipo mais simples de eletrodo reversível é conseguido por recobrir eletronicamente um fio de prata com cloreto de prata mas, para medidas mais precisas o calomel (mercúrio/cloreto de mercúrio) deve ser empregado.

Quando se deseja registrar o potencial do interior da célula, o eletrodo terá que ser muito bem isolado com exceção de sua ponta. Além disso, ele deverá penetrar a célula de maneira sutil sem produzir dano celular ou vazamentos elétricos. O primeiro registro intracelular bem-sucedido foi feito introduzindo-se um capilar de vidro de 50 µm de diâmetro através da fibra muscular de um axônio gigante de lula. No entanto, o método mais utilizado atualmente usa capilares de vidro (borosilicato) de cerca de 2 mm de diâmetro que são puxados por um puxador de micropipetas produzindo uma micropipeta de 0,5 µm de espessura em sua ponta. Este microeletrodo é então preenchido com KCl 3 M e um fio de prata cloretada é inserido na porção terminal do mesmo. Por meio de vários refinamentos dessa técnica, microeletrodos desse tipo têm sido usados para medir diretamente o potencial de membrana não só em neurônios simples como também em vários outros tipos de células (KEYNES e AIDLEY, 2001).

3.1.12- Registro intracelular do potencial de membrana

Quando pela primeira vez Hodgkin e Huxley mediram a absoluta magnitude do potencial elétrico em uma célula viva introduzindo um eletrodo capilar através do axônio gigante de lula, verificaram que, quando a ponta do eletrodo penetrava o suficiente dentro da fibra muscular o potencial tornava-se de 60 mV negativos em relação ao eletrodo posicionado na face externa da membrana em contato com a solução nutritiva. O potencial de repouso através da membrana em um axônio intacto foi então de –60 mV em relação ao lado externo.

Atualmente utiliza-se esta técnica para medir potenciais que variam de 150 mV a poucos microvolts e, em ordem para registrá-los precisamente, a freqüência de resposta do sistema necessita se ajustar de zero a cerca de 50 kHz (1 Hz = 1 ciclo/s). Dessa forma, para produzir o grau necessário de amplificação, um amplificador deve proporcionar um alto grau de resistência de entrada (imput impedance) e deve gerar o mínimo possível de ruído elétrico na ausência deste sinal. Atualmente estes sistemas operacionais de alta qualidade são produzidos em escala industrial não sendo difícil adquiri-los no mercado. No set up eletrofisiológico a saída ou output é comumente acoplada a um osciloscópio de raiocatodo, ajustado a um tubo de registro no intuito de se avaliar posteriormente os sinais adquiridos. Para se obter um registro permanente a figura gravada no vídeo pode ser fotografada. O registro direto em papel por intermédio de um equipamento registrador (fisiógrafo) é também utilizado em alguns casos, mas possui o inconveniente de não reproduzir fidedignamente alguns potenciais de ação de freqüência mais elevada. Assim recentemente introduziu-se o uso de computadores on-line tanto para a gravação quanto para a análise posterior dos resultados, o que facilita muito a análise mais precisa do decurso temporal deste potenciais (KEYNES e AIDLEY, 2001).

3.1.13- Biopotenciais elétricos e o conteúdo quântico

Os primeiros experimentos que exploraram a técnica de microeletrodo intracelular desenvolvida por Hodgkin e Huxley foram aqueles realizados por Katz e colaboradores no University College of London (FATT e KATZ, 1951, 1952; del CASTILLO e KATZ, 1954a, b). Suas descobertas formaram a base para a teoria da liberação quântica do neurotransmissor. A observação crucial, feita em uma preparação nervo-músculo, foi o aparecimento de despolarizações passageiras ao acaso de pequena amplitude (0,5-1,0 mV) com um curso de tempo em torno de 10 ms (FATT e KATZ, 1952). Estes potenciais foram chamados de potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM). O grupo também notou uma flutuação randômica da amplitude dos potenciais de placa terminal evocados (PsPT) registrados em solução nutritiva de Ringer contendo um excesso de íons magnésio. Quando a concentração de magnésio era aumentada a transmissão era reduzida a um nível em que nenhum estímulo nervoso era capaz de gerar um potencial. Além disso, os menores PsPT que foram registrados tinham a mesma amplitude dos PPTM. Então os PsPTM foram correlacionados aos PsPT pela observação de que a flutuação na amplitude dos PsPT em solução com alto magnésio variava exatamente por múltiplos da amplitude dos PPTM (del CASTILLO e KATZ, 1954a, b).

Como resultado das observações citadas acima, foi desenvolvida uma teoria de que o nervo motor libera o neutransmissor acetilcolina em pacotes ou quantas de acetilcolina. Assim, o PPTM representa a liberação da unidade mínima ou quantum de acetilcolina e os PsPT representam liberações múltiplas simultâneas de um quantum. 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 que dá:

m =<u>amplitude do PPT</u> amplitude do PPTM

O grupo de Katz também demonstrou que, em baixos níveis de liberação, o processo de liberação seguia as previsões da estatística de Poisson que diz que a liberação de um quantum é um evento estatisticamente diferente, inalterado pela liberação prévia. Dessa forma o "m" também pode ser calculado através da variância das amplitudes dos PsPT:

 $m = (\underline{\text{média da amplitude dos PsPT}})^2$ variância da amplitude dos PsPT

e também por se acessar o número de PsPT que falharam resultado de uma série de estímulos deflagrados:

$$m = \log_e n^o de estímulos deflagrados$$

 $n^o de PsPT que falharam$

Pouco tempo depois do desenvolvimento da teoria quântica, foi dado um suporte morfológico ao conceito de quantum, pela observação através de eletromicrografias do terminal nervoso de estruturas de pequeno diâmetro (50 nm) ligadas à membrana do citoplasma terminal (PALADE e PALAY, 1954). Estas estruturas foram chamadas de vesículas sinápticas e a sua existência levou à interrelação entre quanta e vesículas sinápticas, a chamada hipótese vesicular da transmissão quântica. De acordo com esta hipótese o PPTM resulta da colisão expontânea de uma vesícula sináptica individual com a membrana pré-sináptica. Isto resulta na exocitose do neurotransmissor dentro da fenda

sináptica onde ele pode interagir com os receptores pós-juncionais para produzir um potencial elétrico. As respostas evocadas de conteúdo quântico maiores que o de uma unidade (acima de várias unidades em algumas sinápses) são o resultado de exocitoses simultâneas disparadas por um influxo de íons cálcio liberando o conteúdo de várias vesículas de acetilcolina. Tem sido demonstrado que as vesículas sinápticas contêm altas concentrações de acetilcolina (MARCHBANKS, 1967) e possuem um mecanismo de transporte para bombear a acetilcolina do citoplasna para o interior da vesícula (PARSONS et al., 1993) formando invaginações em forma de ômega quando elas coalescem com a membrana pré-juncional, durante intensa liberação do neurotransmissor (PRIOR et al., 1993). Desta forma, existe uma forte evidência da ligação entre as vesículas sinápticas e o conteúdo quântico.

Assim, o uso de técnicas eletrofisilógicas convencionais revelou-se importante para o estudo dos efeitos farmacológicos induzidos por venenos animais e suas toxinas em modelos experimentais. Em primeiro lugar, por meio destas técnicas é possível aumentar o conhecimento adequado da fisiopatologia dos envenenamentos e instituírem-se medidas racionais e eficientes para os tratamentos. Em segundo, o uso destas técnicas tem revelado substâncias que vêm contribuindo de modo decisivo para o esclarecimento de vários fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos.

3.1.14- Descrição do potencial de ação do terminal nervoso

O terminal nervoso de mamíferos perde a sua bainha de mielina quando em contato com a fibra muscular. É esta porção não mielinizada que forma a área especializada para a liberação do neurotransmissor, havendo um grande interesse no papel desta área em governar a liberação deste. Foram HODGKIN e HUXLEY (1952) que fizeram a primeira descrição da geração de um potencial de ação ao longo de fibras nervosas não-mielinizadas e atribuíram esta despolarização (a fase de decurso do potencial de ação) a uma corrente de Na⁺ de entrada e a repolarização (a fase de decaimento do potencial de ação) principalmente devido a um aumento na condutância aos íons K⁺). Esta descrição também foi confirmada para outras fibras nervosas não mielinizadas e também para os nodos de
Ranvier de anfíbios (CHIU e RITCHIE, 1982). Entretanto, em nodos de Ranvier de mamíferos, a fase de repolarização do potencial de ação depende principalmente da inativação do canal de Na⁺ e condutâncias de 'vazamento', devido a falta de canais de K⁺. É difícil estabelecer a situação nos terminais nervosos em virtude do tamanho muito pequeno dos mesmos e também da sua relação íntima com a membrana muscular dificultando o uso de técnicas eletrofisiológicas convencionais para explorar as suas propriedades.

Até recentemente não era possível registrar com precisão a atividade elétrica que ocorre nos terminais nervosos não-mielinizados de mamíferos. Portanto, uma prova direta da distribuição dos canais que eram ativamente ou passivamente despolarizados não estava disponível. O potencial de ação do terminal nervoso foi investigado por HUBARD e SCHMIDT (1963). Eles concluíram que os terminais nervosos pré-sinápticos de diafragma de rato são eletricamente excitáveis e são ativamente invadidos por impulso nervoso. Entretanto, seus experimentos foram incapazes de mostrar uma prova visual da posição do eletrodo sendo suas evidências indiretas. Mais recentemente BRIGANT e MALLART (1982), usando uma combinação de um determinado músculo de camundongo muito fino e plano (o triangular externo) e a óptica de Normanski, foram capazes de posicionar o microeletrodo através de controle visual em qualquer ponto ao longo do terminal nervoso e registrar extracelularmente as correntes do terminal nervoso. Usando-se esta técnica, duas formas de onda principais foram registradas dependendo da localização específica do microeletrodo no terminal nervoso. Na transição entre a parte mielinizada e não mielinizada do axônio (denominada de área pré-terminal), a forma de onda consiste em uma deflexão positiva seguida de duas deflexões negativas. Na porção terminal do axônio (denominada de área terminal), a forma de onda consiste de duas deflexões positivas. Correntes extracelulares que entram ou que saem do terminal são registradas como uma queda de potencial através da resistência de selamento do eletrodo. Sinais positivos indicam correntes externas, sinais negativos indicam correntes internas. O sinal positivo menor que precede a forma de onda principal foi descoberto por KONISH e SEARS (1984) por ocorrer simultaneamente na área pré-terminal. Eles sugeriram que este sinal é produzido como resultado de uma descarga de corrente capacitiva produzida pela abertura de canais de Na⁺ despolarizando o terminal.

Usando-se agentes bloqueadores específicos, BRIGANT e MALLART (1982) puderam identificar pela primeira vez os componentes da forma de onda associados com as correntes de Na⁺, K⁺e Ca²⁺. A aplicação iontoforética de tetrodotoxina, um bloqueador de canal de Na⁺, na área pré-terminal abole o primeiro componente negativo, mas em condições normais o mesmo tratamento na área terminal não exerce efeito. Entretanto, quando o último nodo e a região pré-terminal são expostos à tetrodoxina uma pequena corrente de entrada que é sensível a esta toxina foi observada nos terminais (KONISH, 1985). Esta corrente era maior quando a membrana era hiperpolarizada e menor quando a membrana era despolarizada. No entanto, os terminais são ativamente despolarizados mas os potenciais de ação são gerados pelos canais de Na⁺. A aplicação iontoforética de aminopiridinas e tetraetilamônio, bloqueadores de canais de K⁺, suprimem a primeira deflexão positiva retardada (o segundo componente positivo) da forma de onda do terminal. Isto indica que os canais de K⁺ só estão presentes na região das terminações nervosas. BRIGANT e MALLART (1982) concluíram que, juntamente com uma separação temporal de correntes de Na⁺ e K⁺, também existe uma separação física destes canais iônicos. Os canais de Na⁺ estão principalmente concentrados na parte pré-terminal e os canais de K⁺ estão localizados nos terminais juntamente com os canais de Ca⁺². Eles sugeriram que a concentração de canais de Na⁺ na região pré-terminal deixa mais espaço no terminal para outros componentes de membrana mais diretamente envolvidos no processo de liberação e que os canais de sódio dos terminais agem por assegurar a liberação do neurotransmissor. Dos experimentos de BRIGANT e MALLART (1982), KONISHI e SEARS (1984) e KONISHI (1985) pode-se deduzir uma descrição precisa dos eventos elétricos que levam à liberação de acetilcolina. Um impulso nervoso propagado através do axônio motor inicia uma despolarização no último nodo de Ranvier. Esta despolarização invade o terminal pré-sináptico por disseminação eletrotônica e o despolariza. Se a despolarização chegar ao limiar de excitação, um potencial de ação é gerado na parte pré-terminal (heminodo). A reversão do potencial de membrana neste ponto promove um circuito local o qual continua por despolarizar a parte terminal dos terminais principalmente por difusão eletrotônica, apesar dos canais de Na⁺ estarem contribuindo para ativação da despolarização desses terminais. A corrente de K⁺ externa e a corrente de Ca²⁺ interna dos terminais são inicializadas por despolarização. Sobre condições normais a corrente de K⁺ é

muito maior que a corrente de Ca²⁺ e a rede externa de corrente iônica repolariza a membrana. Devido à diferença regional na densidade dos canais iônicos, a diferença de potencial é estabelecida entre as partes terminal e pré-terminal comportando-se como uma 'bacia' do circuito local. A ativação dos canais de Na⁺ espacialmente separados na região do terminal nervoso e dos canais de K⁺ e Ca²⁺ nos outros geram correntes iônicas e separam circuitos locais os quais fluem entre as porções pré-terminais e terminais das terminações nervosas. Assim os sinais registrados em cada ponto dos terminais nervosos correspondem à somação de correntes iônicas passivas entrando ou deixando a membrana naquele ponto.

Registros por longo período de tempo (60 min) da área pré-terminal ou terminal dos terminais nervosos são tecnicamente muito difíceis, já que o selamento em torno do eletrodo de registro está longe de ser perfeito e os sinais demonstram baixa relação entre a taxa de sinal-ruído. Entretanto, usando-se a técnica de registro subendotelial da região pré-terminal do axônio motor de rã (GUNDERSEN et al., 1982) é possível registrar sinais significativamente mais amplos (e com uma larga relação sinal-ruído) além de serem mais estáveis. A mesma técnica foi aplicada por MALLART (1985a) e PENNER e DREYER (1986) em preparação triangular externo de camundongo.

Grupos de nervos são recobertos por três camadas de tecido, o endoneuro, perineuro e o epineuro. O perineuro está como num sanduíche entre o endoneuro e o epineuro. As células do perineuro estão ligadas umas com as outras por meio de junções muito fortes formando um tipo de banda terminal-aberta que é relativamente impermeável ao movimento dos íons. A abertura-interminável da banda perineural e suas propriedades isolantes resultam em um caminho de baixa resistência para a condução das correntes geradas nos terminais. MALLART (1985b) mostrou que as correntes registradas nos terminais podem ser registradas entre 1 mm ou mais da região de placa terminal para perineuro e que o sinal perineural corresponde a corrente que retorna aos nodos de origem no nervo estimulado.

A forma de onda registrada de dentro da banda perineural nas ramificações terminais do nervo motor é em princípio o mesmo sinal registrado na região pré-terminal do terminal nervoso. Ela consiste de uma pequena deflexão ascendente seguida por duas deflexões descendentes (PENNER e DREYER 1986). A forma de onda positiva foi descrita

como sendo uma corrente interna do axônio. O último nodo de Ranvier e a área pré-terminal promovem uma baixa fonte de impedância que descarregam a corrente capacitiva do terminal. O primeiro pico negativo está associado com a corrente interna de Na⁺ produzida por excitação e os nodos de Ranvier superiores e o heminodo; a segunda deflexão negativa foi atribuída a correntes locais geradas pelas correntes externas de K⁺ que estão localizadas nos terminais dos nervos (PENNER e DREYER, 1986). A corrente de Ca⁺² interna do terminal nervoso não é distinguida sobre condições normais, já que a corrente de K⁺ sufoca a corrente de Ca⁺². Isto só é revelado após o bloqueio das correntes externas de K⁺.

3.1.15- A técnica de patch-clamp

A técnica de patch-clamp foi primeiramente descrita por NEHER e SAKMAN (1976) e desenvolvida posteriormente por HAMILL et al., (1981). Esta técnica revolucionou o campo de análises eletrofisiológicas com respeito ao comportamento das membranas celulares por duas principais razões. A primeira é que permitiu a resolução de correntes que fluem através de proteínas simples de canais iônicos (single channel) em membranas celulares nativas. Isto possibilitou um estudo detalhado de sua permeabilidade e propriedades cinéticas, farmacológicas e de modulação bem como promoveu um poderoso e novo critério para a classificação de canais, levando à identificação de vários novos tipos. Em segundo lugar, o patch clamp aumentou o número de células disponíveis para o estudo, o que é conveniente para o uso em eletrofisiologia, por incluir muitos tipos (especialmente de mamíferos) de fibras musculares que, por serem de pequeno diâmetro, mostravam-se de difícil manejo quando se usavam as técnicas eletrofisiológicas convencionais.

A técnica de patch-clamp se utiliza de um microletrodo de vidro preenchido com eletrólito com uma ponta de cerca de 1 µm ou menos. A ponta é polida a fogo para que a borda forme um forte selamento com a membrana celular mais do que penetrar a célula. Isto isola eletricamente uma pequena porção da membrana celular e permite que os íons fluam através dos canais iônicos no patch para serem medidos como corrente elétrica. A corrente que flui através de um simples canal iônico é de cerca de 0.1-10 pA, e um

amplificador sensível e uma atenção particular à redução de ruídos elétricos estranhos são necessários para se estudar as correntes em um único canal.

Várias técnicas experimentais poderosas se tornaram possíveis usando-se o patch- clamp a configuração cell attached, os patches inside-out e outside-out e também o whole cell patch são possíveis. O modo mais simples de operação é a configuração cell-attached, obtida quando a pipeta é selada primeiramente contra a célula. As correntes podem ser registradas de canais iônicos através dos patches isolados sobre condições relativamente naturais mantendo-se a integridade da célula. Cada modalidade de patch é usada para uma determinada finalidade. Por exemplo, na configuração inside-out é possível aplicar substâncias no interior da superficie da membrana. Esta técnica é especialmente empregada para o estudo do efeito intracelular de segundo mensageiros na função do canal iônico. Alternativamente é possível aplicar um pulso de sucção à pipeta sugando-se a parte interna do patch. Esta configuração de whole-cell patch-clamp permite clampear a voltagem de toda a célula como no experimentos com eletrodos intracelulares. Finalmente se a pipeta é puxada para fora da célula em uma configuração de whole-cell, não é difícil de se destacar um pedaço da membrana que ficará aderida à ponta da pipeta. Esta configuração é chamada de outside-out e é extensivamente usada para o estudo de canais receptoresoperados onde várias concentrações de agonistas e antagonistas podem ser aplicadas e removidas.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nesta série de experimentos os objetivos foram o de identificar os componentes neurotóxicos do veneno total com atividade fosfolipásica A₂ ou seja:

 Promover o isolamento, a purificação e a caracterização bioquímica destes componentes usando-se equipamentos de cromatografia líquida, eletroforese e análise de aminoácidos e equipamentos para a medida da atividade fosfolipásica A₂.

- 2- Comparar a seqüência N-terminal dos compostos obtidos com a de outras fosfolipases já descritas na literatura.
- 3- Verificar se as toxinas PLA₂ alteram a liberação de creatino quinase usando-se a preparação *biventer cervicis*.
- 4- Caracterizar farmacologicamente estes compostos usando-se:

Técnicas miográficas

- a) preparação nervo frênico diafragma de camundongo.
- b) preparação *biventer cervicis* de pintainho.

Técnicas eletrofisiológicas

- a) medidas do potencial de membrana em repouso.
- b) medidas do potencial de placa terminal em miniatura (PPTM).
- c) medidas do potencial de placa terminal.
- d) medidas extracelulares do potencial de ação composto em preparação nervo ciático de camundongo.

Além disso, o uso de técnicas eletrofisiológicas mais sofisticadas, como as de whole-cell patch-clamp em cultura de células de neurônios da raiz dorsal, também teve como objetivo:

 a) os registros das correntes de sódio e potássio para a verificação dos possíveis efeitos das neurotoxinas PLA₂ em canais iônicos.

3.3- MATERIAL E MÉTODOS

• Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 30 g, foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. Camundongos machos Balb/c e ratos Sprague-Dawley foram fornecidos pelo biotério da University of Strathclyde. Pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4-10 dias), fornecidos pela Granja Ito S/A. Os animais foram alojados a $25 \pm 2^{\circ}$ C com livre acesso à água e ração (Projeto aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal nº 304-2).

• Veneno

O veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

• Kit de creatino quinase

Foi usado o kit de CK-NAC Cinético Bioclin adquirido da Quibasa Química Básica Ltda (Belo Horizonte, MG, Brasil).

• Solução nutritiva

Nos experimentos com a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo foi usada a solução de Tyrode com a seguinte composição (mM): NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1. Nos experimentos em preparação *biventer cervicis* de pintainho foi usada a solução de Krebs de composição (mM): NaCl 136; KCl 5; CaCl₂ 2.5; NaHCO₃ 23.8; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2 e glicose 11.

Purificação da subfração ativa MiDCA1

• Preparo do veneno

O veneno de *M. d. carinicauda* foi dissolvido em 40 μ l de bicarbonato de amônio completando-se o volume para 100 μ l com ácido trifluoro acético (ATF) 0,1% e centrifugado (14.000 *g*, 3 min, 4 °C) para remover material insolúvel. O sobrenadante claro foi usado para cromatografia.

• Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa Sephasil Peptide C18

Usando-se uma coluna do tipo Sephasil Peptide C18 5 μ m St 4.6/250 (Amersham Pharmacia Biotech), o veneno de *M. d. carinicauda* foi aplicado à coluna pré-equilibrada com ATF (0,1%). O material foi eluído com um gradiente linear (0-65%) de acetonitrila (ACTH) 66% em ATF 0,1%. Em todos os ensaios, o perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. As frações resultantes foram liofilizadas e testadas em sua atividade biológica.

• Cromatografia em HPLC de coluna Fase Reversa de Alta Eficiência

Para verificar a pureza dos picos de interesse eluídos na cromatografia do veneno total em coluna do tipo Sephasil Peptide C18 5 μ m St 4.6/250, bem como o grau de hidrofobicidade destas proteínas, utilizou-se o equipamento Waters HPLC modelo PDA, equipado com duas bombas Waters mod. 510, com injetor automático de amostra Waters modelo U6K e uma coluna C18/µBondapack 3.9 x 300 mm. Para esta cromatografia utilizou-se um gradiente descontínuo de 0 a 100% de solução de acetonitrila 66% em 0,1% de ácido trifluoroacético pH 2,5. As amostras monitoradas a 220 nm e em seguida liofilizadas.

Concentração protéica

As concentrações protéicas, tanto das soluções de veneno total quanto das frações cromatográficas, foram determinadas baseando-se na absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kotron Instruments). Neste caso, uma A_{280nm} de 1,0 (em cubeta de 1 cm) corresponde à concentração de 1,0 mg/ml. A dosagem de proteínas também foi feita utilizando-se o método descrito por LOWRY et al. (1951). A amostra com solução de proteína foi diluída oito vezes em volume final de 200 µl e incubada a temperatura ambiente por 10 min com 1 ml de reagente cuproalcalino, constituído de solução A (carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 N, p/v), solução B1 (sulfato de cobre 1% em H₂O, p/v) e da solução B2 (tartarato de sódio e potássio 2% em H₂O, p/v) na proporção de 100:1:1 v/v, respectivamente.

Em seguida foram adicionados 50 µl de reagente de Folin (Merck), deixando-se por 30 min em temperatura ambiente na ausência de luz. Posteriormente foi lida absorbância a 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva padrão de soro albumina bovina, com concentrações de 0 a 400 µg/ml.

• Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina

O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo com a metodologia descrita por SHÄGGER e VON JAGOW (1987), a partir de uma solução estoque de acrilamida-bisacrilamida (49,5%T; 3%C) e tampão para gel. O gel de corrida compõe-se de 4,0 g de glicerol 89%, em 10 ml de tampão para gel (Tris-HCl 3 M, SDS 0,3 %, pH 8,43), persulfato de amônia (PSA) 0,025% (100 mg/ml), 6,1 ml de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida e TEMED 0,05%, em volume final de 30 ml para cada gel. O gel de separação (spacer gel) foi preparado com tampão de gel 10 ml, solução estoque de acrilamida 10 ml para um volume final de 30 ml com água Milli-Q. Os géis foram adicionados simultaneamente entre duas placas de vidro (sistema duplo de placas SE 250 Might Small - Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), onde o gel superior foi confeccionado usando-se 1,0 ml de solução estoque de acrilamida em 3,1 ml de gel buffer (100 μ l de PSA 100 mg/ml) e 0,1 % de TEMED, em um volume final de 12,5 ml.

As amostras foram dissolvidas em tampão constituído de 50% de glicerol 87%, 20% de tampão gel amostra, 1 g de SDS, 3 mg de EDTA e 10 mg de azul de bromophenol em um volume final de 35 ml. As amostras foram aplicadas em um volume de 25 µl. A corrida eletroforética foi desenvolvida à temperatura ambiente em tampão cátodo Tris-HCl 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25 e tampão para ânodo Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9, com duração aproximada de 3 horas sob corrente de 40 mA.

Após a corrida eletroforética o gel foi corado com Comassie Blue R-250 0,1% em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) durante 5 horas. Em seguida o gel foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na mesma proporção.

• Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo LAEMMLI (1970). Os géis de poliacrilamida foram feitos de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e gel de corrida de 12,5%, preparados a partir de uma solução de acrilamida estoque a 30% e N,N, metileno-bisacrilamida a 0,8% (Bio Rad Labs. Richimond, CA, USA) dissolvidos em água deionizada pelo sistema Milli-Q (mIlipore-Waters Co.).

O gel de corrida foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl (1,5 M-pH 8,8) contendo 0,2% de SDS para solubilização das amostras, 0,1% de N-N-N-Tetrametilediamina (TEMED) e 0,01% de persulfato de amônio para polimerização. Após a polimerização deste foi preparado o gel superior (gel de concentração) com 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 1M, ph 6,8; 0,2 % de SDS, 0,1% de TEMED e 0,01% de persulfato de amônio.

As amostras (20 a 50 μ g de proteína) foram diluídas no tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, adicionando-se 2% de SDS mais 10% de glicerol e 1% de azul de bromofenol. A redução das amostras foi feita com DDT (Sigma), numa concentração final de 0,1 M.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em sistema duplo de placas "SE 250 Might Small II" (HoeferScientific instruments), em tampão de corrida (Tris-HCl, 0,025M, glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) à voltagem inicial de 60 V até a entrada da proteína no gel de corrida e posteriormente de 100 V. Foram usados como padrão os seguintes marcadores de massa molecular, obtidos da Sigma: fosforilase b (97000 kDa), Albumina (66000 kDa), Ovalbumina (45000 kDa), Anidrase carbônica (30000 kDa), Inibidor de Tripsina (20100 kDa) e α -lactalbumina (14400 kDa).

-Coloração das proteínas por prata

As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e utilizadas seqüencialmente, conforme descrito a seguir: Solução fixadora (50%) metanol, (12%) ácido acético e (0,028%) formaldeído por 12 h; 50/5 etanol, 3 x 20 min, solução de sensibilização

(0,2/5 tiossulfato de sódio) por 1 min. DdH2O, 3 x 20s; solução de impregnação (0,2% de nitrato de prata, 0,028% formaldeído) por 20 min; ddH2O, 3 x 20s; solução reveladora (6% de carbonato de sódio, 0,4% de tiossulfato de sódio; 0,018% formaldeído) até o aparecimento dos pontos, solução de paralização (5% de ácido acético) por 10 min.

• Seqüenciamento da porção N-terminal

O seqüenciamento direto da porção N-terminal dos peptídeos obtidos pelo fracionamento do veneno em coluna Sephasil Peptide C18 5 µm St 4.6/250 foi realizado com as proteínas nativas, usando-se um seqüenciador automático (Procise F Sequencer Applyed Biosystem). Os aminoácidos marcados com feniltiohidantoina, foram identificados de acordo com seu tempo de retenção, comparando-os com aminoácidos padrão PTH .

• Análise de aminoácidos

Os aminoácidos foram separados e analisados por HPLC de fase reversa com seu derivado OPA (ortofitalldeído), baseado no método descrito por JARRET et al., (1986). Uma coluna Spherisorb ODS-2 (5mm, 4 x 250 mm) foi usada e eluída a 0,8 ml/min em um gradiente linear formado por soluções de 65% de metanol e tampão fosfato pH 7,25m (50 mM de água). O gradiente aumentou a proporção de 65% de metanol, de 20 a 60% entre 0 a 25 min, 60 a 75% de 25 a 31 min, e 75 a 100% de 31 a 50 min. O efluente da coluna foi monitorado por um detetor de fluorescência Shimadzu (modelo RF350) operando com um comprimento de onda de excitação de 250 nm e um comprimento de onda de emissão de 480 nm. Para a análise dos aminácidos Pro e Cys foi utilizado um sistema Acc-Tag da Waters adaptado para a coluna usada para OPA. O padrão de aminoácidos usado foi o S-18 da Sigma.

• Determinação da atividade fosfolipásica

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por CHO e KEZDY (1991) e HOLZER e MACKESSY (1996). O substrato foi ácido 4-nitro-3(octanoiloxi) benzóico. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 0,1 mg/ml de amostra, no caso do veneno e frações. As amostras foram incubadas junto

com o substrato, tampão de reação (Tris-HCl 0,1 M, Ca⁺² 0,01 M, pH 8) por 30 min. Após o tempo de incubação, a reação enzimática foi lida em um leitor de placas de 96 poços (SpectraMax 340 Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), em 425 nm.

Caracterização farmacológica da PLA₂ MiDCA1

• Determinação de creatino quinase (CK)

A contração de células musculares esqueléticas depende de ATP como fonte de energia, porém, o suplemento de ATP não é suficiente para sustentar a contração por um longo período de tempo. Então, para a célula estar ativa e manter a contração, o ATP precisa ser continuamente abastecido. Isto acontece através da metabolização da glicólise e da ação do ciclo do ácido tricarboxílico. Enquanto o oxigênio está disponível, a célula muscular mantém uma elevada reserva de fosfato, na forma de creatinofosfato, composto rico em energia. A enzima que vai agir sobre o creatinofosfato é a CK, presente no citoplasma da célula muscular. Sua determinação é importante em alguns diagnósticos clínicos, em casos de danos tissulares, como nas distrofias musculares e infarto do miocárdio (NAKADA et al., 1984).

Procedimento: A preparação foi exposta a tratamentos controle (solução de Krebs, 120 min) ou MiDCAI (2.4 μ M, 120 min). Alíquotas de 100 μ L foram retiradas do banho nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, com reposição de igual volume de solução nutritiva. As alíquotas serão mantidas a 4°C até o momento da dosagem enzimática, as quais foram analisadas utilizando-se o "kit" Bioclin® (Quibasa Química Básica LTDA, Brasil), para determinação dos níveis de CK, conforme orientações do fabricante.

• Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

Camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral (300 mg/kg) e posteriormente exsanguinados. Após a dissecação para a retirada do hemidiafragma esquerdo e direito e isolamento dos nervos frênicos correspondentes (BÜLBRING, 1946), as preparações foram banhadas em solução nutritiva de Tyrode (pH 7,5) areada com carbogênio (mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 ; pH 7,5) a 37°C. Cada

segmento do hemidiafragma foi fixado em uma cuba com capacidade para 5 ml, preenchida com solução nutritiva. O músculo diafragma foi mantido, por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina que se manteve em contato com a superfície da solução nutritiva. O transdutor isométrico (BG-50 g) foi acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400). A preparação, então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico, e diretamente (estimulador Grass S 48), usando-se estímulos supramaximais e freqüência de 0,1 Hz e 0,2 ms para estímulos indiretos e 2ms de duração para estímulos diretos. Após o registro em condições controle e a verificação do perfeito estado da preparação, foram adicionadas as frações para a observação dos seus efeitos.

• Preparação músculo biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de GINSBORG e WARRINER (1960). Os pintainhos foram anestesiados com hidrato de cloral (3 mg/kg) e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs de composição já descrita. A solução foi areada de modo constante com carbogênio (mistura 95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantida a 37 °C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados estímulos de até 7 V com pulsos supramaximais de 0,1 Hz de freqüência e 0,2 ms de duração para a estimulação indireta e 20 V (0,1 Hz, 2 ms), para a estimulação direta (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição de ACh (120 μ M), CCh (8 μ M) e KCl (13,4 mM) foram registradas em fisiógrafo Gould RS3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. O registro das contraturas para K⁺, ACh e CCh foram realizados com a ausência de estimulação com a toxina.

• Estudo eletrofisiológico

O registro do potencial de membrana (PM), potencial de placa terminal em miniatura (PPTM), potencial de placa terminal (PPT) foi feito em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo). A preparação com sua face torácica voltada para cima

(hemidiafragma esquerdo), foi fixada, horizontalmente, por meio de alfinetes entomológicos, em cuba revestida de resina e silicone, ("Dow Corning-Sylgard"). A cuba foi preenchida com 2 ml de solução de Tyrode de composição já descrita e a preparação mantida à temperatura ambiente e areada com o borbulhamento de carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Para a observação dos parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina de microscópio estereoscópico (WILD M7 S-SWITZERLAND) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Foi usada a técnica convencional de registro com microeletrodo (FATT e KATZ, 1951). Os microeletrodos de vidro, preparados com o auxílio do Vertical Pipete Puller (modelo 700 D-David Kopf Instruments, CA, USA), foram preenchidos com KCl 3 M, tendo uma resistência entre 15-25 M Ω . As micropipetas foram introduzidas intracelularmente (seis leituras em regiões distintas) sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador Leitz, para a medida do potencial de membrana (PM) e captação dos potenciais em de placa terminal em miniatura (PPTM). O eletrodo indiferente constitui-se de um fio de platina. Os biopotenciais foram obtidos através de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram feitos em um microcomputador (Microtec, São Paulo, SP) carregado com um software para aquisição de dados (AqDADOS, Lynx, São Paulo, SP). O computador munido de uma placa conversora A/D é capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise.

-Registro do potencial de membrana

Para a medida do potencial de mrembrana das fibras musculares, os microeletrodos foram inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio, fazendo-se a medida do deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Além disso, o potencial de membrana foi monitorado digitalmente por intermédio do software já descrito. O mesmo procedimento foi repetido em seis fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média aritmética e o erro padrão. O estudo dos efeitos induzidos pelas frações sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi feito nos tempos t₀ (controle), t₅, t₁₀, t₁₅, t₃₀, t₆₀, t₉₀, t₁₂₀ min e após a lavagem da preparação.

- Registro do potencial de placa terminal em miniatura (PPTM)

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram captados através da inserção do microeletrodo nas fibras musculares, na região da placa motora. Em cada tempo três placas motoras foram impaladas em período de 1 min e posteriormente calculou-se a média aritmética do número de potenciais registrados. Os PsPTM foram captados e observados em osciloscópio (sensibilidade 1 mV/cm). Os potenciais de placa terminal em miniatura foram então registrados e analisados em computador carregado com o software já descrito. Os parâmetros-controle foram definidos antes da adição da fração ativa. Os PsPTM foram registados antes (controle) e após t_{15} , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} min de incubação com a fração ativa.

-Registro do potencial de placa terminal (PPT)

Desacoplamento excitação contração

Para o registro dos potenciais de placa terminal torna-se necessário evitar a deflagração de potenciais de ação quando o nervo motor for estimulado para gerar o potencial de placa terminal. Para tanto submeteu-se a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo ao tratamento com solução hipertônica de glicerol.

Tal procedimento consiste em incubar a preparação por um período de cerca de 1 hora em solução nutriente tornada hipertônica (500 a 700 milimoles/litro) pela adição de glicerol e posteriormente retornar a mesma à solução nutriente isotônica. Com isso ocorre um colapso do sistema de túbulos "T", com a conseqüente interrupção do acoplamento excitação-contração muscular (GAGE e EISEMBERG, 1969). Este tratamento também causa queda do potencial de membrana celular, de forma que muitas células se apresentam com um potencial de membrana sob o qual não é possível deflagrar uma corrente degenerativa de sódio (KORDAS, 1969), assegurando assim, o registro de PsPT isentos de potenciais de ação. Os registros dos PsPT foram feitos em resposta à estimulação elétrica (supra maximal). Para tal, utilizou-se estimulação indireta por meio de eletrodo de platina posicionado de modo a sugar o coto distal do nervo frênico (1Hz por 1 min). Da mesma forma que nos outros experimentos eletrofisiológicos, o sinal passa por um amplificador (Getting Microelectrode Amplifier Model 5, MA, USA) sendo então captado pelo osciloscópio e registrado em computador.

-Análise dos PsPT

Tamanho quântico (TQ)

O tamanho quântico corresponde à despolarização promovida por um "quantum" de acetilcolina; um quantum é definido como a quantidade de acetilcolina contida numa vesícula sináptica (HUBBARD et al., 1969).

No presente trabalho o tamanho quântico foi estimado pelo método da variância (HUBBARD et al., 1969). Este método pressupõe que numa salva de PsPT gerados a uma determinada freqüência, o número de unidades quânticas que integra cada PPT varia, de PPT a PPT, segundo o processo estatístico de Poisson (MIYAMOTO, 1975). Neste caso o quociente entre a variância e a média das amplitudes dos PsPT fornece uma estimativa do tamanho quântico (ELMQVIST e QUASTEL, 1965b). Este corresponde então à "despolarização unitária" ou "despolarização quântica", ou seja, àquela unidade da qual o PPT é um múltiplo inteiro.

Desta forma, o tamanho quântico, como calculado neste trabalho, é uma maneira indireta de se obter a mesma informação que é fornecida de maneira direta pela medida dos potenciais de placa terminal em miniatura.

No presente trabalho foram utilizados, para o cálculo do tamanho quântico, de 30 a 60 PsPT gerados a 1 Hz. Em cada tempo três séries de 1 min de PsPT em diferentes placas foram registradas em cada preparação fazendo-se a média aritmética desses três registros.

-Conteúdo quântico (CQ)

O conteúdo quântico do PPT, como o próprio nome indica, corresponde ao número de "unidades quânticas" cujo somatório deu origem a esse PPT. No caso do presente trabalho, o "tamanho quântico" é a estimativa daquele valor unitário. Assim, uma vez obtido numa dada célula, esse tamanho quântico, o conteúdo quântico do PPT corresponde ao quociente entre a sua amplitude e o tamanho quântico.

Os cálculos relativos ao tamanho quântico e ao conteúdo quântico dos PsPT foram realizados após a correção dos PsPT para a somação não-linear de quanta, de acordo com a seguinte fórmula (ELMQVIST e QUASTEL, 1965b).

PPT'= [(PPT x (PM-PE)]/(PM-PE-PPT)

Em que:

PPT'= PPT corrigido

PPT= PPT observado

PE= potencial de equilíbrio, que foi considerado –5mV (MIYAMOTO, 1975)

PM= potencial de membrana

Para permitir a comparação entre células de variáveis que dependem do potencial de membrana, como a amplitude dos PsPT e o tamanho quântico, estes foram corrigidos para um potencial de membrana padrão de -65 mV.

- Registros extracelulares do potencial de ação composto de nervo ciático de camundongo

Camundongos machos BALB/c pesando entre 25-30g foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono de acordo com The United Kingdom Home office guidelines. O nervo ciático foi removido com cerca de 5-7 cm de comprimento. A preparação foi então montada em uma cubeta de registro consistindo de três compartimentos cilíndricos de 1 ml de capacidade cada. O isolamento elétrico entre os compartimentos foi feito usando-se vaselina. Os dois compartimentos externos foram preenchidos com tampão fisiológico de composição em mM: NaCl 154, KCl 5, MgCl₂1.25, glicose 11, HEPES 146 (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N¹-[2-ethanesuphonic acid], CaCl₂ 1.8, pH 7.4; e os reagentes testados foram adicionados no compartimento central de volume igual a 1 ml. Antes de cada experimento a solução foi saturada com O₂ por 30 min. A técnica extracelular padrão foi empregada para os registros do potencial de ação composto do nervo. Eletrodos do tipo pellet de prata foram mergulhados dentro de cada

compartimento da cuba de registro com a estimulação feita entre o compartimento central e um dos compartimentos externos. Os registros foram obtidos através do compartimento central. O eletrodo terra também foi mergulhado no compartimento central. Um estimulador Grass S48 foi usado para aplicação dos estímulos supramaximais (0.4 Hz, 0.04 ms de duração) através da unidade de isolamento de estímulo modelo SIU 5A (Grass Instrument Co., Quincy, Mass, USA). Os sinais foram amplificados por meio de um transdutor do tipo CED 1902 e digitalizados por meio de um conversor analógico-digital CED 1401 e registrados e analisados posteriormente através do software WinWCP 3.3 (DEMPSTER, 1988). Em cada experimento a amplitude, latência, limiar e o tempo de surgimento "rise time" dos potenciais adquiridos foram avaliados. Antes da adição dos compostos testados a preparação nervo ciático foi incubada em tampão fisiológico por 45 min sobre estimulação supramaximal constante para demonstrar a viabilidade da mesma e a consistência dos registros. O pH e a pressão osmótica foram rechecados no início e no final de todos os registros já que em experimentos preliminares foram percebidos que efeitos deletérios eram promovidos pelo alto ou baixo pH e também pela osmolaridade, no decorrer do experimento. Todas as concentrações de toxina e droga foram testadas por um período máximo de 120 min.

-Dissociação enzimática e cultura celular

Ratos recém-nascidos de 3-7 dias de ambos os sexos foram sacrificados por deslocamento cervical de acordo com as normas do UK Government Animals (Scientific Procedures) Act 1996. Os neurônios gânglionares da raiz dorsal (DRG) de todos os níveis espinais foram dissecados asceticamente e transferidos imediatamente para uma solução padrão de tampão HEPES contendo em mM: NaCl 144, HEPES 10, Glucose 10, KCl 5, CaCl₂ 2 e MgCl₂ 1 (pH 7.4). Todos os tecidos conectivos remanescentes e nervos atachados foram removidos. Os gânglios foram então transferidos para uma solução de tampão HEPES contendo 5 mg/ml de enzima dispase (TipoII) e 2.5 mg/ml da enzima colagenase (Tipo P) por 45 min a 37°C em um banho de agitação. Os gânglios então foram cuidadosamente triturados com uma pipeta de Gilson de 1 ml para induzir a dissociação mecânica do tecido. A suspensão de células foi então centrifugada a 43 G (500 RPM) por 4 min, ressuspendida e foi colocada em lamínola (13 mm de diâmetro) pré-recoberta com

lisina-poli-1 (0.1 mg/ml, PM>300.000 Da) ficando em repouso por 60 min. As células foram finalmente banhadas em um meio modificado L-15 contendo 10% de soro bovino, NaHCO₃ (26 mM), glicose (30 mM), penicilina (30 μ g/ml) e estreptomicina (30 μ g/ml). Citosina arabinonofuranosídeo (10 μ M) foi adicionada para reduzir o crescimento de células, bem como um fator de crescimento neuronal (NGF) (10 ng/ml). As células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada a 100% e areada a 95% O₂ e 5% CO₂ e foram usadas durante o período máximo de 1 dia.

- Técnica de whole-cell patch-clamp

Foi usada a técnica de whole-cell patch-clamp, uma variante da técnica de "tight seal" (HAMILL et al., 1981) para os registros das correntes de Na⁺ e K⁺ usando-se a cultura de células de neurônios gânglionares da raiz dorsal (dorsal root ganglia neurons, DRG). A composição das soluções externa e interna para ambos os registros de correntes de Na⁺ e K⁺ estão descritas a seguir:

Solução externa para correntes de K⁺ (em mM): NaCl 140, KCl 2.5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, HEPES 20, Glicose 10, Sucrose 23.5 pH 7.2 corrigido com NaOH.

Solução interna para correntes de K⁺ (em mM): K-gluconate 100, MgCl₂ 2, EGTA 1, HEPES 5, Sucrose para 320 mOsm, pH 7.2 corrigido com KOH.

Solução externa para correntes de Na⁺ (em mM): NaCl 43.3, KCl 7.5, MgCl₂ 2.12, CaCl₂ 2.1, HEPES 10, TEA-Cl 165.7, 4-AP 0.5, CsCl 168.4, CdCl₂ 0.02, pH 7.2 corrigido com NaOH.

Solução interna para correntes de Na⁺ (em mM): CsF 140, EGTA 1, NaCl 10, HEPES 10, pH 7.3 corrigido com CsOH. Os microeletrodos foram fabricados com capilares de borosilicato (Clarck Electromedical Instruments, Pangbourne, Reading, UK) e exibiam uma resistência de 1.5-3 m Ω quando preenchidos com a solução interna. Os experimentos foram feitos à temperatura ambiente (22-25 °C). O voltage-clamp foi feito usando-se um amplificador de patch-clamp modelo EPC-7 (List electronic, Darmstadt, Germany). Os registros de corrente foram feitos imediatamente após a aplicação da toxina e os registros adquiridos por meio de pulsos de corrente controlados e registrados usando-se um

computador Viglen 486-DX carregado com o software WCP 3.30 (DEMPSTER, 1988) conectado ao amplificador EPC-7 através de uma placa de interface (National Intrusments Labmaster PC/PC + board). As células de DRG foram mantidas a um potencial de –40 a - 60 mV respectivamente entre os protocolos de pulso. As correntes capacitivas foram compensadas usando-se um circuito análogo, combinado com a subtração das correntes de vazamento "leakage currents" utilizando-se um protocolo de subtração do tipo P-4.

• Análise estatística

Conforme necessário, os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Para os experimentos miográficos, a análise estatística foi feita com base no método ANOVA/MANOVA para medidas repetidas, e para os demais experimentos o teste "t"de Student. Os resultados foram considerados significantes quando p \leq 0,05.

3.4- RESULTADOS

• Estudo bioquímico

3.4.1- Ensaio cromatográfico em HPLC de coluna fase reversa Sephasil Peptide C 18

O veneno total foi dissolvido em 40 µl de bicarbonato de amônio completandose o volume para 100 µl com ATF 0,1% (Solvente A), centrifugado, descartando-se o precipitado e usando-se o sobrenadante. Em seguida foi eluído, usando-se um gradiente linear de ACTH 66% em 0,1% de ATF (Solvente B). Foram obtidos 22 picos principais (Figura 6). A atividade fosfolipásica foi evidenciada para os picos 11 e 16. Apenas o pico 16 promoveu atividade neurotóxica e fosfolipásica em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Na Figura 7 vê-se a medida da concentração protéica para as toxinas de interesse.



Figura 6- Perfil cromatográfico obtido pelo fracionamento do veneno de *M. d. carinicauda* em coluna Sephasil Peptide C 18 5 μm ST 4.6/250 eluído em gradiente linear do tampão B (ACTH 66 % em ATF 0,1%) com o tampão A (ATF 0,1%). Note a obtenção de 22 picos principais. * atividade neurotóxica e fosfolipásica; ACTH: acetonitrila; ATF: ácido trifluoroacético

3.4.2- Concentração protéica por Lowry



Amostras			Média	Branco	Med (-) Br	Resultado	
P11	0,228	0,228	0,2280	0,062	0,1660	24,1	µg/20µ1
P16	0,367	0,381	0,3740	0,062	0,3120	51,1	µg/20µ1

Figura 7- Gráfico da concentração protéica por Lowry. P11: pico 11, P16: pico 16.[BSA]: bovine serum albumine.

3.4.3- Ensaio cromatográfico em HPLC de coluna fase reversa C18 de alta eficiência

A fração correspondente ao pico 16 eluída da cromatografia do veneno total em coluna Sephasil Peptide C 18 5 μ m ST 4.6/250 (Pharmacia) em HPLC de fase reversa foi submetida a uma recromatografia em coluna analítica C18 μ Bondapack 3.9 x 300 mm (Waters). Para este protocolo utilizou-se um gradiente descontínuo de 0-100% de solução de acetonitrila em 0,1% de ATF pH 2,5. Apenas um pico principal foi obtido deste processo cromatográfico sugerindo a pureza da toxina (Figura 8).

3.4.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina (SDS-Page)

A fração ativa (PLA₂) correspondente ao pico 16 obtida da cromatografia do veneno total de *M. d. carinicauda* em coluna Sephasil Peptide C 18 5 μm ST 4.6/250 eluído em gradiente linear do tampão B (ACTH 66 % em ATF 0,1%) com o tampão A (ATF 0,1%) também foi submetida à análise do perfil de peso molecular em gel de poliacrilamida em tricina 10% (Figura 8). Na pista eletroforética **MK** tem-se os marcadores de massa molecular: fosforilase (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa). A neurotoxina PLA₂ correspondente ao pico 16 foi denominada MiDCAI e mostrou a presença de uma única banda protéica com massa molecular de aproximadamente 15 kDa confirmando a sua pureza.



Figura 8- Eletroforese em gel de tricina (10%) em SDS da subfração correspondente ao pico 16 purificada em equipamento de HPLC em coluna C18 μBondapack 3.9 x 300 mm, que contém uma única banda protéica como mostra a pista eletroforética da esquerda, com massa molecular aparente de 15 kDa. Na pista da direita estão os marcadores de massa molecular já descritos. MK: marcadores; *pico correspondente a neurotoxina MiDCAI; PLA₂: MiDCAI.

3.4.5- Análise de aminoácidos

A neurotoxina MiDCAI foi submetida à hidrólise ácida (HCl 6N) e à derivatização para obtenção da composição global de aminoácidos que é mostrada na Tabela 1 e Figura 9. O peso molecular calculado é de 15557 e está próximo ao resultado, determinado em gel de poliacrilamida. A análise da composição global de aminoácidos evidenciou uma alta presença de Asp, Cys, Lys, Thr, Tyr, Gly e Ala em comparação com outros resíduos. O PI desta toxina é de 7,94. Não foram determinados resíduos de triptofano pelo processo empregado e outros testes como o de fluorescência não foram utilizados.

Tabela 1- Composição de aminoácidos da neurotoxina fosfolipásica A₂ (MiDCAI), isolada a partir do veneno total de *M. d. carinicauda*. A composição é expressa em moles de resíduo por moles de proteína e expressa como porcentagem molar. **n.d:** significa não determinado; **PM Aa:** peso molecular de cada aminoácido; PM: peso molecular total de cada aminoácido.

	PLA2 MiDCAI	%	PM Aa	PM
Asp	20	17,06	133	2660
Glu	6	5,66	147	882
Ser	4	2,70	105	420
Gly	8	3,85	75	600
His	1	0,99	155	155
Arg	4	4,47	174	696
Thr	10	7,64	119	1190
Ala	8	4,57	89	712
Pro	5	3,69	115	575
Tyr	8	9,30	181	1448
Val	4	3,00	117	468
Met	2	1,91	149	298
Cys	14	10,88	121	1694
Ile	4	3,36	131	524
Leu	6	5,05	131	786
Phe	5	5,30	165	825
Lys	11	10,32	146	1606
Trp	0	n.d.	204	0
Total	120			15557

PI=7.9

3.4.6- Seqüenciamento completo da PLA2 neurotóxica MiDCA1

A neurotoxina MiDCAI purificada em cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C18 µBondapack 3.9 x 300 mm foi submetida ao seqüenciamento da porção N-terminal o que permitiu se determinar a estrutura primária completa da toxina. Duzentos pMoles de proteína intacta após redução e alquilação foram submetidos ao seqüenciamento onde foram determinados 120 resíduos da cadeia polipeptídica.

A estrutura primária completa foi obtida pelo seqüenciamento e sobreposição dos peptídios obtidos do tratamento da proteína com CNBr (Brometo de cianogeno) e com Clt (Clostripaina). A Figura 9 mostra que CNBr-3, CNBr-1, Clt-4, Clt-3 e Clt-5 foram os peptídeos mais importantes para a conclusão da seqüência.



Figura 9- Seqüência completa dos 120 resíduos de aminoácidos da fosfolipase A₂ MiDCAI.

Ácido Aspártico	Asp	D
Àcido Glutâmico	Glu	Ε
Alanina	Ala	Α
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	Ν
Cisteína	Cys	С
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Isoleucina Leucina	Ile Leu	I L
Isoleucina Leucina Lisina	Ile Leu Lys	I L K
Isoleucina Leucina Lisina Metionina	Ile Leu Lys Met	I L K M
Isoleucina Leucina Lisina Metionina Prolina	lle Leu Lys Met Pro	I L K M P
Isoleucina Leucina Lisina Metionina Prolina Serina	Ile Leu Lys Met Pro Ser	I L K M P S
Isoleucina Leucina Lisina Metionina Prolina Serina Tirosina	Ile Leu Lys Met Pro Ser Tyr	I L M P S Y
IsoleucinaLeucinaLisinaMetioninaProlinaSerinaTirosinaTreonina	Ile Leu Lys Met Pro Ser Tyr Thr	I L K M P S S Y T
IsoleucinaLeucinaLisinaMetioninaProlinaSerinaTirosinaTreoninaTriptofano	Ile Leu Lys Met Pro Ser Tyr Thr Thr	I L M P S Y T W
IsoleucinaLeucinaLisinaMetioninaProlinaSerinaTirosinaTreoninaValina	Ile Leu Lys Met Pro Ser Tyr Thr Thr Trp Val	I L K M P S S Y T T W

Tabela 2- Lista de abreviações de aminoácidos. Em destaque (cinza), as abreviações já convencionadas, as quais foram utilizadas neste trabalho.

3.4.7- Comparação da seqüência da toxina MiDCAI com as de outras neurotoxinas fosfolipásicas A₂

A análise da seqüência de aminoácidos da PLA₂ (MiDCAI) mostrou se tratar de uma PLA₂ do tipo ASP(D)49. Assim, a MiDCAI mostra uma grande homologia seqüencial e estrutural com as PLA₂ PA2B e PA2A MICNI do veneno de *Micrurus nigrocinctus*. Tanto a MiDCAI como as outras mostram grande homologia na região de ligação do cálcio, sítio catalítico (resíduos 25-52). As regiões de menor variação são o N-terminal e Cterminal (Figura 10).

	11	t					
	1	10	20	30	40	<u> </u>	<u> </u>
MIDCA1	NKIDFLNMI	OCTTPGRE	PLVAFTNYGC	YCGKGGS	GTPVDELDR	.ссотнрису	DTAKKVFG
MIChI A*	.LK	<i>к</i> н	W- S	Y	к	ĩvк	H
MICNI B*	.LYQLK	КМ-Т.Н	WS		к	vĸ	H
NAJMO*	.LYQ.K	HV.S.P	WWHFAD	RK	AD	v	GE.E.L
NAJOX*	.LYQ̃.K	KV.S.S	W.DFA	R	D		NEAG.IS.
NOTSC**	.LVQ.S	ANH.SR	.SL.YAD	SA		KTD.	AR.T.SYS
BUNMU**	.LYQ̃FK	V.AG-TR.	WIGYV	A		YV	GE.E.IP.
OXYSC***	.LLQ.GF	R.ANRRSR	.VWHYMD	к		E	GE.VRR
OXYSC2***	'.LVQ.GK	E.AIRN.R	.ALDFM		D	E	AE.E.HG-
NAJME***	.LYQ.K	HV.NRS	WWHA	R	D	<u></u>	GEAE.IS.
	Regiao N-te	rminai	Ca	binding lo	op Sitio	Catalitico	Sitio anti-
				t t	11	11 1	11
	6 <u>1</u>	7 <u>0</u>	<u>80</u>	90	100	110	<u>12</u> 0
MIDCA1	CSPYFTM	YSYD-CSE	GKLTCKDTNN	ĸckaavci	VCDRTAALC	FAKAPYND	NYNIDLTKRCO
MICNI A*	СКSМ	–	N.T	DF		N.	FKPG
MICNI B*	СКSМ	–	N.T	DF		N.	.FKPG
NAJN 10*	L.L	.K.EQ	SGG	E	LVN.	GI.A	AVN.KE
NAJOX*	WKT	'E−Q̃	.TGD	S.A.SI)LI.	GNE)N.KAR
NOTSC**	-N.TW.L	WQI.	KTPDSKTG	QRFI)AK.	KE	3PK
NOTSC** BUNMU**	-N.TW.L KTKT	WQI. 'TTK	KTPDSKTG PNT.AAG	QRFI T.ARII	DAK. DTI.	KE	I.FM.SSSTH
NOTSC** BUNMU** OXYSC***	-N.TW.L KTKT AW.L	WQI. 'TTK SWKG	KTPDSKTG PNT.AAG KAPNTKTR	QRFI T.ARII QRFI	DAK. DT.I. RAKE.		I.FM.SSSTH S.W.NTKA.R
NOTSC** BUNMU** OXYSC*** OXYSC2***	-N.TW.L KTKT AW.L *Y.SL.T	WQI. 'TTK .SWKG '.TWERQ	KTPDSKTG PNT.AAG KAPNTKTR VGPY.NSKTQ	QRFI T.ARII QRFP EVFP	DAK. DT.I. RAKE. AFAK.		:PK I.FM.SSSTH S.WNTKAR AHSNTGEK
NOTSC** BUNMU** OXYSC*** OXYSC2*** NAJME***	-N.TW.L KTKT AW.L *Y.SL.T WIKT	WQI. TTK .SWKG .TWERQ .TS.QG	KTPDSKTG PNT.AAG KAPNTKTR VGPY.NSKTQ TLTS.GAA	QRFI T.ARII QRFI EVF <i>I</i> A.SI	DAK. DTI. RAKE. AFAK. DVN.		I.FM.SSSTH. J.FM.SSSTH. S.W.NTKA.R AHS.NTGE.K

coagulante β-Wing Sítio neurotóxico

Domínio C-terminal

Figura 10- Homologia comparativa da seqüência completa de aminoácidos da MiDCAI com a

de outras fosfolipases A_2 . A parte destacada em azul representa a região de uma seqüência invariável entre as diferentes fosfolipases A_2 .

3.4.8- Atividade fosfolipásica

A atividade das PLA₂ de *M. d. carinicauda* foi examinada à temperatura de 37 °C usando-se o substrato sintético cromogênico 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoic acid (HOLZER e MACKESSY, 1996). Na Figura 11 mostra-se um ensaio padrão em que a atividade fosfolipásica foi determinada para o veneno e para as subfrações (6, 7, 11) e para a neurotoxina MiDCAI obtidas pelo fracionamento do veneno de *M. d. carinicauda* em coluna Sephasil Peptide C 18 5 μ m ST 4.6/250 eluído em tampão A (ATF 0,1 %) em gradiente linear do tampão B (ACTH 66 % em ATF 0,1%).



Figura 11- Cinética da atividade fosfolipásica do veneno total de *M. d. carinicauda* (VT), fração 6 (F6), fração 7 (F7), fração 11 (F11) e MiDCAI obtidas do fracionamento do veneno total em HPLC de coluna fase reversa Sephasil Peptide C 18 5 μm ST 4.6/250. Os valores são a média de duplicatas na concentração de 1 μg/μl.

3.4.9- Determinação da atividade enzimática de creatino quinase (CK)

A determinação dos níveis de CK liberada no meio de incubação usando-se a dose de 2.4 μ M para a PLA₂ MiDCAI foi obtida por meio de alíquotas retiradas do líquido presente no banho. Todos os músculos *biventer cervicis* incubados com a toxina ensaiada não exibiram alteração significativa nos valores de CK, em relação ao valor controle (Figura 12).



Tratamento	n	0	15	30	60	90	120
/ Tempo (min)							
	1	16,19	5,396	13,497	18,888	21,586	21,586
	2	5,396	5,396	10,793	0,000	5,396	8,085
Controlo	3	2,698	0,000	21,586	10,793	2,698	2,698
Controle	4	2,698	2,698	5,39	8,095	8,085	5,396
	5	18,88	10,793	10,793	8,095	10,793	10,793
	6	8,095	13,491	8,095	5,396	2,698	2,698
Média		8,99	6,29	11,69	8,54	8,54	9,00
E.P.M.		2,84	2,05	2,27	2,55	2,90	2,3
	1	8,095	8,095	0	35,078	13,49	13,49
	2	2,698	2,698	5,396	2,698	8,095	13,491
MiDCAI	3	5,396	2,698	8,095	16,190	5,396	5,396
(2.4 μM)	4	0,000	10,793	8,095	5,396	18,888	19,00
	5	5,396	8,095	5,396	10,793	13,491	8,095
Média		4,32	6,47	5,40	14,03	11,87	8,54
E.P.M.		1,37	1,62	1,48	5,75	2,35	2,20

Figura 12- Liberação de CK induzida pela PLA_2 neurotóxica MiDCAI. No gráfico cada ponto representa a média \pm erro padrão de 5 a 6 experimentos. E.P.M: erro padrão da média.

• Estudo miográfico

3.4.10- Preparação biventer cervicis de pintainho

-Estimulação elétrica indireta

A neurotoxina PLA₂ MiDCAI foi ensaiada em quatro diferentes concentrações (0.3, 0.6, 1.2 e 2.4 μ M) a 37 °C sob estimulação elétrica indireta. O bloqueio neuromuscular mostrou-se invariavelmente irreversível e dependente da concentração (Figura 13). Dentre todas as concentrações utilizadas somente as concentrações de 0.3 e 0.6 μ M não foram estatisticamente diferentes entre si.

Na concentração de 1.2 μ M observou-se uma significativa inibição da resposta contrátil a partir dos 20 min (p<0,05) a qual atingiu 35 ± 3% (n=6) em 120 min de incubação. Com 2.4 μ M (n=6) de fração obteve-se bloqueio total sem ocorrência de contratura (Figura 13). Nesta concentração o tempo para obtenção de 50 % de bloqueio foi de 30 ± 5 min. Em apenas um experimento foi observada facilitação que se caracterizou por um aumento da força de contração muscular já aos 15 min de observação e que precedeu o bloqueio irreversível. As concentrações de 0.3 e de 0.6 μ M (n=6) determinaram bloqueio neuromuscular de 16 ± 6% e de 25 ± 10% respectivamente; estes níveis de bloqueio não foram significativamente diferentes do controle (Figura 13).

-Resposta contraturante à ACh, CCh e KCl

A incubação da preparação com a PLA_2 MiDCAI reduziu de modo significativo a resposta contraturante à acetilcolina nas concentrações de 1.2 e 2.4 μ M (Figura 14) e determinou um aumento da resposta contraturante ao carbacol em todas as concentrações ensaiadas. A PLA_2 MiDCAI não interferiu significativamente sobre as respostas ao potássio (Figuras 13 e 14).

-Estimulação elétrica direta

A preparação *biventer cervicis* de pintainho foi submetida à estimulação direta durante 120 min de incubação com a PLA₂ MiDCAI. O bloqueio ao estímulo direto foi discreto e não seguiu estritamente o padrão dose-efeito (Figura 15).



Figura 14- Gráfico representativo do efeito da fosfolipase A₂ neurotóxica MiDCAI às respostas aos agonistas ACh (110 μ M), CCh (8 μ M) e KCl (20 mM) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, a 37 °C, após 120 min de incubação (média ± erro padrão de 6 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle 100%). As preparações foram incubadas com as concentrações de toxinas em μ M indicadas sob cada barra do gráfico. *p<0,05 em comparação com o controle Krebs.



Figura 15- Gráfico representativo do efeito da fosfolipase A₂ neurotóxica MiDCAI em preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica direta, a 37 °C, após 120 min de incubação (média ± erro padrão de 6 experimentos), em comparação com aquelas obtidas somente com Krebs (controle 100%). As preparações foram incubadas com as concentrações de PLA₂ em µM indicadas sob cada barra do gráfico. *p<0,05 em comparação com o controle Krebs.</p>

3.4.11- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

Estimulação elétrica indireta

A preparação nervo frênico-diafragma de camundongo mostrou-se menos sensível à ação bloqueadora neuromuscular da PLA₂ MiDCAI em comparação com a preparação de ave quando submetida a estímulo elétrico indireto. Porém, observou-se um aumento da força de contração muscular e leve contratura que precederam o bloqueio parcial irreversível, o que não foi observado em preparação de ave. Assim, para a concentração de 0.6 μ M houve uma facilitação de 6 ± 5% aos 20 min e um bloqueio máximo de 20 ± 8% (n=4) em 120 min de observação. O efeito induzido por esta toxina em preparação nervo-músculo de camundongo também demonstrou ser concentração dependente. Dessa maneira quando ensaiada na concentração de 1.2 μ M e 2.4 μ M induziu também uma facilitação (11 ± 2% e 30 ± 2%) já aos 10 min que precedeu o bloqueio parcial irreversível (40 ± 8% e 45 ± 7%) respectivamente em 120 min de observação (Figura 16).

Estimulação elétrica direta

À semelhança do que ocorreu com a preparação de ave também houve um bloqueio significativo da força de contração muscular em resposta a estímulo direto. Desta maneira quando a toxina foi ensaiada na concentração de 1.2 μ M (n=4) induziu um bloqueio de 55 ± 7% em 120 min de observação (p<0,05) (Figura 17).
Capítulo 1



Figura 17- Gráfico representativo do efeito da PLA₂ MiDCAI em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estimulação elétrica direta, a 37 °C, após 120 min de incubação (média ± erro padrão de 6 experimentos), em comparação com os registros obtidos somente com Tyrode (controle 100%). As preparações foram incubadas com 2.4 μM de toxina. *p<0,05 em comparação com o controle Tyrode.

• Estudo eletrofisiológico

3.4.12- Medida e análise do potencial de membrana (PM)

As medidas do PM de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo em solução nutritiva (controle Tyrode) e de preparações incubadas com a PLA₂ MiDCAI foram obtidas nos tempos (t) t_0 , t_5 , t_{10} , t_{15} , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} na região da placa terminal e distante dela (fibra muscular) (Figura 18). O tempo de observação adotado está relacionado ao tempo de observação usado nos experimentos miográficos.

- 1. Tyrode (n=3): preparações controle comportaram-se de modo homogêneo mantendo os valores dos PM ao longo de 120 min, dentro do esperado $(-82 \pm 0.4 \text{ mV})$ (Tabela 3).
- MiDCAI 0.6 μM (n=4): as preparações incubadas com a PLA₂ MiDCAI quando comparadas ao controle Tyrode mostraram alteração significativas dos valores do PM somente a partir dos 60 min, em ambas as regiões: placa (RP) e fora de placa (FP) (*p<0,05) (Tabela 4).
- 3. MiDCAI 1.2 μ M (n=4): quando as preparações foram tratadas com esta concentração de toxina observou-se um progressiva e acentuada despolarização da membrana a partir dos 10 min (*p<0,05) (Tabela 5), com valores de -17 ± 0,5 mV e -55 ± 0,6 mV (t₁₂₀ min, nas regiões de placa e fora da placa, RP e FP, respectivamente). Já a partir dos 5 min notou-se um grande número de fasciculações que se mantiveram no decorrer dos 120 min de observação.
- 4. MiDCAI 1.2 μ M em Tyrode Ca⁺² 0.9 mM (n=4): quando a concentração do Ca⁺² da solução de Tyrode foi diminuída houve uma diminuição significativa nos níveis de despolarização com valores de -76 ± 0.2 mV e -74 ± 0.3 mV (t₁₂₀ min nas regiões de placa e fora de placa, RP e FP respectivamente, p<0,05). Com este tratamento não foram observadas as fasciculações (Tabela 6 e Figura 19).

- 5. MiDCAI 0.6 μ M + Carbacol 4 μ M (n=3): quando carbacol foi associado à toxina houve um aumento significativo no nível de despolarização na região de placa chegando a valores de -65 ± 06 mV e -71 ± 0,5 mV (t₁₀ min RP e FP respectivamente) (Tabela 7), o qual foi superior aos valores obtidos somente com o CCh 8 μ M (-77 ± 05 mV e -76 ± 0,7 mV, t₁₀ min RP e FP respectivamente) *p<0,05 (Tabela 8 e Figura 19).
- 6. MiDCAI 1.2 μ M 30 min após TTx 0.2 μ M (n=3): a TTx foi usada para bloquear os canais de sódio controlados por voltagem, não bloqueando o influxo de sódio dos canais associados ao receptor nicotínico ativados pela acetilcolina. Nestes experimentos verificou-se uma diminuição significativa no nível de despolarização produzido pela toxina tanto na região de placa quanto fora de placa. Em t₁₂₀ os valores do PM foram $-70 \pm 0,3$ mV e $-71 \pm 0,6$ mV em RP e FP, respectivamente. Também não se verificaram fasciculações (Tabela 9 e Figura 19).
- 7. MiDCAI 1.2 μ M 15 min após d-Tc 3 μ M (n=3): nesta série de experimentos os receptores nicotínicos da placa terminal foram bloqueados com d-Tubocurarina para verificar se haveria alguma proteção contra a despolarização na região de placa terminal e para comprovar o efeito despolarizante na fibra muscular. Verificou-se que não houve proteção significativa contra a despolarização induzida pela MiDCAI. Assim em t₁₂₀ os valores do PM foram -32 ± 0,9 mV e -54 ± 0,7 mV em RP e FP, respectivamente (Tabela 10 e Figura 19).

Tabela 3- MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO(-mV) CONTROLE TYRODE (n=3)

n	t	0	t	5	t1	10	t1	15	ť	30	te	60	ts	90	t1	20		
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
	90	81	78	80	78	80	81	80	81	75	84	85	78	81	81	84	78	85
	79	77	78	82	79	84	83	72	81	83	78	80	78	74	80	89	82	84
1	78	83	80	84	80	72	82	84	79	74	73	77	80	76	77	81	84	86
1	80	81	84	84	84	76	80	84	81	75	85	79	78	79	80	82	80	85
	82	88	83	80	80	83	80	79	79	78	80	79	80	74	78	88	85	77
	82	80	79	85	81	79	78	76	80	77	83	78	79	80	82	79	79	77
																		-
	71	79	81	94	83	99	97	96	86	74	76	78	76	75	76	73	94	84
	76	74	77	99	96	93	92	100	77	68	76	82	84	79	83	72	91	92
2	72	79	76	94	94	93	100	84	73	86	82	92	81	95	70	82	78	84
4	78	79	73	97	94	78	82	96	83	75	74	77	91	78	76	85	83	88
	72	79	73	81	89	100	94	97	74	82	80	83	76	77	74	78	94	90
	72	81	77	90	84	95	99	76	85	72	84	87	80	75	75	79	70	79
		-						-			-		-	-				
	81	78	87	77	86	79	79	79	77	81	88	78	69	81	96	84	96	90
	83	92	85	78	71	82	72	80	83	76	77	81	77	86	98	79	88	89
3	80	88	75	79	88	72	82	76	73	86	73	71	95	72	97	97	85	89
5	85	82	82	82	86	80	88	73	72	78	82	75	84	95	96	80	76	94
	80	83	74	79	79	88	79	84	73	74	78	73	77	91	82	96	80	97
	83	83	83	81	83	75	81	72	76	78	73	85	85	86	83	70	76	91
MÉDIA	79	82	79	85	84	84	85	83	79	77	79	80	80	81	82	82	83	87
E.P.	0,281	0,24	0,234	0,384	0,354	0,492	0,448	0,498	0,243	0,2647	0,255	0,284	0,326	0,393	0,476	0,403	0,395	0,306

n	1	0	t	5	t	10	ť	15	ť	30	t	60	ť	90	tl	20	l	L
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
	97	72	88	88,9	98	89,8	83,9	62	74	86	77,4	75,4	92,9	57,8	67,3	70,3	35,8	23,8
	90	82	92,9	76	44,5	81,9	58,9	81,4	93	79,4	69,8	35,3	81,9	74,9	71,3	30,3	74,4	91,4
1	84	92	82,9	87	88	52,8	80,8	77,4	80	79,3	76,4	69,3	78,4	75,9	76,9	77,9	69,3	83,4
1	90	89	98,9	88,9	80,9	85,3	53,8	67,4	88	91	69,3	73,4	63,3	69,8	80,9	8,7	41,8	78,4
	91	86	87	82,9	79	83,9	83,9	67,7	91	82,9	76,4	76,9	70,3	76,4	80,4	70,8	45,8	82,9
	89	77	85,4	76,8	71,9	88,9	90	70	78	69,3	84,4	74,9	70,3	73,9	57,8	73,8	41,8	85,4
	78,4	85,4	89,9	92,4	90,9	88,4	89,4	87,4	84,4	62,3	83,9	10,2	82,9	82,9	60,8	22,3	89,9	13,8
	91,9	75,9	81,9	80,9	93,4	88,4	97,9	55,8	82,9	74,3	78,9	13,3	78,9	23,8	49,3	44,3	61,3	55,3
2	75,9	76,9	97,4	50,3	74,2	23,8	86,4	88,9	88,9	81,4	59,8	28,3	85,9	51,3	83,4	28,3	70,3	70,4
-	79,9	92,9	92,4	88,4	84,4	82,9	100	32,3	85,4	68,3	77,9	79,9	93,4	17,8	32,3	41,8	82,4	30,3
	80,9	88,4	73,4	94,4	96,4	66,8	78,4	79,4	75,4	52,8	93,4	65,8	83,9	84,4	46,3	33,8	92,4	8,7
	95,9	84,4	86,4	80,9	88,4	81,4	95,4	34,8	67,3	13,8	46,3	70,8	71,8	69,8	62,3	24,3	74,4	53,3
	86,4	85,9	83,4	90,9	71,9	28,3	79,5	76,4	90,9	76,4	70	44,8	81,4	52,3	60	74,9	79,4	43,3
	80,4	81,4	85,4	80,9	86,9	96,4	76,4	84,4	65,8	88,4	72,9	43,8	79,4	75,6	78	50,9	38,8	34,3
3	89,4	70,3	80,4	78,4	86,9	77,9	63,8	83,9	78,4	80,4	67,8	77,9	76,4	59,3	73,4	35,3	30,3	39,8
· ·	80,9	92,4	70,8	80,9	95,4	77,4	77,4	55,3	73,4	70,3	68,7	51,8	81,4	59,8	64,3	23,3	65,3	93,4
	75,4	77,9	76,4	71,9	86,9	80,4	86,9	80,4	80,4	60,3	71,4	71,9	80,9	50,3	64,3	66,3	51,8	77,9
	73,9	86,9	72,4	75,4	90,4	80,9	76,4	73,9	80,4	73,9	72,9	81,9	79,4	50,3	50,3	42,8	43,8	35,8
		01.6	- 0 ·			·	·	(2.6	60.6		- 0 ·		- 0 ·		(7)		-0.6	
	75,9	81,9	78,4	73,9	78,9	77,4	72,4	63,3	69,3	78,9	78,4	64,3	78,4	73,4	65,3	74,4	78,9	44,3
	78,4	72,4	81,4	83,4	78,4	90,4	72,4	76,9	75,9	70,9	68,8	70,3	78,4	75,9	60,3	73,4	79,8	103,4
4	74,9	72,9	80,9	70,3	72,9	61,8	72,9	65,8	72,9	68,3	70,3	79,4	74,9	73	57,3	58,3	91,4	57,8
	79,8	72,9	75,9	79,4	74,9	70,3	73,3	100	73,4	69,3	72,4	70,3	73,4	73,9	65,8	72,9	80,4	95,6
	81,4	70,8	69,3	70,3	86,9	65,8	78,9	90,4	82,9	89,4	64,3	71,9	69,8	69,8	62,8	66,3	60,3	77,9
	72,4	80,4	77,9	88,4	76,9	73,4	73,9	66,8	66,8	77,8	69,3	85,4	64,3	76,9	46,8	75,4	93,4	55,3
	m	04	e	<u> </u>	<u> </u>		_		_			0	_	(-	0			6
MEDIA	83	81	83	80	82	75	79	72	79	73	73	62	78	65	63	52	66	60
E.P.	0,3	0,301	0,331	0,395	0,473	0,754	0,47	0,674	0,333	0,653	0,376	0,896	0,312	0,705	0,52	0,911	0,829	1,142

Tabela4-MEDIDADOPOTENCIALDEMEMBRANAEMREPOUSO(-mV)MiDCAI 0.6 μM (n=4)

n	t	0	t	5	t	10	t	15	ť	30	t	60	ť	0	t1	20	I	
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
	74,4	77,9	76,4	84,9	55	54,8	42,3	60,3	44,3	65,3	35,3	56,3	12	49,3	2,2	75,9	23,8	67,3
	84	78,4	77,4	78,9	40,8	80,4	73,4	71,4	38,8	68,3	17,8	73,4	6,2	58,8	9,7	76,4	13,3	54,3
1	74	76,4	70,8	73,4	81,9	58,8	72,4	73,4	62,3	72,3	35,8	69,3	5,7	71,4	32,9	67,3	11,3	66,8
1	75,4	80,9	72,4	72,9	76,4	81,4	46,8	65,8	53,3	48,3	32,3	62,3	9,7	41,3	42	34,3	13,8	43,8
	73,4	76,4	71,4	77,4	77,4	76,9	41,3	68,8	69,8	70,8	25,3	53,6	32,3	34,8	12,8	63,3	23,8	60,3
	81	80,9	69,8	82	45,3	65,8	50,8	56,3	11,8	62,3	35,8	64,3	23,3	60,3	8,7	67,3	13,3	36,3
	70,3	84,9	79,4	76,9	75,4	72,4	72,9	57,8	74,4	65,3	38,8	61,3	62,3	52,3	14,3	69,3	23,8	55,8
	76,9	75,9	74,4	71,9	82,4	72,4	76,9	80,4	77,9	55,8	76,6	67,8	46,3	54,3	13,3	50,8	13,3	44,3
2	80,4	80,9	77,4	74,4	72,4	68,3	76,9	56,8	69,3	72,4	47,8	40,8	36,3	64,8	21,3	61,3	11,3	67,3
2	81,9	84,9	80,4	56,3	84,4	40,8	78,9	78,9	72,9	70,3	70,8	46,8	54,3	64,3	5,7	56,3	13,8	37,8
	81,4	82,9	74,4	70,3	79,9	76,9	82,9	68,8	62,9	48,8	58,3	67,3	68,8	64,8	11,3	56,8	9,7	64,8
	91,4	96,2	79,9	60,8	89,9	78,4	67,8	68,8	78,9	69,8	74,4	51,8	45,3	44,3	17,8	52,8	20,3	40,8
	84	86,4	41,2	84,4	20,3	79,9	72,4	76,3	26,9	64,8	55	47,8	29,3	46,8	5,2	51,3	5,2	65,3
	85	83,4	19,8	70,8	81,4	63,8	81,4	43,3	8,7	51,8	18,8	43,8	71,4	64,3	12,8	38,3	28,3	51,8
2	90	82,9	69,3	66,3	45,8	48,8	34,8	42,3	7,7	67,8	35,3	53,3	51,8	41,3	47,8	67,3	20,8	67,3
3	81,9	87,4	61,8	72,4	64,3	66,3	66,8	70,3	10,7	70,8	29,3	44,3	26,8	45,8	17,3	32,3	10,8	69,3
	90,9	87,9	24,8	79,4	76,9	41,3	33,8	56,3	22,8	39,3	54,3	31,3	52,3	39,3	13,8	35,3	6,2	77,4
	81,4	80,4	9,7	75,9	80,4	52,3	66,8	48,3	59,8	53,3	69,3	32,3	48,3	51,8	12,8	40,3	4,2	59,3
MÉDIA	81	83	63	74	68	66	63	64	47	62	45	54	38	53	17	55	15	57
E.P.	0.255	0.211	0.94	0.311	0.792	0.556	0.698	0.481	1.095	0.416	0.79	0.522	0.877	0.444	0.512	0.6	0.294	0.511

Tabela 5- MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV) MiDCAI 1.2 μM (n=3)

n	t	0	t	5	t	10	t	15	ť	30	t	60	ť	0	t1	20]	[]
	RP	FP																
	75,4	85,9	90,4	82,4	64	92,8	86,4	74,9	93,4	90,4	76,9	70,8	75,9	68,3	77,8	77,8	62,3	78,9
	73,4	77,4	48,4	84,4	80,4	53,8	86,4	74,9	81,4	93,4	77,4	75,9	77,4	80,9	78,9	74,9	80,3	73,4
1	82,9	78,9	45,48	75,9	79,4	87,4	82,4	80,4	99,4	78,9	75,4	84,9	77,9	70,3	81,9	72,9	81,4	66,8
1	81,9	82,9	89,9	67,8	82,9	83,4	84,4	76,4	94,4	61,8	70,8	77,9	76,9	79,8	71,4	85,9	89,4	67,3
	82,9	88,4	75,4	66,3	82,9	81,4	87,9	90,9	84,4	76,4	80,4	80,4	80,9	67,3	73,9	75,9	77,9	65,3
	76,4	78,4	75,4	84,4	88,4	84,4	81,9	83,4	95,4	82,4	82,4	73,4	68,3	77,4	75,9	70,3	84,9	87,9
	86,4	84,4	86,4	78,4	81,4	70,3	77,4	85,4	93,4	58,3	84,4	74,4	70,3	75,4	76,9	62,3	78,9	83,9
	86,9	73,9	76,9	69,3	74,4	74,4	79,4	73,4	92,9	80,9	80,4	86,4	79,3	81,9	73,9	69,3	71,8	86,4
2	86,4	76,4	80,4	74,9	73,4	73,4	85,4	64,3	91,4	79,4	69,7	87,4	76,3	85,9	74,1	61,8	87,4	88,4
2	91,4	77,4	68,3	77,9	73,9	79,4	79,4	86,9	93,9	73,4	82,4	87,9	75,6	51,3	71,4	68,3	60,3	90,4
	96,9	82,4	67,8	71,4	71,9	87,4	76,4	83,9	92,4	80,4	86,4	93,9	81,4	78,3	74,4	63,8	82,4	81,4
	83,9	85,4	80,9	72,4	79,9	87,4	73,9	83,4	88,4	82,9	83,4	94,4	80,4	84,9	69,8	70,3	83,4	75,4
	91,9	88,4	88,9	98,4	86,5	81,9	79,4	90,4	75,9	93,4	78,4	77,9	67,3	87,9	80,4	86,9	91,4	70,3
	78,9	72,9	81,4	80,9	75,9	95,9	77,4	87,4	80,4	81,9	77,8	85,9	91,6	75,9	75,8	77,8	78,4	98,4
3	87,9	78,9	75,9	79,4	84,4	76,9	97,4	94,4	72,9	88,7	84,4	79,4	100	93,4	85,4	74,4	92,9	83,4
5	76,9	71,9	85,9	87,4	84,4	77,9	82,9	85,5	69,8	86,7	79,9	86,9	78,9	96,9	71,4	83,4	84,4	68,3
	85,4	89,4	95,4	89,4	85,9	88,4	87,4	77,9	83,9	77,4	76,4	79,4	76,9	76,4	72,9	70,3	73,1	65,8
	84,4	73,9	81,4	96,4	86,9	87,4	88,4	82,9	75,4	82,4	92,4	87,4	82,4	72,4	79,9	84,4	79,9	88,8
MÉDIA	84	80	77	80	80	81	83	82	87	81	80	82	79	78	76	74	80	79
E.P.	0,257	0,236	0,557	0,382	0,269	0,402	0,235	0,308	0,369	0,388	0,227	0,285	0,318	0,435	0,174	0,323	0,368	0,423

Tabela 6- MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV)MiDCAI 1.2 μ M EM TYRODE Ca⁺² 0.9 mM (n=3)

Tabela 7- MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO(-mV)CARBACOL 8 μM (n=3)

n	t	0	t	5	t	10	t	15	ť.	30	t	50	ť	0	t1	20]	L
	RP	FP																
	79,4	80,4	74,4	62,8	97,4	74,4	73,9	58,7	65,8	76,4	74,4	80,4	59,3	74,4	61,3	66,8	63,3	75,4
	81,4	72,4	62,8	78,9	80,4	77,4	65,8	67,3	57,5	75,6	68,3	81,4	50,3	81,4	67,8	71,9	64,8	78,9
1	71,4	89,9	40,3	68,3	81,9	78,4	72,9	77,4	79,4	66,3	81,4	76,9	59,8	75,9	51,8	77,9	73,4	72,4
1	82,4	84,9	36,8	75,4	62,8	30,3	71,4	75,9	71,4	78,9	76,9	76,9	59,7	77,9	54,3	74,9	80,89	69,3
	84,4	82,4	29,8	63,3	77,9	85,4	52,3	78,9	59,8	68,8	68,3	78,9	40,8	73,9	73,9	77,4	82,9	84,9
	77,4	76,4	64,8	77,3	86,4	72,4	46,8	83,4	74,4	77,9	69,3	72,9	49,8	73,4	70,3	84,4	77,7	72,9
	82,4	86,4	75,9	82,4	97,4	74,4	81,8	84,4	77,4	74,4	72,9	82,4	74,9	84,9	67,8	74,9	77,4	88,4
	74,4	84,4	82,4	76,4	80,4	77,4	48,3	80,4	22,8	75,4	66,3	76,4	77,4	78,9	31,3	74,9	78,4	85,4
2	84,4	84,4	85,9	70,4	81,9	78,4	32,3	92,4	30,3	76,4	67,8	73,4	78,4	82,9	78,9	56,3	74,3	96,4
4	71,4	97,9	71,4	82,4	62,8	30,3	73,4	80,4	65,3	78,4	44,3	74,4	60,3	79,4	67,3	83,9	76,4	84,9
	90,4	84,9	60,3	74,9	77,9	85,4	74,4	74,9	73,4	84,4	79,3	77,9	69,3	86,9	76,4	77,9	64,3	79,7
	85,9	82,4	67,3	77,4	86,4	72,4	72,4	74,9	52,8	86,4	53,8	70	88,9	76,4	44,8	80,4	72,9	81,4
	77,8	90,4	73,9	80,9	82,4	79,9	71,4	84,9	74,9	84,4	75,4	95,9	57,3	72,4	15,8	62,3	87,9	82,4
	88,4	85,9	67,3	76,9	75,9	71,4	79,4	79,4	76,4	74,4	63,8	78,9	71,8	82,9	50,3	76,9	100	86,9
3	97,9	72,4	64,8	86,9	68,3	98,4	74,4	96,4	77,4	73,4	71,9	88,4	70,8	74,4	61,8	82,4	86,4	92,4
5	83,9	85,4	75,9	82,4	82,4	75,9	73,4	74,4	59,8	77,4	81,4	82,4	59,3	70,3	73,4	72,4	70,8	86,7
	85,4	74,4	69,8	71,4	56,8	83,4	67,3	70,8	79,8	82,4	41,3	81,4	74,9	76,3	25,8	78,9	75,8	84,9
	89,4	70,8	68,3	77,4	66,8	82,4	32,3	84,4	67,8	75,9	49,8	86,9	63,8	83,4	79,4	70,3	83,9	100
MÉDIA	83	83	65	76	78	74	65	79	65	77	67	80	65	78	58	75	77	84
E.P.	0,283	0,296	0,631	0,273	0,464	0,711	0,639	0,362	0,671	0,214	0,507	0,258	0,499	0,198	0,782	0,305	0,379	0,338

n	t	0	t	5	t	0	t	15	ť	30	t	50	ť) 0	t1	20]	Ĺ
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
	93,2	78,3	74,4	66,8	74	74,9	76,4	63,8	68,8	77,9	78,4	77,4	81,4	61,8	72,9	70,3	42,3	62,8
	91,9	77,4	75,4	72,9	83,4	82,4	77,4	78,9	73,9	78,9	63,8	60,8	82,9	72,4	59,8	59,3	54,3	59,3
1	72,9	75,4	76,9	70,3	81,4	76,9	62,8	67,3	75,4	76,9	73,4	62,3	81,4	71,9	47,3	47,3	58,8	74,9
1	87,4	75,4	78,9	78,4	78,4	64,8	67,8	73,9	80,4	50,8	79,9	77,9	80,9	78,4	73,4	82,4	52,8	77,4
	80,9	77,9	79,4	81,9	72,4	80,9	80,4	68,3	68,8	77,9	71,9	73,9	74,4	66,3	41,3	68,3	69,3	70,8
	82,9	84,4	81,9	85,9	76,9	73,4	65,3	76,4	56,8	72,9	59,3	74,9	66,8	74,4	73,4	72,4	66,8	68,8
	87,4	91,4	54,8	71,7	54,3	66,8	59,8	78,4	78,4	74,8	77,4	79,9	79,4	78,9	77,4	72,4	74,4	91,4
	98,9	83,4	67,3	60,3	61,8	96,9	63,8	65,8	71,4	73,4	79,9	56,3	64,8	70,3	76,4	68,8	80,4	72,9
2	84,9	82,4	66,8	77,4	54,3	61,3	67,8	74,4	61,8	76,9	78,4	73,9	51,3	77,4	67,8	73,9	76,4	79,4
2	78,4	80,9	57,3	63,8	56,8	58,3	64,3	74,4	64,8	77,4	72,4	88,9	77,9	65,8	35,3	85,9	72,4	70,3
	89,9	89,9	63,3	65,8	59,3	82,9	46,8	69,3	71,8	93,9	70,3	82,4	68,9	80,4	80,4	69,8	54,3	81,9
	98,9	87,9	65,8	72,8	48,3	61,3	75,9	77,4	77,8	72,4	80,9	75,4	72,4	71,4	57,8	74,4	63,8	47,8
	84,4	85,4	67,3	63,8	63,3	57,8	57,3	70,8	23,3	48,3	45,3	55,3	59,3	69,3	81,9	57,8	38,3	78,4
	73,9	83,4	64,8	67,3	50,3	65,3	60,3	71,8	41,8	40,3	52,3	52,3	37,3	48,8	65,8	75,8	44,3	33,8
3	82,4	73,4	49,3	64,3	68,8	70,8	71,3	64,8	38,8	44,3	36,8	46,3	40,3	70,3	69,8	60,8	45,8	40
5	75,4	85,9	57,8	57,8	60,8	63,2	70,8	70,3	42,3	47,8	51,3	69,8	21,8	48,3	34,8	41,3	34,8	41,3
	76,4	78,9	57,8	63,8	70	66,8	66,8	67,3	35,3	36,8	34,3	73,9	33,8	57,8	47,8	78,9	70,3	65,3
	99,4	85,9	58,3	65,3	57,8	71,4	72,9	61,3	39,3	45,3	77,9	65,8	33,8	50,3	59,8	54,8	63,3	56,8
MÉDIA	86	82	67	69	65	71	67	71	59	65	66	69	62	67	62	67	59	65
E.P.	0,357	0,217	0,399	0,317	0,454	0,427	0,344	0,219	0,745	0,72	0,645	0,48	0,836	0,427	0,638	0,492	0,579	0,664

Tabela 8-MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO(-mV)MiDCAI 0.6 μM + CARBACOL 4 μM (n=3)

n	t	0	1	5	t	10	t	15	ť	30	t	60	ť	90	t1	20]	[]
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP										
	76,9	85,4	82,4	63,8	70	81,4	72,2	44,3	82,9	58,3	80,4	28,8	71,4	64,3	74,9	79,8	71,4	56,3
	72,4	71,9	83,9	85,4	81,9	61,3	67,3	94	83,9	85,9	75,4	65,3	82,9	72,9	71,9	73,4	70,3	72,9
1	92,9	80,4	74,9	74,4	85,4	75,4	67,8	81,4	78,4	65,3	80,9	68,8	69,3	62,8	73,9	35,3	81,4	47,8
1	81,9	76,4	88,9	86,4	76,4	81,9	70,8	78,4	79,4	57,4	72,9	76,9	74,4	68,3	63,3	73,9	77,4	80,4
	77,4	83,9	78,9	88,9	74,4	70,3	76,9	64,8	76,4	86,9	84,4	50,8	74,9	38,4	67,8	66,3	77,4	80,4
	82,9	86,9	90,4	82,9	74,4	77,4	70,9	55,8	77,9	80,4	64,8	56,8	75,4	68,4	81,8	63,3	71,4	64,3
	81,9	78,9	83,4	66,3	80,4	79,4	65,8	88,4	78,9	74,4	70,8	70,8	67,9	64,3	73,4	71,4	78,4	71,4
	83,4	84,4	79,4	88,4	71,9	85,9	83,4	82,9	76,9	78,4	66,3	60,3	60,3	61,3	74,4	85,9	80,4	82,9
2	79,4	74,9	73,9	73,4	73,4	77,4	72,4	68,3	78,4	76,9	68,3	63,3	60,3	70,8	77,4	79,9	86,4	80,9
-	86,4	90,4	85,4	79,9	78,9	73,4	84,5	84,9	78,9	70,8	69,3	70,3	45,3	68,3	65,8	72,9	61,3	65,3
	77,9	77,9	90,9	79,4	80,4	72,4	80,9	81,4	80,9	73,4	64,8	62,8	57,3	35,3	67,3	84,4	63,3	81,4
	86,9	77,8	83,4	88,9	73,9	77,4	82,9	65,8	83,4	77,9	83,9	35,6	61,3	35,8	72,3	76,9	82,4	75,4
	71,4	78,4	75,9	87,4	81,9	88,4	86,4	75,4	64,8	68,8	73,9	90,9	48,8	23,3	71,8	45,8	79,4	79,3
	83,4	71,4	70,3	81,4	79,9	74,8	75,4	84,4	78,4	72,9	70,3	70,8	64,8	84,4	89,4	79,4	73,9	83,4
3	75,4	78,9	85,9	83,4	84,4	80,4	87,4	75,9	67,3	78,4	76,4	68,8	64,3	87,9	63,3	77,9	59,3	75,9
	71,9	82,9	78,9	78,4	77,4	77,9	70,8	75,9	77,4	64,8	60,8	77,4	58,3	79,8	62,8	45,8	67,3	87,9
	77,4	71,4	78,4	81,9	82,4	85,9	81,4	67,3	70,3	74,8	79,9	82,4	74,3	56,3	60,8	85,4	58,3	78,9
	77,4	72,4	76,9	75,9	74,9	82,4	75,9	67,3	75,6	80,9	67,8	82,4	56,8	86,4	54,8	71,4	57,8	57,8
MÉDIA	80	79	81	80	78	78	76	74	77	74	73	66	65	63	70	71	72	73
E.P.	0,236	0,235	0,243	0,307	0,185	0,267	0,289	0,509	0,214	0,347	0,292	0,652	0,41	0,776	0,341	0,603	0,378	0,456

Tabela 9- MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV)MiDCAI 1.2 μM 30 min APÓS TTx 0.2 μM (n=3)

n	t	0	t	5	t	10	t	15	ť	30	t	60	ť	90	t1	20]	[]
	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP	RP	FP
	75	84	71	83	68	66	52	87	63	62	74	72	24	49	5,2	85	68	78
	85	63	79	70	79	71	43	85	91	86	70	56	75	68	28,3	68	68	70
1	79	63	82	76	83	74	69	83	81	75	65	42	84	68	20,8	63	49	45
1	95	76	78	67	73	72	65	64	72	79	68	58	83	52	10,8	63	34	47
	79	75	78	62	76	74	77	78	85	63	93	56	60	75	6,2	47	77	65
	89	69	71	65	65	66	71	75	83	100	87	63	76	80	4,2	67	74	85
	90	85	80	64	71	69	53	58	60	35	56	54	61	62	30	44	63	51
	73	65	81	68	63	60	62	65	55	44	58	53	56	35	28	44	48	35
2	79	89	82	77	64	65	61	58	45	47	40	52	63	46	38	16	48	75
2	77	85	86	58	80	65	58	31	49	64	45	52	39	40	47	38	38	27
	88	77	79	51	70	60	68	32	51	60	53	64	37	59	52	53	56	67
	75	71	90	54	63	58	62	34	54	66	61	48	59	27	47	30	51	26
	91	96	78	84	61	87	77	34	31	72	79	38	35	71	20	70	20	81
	93	97	82	83	80	71	85	40	74	73	15	46	75	77	39	20	23	35
3	88	78	81	84	69	54	78	81	97	63	22	21	21	60	73	76	50	61
Ũ	89	77	85	78	80	79	45	76	77	75	48	88	83	76	60	54	71	7
	94	89	77	77	76	33	71	24	56	60	57	64	26	15	88	65	59	64
	94	87	73	76	72	75	52	31	49	32	77	61	18	78	72	15	73	85
	83	73	80	47	80	84	54	81	45	53	34	27	74	63	23,8	67	21	15
	76	71	83	78	79	68	76	71	72	25	56	49	29	79	13,3	75	9	38
4	83	85	79	76	82	72	86	89	38	49	27	76	78	75	11,3	34	10	68
-	87	82	86	89	75	74	83	70	20	71	71	64	73	17	13,8	20	47	29
	78	89	82	68	81	77	85	73	22	80	51	20	59	68	9,7	51	46	21
	84	89	56	83	62	80	64	66	48	80	45	67	63	74	20,3	78	43	26
								-									-	-0
MEDIA	84	80	79	72	73	<u>69</u>	67	62	59	63	56	54	56	59	32	52	48	50
EP.	0,286	0,408	0,277	0,473	0,301	0,462	0,532	0,882	0,871	0,747	0,827	0,678	0,912	0,822	0,985	0,877	0,839	0,992

Tabela 10- MEDIDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO (-mV)MiDCAI 1.2 μM 15 min APÓS d-Tc 3 μM (n=3)



Figura 19- Efeito de tratamentos farmacológicos sob a despolarização induzida pela fosfolipase A₂ MiDCAI. 1: MiDCA1 0.6 μM; 2: MiDCAI 1.2 μM;
3: carbacol 8 μM; 4: MiDCAI 0.6 μM + carbacol 4 μM; 5: MiDCAI 1.2 μM em Tyrode com Ca⁺² 0.9 mM; 6: PLA₂ 1.2 μM após TTx 0.2 μM; 7: MiDCAI 1.2 μM 15 min após d-Tc 3 μM. *p<0,05 significância em relação ao controle positivo 2.

3.4.13-Medida e análise dos potenciais de placa terminal em miniatura (PsPTM)

Foram obtidas medidas de freqüência e de amplitude, nos tempos t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} min e também após a lavagem da solução (**L**). Como no protocolo anterior, as preparações incubadas com toxina e com solução nutritiva de Tyrode foram observadas por 120 min.

- 1. Tyrode: a freqüência dos PsPTM ficou em $50 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ em preparações controle antes da adição da toxina.
- 2. MiDCAI 0.6 μ M (n=3): o tratamento das preparações com esta toxina determinou uma ligeira diminuição na freqüência dos PPTM aos 15 min (40 ± 1 min⁻¹) seguida de um aumento gradativo que foi máximo aos 30 min (73 ± 2 min⁻¹, p< 0,05). Logo após este aumento seguiu-se uma nova e progressiva diminuição no número destes potenciais (Figura 20) chegando próximo aos níveis controle em 120 min de observação (47 ± 0,7 min⁻¹). Não houve alteração significativa da amplitude média observada durante os 120 min de experimento (0,55 mV) quando comparada aos valores controle antes da adição da toxina (0,5 mV). No entanto verificou-se um aumento significativo no número de potenciais gigantes (potenciais maiores que o dobro da amplitude média do controle) que ficou em torno de 200 ± 2% de aumento aos 120 min de observação (p<0,05).
- 3. MiDCAI 1.2 μ M (n=3): nesta concentração a toxina exibiu um efeito trifásico caracterizado por uma depressão inicial seguida de grande aumento na liberação, porém sem alteração da amplitude média; este efeito foi seguido pelo desaparecimento gradual dos PsPTM no ruído (Figura 21). Observou-se ainda que a partir dos 30 min de experimentação houve um aumento progressivo no número de potenciais observados e que foram caracterizados como "bursts" (1750 ± 4 min⁻¹) que chegaram a 3170 ± 3 min⁻¹ aos 60 min de observação. Após este efeito, verificou-se uma diminuição gradativa no número de potenciais que ficaram abaixo dos

valores controle após 120 min de observação. O registro e análise dos resultados foram feitos utilizando-se um software de aquisição de dados (AqDADOS, Lynx, Brasil) que permitiu a avaliação individual de cada potencial adquirido. Nesta concentração (1.2μ M) a toxina determinou uma certa resistência da fibra muscular ao impalamento ou à introdução intracelular do microeletrodo devido ao grande número de fasciculações seguidas de potenciais de ação além da despolarização induzida pela toxina. Nesta série de experimentos também não houve alteração significativa da amplitude média dos PsPTM 0,37 mV quando comparada com a amplitude controle antes da adição da toxina 0,55 mV. Porém, também houve uma aumento significativo no número de potenciais gigantes observados que ficou em 500 ± 3 % acima dos valores controle.



Figura 20- Efeito induzido pela PLA₂ MiDCAI (0.6 μ M) sobre a freqüência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura em preparação diafragma de camundongo em diferentes tempos. Note-se o aumento significativo da freqüência e no número de potenciais gigantes (> 1,3 mV). O histograma representa a média ± o erro padrão de 3 experimentos. *p<significância.



Figura 21- Efeito induzido pela PLA₂ MiDCAI (1.2 μM) sobre a freqüência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura em preparação diafragma de camundongo em diferentes tempos. Note-se o efeito trifásico e o aumento significativo no número de potenciais gigantes (> 1,3 mV). O histograma representa a média ± o erro padrão de 3 experimentos. *p<significância.</p>

3.4.14- Medida e análise dos potenciais de placa terminal (PsPT)

Nesta série de experimentos eletrofisiológicos a PLA₂ MiDCAI foi estudada para verificação de seus possíveis efeitos sobre o conteúdo quântico (CQ) e o tamanho quântico (TQ) em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo tratadas com glicerol para impedir a contração muscular. As preparações foram estimuladas a 1Hz durante 1 min. Neste intervalo de tempo de 30-60 potenciais foram registrados para o cálculo do conteúdo quântico em t₀, t₁₀, t₃₀, t₆₀ min.

- 1. Controle solução nutritiva de Tyrode (n= 8): os valores do conteúdo quântico dos PsPT ficaram em torno de 33 ± 2 em t₀ e 34 ± 2 em t₆₀ min (Tabela 11). Nestes experimentos os valores do TQ foram de 0,63 \pm 0,3 em t₀ e 0,58 \pm 0,2 em t₆₀ min. A amplitude média dos potenciais ficou em torno de 2,4 \pm 0,7 em t₀ e 4,8 \pm 2 em t₆₀ min (Figura 22).
- 2. VT 10 µg/ml (n=8): Nestes experimentos avaliaram-se o efeito induzido pelo veneno total de *Micrurus dumerilii carinicauda* sobre o CQ, o TQ e a amplitude dos PsPT. Assim os valores do CQ não foram alterados significativamente com este tratamento ficando em 21 ± 2 em t₁₀ e 24 ± 1 em t₆₀ min (Tabela 11 e Figura 23). Também não foram alterados os valores do TQ que variaram de 0,41 ± 0,18 em t₁₀ e 0,60 ± 0,3 em t₆₀ min (Tabela 11). No entanto, o veneno total foi capaz de aumentar significativamente o valor das amplitudes médias em t₁₀ (6 ± 1,3) e em t₃₀ (5,6 ± 0,8) p<0,05, corroborando o efeito facilitador inicial que precede o bloqueio irreversível observado em registros miográficos (Tabela 11 e Figura 22).
- 3. MiDCAI 0.6 μ M (n=14): Nesta série de experimentos verificou-se um aumento significativo do CQ em t₆₀ min (160 ± 4, p<0,05) (Tabela 11 e Figura 23). Nesta concentração não houve alteração significativa do TQ que variou de 0,3 ± 0,09 em t₁₀ min a 0,92 ± 0,6 em t₆₀ min (Tabela 11). No

entanto, as amplitudes médias dos PsPT foram significativamente alteradas em t₃₀ min (12 ± 2 mV, p<0,05) (Tabela 11 e Figura 22).

4. MiDCAI 1.2 μ M (n=14): Nesta concentração de toxina também verificou-se um aumento significativo do CQ seguido de diminuição também significativa em relação ao controle (Tabela 11 e Figura 23). Desta forma, os valores do CQ foram 94 ± 10 em t₁₀ e 14 ± 4 em t₆₀ min (p<0,05). Neste caso houve alteração significativa do TQ aos 60 min que ficou em 0,23 ± 0,04 em t₁₀ e 1,23 ± 0,4 em t₆₀ min (p<0,05) (Tabela 11). Nesta concentração de toxina também verificou-se um aumento significativo na amplitude média dos PsPT cujo os valores ficaram em 8,7 ± 2 mV em t₁₀ e 5 ± 1 mV em t₃₀ (p<0,05) (Tabela 11 e Figura 22).

Tabela 11- EFEITO DO VENENO (VT) E MIDCAI SOBRE O TAMANHOQUÂNTICO E O CONTEÚDO QUÂNTICO DOS PSPT ELICITADOS EMESTÍMULOS DE 1 Hz

Tratamento	т	Q		CQ		n
	Tempo	o (min)		Tempo (min))	
	to	t ₆₀	to	t ₁₀	t ₆₀	
Controle	0,63 ±0,3	0,54 ±0,2	33 ± 2	32 ±1,5	34 ±2	8
VT 10 µg/ml	0,41 ±0,18	0,60 ±0,3	21 ±2	20 ± 2	24±1	8
MiDCAI0.6 µM	0,26 ±0,09	0,92 ±0,6	33 ± 2	60 ± 4	*160 ±4	14
MiDCAL1.2 µM	0,22 ±0,04	*1,23 ±0,4	32 ±1	*94 ±10	*14 ±4	14

TQ: Tamanho quântico

CQ: Conteúdo quântico

* significância para p<0,05 em relação ao controle



Figura 22- Efeito de diferentes tratamentos sobre a amplitude do potencial de placa terminal obtido em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo tratado com glicerol em temperatura ambiente. Em (B), o gráfico da amplitude do potencial em função do tempo, comparando as preparações tratadas com veneno e PLA₂ com o controle. Em (A), registro representativo do efeito induzido pela PLA₂ MiDCAI 0.6 µM sobre a amplitude do potencial de placa terminal onde 1, 2, 3 e 4 representam os registros nos tempos t₀, t₁₀, t₃₀ e t₆₀ min respectivamente. Em (B) cada ponto representa a média ± erro padrão de 8-14 experimentos. VT: veneno total 10 µg/ml; PPT: potencial de placa terminal.



Figura 23- Efeito de diferentes tratamentos sobre o conteúdo quântico do potencial de placa terminal obtido da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. O gráfico representativo do conteúdo quântico em função do tempo, comparando as preparações controle com as tratadas com veneno e PLA₂. Note o aumento seguido de diminuição significativos do conteúdo quântico. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 8-14 experimentos. VT: veneno total 10 µg/ml; *p<0,05 em comparação com o controle.</p>

3.4.15- Medida e análise dos potenciais de ação compostos (CAP) em preparação nervo ciático de camundongo

Os efeitos induzidos pela administração da PLA2 MiDCAI sobre os vários parâmetros analisados do potencial de ação composto de nervo ciático de camundongo foram descritos na Tabela 12. Assim, a aplicação de MiDCAI (0.6 µM, n=3) promoveu somente aumento na amplitude do potencial de ação composto de no máximo $30 \pm 9\%$ (n=3, p<0.05) aos 90 min de incubação não havendo bloqueio abaixo dos níveis controle ao final de 120 min de observação (Figura 24). Porém, quando as doses subseqüentes de 1.2 e 2.4 µM foram aplicadas, observou-se uma atenuação do efeito facilitatório e um reforço no efeito bloqueador. Desta forma, com a concentração de 1.2 µM houve um aumento de apenas $11 \pm 5\%$ aos 30 min de incubação e um bloqueio de $6 \pm 2\%$ ao final de 120 min (n=3). Da mesma forma com a concentração de 2.4 μ M houve uma facilitação de 3 \pm 0.5% aos 10 min e um bloqueio de $47 \pm 13\%$ (n=3, p<0.05) ao final de 120 min (Figura 24). Nesta série de experimentos também foram feitos testes com 3,4-DAP na tentativa de se elucidar o efeito facilitador promovido pela MiDCAI nestas preparações (Tabela 12 e Figura 24B). Além disso, quando a concentração de Ca⁺² foi reduzida a zero na solução nutritiva o efeito facilitador ainda foi observado. Assim, em solução a Ca⁺² zero a administração de MiDCAI (0.6 μ M, n=3, p<0.05) induziu facilitação máxima de 17 ± 6% aos 60 min não havendo bloqueio ao final de 120 min de observação (Tabela 12). No entanto, para a concentração de 2.4 µM não houve facilitação sendo o efeito caracterizado por apenas bloqueio de $70 \pm 6\%$ ao final de 120 min de observação (Figura 24).



Figura 24- Forma de onda típica do potencial de ação composto registrado em preparação nervo ciático de camundongo. Em (A), registro representativo do efeito induzido pela PLA₂ MiDCAI sobre a amplitude do potencial de ação composto onde (a) representa o controle, (b) a preparação tratada com 0.6 μM de MiDCAI e (c) a preparação tratada com 2.4 μM de MiDCAI no tempo 0 e 120 min, respectivamente. Note-se o aumento significativo na amplitude destes potenciais com a menor concentração e reforço do bloqueio com a concentração maior. Em (B), o gráfico da amplitude do potencial em função do tempo, comparando as preparações controle com as tratadas com PLA₂, onde cada ponto representa a média ± erro padrão de 3 experimentos.* significância.

3.4.16- Experimentos de whole-cell patch-clamp em neurônios DRG

Efeito da PLA₂ MiDCAI sobre a amplitude das correntes de Na⁺ registradas em células de neurônios DRG

As correntes de entrada "inward currents" registradas de neurônios DRG exibiram um limiar para ativação em torno de -20 mV para um potencial de manutenção negativo "holding potencial" de -85 mV. As correntes de Na⁺ em whole-cell registradas durante vários protocolos de voltage-clamp (voltage-clamp steps) aplicados em um holding potential de -85 é mostrada na Figura 25. Neste caso quando a PLA₂ MiDCAI foi a aplicada à temperatura ambiente (0.6 e 2.4 μ M, n=3) houve um leve aumento não significativo (11 ± 7%) na amplitude das correntes registradas para a concentração de (2.4 μ M) (Figura 25).

Efeito da PLA₂ MiDCA1 sobre a amplitude das correntes de K⁺ registradas em células de neurônios DRG

A Figura 26 mostra o efeito induzido pela PLA₂ MiDCAI (0.6 e 2.4 μ M) sobre amplitude das correntes de K⁺ registradas em células DRG neurônios. A corrente total foi registrada durante um voltage step de +60 mV. A aplicação da toxina promoveu um bloqueio de 29.66 ± 3.17% para a concentração de (0.6 μ M) e de 31 ± 1% (2.4 μ M, p<0.05) na transferência de carga imediatamente após a aplicação da toxina. Não houve diferença estatística entre entre as concentrações de toxina utilizadas. No entanto, um recobro na amplitude das correntes foi observado após a lavagem da preparação quando a concentração menor foi testada. O mesmo não foi notado com a concentração maior que promoveu um bloqueio irreversível na amplitude dessas correntes.



Figura 25- Registros representativos do efeito induzido pela PLA₂ (MiDCAI) sobre as correntes de Na⁺ registradas em células de neurônios DRG. As correntes foram registradas através de um protocolo de despolarização que variou de – 85 mV a – 20mV. Em A, ausência de efeito à aplicação de MiDCAI (0.6 μM). Em B, aumento não significativo na amplitude da corrente em resposta a aplicação de MiDCAI (2.4 μM) em comparação ao controle.



Figura 26- Correntes de K⁺ representativas do efeito induzido pela PLA₂ (MiDCAI) sobre registros feitos em células de neurônios DRG. Em A, efeito induzido por MiDCAI (0.6 μ M). Em B, efeito induzido por MiDCAI (2.4 μ M). As correntes totais foram registradas durante um protocolo de voltagem (voltage step) de -50 mV a -100 mV.

3.5- DISCUSSÃO

Relação entre as características bioquímicas e os efeitos farmacológicos

Os venenos de serpentes apresentam várias isoformas que, apesar de sua grande similaridade em termos estruturais, funcionais e seqüência de aminoácidos, demonstram funções biológicas diversas que ocorrem independentemente da atividade enzimática. Algumas PLA₂ botrópicas e crotálicas, por exemplo, facilmente formam uma estrutura dimérica na solução fisiológica e eventualmente estruturas triméricas e tetraméricas (JORGENSEN et al., 2002). Esta transição típica de uma PLA₂ monomérica para triférica pode ser observada simplesmente por eletroforese (SDS-PAGE ou Tricina-SDS-PAGE) na presença de DDT. No caso da PLA₂ MiDCAI esta transição não foi observada. Esta não dimerização poderia explicar a redução da força enzimática e também da atividade farmacológica (TOYAMA et al., 2003). O caráter básico da PLA₂ parece ser um importante pré-requisito molecular para a estrutura homodimérica.

Além disso, várias PLA₂ de venenos de serpentes não neurotóxicas ou PLA₂ de mamíferos apresentam um grande número de atividades biológicas independentemente da sua neurotoxicidade que corroboram a idéia de um sítio de ligação em comum da PLA2 na membrana celular. Recentemente alguns receptores para PLA₂ foram caracterizados e os modelos moleculares mostraram que a interação entre estas toxinas protéicas e o receptor é independente sequencialmente de um domínio do tipo CDR-like (VALENTIN e LAMBEAU, 2000). A análise molecular subseqüente de fosfolipases pancreáticas mostraram que o loop de ligação ao Ca⁺² e o sítio catalítico são regiões críticas para esta ligação. Há pouco a análise seqüencial revelou "motifes" de PLA2 em proteínas encapsuladas do vírus da parvovirose, mas estas proteínas não mostraram atividade enzimática. A comparação estrutural desta nova proteína com as PLA2 secretadas previamente descritas, sugerem que o loop de ligação ao Ca⁺² está envolvido no reconhecimento molecular ao receptor de membrana (ZADORI et al., 2001). Assim, mutações simples observadas para a MiDCAI em relação ao loop de ligação ao Ca⁺² poderão inibir fortemente sua capacidade de ligação ao receptor, mas a análise feita até agora ainda não pode excluir a participação de outras regiões como o sítio ativo e o β-wing.

A perda evolucionária do loop pancreático na classe I das PLA₂ parece ser importante para a aquisição de uma miotoxicidade completa por conta do aumento da atividade enzimática. A análise da MiDCAI mostrou a presença de resíduos de aminoácidos altamente conservados para a atividade miotóxica (R16, V93, A105, N113 e Y114), os quais são considerados aminoácidos essenciais para esta atividade (ALAPE-GIRÓN et al., 1999). Assim, a fraca ou praticamente inexistência de miotoxicidade observada com a MiDCAI provavelmente surge da falta de atividade enzimática, a qual é importante para a atividade miotóxica principalmente das PLA₂ do grupo I, e a exclusão deste pró-peptídeo, o qual leva a uma PLA₂ constitutivamente ativa, foi provavelmente crucial na evolução da miotoxicidade (ALAPE-GIRÓN et al., 1999).

Em relação à neurotoxicidade, pode-se afirmar que a região responsável por esta ação, na maioria das PLA₂, está localizada entre os resíduos de aminoácidos 80 e 110 para o grupo I das PLA₂ (KINI e IWANAGA, 1986). Recentemente, a cristalografia mostrou que as regiões neurotóxicas compreendem os resíduos de aminoácidos 80 ao 95 que correspondem ao loop 6 para algumas PLA₂ (SINGH et al., 2001). A análise seqüencial da MiDCAI para esta região não é tão evidente como observado para outras PLA2. Além disso, estudos de modificação química indicaram que os segmentos 59 a 90, os quais incluem uma α-hélice curta (resíduos 58-66) que também contém uma região anticoagulante e um loop β -wing (75-85), estão diretamente envolvidos na determinação da neurotoxicidade de acordo com YANG (1997). Provavelmente a neurotoxicidade observada para a MiDCAI envolve uma extensa região que inclui a região anticoagulante e a β -wing. A MiDCAI mostrou o H48, D49, Y52 e D99, os quais são os mais importantes resíduos de aminoácidos na atividade enzimática. A formação da estrutura dimérica é muito importante para atividade enzimática e recentemente trabalhos mostraram que PLA2 de venenos de serpente apresentam um comportamento alostérico em solução (De OLIVEIRA et al., 2001) sendo a estrutura dimérica muito importante para a atividade neurotóxica, no caso das PLA₂ do grupo I (BANUMATHI et al., 2001). Além disso, a estrutura dimérica foi formada pelo contato molecular das áreas C-terminal, ligação do Ca^{+2} e β -wing entre monômeros (RIGDEN et al., 2003). Alguns resíduos de aminoácidos foram considerados importantes para este contato como G53, S59, S60 e a comparação do loop C-terminal e

 β -wing da MiDCAI mostrou uma baixa homologia seqüencial e estrutural com PLA₂ miotóxicas ativas e PLA₂ da classe 1. De acordo com SINGH et al., (2001) os aminoácidos Y3, W64 e F66 são resíduos de aminoácidos importantes também para a dimerização. A estrutura primária da MiDCAI mostrou várias mutações de aminoácidos no domínio C-terminal e ausência do Y3 e W64, o que leva a especular que a ausência destes elementos estruturais são importantes para a dimerização da MiDCAI e conseqüentemente levaram à perda da atividade enzimática e miotóxica.

Efeito induzido pela PLA₂ MiDCA1 em preparações neuromusculares

A ocorrência de PLA₂ em venenos de serpentes é uma observação comum (DAVIDSON et al., 1991). Estas enzimas têm demonstrado compartilhar uma alta identidade em sua seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional (HEINRIKSON, 1991). Apesar desta alta homologia demonstrada por algumas PLA₂ neurotóxicas estas podem diferir quanto ao tipo e à potência do seu efeito farmacológico.

Em músculos esqueléticos de vertebrados as PLA₂ ou toxinas com atividade fosfolipásica A2 inibem a transmissão neuromuscular através de três principais modos de ação. Baseado na diferença em seu sítio de ação principal, as fosfolipases A₂ dos venenos de serpentes podem ser classificadas em três grupos. O primeiro grupo, cujo exemplo é a β-bungarotoxina e algumas outras neurotoxinas pré-sinápticas, inibe a transmissão neuromuscular por atuar seletivamente no terminal nervoso motor. O segundo grupo, cuja PLA₂ básica do veneno de Naja nigricollis é o principal exemplo, produz um efeito miotóxico relevante e também deprime a sensibilidade dos receptores subsinápticos da acetilcolina. O efeito pré-sináptico das PLA₂ pertencentes a este grupo é geralmente mascarado por sua atividade miotóxica. O terceiro grupo inclui as PLA2 ácidas e neutras de vários venenos de serpentes, exercem pequeno efeito no nervo e no músculo em pequenas concentrações e podem ser caracterizadas como PLA₂ não-tóxicas. Assim os efeitos induzidos pela PLA2 MiDCAI em preparações neuromusculares de camundongo e pintainho demonstram uma potência discreta se comparada as outras PLA2 ativas na junção neuromuscular, porém similar àquele observado com a β-bungarotoxina (CHANG e LEE, 1963).

O efeito da PLA₂ MiDCAI em preparação de camundongo foi caracterizado por uma leve depressão seguida de facilitação transitória da neurotransmissão (aumento da força de contração muscular) e leve contratura que precedem o bloqueio neuromuscular irreversível, o que também foi visto com o veneno total de Micrurus dumerilii carinicauda em camundongos. Este resultado sugere que o componente do veneno que promove o efeito facilitador inicial observado em preparação de camundongo seja a PLA₂ MiDCAI. A potência e as características do efeito neurotóxico induzido por toxinas PLA2 depende na maioria dos casos do tipo de preparação utilizada (LEE e HO, 1982). Assim, o efeito facilitador observado em camundongos com a adição do veneno total não pode ser visto em ratos (SERAFIM et al., 2002). Na preparação NFD de camundongos observou-se também uma leve diminuição da resposta a estímulos diretos de intensidade inferior ao observado com o veneno de Micrurus fulvius (WEISS e McISAAC, 1971). Isto porque algumas fosfolipases A2 exercem, em concentrações maiores, ação miotóxica, diminuindo ou abolindo a excitabilidade das fibras musculares e outras atuando especificamente nas fibras musculares (FOHLMAN e EAKER, 1977). Porém, no caso da MiDCAI, esta hipótese pode tornar-se menos relevante já que não houve alteração da contratura ao KCl e também por se observar que não há a liberação de creatino kinase em músculos biventer cérvicis de pintainho, fator relevante no desenvolvimento da miotoxicidade (GOULART et al., 1999). Assim, a leve contratura observada em preparações neuromusculares de camundongo seria resultado de um efeito despolarizante direto das fibras musculares como observado para outros venenos (LEE e HO, 1982). Os mesmos efeitos neuromusculares também foram observados em preparação biventer cervicis de pintainho, que demonstrou ser mais sensível ao efeito bloqueador neuromuscular. Nesta preparação, porém, houve a ausência do efeito facilitador inicial. Assim, após o tratamento com a PLA₂ observou-se uma redução progressiva da força de contração muscular que culminou em bloqueio total em concentrações mais elevadas. Também observou-se um leve bloqueio da resposta à ACh exógena sem alteração da resposta ao carbacol. Com relação ao efeito bloqueador da resposta à ACh exógena a explicação poderia residir no fato de que algumas PLA₂, ensaiadas em maior concentração, possuem a capacidade de produzir dessensibilização parcial dos receptores nicotínicos da placa motora como efeito secundário, como ocorre com a crotoxina (VITAL BRAZIL et al.; 2000). Assim, em determinadas concentrações,

substâncias como a ACh, que são facilmente degradadas pela acetilcolinesterase, não seriam capazes de ativar o receptor nicotínico em tempo suficiente para produzir contratura. Além disso, associa-se este resultado ao fato de não ter sido utilizado um protocolo de dose cumulativa de ACh, o que poderia evidenciar o desbloqueio dos receptores nicotínicos como visto com o carbacol (LEE e HO, 1982). O efeito pós-sináptico secundário pode estar relacionado à ligação da neurotoxina somente em uma ou algumas da subunidades do receptor nicotínico já que não há interferência no binding da ACh e da α-neurotoxina de *Naja nigrocollis* no sítio do receptor colinérgico (BON e CHANGEAUX, 1977). Este efeito também pode ser corroborado pelo fato de que em experimentos eletrofisiológicos observou-se que o bloqueio induzido pela d-Tc não impediu a despolarização em regiões de placa terminal em preparação diafragma de camundongo, sugerindo que o sítio de ligação da toxina não seja o mesmo do curare (VITAL BRAZIL et al., 2000).

Assim pode-se sugerir que os efeitos induzidos pela PLA₂ MiDCAI são típicos da maioria das neurotoxinas PLA₂ pré-sinápticas. Corroboram também esta idéia o fato de que na vigência do bloqueio neuromuscular observado em preparação nervo frênicodiafragma de camundongo a liberação espontânea achava-se muito aumentada ("bursts" de potenciais de placa terminal em miniatura), enquanto a causada pela estimulação elétrica do nervo frênico encontrava-se diminuída (HO e LEE, 1983). Reforça esta última hipótese o fato de ser irreversível o bloqueio neuromuscular induzido por esta toxina enquanto são prontamente reversíveis as suas ações pós-sinápticas: inibição reversível da contratura causada pela ACh e carbacol (LEE e HO, 1982).

Estudo eletrofisiológico

Efeito sobre o potencial de membrana em repouso da preparação diafragma de camundongo

O tratamento de preparações NFD de camundongo com a PLA₂ MiDCAI proveu uma despolarização irreversível do potencial de membrana tanto dentro como fora da região de placa. Este efeito é inibido quando a preparação é tratada com TTx ou pela diminuição do Ca^{+2} da solução nutritiva. A inibição do efeito despolarizante pelo tratamento prévio da preparação com TTx sugere que a toxina esteja atuando diretamente

em canais de sódio. Assim, a leve contratura observada em preparação NFD de camundongo seria explicada, efeito que também foi visto com outros venenos animais (FONTANA e VITAL BRAZIL, 1985). Além disso, o efeito inibitório da despolarização promovido pela diminuição da concentração de Ca+2 sugere ainda que o efeito despolarizante seja cálcio-dependente como ocorre com outras PLA₂ neurotóxicas (LANDON et al., 1980; LEE e HO, 1982). Isto poderia ser explicado pelo fato de que íons Ca⁺², em combinação com a calmodulina ou outra proteína de ligação como a calpactina (BURGOYNE, 1988), são gatilhos para um grande número de atividades celulares e muitas funções neuronais que são básicas para a atividade nervosa (ativação de microtúbulos, up-regulation de um grande número de receptores, síntese do neurotransmissor e estocagem das vesículas, estimulação da função mitocondrial, liberação de neurotransmissores e outras) que são dependentes da entrada de Ca²⁺ (YASHAR et al., 1998). Além disso, o fato de que em preparações tratadas com altas concentrações de d-tubocurarina a despolarização em regiões de placa terminal ocorreu normalmente, também reforça um efeito direto em canais iônicos. O extensivo estudo das proteínas de membrana seja no terminal nervoso, seja no músculo esquelético, tem demonstrado que 80% do Ca⁺² é armazenado no retículo sarcoplasmático via Ca⁺²-ATPase. Os outros 20% de Ca⁺² são expelidos do citosol para o espaco extracelular por duas classes de proteínas transportadoras presentes no sarcolema: a Ca⁺²-ATPase e o trocador Na⁺/Ca⁺². A este último têm sido atribuído o mecanismo dominante de extrusão do Ca⁺² para o espaço extracelular (YASHAR et al., 1998). Embora o trocador Na⁺/ Ca⁺² tenha sido mais estudado na célula muscular cardíaca, onde tem papel central na regulação da concentração de Ca⁺² mioplasmático livre, ele também está presente na célula muscular esquelética (BALNAVE e ALLEN, 1998). A 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 e HIDALGO, 1989). Talvez resida neste mecanismo uma provável explicação para a inibição do efeito despolarizante pelo Ca⁺² da solução nutritiva em baixas concentrações. Além disso, a sugestão de um efeito despolarizante via canais iônicos pode ser reforçada em resultados que demonstraram que a incubação de metade da concentração de MiDCAI mais metade da concentração de carbacol produziu uma potenciação do efeito despolarizante. Esses resultados indicam que o sítio de atuação do carbacol é diferente do

da PLA₂ (VITAL BRAZIL et al., 2000). Sabe-se que o carbacol ou carbamilcolina atua como a acetilcolina, ligando-se aos receptores nicotínicos da região subsináptica promovendo a despolarização por aumento do influxo de Na⁺ (VITAL BRAZIL et al., 2000). Além disso, o grande número de fasciculações que precederam as contrações musculares expontâneas tem sido relacionado com o efeito promovido por substâncias que atuam em canais de Na⁺² (VITAL BRAZIL et al., 2000). Estes efeitos refletem a ação despolarizante do composto mas, se a ação é exercida inteiramente na membrana pós-juncional do terminal nervoso motor ou se o terminais nervosos motores estão sendo despolarizados e excitados para que um potencial de ação reflexo esteja sendo gerado, fica difícil saber.

Efeito sobre o potencial de placa terminal em miniatura da preparação de camundongo

As neurotoxinas pré-sinápticas ofídicas, todas dotadas de atividade fosfolipásica A₂, são os constituintes mais tóxicos dos venenos ofídicos. Atuam na junção neuromuscular inibindo a liberação de acetilcolina por impulsos nervosos (ABE et al., 1976). No entanto, antes de bloquear a liberação de acetilcolina estas neurotoxinas deprimem a liberação de forma transitória antes de aumentar a liberação. O mecanismo de ação responsável por este efeito trifásico ainda não é bem esclarecido, porém, sabe-se que o efeito facilitador induzido por estas toxinas em preparações nervo-músculo de mamíferos é independente da atividade fosfolipásica A₂ (CHANG e LEE, 1977). A β -bungarotoxina, crotoxina, taipoxina, notexina e amoditoxina são exemplos de neurotoxinas que possuem atividade fosfolipásica A₂.

Similar a estas outras toxinas a PLA₂ MiDCAI também produziu um efeito trifásico aumentando significativamente a freqüência dos PPTM após um ligeiro período de depressão antes de reduzir a liberação abaixo dos níveis controle. A diminuição transitória na liberação do neurotransmissor tem sido atribuída a uma ligação da neurotoxina a sítios pré-sinápticos específicos, a qual também não está relacionada à atividade fosfolipásica A₂ (KELLY et al., 1979). Além disso, na maioria dos experimentos observou-se um aumento significativo no número de PsPTM gigantes em analogia aos efeitos induzidos por toxinas

pré-sinápticas (LEE e HO, 1982). Potenciais gigantes são comumente definidos como aqueles com amplitude maior que duas vezes a amplitude média do controle (LEE et al., 1984). Porém, o aumento no número dos potenciais gigantes deve ser analisado com cuidado pois tanto pode evidenciar uma ação ao nível subsináptico como ocorre com os anticolinesterásicos, com aumento da amplitude (FATT e KATZ, 1952), como também uma ação pré-sináptica como visto com a crotoxina (HAWGOOD et al., 1988). Porém, no caso da MiDCAI o fato de não ter havido diminuição na amplitude média dos PsPTM na fase de esgotamento na liberação do neurotransmissor, evidencia a origem pré-sináptica para os potenciais gigantes (VITAL BRAZIL e FONTANA, 1984). Se ocorresse alteração da amplitude média destes potenciais haveria uma forte sugestão de efeito sobre os receptores nicotínicos da região subsináptica como é observado para o veneno total e outros venenos e neurotoxinas elapídicas (SERAFIM et al.; 2002; VITAL BRAZIL et al., 1995). Considera-se o efeito no aumento da freqüência dos PPTM como um aumento na liberação espontânea de acetilcolina. A explicação mais simples para este fenômeno seria que a atividade enzimática da PLA₂ produziria uma perturbação suficiente no axônio da membrana, a qual levaria a um aumento na permeabilidade aos íons Ca⁺² (ABE et al., 1976). Outra explicação sugere que o aumento do Ca^{+2} intracelular estaria associado a uma inibicão do mecanismo de remoção do Ca⁺² do terminal pela mitocôndria (WAGNER et al., 1974). Além dessas hipóteses, sugeriu-se que a atividade fosfolipásica dessas toxinas fariam uma ativação do processo de liberação de acetilcolina devido à produção de ácidos graxos e lisofosfolipídios (ABE et al., 1976), os quais são conhecidos por promover a fusão membranas (KANTOR PRESTEGARD, 1975). Porém, investigações de e eletrofisiológicas mais recentes têm indicado que este estágio facilitador que antecede o bloqueio pode também estar associado ao bloqueio de alguns tipos de canais de K⁺ (ROWAN e HARVEY, 1988) dentro do terminal nervoso motor. O bloqueio dos canais de potássio ocasionaria um retardo na repolarização do terminal nervoso motor após o potencial de ação. Isto faria com que os canais de Ca⁺² voltagem-dependentes se abrissem por um período maior que o normal, aumentando o influxo de Ca⁺² para o terminal nervoso para disparar uma grande quantidade de neurotransmissor (PENNER e DREYER, 1986).

Efeito sobre o conteúdo quântico do potencial de placa terminal

Toxinas curareformes as quais ligam-se ao receptor nicotínico da placa terminal bloqueando a transmissão neuromuscular não são o único tipo de neurotoxinas presentes em venenos de serpentes elapídicas (LEE, 1972). A maioria das PLA₂ pré-sinápticas induzem alterações trifásicas no conteúdo quântico da liberação evocada em junções neuromusculares de anfíbios e mamíferos (HAWGOOD e SMITH, 1989). No entanto, os mecanismos relacionados a esta série de alterações são ainda pouco decifrados. Experimentos demonstram que na fase de aumento da resposta a toxina bloqueia uma certa classe de canais de potássio, o que foi observado em mamíferos mas não em anfíbios (ROWAN e HARVEY, 1988). Nesta série de experimentos mais uma vez os resultados reforçam a idéia de que a PLA₂ MiDCAI seja uma neurotoxina pré-sináptica por exercer um aumento seguido de diminuição significativos do conteúdo quântico (CQ) (TU, 1991). Além disso, O aumento significativo do tamanho quântico (TQ) observado pode explicar o aparecimento dos potenciais gigantes observados em ambas as concentrações testadas (HUBBARD et al. 1969). Fica claro que no caso da MiDCAI o efeito induzido na liberação espontânea está interrelacionado àqueles observados na liberação evocada. Neste aspecto, o aumento significativo das amplitudes dos PsPT poderia sugerir um bloqueio dos canais de potássio do terminal nervoso motor. Os dois principais tipos de canais de K⁺ são os voltagem-dependentes e os canais de K⁺-Ca⁺²- ativados (K_{Ca}). O bloqueio dos K_{Ca} os quais estão co-localizados com os canais Ca⁺² voltagem-dependentes aumenta a liberação do neurotransmissor de maneira mais rápida do que somente o bloqueio de canais de K⁺ voltagem-dependentes (VATANPOUR e HARVEY, 1995). Além disso, os canais de K⁺ voltagem-dependentes promovem o disparo repetitivo dos potenciais evocados em um único estímulo, o que não ocorre quando se bloqueia os canais K_(Ca) (VATANPOUR e HARVEY, 1995).

Efeito sobre o potencial de ação composto do nervo ciático de camundongo

A liberação de acetilcolina (ACh) nos terminais nervosos é um processo altamente controlado que necessita da entrada precisa de Ca^{+2} nos terminais nervosos através de canais de Ca⁺² voltagem-dependentes (AUGUSTINE et al., 1987). Múltiplos subtipos de canais de Ca⁺² foram identificados baseados em suas características farmacológicas, biofísicas e moleculares. Dessa forma, os canais de Ca^{+2} anteriormente denominados de L, T, N, P, Q e R. atualmente são nomeados de Cav1.1-1.4, Cav2.1-2.3, Cav3.1-3.3 (ERTEL et al. 2000). Freqüentemente mais de um subtipo de canal de Ca^{+2} coexiste no mesmo nervo terminal para controlar a liberação do neurotransmissor (TURNER et al, 1993). A liberação de ACh de um nervo motor de mamífero maduro depende fundamentalmente da entrada de Ca^{+2} através dos canais de Ca^{+2} do tipo P/Q (PROTTI et al., 1996) e não através dos canais de Ca^{+2} do tipo N, os quais controlam a liberação de acetilcolina de nervos motores de anfíbios (SANO et al., 1987) e de aves (de LUCA et al., 1991).

O controle da liberação de acetilcolina nos nervos motores requer não só uma abertura precisa e rápida dos canais de Ca^{+2} nos terminais nervosos como também mecanismos para o fechamento desses canais. Um desses mecanismos envolve a abertura de canais de K⁺ os quais retornam a membrana despolarizada ao potencial de repouso e assim alterando o estado de abertura dos canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes (LIÑAS et al., 1981; AUGUSTINE, 1990). Até o momento três tipos de correntes de K⁺ foram identificadas em terminais nervosos motores de mamíferos: uma corrente de K⁺ rápida voltagem-dependente, uma lenta e outra corrente de K⁺-Ca⁺²-dependente (MALLART 1985a; TABTI et al., 1989). Evidências sugerem que os canais de potássio cálcio-ativados (K_{ca}) estão co-localizados com os canais de Ca⁺² voltagem-dependentes atenuando a liberação do neurotransmissor por contribuir com a repolarização da membrana e, dessa forma, alterando o estado de abertura dos canais de Ca⁺² voltagem-dependentes (XU e ATCHISON, 1996).

Os resultados obtidos com a MiDCAI em preparação nervo ciático de camundongo sugerem que o aumento na amplitude do potencial de ação composto (CAP) induzido pela MiDCAI esteja intimamente relacionado ao bloqueio das correntes de K⁺. Corrobora esta idéia o aumento similar da amplitude obtido quando a 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) foi testada na mesma preparação. Ainda é possível sugerir que a PLA₂ não esteja atuando em canais de potássio voltagem-dependentes. Esta hipótese torna-se mais evidente pelo fato da não observação de pós-potenciais ou disparos repetitivos por estímulo quando a toxina foi testada. Este efeito é claramente observado quando o potencial de ação
composto é elicitado na presença de bloqueadores de canais de potássio voltagem-dependentes como a 4-AP ou 3,4 DAP (ENG et al., 1988).

No terminal nervoso de preparações neuromusculares, a fase final da eventual falha na liberação do neurotransmissor foi descrita como sendo devido a uma hidrólise enzimática dos fosfolipídios dentro do terminal nervoso, resultando em uma inativação do mecanismo de liberação (LEE e HO, 1982). Porém, no presente protocolo de experimentos com o potencial de ação composto, acreditamos que a toxina estaria produzindo um bloqueio por hiperpolarização, o que levaria a uma diminuição gradativa da amplitude do potencial de ação similarmente ao que ocorre quando grandes concentrações de 3,4-DAP são testadas (FLINK e ATCHISON, 2003). Outro indicativo para esta hipótese seria o retardo no retorno à linha de base que foi observado em nos atuais experimentos, e que também é indicativo de hiperpolarização (ENG et al., 1988).

Efeito sobre as correntes de Na⁺ e K⁺ registradas em neurônios da raiz dorsal

A análise dos efeitos induzidos por neurotoxinas PLA₂ em canais iônicos se torna mais difícil porque muitos dos estudos realizados até hoje foram indiretamente realizados em terminais nervosos motores (DREYER e PENNER, 1987; SCHIAVO et al., 2000). Existem poucos estudos utilizando a técnica de patch-clamp na comprovação desses efeitos (PETERSEN et al.,1986). Além disso, a relação entre neurotoxicidade e atividade PLA₂ não foi esclarecida até o momento (SCHIAVO et al., 2000).

No sistema nervoso periférico, o corpo da célula neuronal reside no gânglio da raiz dorsal, e projeta axônios que enervam alvos periféricos e centrais. Um diverso grupo de canais iônicos ligantes e voltagem-dependentes modificam estímulos inócuos e nóxios (nociceptivos) em despolarizações que são conduzidas através dos axônios e finalmente convertidas em liberação do neurotransmissor (RASBAND et al., 2001). Os neurônios ganglionares da raiz dorsal (DRG) são um grupo heterogêneo de neurônios sensoriais primários dentro de uma via somática e visceral (EVERILL et al., 1998). Em estudos de correntes de K⁺ em neurônios DRG a fase de repolarização do potencial de ação foi descrita

como sendo modulada por correntes de K^+ voltagem-dependentes (SAFRANOV et al., 1996).

No entanto, usando-se a técnica de cDNA, SCHOLZ et al. (1998) demonstram a existência de uma determinada família de canais de K⁺-Ca²⁺-ativados em neurônios DRG, que são responsáveis pela falha da condução durante a estimulação repetitiva.

Como já discutido acima, os efeitos induzidos pela PLA_2 MiDCAI em potencial de ação composto de nervo ciático de camundongo sugerem que a toxina não esteja bloqueando canais de K⁺ voltagem-depentendes (v.g. a não observação de pós-potenciais ou disparos repetitivos por um único impulso como observado em presença de 3,4-DAP).

A liberação de acetilcolina no terminal nervoso motor é um processo altamente controlado que requer a entrada de Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes dentro do terminal (AUGUSTINE et al., 1987). Assim, o controle da liberação de acetilcolina nestes terminais requer não só uma abertura rápida e precisa destes canais mas também mecanismos para fechamento destes canais iônicos. Um desses mecanismos envolve a abertura de canais de K⁺, os quais fazem com que a membrana despolarizada retorne ao potencial de repouso e assim alterando o estado de abertura dos canais de Ca²⁺- voltagem-dependentes (LIÑAS et al., 1981). Três tipos de correntes de K⁺ foram identificadas no terminal nervoso motor de mamíferos: uma corrente de K⁺-voltagem dependente lenta e uma rápida e uma corrente de K⁺ Ca⁺²-dependente (K_{Ca}) (MALLART, 1985a). Evidências sugerem que os canais de K_{Ca} estão não só co-localizados com os canais de Ca⁺²- voltagem-dependentes nos terminais nervosos como também participam atenuando a liberação do neurotransmissor por contribuir com a repolarização da membrana, alterando assim o estado de abertura dos canais de Ca⁺² voltagem-dependentes (MALLART, 1985a).

Sendo assim, poder-se-ia sugerir que o bloqueio parcial das correntes de K⁺ induzido pela MiDCAI seja devido ao bloqueio de canais de K_{Ca} e que este efeito seria o responsável pelo aumento da liberação do neurotransmissor. Uma afirmação mais precisa viria de medidas das correntes de potássio em neurônios DRG realizadas em presença de bloqueadores específicos de canais de K⁺-Ca⁺²-ativados como as toxinas fosfolipásicas A₂ iberiotoxina (GALVEZ et al., 1990), caribdotoxina (ANDERSON et al., 1988) e apamina (DREYER e PENNER, 1987).

Foi demonstrado também que o principal componente neurotóxico do veneno da serpente *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*, a β -agkistrodotoxina (β -AgTx) também desenvolve alterações eletrofisológicas muito semelhantes às observadas com a MiDCAI (v.g. efeito trifásico na liberação espontânea e aumento seguido de diminuição na liberação fásica) (WU et al., 2002).

Além do efeito induzido em correntes de K⁺ a MiDCAI também promoveu um efeito secundário não significativo em correntes de sódio. Este resultado sugere um efeito inespecífico da toxina nestes canais como, por exemplo, como aquele promovido por anestésicos locais que também bloqueiam correntes de potássio voltagem-ativadas (KOMAI e McDOWELL, 2001) e até mesmo como outras neurotoxinas PLA₂ que demonstram diferentes atividades dependendo do tipo de preparação e concentração usada (LEE e HO, 1982). Porém, não se pode descartar até o momento a contribuição deste efeito para a despolarização observada em preparações neuromusculares de camundongo, já que a TTx foi capaz de impedir esta despolarização.

As neurotoxinas que ligam-se a canais de sódio voltagem-ativados estão classificadas em pelo menos cinco classes distintas de acordo com o tipo de receptor de ligação. Toxinas hidrofílicas como a tetrodoxina (TTx), saxitoxina (STx) e α -conustoxina ligam-se a receptores do tipo1. Neurotoxinas lipo-solúveis como a batracotoxina (BTx), veratrina, aconitina e graiatoxina ligam-se a receptores do tipo 2. Toxinas escorpiônicas do tipo α e toxinas de anêmonas marinhas ligam-se a receptores do tipo 3. Toxinas escorpiônicas do tipo β ligam-se a receptores do tipo 4. Brevetoxinas lipo-solúveis e ciguatoxinas ligam-se a receptores do tipo 5. Assim, as toxinas do tipo 2 agem ativando os canais de Na⁺, produzindo uma despolarização persistente do potencial de membrana (WANG e WANG, 2003).

3.6- CONCLUSÃO

Desta forma, os experimentos realizados até o momento com a neurotoxina PLA₂ MiDCAI permitem sugerir que os efeitos neuromusculares desencadeados por esta toxina se dariam principalmente ao nível pré-sináptico. Além disso, o conjunto de ações observadas em preparações neuromusculares ocorre principalmente devido:

- 1- Ao bloqueio irreversível de canais de potássio na região do terminal nervoso motor fazendo com que haja um aumento no volume de acetilcolina liberado promovendo uma despolarização parcial dos receptores nicotínicos como aquela observada com a PLA₂-crotoxina (VITAL BRAZIL et al., 2000) e também para outras neurotoxinas como a croroxina, taipoxina.
- 2- À ligação da toxina em canais de Na⁺ gerando a ativação irreversível desses canais e conseqüente despolarização tanto no terminal quanto na fibra muscular.
- 3- E que todos estes efeitos seriam PLA_2 -dependentes já que alguns foram inibidos com a retirada do Ca^{2+} extracelular.



Figura 13- Efeito da PLA₂ MiDCAI sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação elétrica indireta a 37 °C. Em A, o gráfico da resposta contrátil em função do tempo, comparando a as preparações tratadas com a toxina MiDCAI com o controle Krebs. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 6 experimentos. Em B, o registro representativo da preparação em solução nutritiva de Krebs. Em C, registro representativo da preparação tratada com MiDCAI 1.2 µM. Em D, registro representativo da preparação tratada com MiDCAI 2.4 µM. As respostas à ACh (■ 55 µM e • 110 µM), ao CCh (◆, 8 µM) e ao KCl (●, 20 mM) foram obtidas antes e após a incubação com a toxina. Note-se o bloqueio da resposta à ACh mas não ao carbacol. * p<0,05 em comparação com o controle.



Figura 16- Efeito induzido pela toxina MiDCAI sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estimulação elétrica indireta, a 37°C. Em A, o gráfico da resposta contrátil em função do tempo comparando as preparações tratadas com o controle sem adição de toxina (solução de Tyrode). Em B, registro miográfico representativo da incubação da neurotoxina MIDCAI 0.6 μM. Em C, registro miográfico representativo da incubação da toxina MiDCAI na concentração de 1.2 μM. Em D, registro miográfico da toxina MiDCAI 2.4 μM. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 a 6 experimentos. L: lavagem *p<0,05 em comparação com o controle Tyrode.</p>



Figura 18- Potenciais de membrana em repouso (diafragma de camundongo). Em (A) gráfico representativo da despolarização na região de placa terminal. Em (B) gráfico demonstrativo da região de fibra muscular. Note-se a despolarização tanto na região de placa quanto na de fibra muscular após a exposição com diferentes concentrações de MiDCAI. No gráfico cada ponto representa a média ± erro padrão de 3-4 experimentos *p<0,05 em comparação do controle com as preparações tratadas.</p>

B

Amplitude (mV) Latência (ms) Rise time (ms) Limiar (V) Fim da Final da Final da Tempo 0 Tempo 0 Tempo 0 Tempo 0 Fim da incubação incubação incubação incubação Tratamento (valores (valores (valores (valores absolutos) (% tempo 0) (% tempo 0) absolutos) (% tempo 0) absolutos) (% tempo 0) absolutos) Controle 102.16 ± 4 3.53 ± 1.03 93.96 ± 0.03 14.68 ± 2.61 100.63 ± 0.5 0.324 ± 0.13 109 ± 5.82 3.71 ± 0.23 100.9 ± 0.8 2.21 ± 0.20 114.3 ± 2.83 11.74 ± 0.03 99.82 ± 0.17 0.493 ± 0.09 103.24 ± 1.55 3.8 ± 0.30 MiDCAI (0.6 µM) 4.04 ± 0.97 94.5 ± 11.22 14.71 ± 2.82 83.5 ± 13.87 0.248 ± 0.02 3.53 ± 0.24 120.74 ± 0.74 108.7 ± 2 MiDCAI (1.2 µM) 6.13 ± 2.59 *53.2 ± 13.51 11.5 ± 0.21 100.6 ± 0.34 0.576 ± 0.31 104.25 ± 3.45 4.16 ± 0.23 104.72 ± 2 MiDCAI $(2.4 \mu M)$ 3.20 ± 1.7 $^{*}120.8 \pm 12.4$ 3,4-DAP 5.14 ± 0.21 101.9 ± 5.30 0.615 ± 0.11 87.80 ± 1.58 3.95 ± 0.08 98.35 ± 1 $(10 \,\mu M)$ 1.91 ± 0.64 102.39 ± 1.6 5.1 ± 2.34 97.92 ± 1.64 $0.61{\pm}\,0.24$ 93.54 ± 14.57 4.5 ± 0.17 103.01 ± 2 Controle Ca⁺² 0 MiDCAI 2.04 ± 0.08 116.23±6.6 8.55 ± 2.4 100 ± 0.61 0.68 ± 0.06 82.48 ± 3.22 4.15 ± 0.08 99.96 ± 1.4 $(0.6 \,\mu\text{M})\,\text{Ca}^{+2}\,0$ MiDCAI (2.4 µM) $*28.12 \pm 6.24$ 0.522 ± 0.1 3.78 ± 1.72 7.4 ± 2.33 100.9 ± 0.45 $115..86 \pm 2.2$ 4.23 ± 1.14 103 ± 1.9 $Ca^{+2}0$

 Tabela 12- Parâmetros eletrofisiológicos extraídos do potencial de ação composto evocado em preparação nervo ciático de camundongo. A toxina foi aplicada à temperatura ambiente por um período de 120 min.

* significância para p< 0,05

4- CAPÍTULO 2

Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e farmacológica de duas novas isoformas bloqueadoras neuromuscular procedentes do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*

4.1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1.1- Mecanismo de ação das α-neurotoxinas nos receptores nicotínicos da placa terminal, no órgão elétrico de certos peixes e nas terminações neuronais

A função biológica das neurotoxinas do veneno de serpentes é a de imobilizar a presa em potencial e espécies predadoras. Os venenos das serpentes elapídicas (cobras, kraits, mambas) contêm vários polipeptídeos do tipo α -neurotoxinas cujo alvo em comum são os receptores nicotínicos para acetilcolina do tipo muscular. Os receptores nicotínicos da placa terminal ou do órgão elétrico de certos peixes (v.g. *Eletrophorus electricus*, as várias espécies de torpedo) podem ser ou bloqueados ou estabilizados em seu estado de alta afinidade para antagonistas, isto é, dessensibilizados, por toxinas peptídicas.

As toxinas denominadas neurotoxinas pós-sinápticas, toxinas curaremiméticas (KARLSSON, 1979) ou α-neurotoxinas (CHIAPPINELLI, 1985) ligam-se com grande seletividade ao receptor nicotínico da placa terminal ou do órgão elétrico, impedindo a sua interação com o neurotransmissor e demais agonistas (LEE, 1970). São como o curare antagônicos da acetilcolina (ENDO e TAMYIA, 1991). As neurotoxinas pós-sinápticas cuja DL₅₀ varia, regra geral, de 50 a 150 µg/kg em camundongo, são constituintes da peçonha de quase todas as serpentes da família Elapidae (Elapinae e Hidrophiinae). São proteínas de pequeno peso molecular e elevado ponto isoelétrico, constituída por uma única cadeia peptídica, interligada por pontes dissulfídicas. Como ja citado, estas neurotoxinas ligam-se com alta afinidade e especificamente aos sítios de ligação da acetilcolina nos K_D 10⁻¹² a 10⁻⁹ mol/l com receptores para acetilcolina do músculo esquelético, (CHANGEAUX et al., 1970). O receptor nicotínico do músculo esquelético é uma proteína heteropentamérica consistindo de cinco subunidades de membrana com a estequiometria de $2\alpha 1$, $1\beta 1$, 1γ e 1δ (SÁEZ-BRIONES et al., 1999, PATERSON e NORDBERG, 2000). O receptor consiste de dois sítios de ligação para acetilcolina localizados na interface entre as cadeias $\alpha 1$ e γ e $\alpha 1$ e δ (SÁEZ-BRIONES et al., 1999; PEDERSEN e COHEN, 1990). Dado que estes sítios de ligação interagem de uma maneira cooperativa positiva, por ocupar um ou ambos os sítios, as neurotoxinas de serpentes inibem a abertura do canal iônico associada ao receptor em resposta aos agonistas colinérgicos (PATERSON e NORDBERG,

2000). Assim, as α -neurotoxinas bloqueiam a transmissão nicotínica no músculo esquelético e causam a paralisia da presa.

Em contraste com as β -neurotoxinas as α -neurotoxinas são somente encontradas nos venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hidrofidae*. Mais de 100 neurotoxinas pós-sinápticas foram isoladas e seqüenciadas (ENDO e TAMYIA, 1991).

Dependendo da sua seqüência, as neurotoxinas pós-sinápticas são subdivididas em neurotoxinas de cadeia curta ou longa (DUFTON e HARVEY, 1989). As neurotoxinas de cadeia longa possuem de 66-74 resíduos de aminoácidos e comumente cinco pontes de dissulfeto. Enquanto as posições de quatro pontes de dissulfeto são comuns em ambas neurotoxinas de cadeia longa ou curta, uma ponte de dissulfeto extra é encontrada nas de cadeia longa é geralmente localizada entre a as posições Cys-30 e Cys-34 (ENDO e TAMYIA, 1991). O bloqueio neuromuscular induzido pelas neurotoxinas pós-sinápticas se estabelece lentamente e bem mais lentamente no caso de neurotoxinas de cadeia longa (KARLSSON, 1979). Por outro lado, a ação, regra geral, das neurotoxinas curtas é lentamente reversível pela lavagem da preparação com solução nutritiva adicionada ou não de neostigmina enquanto as das longas é irreversível nessas condições. Contudo, há exceções, pois a reversibilidade depende também da preparação neuromuscular empregada: a neurotoxina A da peçonha de Naja naja da Índia, apesar de longa, produz bloqueio reversível na preparação ciático-músculo sartório de Rana tigrina enquanto as curtas (cobratoxina, erabutoxinas a e b), como as longas (toxina A, α -bungarotoxina) provocam bloqueio irreversível na preparação nervo-músculo biventer cervicis de pintainhos (LEE et al., 1972). O bloqueio induzido pela peçonha de *Micrurus frontalis* de exemplares do Estado de São Paulo, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, também é reversível. Contudo, inibe irreversivelmente a ação contraturante da acetilcolina na preparação hemidiafragma cronicamente desnervado de rato. A ligação neurotoxinareceptor requer alterações conformacionais importantes das neurotoxinas. Apesar dessa forte ligação com o receptor, o bloqueio produzido pelas neurotoxinas curaremiméticas, quando reversível, é antagonizado pela neostigmina, em particular no pombo, cão e macaco (cebus sp) (VITAL-BRAZIL et al., 1976). Até recentemente a maior diferença funcional entre os dois tipos de α -neurotoxinas era a cinética de associação e dissociação com o

receptor nicotínico do músculo esquelético (TSETLIN, 1999). Mostrou-se que as neurotoxinas de cadeia curta tendem a se associar com o receptor aproximadamente de seis a sete vezes mais rápido e se dissociar de cinco a nove vezes mais rápido do que as neurotoxinas de cadeia longa (CHICHEPORTICHE et al., 1975). Entretanto, também foi demonstrado que as α -neurotoxinas de cadeia longa ligam-se aos receptores nicotínicos neuronais do tipo α 7 com afinidade maior do que as neurotoxinas de cadeia curta (SERVENT et al., 1997). Apesar da ausência de uma ponte dissulfidica extra a neurotoxina de *Laticauda colubrina* é considerada uma neurotoxina de cadeia longa (SERVENT et al., 1997). Entretanto, funcionalmente ela se comporta como uma neurotoxina de cadeia curta em nível dos receptores nicotínicos neuronais do tipo α 7 (SERVENT et al, 1997). Assim, a classificação funcional das α -neurotoxinas requer uma caracterização farmacológica em ambos os receptores nicotínicos do músculo esquelético e neuronais.

Muitos dos resíduos de aminoácidos da erabutoxina, uma neurotoxina de cadeia curta da serpente marinha Laticauda semifasciata, e que são necessários para a ligação de alta afinidade aos receptores nicotínicos do músculo esquelético já foram identificados. Usando-se mutagênese sítio-direcionada, mostrou-se que alterações em qualquer um dos Ser-8, Lys-27, Trp-29, Asp-31 ou Arg-33 diminuem muito a afinidade de ligação da toxina (PILLET et al., 1993). Em adição a estes resíduos de aminoácidos GLn-7, GLn-10, Glu-38 e Lys-47 da erabutoxina mostraram-se importantes para a ligação de alta afinidade ao receptor nicotínico do músculo esquelético (TRÉMEAU et al., 1995). Entretanto, parece que resíduos específicos de aminoácidos de todos os três loops da erabutoxina contribuem para o sítio funcional, incluindo aqueles resíduos variantes e invariantes. Sugeriu-se que os resíduos invariantes formam um centro funcional, enquanto os resíduos variantes permitem a ligação de alta especificidade relativa ao tipo de presa (TRÉMEAU et al., 1995). Apesar de mais de 100 neurotoxinas terem sido isoladas e seqüenciadas, apenas algumas foram extensiva e farmacologicamente caracterizadas. Muitas toxinas foram caracterizadas como pós-sinápticas por meio da sua seqüência de aminoácidos e/ou a observação da paralisia flácida em camundongos. Enquanto no passado as neurotoxinas foram caracterizadas por

estudos de DL_{50} , isto se tornou mais difícil de se realizar atualmente por razões óbvias regulatórias e éticas. Outros estudos foram realizados usando-se a técnica de binding em receptor nicotínico ligado à membrana do órgão elétrico de Torpedo (CHICHEPORTICHE et al., 1975; GONG et al., 1999). Enquanto estes ensaios provêm importante informação quanto à ligação aos receptores pelas neurotoxinas pós-sinápticas, não se é possível determinar se a neurotoxina é um agonista ou um antagonista do receptor nicotínico. Entretanto, a atividade agonista ou antagonista pode ser determinada in vitro usando-se preparações neuromusculares. Como já foi descrito, tanto a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo quanto a de biventer cervicis de pintainho foram usadas extensivamente para determinar a neurotoxicidade dos venenos de serpentes (HARVEY et al., 1994; CRACHI et al., 1999; WIKRAMARATNA e HODGSON, 2001). Todavia, apesar da preparação biventer cercicis de pintainho conter fibras musculares de inervação múltipla e portanto serem capazes de responder a ações exógenas agonistas, estas ou outras preparações não foram usadas para se determinar o valor pA2 das neurotoxinas pós-sinápticas. Isto se dá provavelmente ao fato amplamente conhecido de que a maioria das neurotoxinas pós-sinápticas de venenos de serpentes, especialmente as neurotoxinas de cadeia longa, apresentam um biding quase que irreversível ao receptor nicotínico do músculo esquelético (CHICHEPORTICHE et al., 1975). Ficou demonstrado que no pseudo-antagonismo irreversível demonstrado por muitas neurotoxinas pós-sinápticas, a análise do plot de Shild das curvas de concentração-resposta na presença dessas neurotoxinas é inválida. Entretanto o método modificado de Lew e Angus pode ser usado para gerar uma estimação confiável do valor de pA₂ nestes casos (LEW e ANGUS, 1995). Em adição, considerando-se a natureza pseudo-antagonística irreversível das neurotoxinas de serpentes, poder-se-ia questionar a propriedade de nomear estas neurotoxinas como toxinas curare-miméticas.

4.1.2. As α-neurotoxinas do tipo três dedos

A família das neurotoxinas pós-sinápticas do tipo três dedos é caracterizada por uma base formada por três loops adjacentes que emergem de um centro pequeno, globular e hidrofóbico o qual é interligado por quatro pontes de dissulfeto conservadas (TSETLIN, 1999). A neurotoxina é uma molécula plana em forma de folha com uma leve concavidade, o plano sendo determinado por uma extensa folha do tipo β em multi-camadas (TSETLIN, 1999). Além disso, a pasta dos três dedos é também susceptível a uma variedade de desvios aparentes e súbitos como o número de camadas β presentes, tamanho do loop e calda C-terminal bem como curvas e voltas de vários loops os quais exercem grande significância com respeito em relação a função e seletividade dos alvos moleculares. Portanto, apesar da prega geral, as toxinas do tipo três dedos demonstram um variado range de atividades farmacológicas incluindo neurotoxicidade central e periférica, citotoxicidade, cardiotoxicidade, inibição enzimática como as da acetilcolinesterase, efeitos hipotensivos e agregação plaquetária (NIRTHAN et al., 2003). Entretanto, foi proposto que a plataforma das toxinas do tipo três dedos é usada pela serpente como suporte para diferentes combinações de grupos funcionais, gerando uma variedade de alvos específicos. Pode parecer que as serpentes aderem a uma política de economia estrutural por utilizar um número limitado de moldes moleculares para obter uma extraordinária diversidade funcional.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nesta fase do projeto os objetivos principais foram identificar, purificar e caracterizar bioquímica e farmacologicamente os componentes neurotóxicos do veneno total desprovidos de atividade PLA₂ usando-se:

- a) equipamento de cromatografia líquida para a separação, extração e purificação dos componentes do veneno total;
- b) técnica de eletroforese para a comprovação da pureza dos compostos;
- c) medida da atividade fosfolipásica A_{2;}
- d) técnica miográficas usando-se a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo para a caracterização farmacológica;

 e) técnica eletrofisiológica em preparação diafragma de camundongo para a medida do potencial de membrana em repouso para a determinação da capacidade despolarizante ou adespolarizante das frações em estudo.

4.3- MATERIAL E MÉTODOS

• Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 30 g, foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. Pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4-10 dias), fornecidos pela Granja Ito S/A (Sumaré-SP). Os animais foram alojados a $25 \pm 2^{\circ}$ C com livre acesso à água e ração (Projeto aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal nº 304-2).

• Veneno

O veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

• Solução nutritiva

Nos experimentos com a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo foi usada a solução de Tyrode com a seguinte composição (mM): NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose. Nos experimentos em preparação *biventer cervicis* de pintainho foi usada a solução de Krebs de composição (mM): NaCl 136; KCl 5; CaCl₂ 2.5; NaHCO₃ 23.8; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2 e glicose 11.

Purificação das sufrações neurotóxicas F6 e F7 do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*

• Preparo do veneno

O veneno de *M. d. carinicauda* foi dissolvido em 40 μ l de bicarbonato de amônio completando-se o volume para 100 μ l com ATF 0,1% e centrifugado (14.000 g, 3 min, 4 °C) para remover material insolúvel. O sobrenadante claro foi usado para cromatografia.

• Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa Sephasil Peptide C18

Usando-se uma coluna do tipo Sephasil Peptide C18 5 μ m St 4.6/250 (Amersham Pharmacia Biotech), o veneno de *M. d. carinicauda* foi aplicado à coluna préequilibrada com ATF (0,1%). O material foi eluído com um gradiente linear (0-65%) de acetonitrila 66% em ATF 0,1%. Em todos os ensaios, o perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. As frações resultantes foram liofilizadas e testadas em sua atividade biológica.

• Cromatografia em HPLC de coluna Fase Reversa de Alta Eficiência

Para verificar a pureza dos picos de interesse eluídos na cromatografia do veneno total em coluna do tipo Sephasil Peptide C18 5 μ m St 4.6/250, bem como o grau de hidrofobicidade destas proteínas, utilizou-se o equipamento Waters HPLC modelo PDA, equipado com duas bombas Waters mod. 510, com injetor automático de amostra Waters modelo U6K e uma coluna C18/µBondapack 3.9 x 300 mm. Para esta cromatografia utilizou-se um gradiente descontínuo de 0 a 100% de solução de acetonitrila 66% em 0,1% de ácido trifluoroacético pH 2,5. As amostras foram monitoradas a 220 nm e em seguida liofilizadas.

• Concentração protéica

As concentrações protéicas, tanto das soluções de veneno total quanto das frações cromatográficas, foram determinadas baseando-se na absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kotron Instruments). Neste caso, uma A_{280nm} de 1,0 (em cubeta de 1 cm) corresponde à concentração de 1,0 mg/ml. A dosagem de proteínas também foi feita utilizando-se o método descrito por LOWRY et al., 1951. A amostra com solução de proteína foi diluída oito vezes em volume final de 200 µl e incubada à temperatura ambiente por 10 min com 1 ml de reagente cuproalcalino, constituído de solução A (carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 N, p/v), solução B1 (sulfato de cobre 1% em H₂O, p/v) e da solução B2 (tartarato de sódio e potássio 2% em H₂O, p/v) na proporção de 100:1:1 v/v, respectivamente.

Em seguida foram adicionados 50 µl de reagente de Folin (Merck), deixando-se por 30 min em temperatura ambiente na ausência de luz. Posteriormente foi lida absorbância a 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva-padrão de soro albumina bovina, com concentrações de 0 a 400 µg/ml.

• Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo LAEMMLI (1970). Os géis de poliacrilamida foram feitos de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e gel de corrida de 12,5%, preparados a partir de uma solução de acrilamida estoque a 30% e N,N, metileno-bisacrilamida a 0,8% (Bio Rad Labs. Richimond, CA, USA) dissolvidos em água deionizada pelo sistema Milli-Q (mIlipore-Waters Co.).

O gel de corrida foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl (1,5 M-pH 8,8) contendo 0,2% de SDS para solubilização das amostras, 0,1% de N-N-N-Tetrametilediamina (TEMED) e 0,01% de persulfato de amônio para polimerização. Após a polimerização deste foi preparado o gel superior (gel de concentração) com 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 1M, ph 6,8; 0,2 % de SDS, 0,1% de TEMED e 0,01% de persulfato de amônio.

As amostras (20 a 50 μ g de proteína) foram diluídas no tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, adicionando-se 2% de SDS mais 10% de glicerol e 1% de azul de bromofenol. A redução das amostras foi feita com DDT (Sigma), numa concentração final de 0,1 M.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em sistema duplo de placas "SE 250 Might Small II" (HoeferScientific instruments), em tampão de corrida (Tris-HCl, 0,025M, glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) à voltagem inicial de 60 Volts até a entrada da proteína no gel de corrida e posteriormente de 100 Volts. Foram usados como padrão os seguintes marcadores de massa molecular, obtidos da Sigma: fosforilase b (97000 kDa), Albumina (66000 kDa), Ovalbumina (45000 kDa), Anidrase carbônica (30000 kDa), Inibidor de Tripsina (20100 kDa) e α -lactalbumina (14400 kDa).

-Coloração das proteínas por prata

As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e utilizadas seqüencialmente, conforme descrito a seguir: Solução fixadora (50%) metanol, (12%) ácido acético e (0,028%) formaldeído por 12 h; 50/5 etanol, 3 x 20 min, solução de sensibilização (0,2/5 tiossulfato de sódio) por 1 min. DdH2O, 3 x 20s; solução de impregnação (0,2% de nitrato de prata, 0,028% formaldeído) por 20 min; ddH2O, 3 x 20s; solução reveladora (6% de carbonato de sódio, 0,4% de tiossulfato de sódio; 0,018% formaldeído) até o aparecimento dos pontos, solução de paralisação (5% de ácido acético) por 10 min.

• Análise de aminoácidos

Os aminoácidos foram separados e analisados por HPLC de fase reversa com seu derivado OPA (ortofitalldeído), baseado no método descrito por JARRET et al., (1986). Uma coluna Spherisorb ODS-2 (5mm, 4 x 250 mm) foi usada e eluída a 0,8 ml/min em um gradiente linear formado por soluções de 65% de metanol e tampão fosfato pH 7,25m (50 mM de água). O gradiente aumentou a proporção de 65% de metanol, de 20 a 60% entre 0 a 25 min, 60 a 75% de 25 a 31 min, e 75 a 100% de 31 a 50 min. O efluente da coluna foi monitorado por um detetor de fluorescência Shimadzu (modelo RF350) operando com um comprimento de onda de excitação de 250 nm e um comprimento de onda de emissão de 480 nm. Para a análise dos aminácidos Pro e Cys foi utilizado um sistema Acc-Tag da Waters adaptado para a coluna usada para OPA. O padrão de aminoácidos usado foi o S-18 da Sigma.

• Determinação da atividade fosfolipásica

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por CHO e KÉZDY (1991) e HOLZER e MACKESSY (1996). O substrato foi ácido 4-nitro-3(octanoiloxi) benzóico. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 0,1 mg/ml de amostra, no caso do veneno e frações. As amostras foram incubadas junto com o substrato, tampão de reação (Tris-HCl 0,1 M, Ca⁺² 0,01 M, pH 8) por 30 min. Após o tempo de incubação, a reação enzimática foi lida em um leitor de placas de 96 poços (SpectraMax 340 Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) 425 nm.

Caracterização farmacológica das subfrações neurotóxicas F6 e F7

• Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

Camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral (300 mg/kg) e posteriormente exsanguinados. Após a dissecação para a retirada do hemidiafragma esquerdo e direito e isolamento dos nervos frênicos correspondentes (BÜLBRING, 1946), as preparações foram banhadas em solução nutritiva de Tyrode (pH 7,5) areada com carbogênio (mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂; pH 7,5) a 37°C. Cada segmento do hemidiafragma foi fixado em uma cuba com capacidade para 5 ml, preenchida com solução nutritiva. O músculo diafragma foi mantido, por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina que se manteve em contato com a superfície da solução nutritiva. O transdutor isométrico (BG-50 g) foi acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400). A preparação, então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico, e diretamente (estimulador Grass S 48), usando-se estímulos supramaximais e freqüência de 0,1 Hz e 0,2 ms para estímulos indiretos e 2ms de duração para estímulos diretos. Após o registro em condições-controle e a verificação do perfeito estado da preparação, foram adicionadas as frações para a observação dos seus efeitos.

• Estudo eletrofisiológico

O registro do potencial de membrana (PR) foi feito em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo). A preparação com sua face torácica voltada para cima (hemidiafragma esquerdo), foi fixada horizontalmente por meio de alfinetes entomológicos, em cuba revestida de resina e silicone, ("Dow Corning-Sylgard"). A cuba foi preenchida com 2 ml de solução de Tyrode de composição já descrita e a preparação mantida à temperatura ambiente e areada com o borbulhamento de carbogênio (mistura de 95% O_2 e 5% CO_2). Para a observação dos parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina de microscópio estereoscópico (WILD M7 S-SWITZERLAND) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Foi usada a técnica convencional de registro com microeletrodo (FATT e KATZ, 1951). Os microeletrodos de vidro, preparados com o auxílio do Vertical Pipete Puller (modelo 700 D-David Kopf Instruments; CA, USA), foram preenchidos com KCl 3 M, tendo uma resistência entre 15-25 M Ω . As micropipetas foram introduzidas intracelularmente (seis leituras em regiões distintas) sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador Leitz, para a medida do potencial de repouso (PR) e captação dos potenciais em de placa terminal em miniatura (PPTM). O eletrodo indiferente constitui-se de um fio de platina. Os biopotenciais foram obtidos por intermédio de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros foram feitos em um microcomputador (Microtec, São Paulo, SP) carregado com um software para aquisição de dados (AqDADOS, Lynx, São Paulo, SP). O computador munido de uma placa conversora A/D é capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise.

• Registro do potencial de membrana

Para a medida do potencial de repouso das fibras musculares, os microeletrodos foram inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio, fazendo-se a medida do deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Além disso, o potencial de membrana foi monitorado digitalmente por meio do software já descrito. O mesmo procedimento foi repetido em seis fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média aritmética e o erro padrão. O estudo dos efeitos induzidos pelas frações sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi feito nos tempos t₀ (controle), t₅, t₁₀, t₁₅, t₃₀, t₆₀, t₉₀, t₁₂₀ min e após a lavagem da preparação.

4.4- RESULTADOS

Estudo bioquímico

4.4.1- Ensaio cromatográfico em HPLC de coluna fase reversa Sephasil Peptide C 18

O veneno total foi dissolvido em 40 μ l de bicarbonato de amônio completandose o volume para 100 μ l com ATF 0,1% (Solvente A), centrifugado, descartando-se o precipitado e usando-se o sobrenadante. Em seguida foi eluído, usando-se um gradiente linear de ACTH 66% em 0,1% de ATF (Solvente B). Foram obtidos 22 picos principais (Figura. 27). A atividade farmacológica sobre a junção neuromuscular foi evidenciada nos picos 6, 7 e 16. Os picos 6 e 7 não mostraram atividade fosfolipásica A_2 . Porém quando testados individualmente (5 µg/ml) em preparação NFD de camundongo, observou-se uma maior potência (4x) em causar bloqueio da neurotransmissão comparada a do veneno total (Figura 29).



Figura 27- Perfil cromatográfico obtido do fracionamento do veneno de M. d. carinicauda em coluna Sephasil Peptide C 18 5 μm ST 4.6/250 eluído em gradiente linear do tampão B (ACTH 66 % em ATF 0,1%) com o tampão A (ATF 0,1 %). Note-se a obtenção de 22 picos principais. * atividade neurotóxica.

4.4.2- Concentração protéica por Lowry



Amostras			Média	Branco	Med (-) Br	Resultado	
F6	0,224	0,217	0,2205	0,062	0,1585	22,7	µg/20ul
F7	0,084	0,089	0,0865	0,062	0,0245	-2,1	µg/20ul
MiDCAI	0,367	0,381	0,3740	0,062	0,3120	51,1	µg/20ul

Figura 28- Gráfico da concentração protéica por Lowry. [BSA]: bovine serum albumine.



Figura 29- Registro miográfico representativo da incubação das subfrações obtidas do veneno de *M. d. carinicauda* em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo estimulada indiretamente (0,1 Hz, 0,2 ms). Em A, efeito induzido pelo pico 6 (5 μg/ml). Em B, efeito induzido pelo pico 7 (5 μg/ml). Em C perfil miográfico do veneno total (20 μg/ml). T: toxina; L: lavagem; VT: veneno total.

4.4.3- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

O veneno total e suas subfrações F6 e F7 foram submetidos à análise do perfil de massa aparente em gel de poliacrilamida a 12,5 %, com SDS, como descrito em Material e Métodos. O gel foi corado com prata e as frações F6 e F7 apresentaram uma única banda com aproximadamente 14 kDa cada em condições não redutoras (Figura 30).



Figura 30- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, na presença de SDS, do veneno total e das subfrações neurotóxicas F6 e F7. A subfrações foram obtidas através da cromatografia do veneno total de *M. d. carinicauda* em coluna Sephasil Peptide C 18 5 μm ST 4.6/250 eluido em gradiente linear do tampão B (ACTH 66 % em ATF 0,1%) com o tampão A (ATF 0,1 %). VT: veneno total; MK: marcadores de massa molecular descritos em Material e Métodos.

4.4.4- Análise de aminoácidos

As subfrações ativas F6 e F7 foram submetidas à hidrólise ácida (HCl 6N) e à derivatização para obtenção da composição global de aminoácidos que é mostrada nas Tabelas 13 e 14. O peso molecular calculado é de 13708 para a F6 e 13933 para a F7 que estão próximos ao resultado, determinado em gel de poliacrilamida. A análise da composição global de aminoácidos evidenciou uma alta presença de Gly, Thr, Pro, Ile, Ala e Asp para ambas as proteínas em comparação com outros resíduos. Não foram determinados resíduos de triptofano pelo processo empregado e outros testes como o de fluorescência não foram utilizados.

Tabela 13- Composição de aminoácidos da neurotoxina F6, isolada a partir do veneno total de *M. d. carinicauda*. A composição é expressa em moles de resíduo por moles de proteína e expressa como porcentagem molar. **n.d:** significa não determinado; **PM Aa**: peso molecular de cada aminoácido; **PM:** peso molecular total de cada aminoácido.

	F6	%	PM Aa	PM
Asp	13	8,57	133	1496
Glu	6	2,84	147	775
Ser	7	5,36	105	610
Gly	21	14,21	75	1198
His	0	0	155	0
Arg	6	4,12	174	937
Thr	14	7,06	119	1556
Ala	10	8,13	89	711
Pro	19	16,76	115	1845
Tyr	2	2,00	181	228
Val	6	5,28	117	979
Met	1	0,86	149	131
Cys	0	0	121	0
Ile	13	10,60	131	1341
Leu	3	2,13	131	340
Phe	7	6,15	165	1030
Lys	4	5,91	146	513
Trp	0	n.d.	204	0
Total	132			13708

Tabela 14- Composição de aminoácidos da neurotoxina F7, isolada a partir do veneno total de *M. d. carinicauda*. A composição é expressa em moles de resíduo por moles de proteína e expressa como porcentagem molar. **n.d:** significa não determinado; **PM Aa**: peso molecular de cada aminoácido; **PM:** peso molecular total de cada aminoácido.

	F7	%	PM Aa	PM
Asp	9	5,94	133	1036
Glu	4	2,02	147	517
Ser	8	5,60	105	697
Gly	25	16,41	75	1427
His	0	0	155	0
Arg	7	4,81	174	1093
Thr	18	8,78	119	2000
Ala	9	7,42	89	640
Pro	18	15,48	115	1748
Tyr	3	2,79	181	342
Val	9	7,55	117	1468
Met	0	0	149	0
Cys	0	0	121	0
Ile	6	4,54	131	619
Leu	5	3,82	131	566
Phe	5	4,25	165	736
Lys	8	10,31	146	1026
Trp	0	n.d.	204	0
Total	134			13933

Caracterização farmacológica das subfrações F6 e F7

Estudo miográfico

4.4.5- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

Estimulação elétrica indireta

A incubação da preparação com o pico 6 (5 μ g/ml) a 37 °C causou uma diminuição gradativa da força de contração muscular até a sua inibição completa. Nesta concentração observou-se um bloqueio de 50 % da resposta contrátil em 18 ± 3 min e bloqueio de 100% em 50 ± 2 min de observação (n=4, p<0,05). Sucessivas lavagens da preparação não reverteram o bloqueio instalado e nem mesmo a aplicação de neostigmina (6 μ M) (não mostrado) e 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP, 10 μ M) mostraram-se eficazes em reverter os bloqueios neuromusculares induzidos (Figura 31).

Da mesma forma o pico 7 ensaiado a 37°C (5 μ g/ml) demonstrou a mesma potência em bloquear a junção neuromuscular de camundongo. Neste caso o bloqueio de 50% foi obtido aos 17 ± 3 min e alcançou 100 % de bloqueio aos 65 ± 3 min de observação (n=4, p<0,05). Sucessivas lavagens e neostigmina (6 μ M) (não mostrado) também foram ineficazes em reverter o bloqueio. Porém, 3,4-DAP (10 μ M) reverteu parcialmente o bloqueio neuromuscular (15 ± 2%) (Figura 31).



Figura 31- Registros miográficos representativos da incubação das subfrações neurotóxicas F6 e F7 em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estimulação indireta e direta a 37°C. Estímulos indiretos foram dados a 1Hz e 0,2 ms e os diretos a 1Hz e 2 ms. Em (A), o gráfico da resposta contrátil em função do tempo comparando as preparações tratadas com o controle Tyrode. E (B), registro miográfico representativo da incubação da toxina F6 (5 µg/ml). Em (C), registro miográfico representativo da incubação da toxina F7 (5 µg/ml). Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 experimentos. *p<0,05; L: lavagem; 3,4-DAP: 3,4-diaminopiridina (10 µM); E.D.: estimulação direta; E.I.: estimulação indireta.</p>

Estudo eletrofisiológico

4.4.6- Medidas do potencial de membrana em repouso

As medidas do PR de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo em solução nutritiva (controle Tyrode) e de preparações incubadas com as subfrações F6 e F7 foram obtidas nos tempos (t) t₀, t₅, t₁₀, t₁₅, t₃₀, t₆₀, t₉₀, t₁₂₀ na região da placa terminal e distante dela (fibra muscular). O tempo de observação adotado está relacionado ao tempo de observação usado nos experimentos miográficos.

- 1. Tyrode (n=3): preparações controle comportaram-se de modo homogêneo mantendo os valores dos PR ao longo de 120 min, dentro do esperado (-80 \pm 0.3 mV).
- F6-F7 5 μg/ml (n=3): as preparações incubadas com as subfrações F6-F7 quando comparadas ao controle Tyrode não induziram alterações dos valores do PM somente em ambas as regiões pesquisada durante 120 min de observação: placa (RP) e fora de placa (FP) (Figura 32).



Figura. 32- Efeito induzido pelo pool das neurotoxinas F6-F7 (5 μg/ml) sobre o potencial de membrana da placa motora e da fibra muscular em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Note-se que não há alteração no potencial de membrana. O gráfico representa a média ± erro padrão de três experimentos.

4.5- DISCUSSÃO

Os venenos de *Micrurus fulvius* e *Micrurus nigrocinctus* que são serpentes corais da América Central e América do Norte, respectivamente, deprimem as respostas à estimulação elétrica direta do músculo e despolarizam a membrana da fibra muscular (WEIS e MCISAAC, 1971; GOULARTE et al., 1995). Em contraste, os venenos das serpentes corais sul-americanas *M. lemniscatus*, *M. frontalis* e *M. corallinus* não alteram a força de contração muscular em resposta a estímulos diretos (VITAL BRAZIL et al, 1976) nem o potencial de membrana de preparações neuromusculares (VITAL BRAZIL e FONTANA, 1984).

As α-neurotoxinas ou toxinas pós-sinápticas são antagonistas dos receptores nicotínicos do músculo esquelético. Elas são largamente referidas como toxinas curaremiméticas devido às similaridades no mecanismo de ação em relação ao (+)-tubocurarina (ENDO e TAMYIA, 1991).

Em contraste com as β -neurotoxinas, as α -neurotoxinas são somente encontradas nos venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae. Mais de 100 neurotoxinas pós-sinápticas já foram isoladas e seqüenciadas, porém muito poucas foram estudadas profundamente do ponto de vista do seu modo de ação (HODGSON e WIKRAMARATNA, 2002). Além disso, muitas toxinas foram caracterizadas como pré ou pós-sinápticas por meio de sua seqüência de aminoácidos ou a ocorrência de paralisia flácida (HODGSON e WIKRAMARATNA, 2002).

Normalmente, estas toxinas são caracterizadas por estudos de "binding" usando-se a membrana-ligada do órgão elétrico de "Torpedo" (CHICHEPORTICHE et al., 1975). Porém, apesar de se obter informações importantes sobre o sítio de ligação dessas toxinas, por intermédio da técnica de "binding" não se é possível saber se a substância é um agonista ou antagonista do receptor nicotínico. No entanto, informações mais precisas sobre a atividade agonista ou antagonista dessas toxinas é dada usando-se preparações neuromusculares de mamíferos e ave (VITAL BRAZIL et al., 1979; VITAL BRAZIL et al., 2000).

Assim, o estudo detalhado, bioquímico e farmacológico de novas neurotoxinas pós-sinápticas que não a conhecida α -bungarotoxina aumentaria a disponibilidade dessa classe de neurotoxinas corroborando os estudos de "binding", o que tem encorajado o estudo de venenos como fontes destas proteínas.

Como mostrou-se, até agora, as subfrações ativas (F6-F7) oriundas do fracionamento do veneno de *M. dumerilii* carinicauda não deprimem as respostas à estimulação direta e não despolarizam a membrana da fibra muscular assim como ocorre com o veneno total (SERAFIM et al., 2002). Assim, similarmente a outros venenos de serpentes sul-americanas e também a toxinas pós-sinápticas isoladas de serpentes elapídicas as subfrações (F6-F7) não alteram a excitabilidade da membrana da fibra muscular. Assim sendo, supõe-se que a causa primária do bloqueio neuromuscular induzido por estas subfrações seja a sua ligação com os receptores nicotínicos da placa terminal, impedindo a interação com o neurotransmissor ACh.

Além disso, a ineficácia da neostigmina em antagonizar o bloqueio da resposta contrátil em diafragma de camundongo corrobora os achados de (SERAFIM et al., 2002) com o veneno total. Com este veneno, observaram que após a adição de neostigmina houve um recobro muito pequeno da amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura e sugeriram que a maioria dos receptores nicotínicos da placa terminal foram bloqueados de forma não-competitiva como ocorre com o veneno de *M. spixii*.

Além disso, o fato de nas atuais condições experimentais a neostigmina não ter sido capaz de reverter o bloqueio neuromuscular e a reversão insignificante produzida pela 3,4-DAP pode sugerir que se está lidando com toxinas pós-sinápticas de cadeia longa (KARLSSON, 1979).

Um dos fatores limitantes ao estudo de toxinas oriundas de venenos elapídicos é sem dúvida o baixo rendimento que estas toxinas apresentam, além da dificuldade em se conseguir quantidades suficientes de veneno (BOLAÑOS, 1972).

Assim, com o veneno de *M. dumerilii carinicauda* não foi diferente. O rendimento das subfrações (F6-F7) ficou em torno de 0.1 %, o que impediu um estudo mais detalhado de suas atividades na junção neuromuscular.

Porém, até onde se pôde avançar ficou demonstrado de que estas duas subfrações exercem um papel fundamental e preponderante no bloqueio neuromuscular desencadeado pelo veneno total.

Também por meio da eletroforese em SDS-PAGE observou-se que o peso molecular destas duas subfrações se encontra em torno de 14 kDa, valor semelhante ao de toxinas elapídicas pós-sinápticas ou α -neurotoxinas como as do veneno de *Bungarus fasciatus* que exibem peso molecular de 14.2 kDa (THEO et al., 1982).

Os pesos moleculares das α -neurotoxinas podem variar muito. Por exemplo no caso da α -bungarotoxina a cromatografia de exclusão sugere um peso molecular de 15 a 16 kDa enquanto a análise de aminoácidos indica um peso molecular de 8 kDa (THEO et al., 1982).

Assim, a caracterização completa das subfrações (F6 e F7) como α neurotoxinas só seria possível por meio da verificação de características bioquímicas e farmacológicas básicas. Neste aspecto, seria imprescindível promover-se um estudo das composições de aminoácidos, do ponto isoelétrico, dos resíduos de aminoácidos Nterminais ou seqüenciamento completo além de um estudo eletrofisiológico mais detalhado como o realizado para a PLA₂ MiDCAI.

4.6- CONCLUSÃO

Os estudos realizados até o momento com as neurotoxinas bloqueadoras F6 e F7 permitem concluir que:

- a) as duas subfrações ativas F6 e F7 são isoformas neurotóxicas por possuírem o mesmo peso molecular e desenvolverem as mesmas alterações neuromusculares em preparação de camundongo;
- b) Possuem peso molecular semelhante ao de outras neurotoxinas curareformes ou α-neurotoxinas elapídicas;

- c) Não exercem efeito sobre a resposta a estímulos diretos em preparações neuromusculares de camundongo.
- d) Não possuem atividade despolarizante no terminal nervoso motor nem na fibra muscular;
- e) Exercem efeito bloqueador neuromuscular irreversível;
- f) São responsáveis pelo efeito neurotóxico principal do veneno já caracterizado como de ação pós-sináptica por SERAFIM et al. (2002).

5- CONCLUSÃO GERAL

Este estudo atingiu os objetivos propostos, quais sejam:

- 1) Identificar e isolar as neurotoxinas constituintes do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*.
- Promover a caracterização bioquímica e farmacológica destas toxinas disponibilizando-as como novas neurotoxinas isoladas de um veneno elapídico.
- Proporcionar um avanço no estudo toxinológico por meio do uso de técnicas eletrofisiológicas mais refinadas como a de whole-cell patch-clamp fato pouco comum na atualidade.

Assim, a nova fosfolipase A_2 , a qual foi chamada de MiDCAI, é uma nova neurotoxina de ação pré-sináptica dentre as poucas já isoladas e caracterizadas dos venenos de serpentes elapídicas sul-americanas. Além disso, não possui atividade musculotrópica significativa. Também demonstrou atuar como uma toxina bloqueadora de canais de potássio, ação responsável pelo efeito facilitador desenvolvido em preparações neuromusculares de camundongo.

A caracterização bioquímica e farmacológica parcial das outras duas neurotoxinas isoladas (F6 e F7) também permite concluir que:

- a) o peso molecular destas duas neurotoxinas se assemelha ao de outras neurotoxinas elapídicas de ação pós-sináptica descritas na literatura;
- b) O fato de essas toxinas não exercerem efeito despolarizante na fibra muscular de preparação diafragma de camundongo reforça a idéia de uma ação do tipo curaremimética;
- c) A irreversibilidade da ação bloqueadora neuromuscular também corrobora a idéia de que estas toxinas sejam do tipo α-neurotoxinas, fato que é comum para venenos elapídicos.
6- PERSPECTIVAS FUTURAS

O fracionamento bioquímico do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* demonstrou um número acentuado de frações que compõem este veneno. Neste trabalho, foi dada ênfase no estudo apenas das frações com atividade neurotóxica. Por fim, este estudo pode ser complementado com as seguintes perspectivas:

- a) Realizar experimentos bioquímicos com a PLA₂ MiDCAI para se comprovar a falta de atividade anti-colinesterásica.
- b) Utilizando-se a técnica de patch-clamp, promover o isolamento das correntes de potássio para determinação do tipo de canal de potássio que está sendo bloqueado por esta toxina.
- c) Promover um estudo de binding para se averiguar com exatidão em que área do terminal nervoso pré-sináptico a toxina está se ligando.
- d) Realizar a análise de cristalografia da toxina para um maior entendimento na relação estrutura-atividade.

Com relação às isoformas F6 e F7:

- a) Promover o seqüenciamento completo e análise de aminoácidos para a realização da homologia comparativa com outras neurotoxinas elapídicas;
- b) Promover um estudo miográfico em preparação *biventer cervicis* de pintainho e diafragma de camundongo desnervado para a comprovação do sítio de ação pós-sináptico;
- c) Promover um estudo de binding para a avaliação com mais precisão do sítio de ligação para estas duas isoformas.
- d) Promover um estudo eletrofisiológico completo como o realizado para a PLA₂ neurotóxica MiDCAI. Neste aspecto, utilizar a técnica de voltage-clamp em oocitos de rã para uma avaliação mais clara do efeito destas duas isoformas em receptores nicotínicos do tipo muscular.

Quanto às outras frações obtidas do veneno total:

Isolar e caracterizar bioquímica e farmacologicamente as subfrações responsáveis pelo conhecido efeito cardiotóxico do veneno total.



ABE, T; LIMBRICK, A. R.; MILEDI, R. Acute muscle denervation induced by beta-bungarotoxin **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 194: 545-53, 1976.

ALAPE-GIRÓN, A.; STILES, B.; SCHMIDT, J.; GIRÓN-CORTES, M.; THELESTAM, M.; JORNVALL, H.; BERGMAN, T. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A₂ from the venom of coral snakes *Micrurus nigrocinctus*. **FEBS Lett**, 380: 29-32, 1996.

ALAPE-GIRÓN, A., PERSSON, B., CEDERLUND, E., FLORES-DIAZ, M., GUTIERREZ, J.M., THELESTAM, M., BERGMAN, T. JORNVALL, H. Elapid venom toxins:multiple recruitments of ancient scaffolds. **Eur J Biochem**, 259: 225-34, 1999.

ANDERSON, R.G. The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem, 67: 199-225, 1998.

ANDERSON, A.J.; HARVEY, A.L.; ROWAN, E.G.; STRONG, P.N. Effects of charybedotoxin, a blocker of Ca⁺-activated potassium channels, on motor nerve terminals. **Br J Pharmacol**, 95: 1329-35, 1988.

ANDERSON, D.C.; PARSONS, S.M. Uncoupling of cholinergic synaptic vesicles by the presynaptic toxin β-bungarotoxin . **J Neurochem**, 47:1305-11, 1986.

ARITA, H.; HANASAKI, K.; NAKANO, T.; OKA, S.; TERAOKA, H.; MATSUMOTO, K. Novel proliferative effect of phospholipase A2 in Swiss 3T3 cells via specific binding site. **J Biol Chem**, 266: 19139-41, 1991.

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C .A.; MANDELBOUM, F. R. Isolation of the proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, 23: 691-5, 1985.

AUGUSTINE, G. J. Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. **J Physiol**, 431:343-64, 1990.

AUGUSTINE, G. J.; CHARLTON, M. P., SMITH, S. J. Calcium action in synaptic transmitter release. **Annu Rev Neurosci**, 10: 633-93, 1987.

BALNAVE, C. D.; ALLEN, D. G. Evidence for Na⁺/ Ca²⁺ exchange in intact single skeletal muscle fiber from the mouse. **Am J Physiol**, 274: 940-6, 1998.

BANUMATHI, S.; RAJASHANKAR, K. R.; NOTZEL, C.; ALEKSIEV, B.; SINGH, T.
P.; GENOV; N.; BETZEL, C. Structure of the neurotoxic complex vipoxin at 1.4 A resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 57:1552-9, 2001.
BARROS, T. Las serpientes de coral (Elapidae: Micrurus) de la cuenca del lago de Maracaibo y sus controvertidas espécies miméticas. In: Primer Encuentro Nacional de Herpetofauna y Animales Venenosos. Universidad Central de Venezuela. Caracas, 2002.

BERGER, B. J.; BHATTI, A. R. Snake venoms and their cross-reactivity: a review. **Biochem Cell Biol**, 67: 597-601, 1989.

BEHEND, N.; JENSEN, O.N.; ENGELHOLM, L. H.; MORTZ, E.; MAN, M.; DANO, K. A urokinase receptor-associated, for secretory phospholipases A₂ protein with collagen binding properties. **J Biol Chem**, 275: 1993-2002, 2000.

BIEBER, A. L. Metal and non protein constituents in snake venoms. In: LEE, C. Y. **Snake Venoms**: Handbook of experimental pharmacology. New York: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 1979.v.52.

BJARNASON, J.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, 2: 325-72, 1994.

BLANKENSHIP, J. E. Tetrodotoxin: from poison to powerful tool. **Perspect Biol Med**, 19: 509-26, 1976.

BOLANOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. **Am J Trop Med Hyg**, 21: 360-3,1972.

BRIGANT, J. L.; MALLART, A. Presynaptic currents in mouse motor endings. **J Physisol**, 333: 619-36, 1982.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic-nerve diaphragm preparation of the rat. **Br J Pharmacol**, 1: 38-61, 1946.

BURGOYNE, R. D. Calpactine in exocitosis. Nature, 331: 20, 1988.

CAHALAN, M. Molecular properties of sodium channel in excitable membrane. In: COTMEN, C.W.; POSTE, G.; NICOLSON, G. **The cell surface and neuronal function**. Amsterdan: North-Holland Publishing Company, 1980. p.1-47.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Comstock Publishing Associates, 1989. p.90-153. v1.

CATTERAL, W. A. Neurotoxins as allosteric modofiers of voltage-sensitive sodium channels. In: CECCARELLI, B.; CLEMENTI, F. Neurotoxins: Tools in Neurobiology. New York: Raven Press, 1979. p 1-16.

CATTERAL, W. A.; HARTSHONE, R. P.; BENESKI, D. A. Molecular properties of neurotoxin receptor sites associated with sodium channels from mammalian brain. **Toxicon**, 20: 27-40, 1982.

CARATSCH, C. G.; MARANDA, B., MILEDI, R.; STRONG, P. N. A further study of the phospholipase-independente action of β -bungarotoxin at frog endplates. **J Physiol** 319: 179-91, 1981.

CARATSCH, C. G.; MILEDI, R.; STRONG, P. N. Influence of divalent cations on the fosfolipase independent action of β -bungarotoxin of the frog neuromuscular junctions. **J Physiol**, 363: 169-79, 1985.

CHANG, C. C.; SU, M. J. Mutual potentiation, at nerve terminals, between toxins from snake venoms which contain phospholipase A activity: β -bungarotoxin, taipoxin, crotoxin. **Toxicon**, 18: 641-48, 1980.

CHANG, C. C. Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. **Proc Natl** Sci Counc B, 9, 126-42, 1985.

CHANG, C. C.; LEE, C. Y. Isolation of neurotoxins from the venom of Bungarus multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action. Arch Int Pharmacodyn, 144: 241, 1963.

CHANG, C. C.; LEE, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American Ratlesnake venom, is presynaptic toxin acting like β-bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 296: 159-68, 1977.

CHANG, C. C.; SU, M. J. Presynaptic toxicity of the histidine-modified, phospholipase A_2 –inactive β -bungarotoxin, crotoxin and notexin. **Toxicon**, 20: 895-905, 1982.

CHANG, C. C. The action of snake venoms on the nerve and muscle. In: LEE, C. Y. Snake Venoms. Berlin: Springer, 1979. p. 309-76.

CHIAPPINELLI, V. A. Action of snake venom toxins on neural nicotinic receptors and other neuronal receptors. **Pharmc Ther**, 31: 1-32, 1985.

CHANGEAUX, J. P.; KASSAI, M.; LEE, C. Y. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, 67: 1241-7, 1970.

CHICHEPORTICHE, R.; VINCENT, J. P.; KOPEYAN, C.; SCHEWEITZ, H.; LAZDUNSKI, M. Structure-function relationship in the binding of snake neurotoxins to the torpedo membrane receptor. **Biochemistry**, 14: 2081-91, 1975.

CHIU, S.Y., RITCHIE, J. M. Evidence for the presence of potassium channels in the internod of frog myelinated nerve fibres. **J Physiol**, 322: 485-501, 1982.

CHO, W.; KÉZDY, F. J. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A₂. **Methods Enzymol**, 197: 75-9, 1991.

COHEN, P.; DAWSON, J. H.; SELIGMAN JR., E. B. Cross-neutralization of *Micrurus fulvius fulvius* (coral snake) venom by anti-*Micrurus carinicauda dumerilii* serum. **Am J Trop Med Hyg**, 13: 308-10, 1968.

CONDREA, E., FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E., YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja naja atra* snake venom Phospholipases A₂. **Toxicon**, 19: 705-20, 1981.

CONDREA, E.; RAPUANO, B. E., FLETCHER, J. E.; YANG, C. C., ROSENBERG, P. Ethoxyformylation and guanidination of snake venom Phospholipases A₂: effects on enzymatic activity, lethality and some pharmacological properties. **Toxicon**, 21: 209-18, 1983a.

CONDREA, E.; RAPUANO, B. E.; SOONS, K. R.; YANG, C. C; ROSENBERG, P. Effect of methylation of histidine-48 on some enzymatic and pharmacological activities of snake venoms PLA₂. Life Sciences, 32: 1455-61, 1983b.

CRACHI, M. T.; HAMMER, L. W.; HODGSON, W. C. A pharmacological examination of venom from the Papuan taipan (Oxyuranus scutellatus canis). **Toxicon**, 37: 1721-34, 1999.

CREMONA, O.; DE CAMILLI, P. Synaptic vesicle endocytosis. **Curr Opin Neurobiol** 7: 323-30, 1997.

DATYMER, M. E.; GAGE, P. W. Presynaptic and postsynaptic effects of venom of Australian tiger-snake at the neuromuscular junction. **Br J Pharmacol**, 49: 340-54, 1973.

DE LUCA, A.; RAND, M. J.; REID, J. J.; STORY, D. F. Differential sensitivities of avian and mammalian to inhibition of cholinergic transmission by ω-conotoxin. GVIA. **Toxicon**, 29: 311-20, 1991.

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.

DEMPSTER, J. Computer analysis of electrophysiological signals. In: Frazer, P. J. Microcomputers in Physiology: a Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1988. p. 51-93.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, 269: 13057-60, 1994.

DENNIS, E. A.; RHE, S. G., BILAH, M. M.; HANNUN, Y. A. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. **Faseb J**, 5: 2068-77, 1991.

DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S.; WARD, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A_2 abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, 40: 6912-20, 2001.

DIAMOND, I.; GOLDBERG, A. L. Uptake and release of 45_{ca} by brain microssomes, synaptossomes and synaptic vesicles. **J Neurochem**, 19:1419-31, 1971.

DODDS, D. C.; OMEIS, I. A.; CUSHMAN, S. J.; HELMS, J. A.; PERIN, M. S. Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium binding-protein 49. J Biol Chem 272: 21488-94, 1997.

DONOSO, P.; HIDALGO, C. Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**, 978: 8-16, 1989.

DOWDALL, M. J.; FOHLMAN, J. P.; WATTS, A. Presynaptic action of snake venom neurotoxins on cholinergic systems. In: CECCARELY, B., CLEMENTI, F. **Neurotoxins:Tools in Neurobiology**. New York: Raven Press, 1977. p.63-76.

DREYER, F.; PENNER, R. The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals. **J Physiol**, 386: 455-63, 1987.

DUFTON, M. J.; HARVEY, A. L. The long and the short of snake toxins. **Trends Pharmacol Sci**, 10: 258-9, 1989.

EAKER, D. – Structural nature of presynaptic neurotoxins from Australian elapid venoms. **Toxicon**, 13: 90-1, 1975.

ELMQVIST, D.; QUASTEL, D. M. J. Presynaptic action of hemicholinium at the neuromuscular junction. **J Physiol**, 177: 463-82, 1965a.

ELMQVIST, D.; QUASTEL, D. M. J. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. **J Physiol**, 178: 505-29, 1965b.

ENDO, T.; TAMYIA, N. Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In: Harvey, AL. **Snake Toxins**. New York: Pergamon Press, 1991. p. 165-221.

ENG, D. L.; GORDON, T. R.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S.G. Development of 4-AP and TEA sensitivities in mammalian myelinated nerve fibers. **J Neurophysisol**, 60: 2168-79, 1988.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORY, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L. nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, 25: 533-35; 2000.

ESQUERDA, J. E.; SOLSONA, C; MARSAL, J. Binding of β-bungarotoxin to Torpedo electric organ synaptossomes. A high resolution autorediographic study. **Neuroscience**, 7: 751-8, 1982.

EVERILL, B.; RIZZO, M. A.; KOCSIS, J. D. Morphologically identified coetaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying proportions. **Am Phys Soc**: 79: 1814-24, 1998.

FATT, P.; KATZ, B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. **J Physiol**, 115: 320-70, 1951.

FATT, P.; KATZ, B. Spontaneous sub-threshold activity at motor nerve endings. **J Physiol**, 117: 109-28, 1952.

FAYARD, J. M.; TESSIER, C.; PAGEAUX, J. F.; LAGARDE, M.; LAUGIER, C. Nuclear location of PLA₂ –I in proliferative cells. **J Cell Sci**, 111: 985-94, 1998.

FERREIRA, M. L.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUM, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZUTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, B. A new bradykinin potentiating (Pepitide P). Isolated from the venom of Bothrops jararacussu (Jararacussu Tapete, Urutu Dourado). **Toxicon**, 30: 33-40, 1992.

FLEER, E. A. M; VERHEIJ, H. M.; DE HASS, G. H. - Modification of carboxilate groups in bovine pancreatic phospholipase A_2 . Identification of Aspartate-49 as Ca^{2+} binding ligand. **Eur J Biochem**, 113: 283-8, 1981.

FLETCHER, J. E.; MIDDLEBROOK, J. L. Effects of β -bungarotoxin and *Naja naja atra* snake venom PLA₂ on aceltilcholine release and choline up-take in synaptossomes. **Toxicon**, 24: 91-9, 1986.

FLINCK, M. T., ATCHISON, W. D. Iberitoxin-induced block of Ca^{+2} -activated K⁺ channels Induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from Mammalian Motor nerve terminals. **J Pharmacol Exp Ther**, 305: 646-52, 2003.

FOHLMAN, J. Comparison of two highly toxic Australian snake venoms: the taipan oxyuranus s. scutellatus) and the fierce snake (Parademansia microlepdotus). **Toxicon**, 17: 170-2, 1979.

FOHLMAN, J.; EAKER, D.; KARLSOON, E.; THESLEFF, S. Taipoxin, an extremly potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake Taipan (Oxyuranus s. scutellatus). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. **Eur J Biochem**, 68: 457-69, 1976.

FOHLMAN, J.; LIND, P.; EAKER, D. Taypoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin. Elucidation of the primarily structure of the acidic carbohydrate-containing taypoxin-subunit, a prophospholipase homolog. **FEBS Lett**, 84: 367-71, 1977.

FONTANA, M. D.; VITAL-BRAZIL, O. Mode of action of *Phoneutria negriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. **Brazilian J Med Biol Res**, 18: 557-565, 1985.

FRY, M. R.; GHOSH, S. S.; EAST, J. M.; FRANSON, R. C. Role of human sperm phospholipase A_2 in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A_2 activity on membrane perturbation and oocyte penetration. **Biol Reprod**, 47: 751-9, 1992.

GAGE, P. W.; EISENBERG, R. S. Action potentials, after potentials and excitationcontraction coupling in frog sartorius fibers without transverse tubules. **J Gen Physiol**, 53: 298-310, 1969.

GALVEZ, A.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; REUBEN, J.P; ROY-CONTANCIN, L.; FEINGENBAUM, P.; KACZOROWSKI, G.J.; GARCIA, M.L. Purification and characterization of a unique potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channels from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*. J Biol Chem, 265:11083-90, 1990.

GINSBORG, B. L.; WARRINER, J. N. The isolated chick *biventer cervicis* nerve muscle preparation. **Br J Pharmacol**, 15: 410-15, 1960.

GLASGOLEVA, I. M.; YE, M.; LIBERMAN, A.; KHASHAYEV, Z.; K.H., M. Effect of uncoupling agents of oxidative phosphorylation on the release of acetylcholine from nerve endings. **Biofizica**, 15: 76-3, 1970.

GONG, N.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Postsynaptic short-chain neurotoxin from Psudonaja textilis cDNA cloning, expression and protein characterization. **Eur J Biochem**, 265: 982-9, 1999.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J.; HOLBROOKE, S. E.; MARSH, N. A.; SANTANA DE SA. S.; TU, A. T. Sites of action of Mojave toxin isolated of the venom of Mojave rattlesnake. **Br J Pharmac**, 69: 421-31, 1980.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D. M.; HAWGOOD, B. J.; EKDER, H. Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, 22: 85-98, 1984.

GOULARTE, F. C.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; COGO, J. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. **Toxicon**, 33: 679-89, 1995.

GOULARTE, F. C.; da CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Electrophysiological and ultrastructural analysis of the neuromuscular blockade and myotoxicity induced by the Micrurus nigrocinctus snake venom. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 49: 290-6, 1999.

GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I. Ammodytoxins (*Vipera ammodytes ammodytes*). In RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C. Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. New York: Oxford University Press, 1997. p.224-6.

GUNDERSEN, C. B.; NEWTON, M.W.; JENDEN, D. J. β-bungarotoxin elevates diaphragm acetylcholine levels. **Brain Res**, 182: 486-90, 1980.

GUNDERSEN, C. B.; KATZ, B.; MILEDI, R. The antagonism between botulinum toxin and calcium in motor nerve terminals. **Proceedings of the Royal Society of London (B)**, 216: 369-76, 1982.

HALLIWELL, J. V.; TSE, C. K.; SPOKES, J. W.; OTHMAN, I.; DOLLY, J. O. biochemical and electrophysiological demonstrations of the actions of β -bungarotoxin on synapses in brain. **J Neurochem**, 30: 543-50, 1982.

HALPERT, J.; EAKER, D.; KARLSSON, E. The role of the phospholipase in the action of a presynaptic neurotoxin from the venom of *Notechis scutatus scutatus* (Australian Tiger snake). **FEBS Letters**, 61: 72-6, 1975.

HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and free-membrane patches. **Plügers Arch**, 391: 85-100, 1981.

HANAHAN, D. J. In: Phospholipases. The enzymes, 3rd ed., vol V, 71-85, 1971.

HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. **Pharmac Ther**, 31: 79-102, 1985.

HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A.; KARLSSON, E. - Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 2: 383-404, 1975.

HARRIS, J. B.; MARTIN, C. A. - Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taypoxin, of the Australian taipan, *Oxyurannus scutellatus*. **Br J Pharmacol**, 76: 61-75, 1982.

HARVEY, A. L. – Cardiotoxin from cobra venoms – possible mechanisms of action. **J Toxicol Toxin Reviews**, 4: 41-69, 1985.

HARVEY, A. L.; KARLSSON, E. Protease inhibitor homologues from mamba venoms: facilitation of acetylcholine release and interaction with prejuntional blocking toxins. **Br J Pharmacol**, 77: 153-161, 1982.

HARVEY, A. L.; ANDERSON, A. J. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. **Pharmac Ther**, 31: 33-55: 1983.

HARVEY, A. L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS, J. B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro prepartions from rodents and chicks. **Toxicon**, 32: 257-65, 1994.

HARVEY, A. L. Cytolytic toxins. In: SHIER, W. R.; MEBS, D. Handbook of Toxinology. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 48-53.

HASS, A.; ROSSBERG, M. I.; HODES, H. L.; YATT, A. C.; HODES, D. S. - Endotoxin levels in immunocompromised children with fever. **J Pediatr**, 109: 265-9, 1986.

HAWGOOD, B. J.; SMITH, J. W. The mode of action of the phospholipase A (crotapotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake at the mouse neuromuscular junction. **Br J Pharmacol**, 61: 597-609: 1977.

HAWGOOD, B.; BON, C. Snake venom presynaptic toxins. In: TU A.T. Handbook of Natural Toxins. New York: Marcel Dekker, 1991. p.3-52.

HAWGOOD B. J.; SMITH, I. C. H. The importance of phospholipase A_2 in the early induction by crotoxin of biphasic changes in end plate potentials at the frog neuromuscular junction. **Toxicon**, 27: 272-6, 1989.

HAWGOOD, B. J.; SMITH, I. C. H.; STRONG, P. N. Early induction by crotoxin of biphasic frequency changes and giant miniature endplate potentials in frog muscle. **Brit J Pharmacol**, 94: 765-72, 1988.

HEINRIKSON, R. L. - Dissection and sequence analysis of phospholipases A₂. **Methods Enzymol**, 197: 201-14, 1991.

HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A_2 - α from the venom of *Crotalus adamanteus*. **J Biol Chem**, 252: 4913-21, 1977.

HO, C. L.; LEE, C. Y. Mode of neuromuscular blocking action of ceruleotoxin. **Toxicon**, 22: 301-7, 1983.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction excitation in nerve. **J Physiol**, 166:145-67, 1952.

HODGSON, W. C.; WICKRAMARATNA, J. C. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. **Clin Ex Phar Phy**, 29: 807-14, 2002.

HOLZER, M.; MAKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, 34: 1149-55, 1996.

HOWARD, B. D. Effects of β -bungarotoxin of mitochondrial respiration are caused by associated phospholipase A activity. **Biochem Biophys Res Com**, 67: 58-65, 1975.

HOWARD, B. D.; WU, W.C.S. evidence that β -bungarotoxin acts at the exterior of the nerve terminals. **Brain Research**, 103: 190-2, 1976.

HOWARD, B. D.; TRUOG, R.. Relationship between neurotoxicity and phospholipase A activity of β -bungarotoxin. **Biochemistry**, 16: 122-5, 1977.

HUBBARD, J. I.; SCHMIDT, R. F. An electrophysiological investigation of mammalian nerve terminals. **J Physiol**, 166: 145-67, 1963.

HUBBARD, J. I.; LLINÁS, R., QUASTEL, D. M. J. Investigation of presynaptic function. In: **Electrophysiological analysis of synaptic transmission.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1969. 112-43.

IKEDA, K.; HAYASHI, K. pH-dependence of the binding constant of Ca^{+2} to β bungarotoxin from *bungarus multicinctus* venom. **J Biochem**, 93: 1343-51, 1983.

IWANAGA, S.; OHSHIMA, G.; SUZEK, L. Proteinase from the venom of Agkistrodon Halys Blomhoffi. In: LORAND, L. **Methods in Enzimology**. N. Y. Academic Press, 1976.

IWANAGA, S.; SUSUKI, T. Enzymes in snake venom. In: LEE, C. Y. Snake venoms: Handbook of Experimental Pharmacology. New York: Springer-Verlag. Berling Heidelberg, 1979. p. 41-55.

JARRET, H. W.; COOSKY, K. D.; ELLIS, B.; ANDERSON, J. M. The separation of ophthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica column. **Anal Biochem**, 153: 189-98, 1986.

JIA, L. G.; SHIMOKAWA, K. I.; BJAMSON, J. B., FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, 34: 1269-76, 1996.

JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Biochemistry of snake venoms. Clin Sci, 65: 389-31, 1970.

JORGENSEN, K., DAVIDSEN, J., MOURITSEN, O.G. Biphysical mechanisms of phospholipase A₂ activation and use in liposome-based drug delivery. **FEBS Lett**, 521: 23-27, 2002.

KAISER, I. I.; GUTIERREZ, J. M.; PLUMMER, D.; AIRD, S. D.; ODELL, G. V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of B*othrops asper*. **Arch Biochem Biophys**, 278: 319-25, 1990.

KANTOR, H. L.; PRESTEGARD, J. H. Fusion of fatty acid containing lecithin vesicles Biochemistry, 14: 1790-5, 1975.

KAMENSKAYA, M. A.; THESLEFF, S. Neuromuscular blocking actions of an isolated toxin from the elapid (Oxyuranus scutellatus). Act Physiol Scand, 90: 716-24, 1974.

KAO, C.Y. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. **Pharmacol Rev**, 18: 997-1049, 1966.

KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: LEE, C.Y. Handbook of experimental pharmacology. New York: Springer, Berling Heidelberg, 1979. p. 159-212.

KARLSSON, E.; EAKER, D.; RYDÉN, L. Purification of presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake Notechis scutatus scutatus. **Toxicon**, 10: 405-413, 1972.

KELLAWAY, S. H.; CHERRY, R. O.; WILLIAMS, F. E The peripheral action the Australian snake venoms. II. The curare-like action in mammals. Australian J Exper Biol Med Sci, 10: 181-94, 1932.

KELLY, R. B.; VON WEDEL, R. J.; STRONG, P. N. Phospholipase-independent inhibition of transmitter release by β -bungarotoxin. In: CECCARELLI, B.; CLEMENTI, F. Advances in cytopharmacology. New York: Raven Press, 1979. p. 77-85.

KEYNES, R. D., AIDLEY, D. J. Nerve and Muscle. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 11-15.

KINI, R. M., IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases. I: Prediction of presynaptic neurotoxicity. **Toxicon**, 24: 527-41, 1986.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, 27: 613-35, 1989.

KINI, R. M. Venom Phospholipases Enzymes. Chichester: John Willey & Sons, 1997. p.269-282.

KOMAI, H.; MCDOWELL, T. S. Local anesthetic inhibition of voltage-activated potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Anesthesiology**, 94: 1089-95, 2001.

KONISH, T. Electrical excitability of motor nerve terminals in the mouse. **J Physiol** 411-21, 1985.

KONISH, T.; SEARS, T. A. Electrical activity of mouse motor nerve terminals. **Proceedings of the Royal Society**, 222: 115-20, 1984.

KORDAS, M. The effect of membrane polarization on the time course of the end-plate current in frog *sartorius* muscle. **J. Physiol**, 204: 493-502, 1969.

KRIZAJ, I; DOLLY, J. O; GUBENEK, F. Identification of the neural acceptor in bovine cortex for ammodytoxin C, a presynaptically neurotoxic phospholipase A₂. **Biochemistry**, 33: 13938-45, 1994.

KRIZAJ, I; DOLLY, J. O.; GUBENSEK, F. Neurotoxic Phospholipases A₂ ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in Torpedo marmmorata electric organ. **Biochemistry**, 36: 2779-87, 1997.

KRIZAJ, I.; GUBENSEK, F. Neuronal receptors for phospholipases A_2 and β -neurotoxicity. **Biochemie**, 82: 807-14, 2000.

KRIZAJ, I; ROWAN, E. G.; GUBENSEK, F. Ammodytoxin A, acceptor in bovine synaptic membranes. **Toxicon**, 33: 437-49, 1995.

KUDO, H.; SHIMA, K.; ISHIHARA, T. Secondary lectrons induced by fast ions under channeling conditions. Physical Review. **B Condensed Matter**, 47: 27-34, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-5, 1970.

LAI, M. K.; WEN, C. Y.; LEE, C. Y. Local lesion caused by cardiotoxin isolated from Formosan cobra venom. **Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi**., 71: 328-32, 1972.

LAMBEAU, G.; BARHANIN, J.; SCHWEITZ, H.; QAR, J.; LAZDUNSKI, M. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. **J Biol Chem**, 264: 11503-10, 1989.

LANDON, D. N.; WESTGAARD, R. H.; MACDERMOT, J.; THOMPSON, E. J. The morphology of rat soleus neuromuscular junction treated *in vitro* with purified β -bungarotoxin. **Brain Research**, 202: 1-20, 1980.

LEE, C. Y. Elapide neurotoxins and their mode of action. Clin Toxicol., 3: 457-72, 1970.

LEE, C. Y. Mode of action of cobra venom and its purified toxins. In: SIMPSON, L.L. **Neuropoisons and their Pathophysiological Actions**. NewYork: Plenum Press, 1971. p. 21.

LEE, C. Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. **An Rev Pharmacol**, 12: 265-72, 1972.

LEE, C. Y.; CHANG, C. C. Modes of action of purified toxins from elapide venoms on neuromuscular transmission. **Mem Inst Butantan**, 33: 555-72, 1966.

LEE, C. Y.; HO, C. L. The pharmacology of Phospholipases A₂ isolated from snake venoms , with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In: Advances in Pharmacology 4, 37-52, Biochemical-Immunological Pharmacology, eds YOSHIDA, H.; HAGIWARA, Y.; EBASHI, S. Proceedings from the 8th International Congress in Pharmacology. Tokyo, 1982, Pergamon Press, Oxford.

LEE, C. Y.; CHANG, C. C.; CHEN, Y. M. Reversibility of neuromuscular blockade by neurotoxins from *Elapidae* and Sea snake venoms. **J Formosan Med Assoc**, 71: 344-50, 1972.

LEE, C. Y.; TSAI, M. C.; CHEN, Y. M.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. Mode of neuromuscular blocking action of phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes* venom. **Arch Int Pharmacodyn**, 268:313-24, 1984.

LEW, M. J.; ANGUS, J. A. Analysis of competitive agonist-antagonist interaction by non-linear regression. **Trends Pharmacol Sci**, 16: 328-37, 1995.

LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (Ophiophagus hannah) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, 32: 1349-58, 1994.

LING, G., GERARD, R. W. The normal membrane potential of frog sartorius fibres. **J Cell Physiol** 34: 383-96, 1949.

LIÑAS, R; STEINBERG, I. Z.; WALTON, K. Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. **Biophys J**, 33: 289-321, 1981.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193: 265-75, 1951.

LULLMANN-RAUCH, R; THESLEFF, S. Effects of taipoxin on the ultrastructure of cholinergic axon terminals in the mouse adrenal medulla. **Neuroscience**, 4: 837-41, 1979.

MCINTOSH, J. M.; GHOMASHCHI, F. GELB, M. H., DOOLEY, D. J.; STOEHR, S. J.; GIORDANI, A. B.; NAISBITT, S. R. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail Conus magus. **J Biol Chem**, 270: 3518-26, 1995.

MACLEAN, R. L.; MASSARO, E. J., ELLIOT, W. B., OLIVEIRA, B. M. A comparative study of the homology of certain enzymes in Elapidae venoms. **Comp Biochem Physiol**, 39:1023-37, 1971.

MALLART, A. A calcium-activated potassium current in motor nerves terminals of the mouse. **J Physiol**, 368: 577-591, 1985a.

MALLART, A. Electric current flow inside perineural sheaths of mouse motor nerve. **J Physiol**, 368: 565-75, 1985b.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Some physical and biochemical characteristic of HF2, one of the hemorrhagic factor in the venom of *Bothrops jararaca*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAI, Y. **Animal, plant and microbial toxins**. London: Plenum Press, 1976. p. 3.

MARCHBANKS, R. M. Compartmentation of acetylcholine in synapstosomes. **Biochem Pharmacol**, 16: 921-3, 1967.

MASUKAWA, L. M.; LIVENGOOD, D. R. Alterations in spontaneous transmitter release by divalent cations after treatment of the neuromuscular junction with β -bungarotoxin. **Cell Moll Biol**, 2: 277-90; 1982.

MAYER, F.; KIFFMAN, P.; LINKER, A. Hialuronidase. In: Bouer, P. D.; LARDY, H.; MYRBACK, K. **The Enzymes**. London: Academic Press, 1960.

MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. Int J Biochem Biophys, 1: 335-42, 1970.

MELDRUM, B. S. The action of snake venoms on nerve and muscle. The pharmacology of phospholipase A and of polypeptide toxins. **Pharmacol Rev**, 17: 393-45, 1965.

MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIRAHA, H.; TU, A. T. Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrinogenase activity from *Crotalus rubber rubber* venom. **Arch Biochem Biophys**, 253: 108-15, 1987.

MIYAMOTO, M. Binomial analysis of quantal transmitter release at glycerol treated frog neuromuscular junction. **J Physiol**, 250: 121-42, 1975.

MURAKAMI, M.; KAMBI, T.; SHIMBARA, S.; YAMAMOTO, S.; KUWATA, H.; KUDO, I. Functional association of group IIA secretory phospholipase A_2 with the glycosilphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxigenase-2-mediated delayedprostanoid-biosynthetic pathway. **J Biol Chem** 274: 2927-36,1999.

NAKADA, K.; KAKADA, F.; ITO, E.; INOUE, F. Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. **Toxicon**, 22: 922-30, 1984.

NAKAJIMA, M.; KANASAKI, K.; UEDA, M.; ARITA, H. Effect of pancreatic type phospholipase A₂ on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites. **Febs Lett**, 309: 261-4, 1992.

NARAHASHI, T.; ANDERSON, N. C.; MOORE, J. W. Comparison of tetrodotoxin and procaine in internally perfused squid giant. **J Gen Physiol**, 50: 1413-28, 1967.

NEHER, E., SAKMANN, B. Single channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibres. **Nature**, 260: 799-802, 1976.

NICHOLS, D.; SNELLING, R.; DOLLY, O. Bioenergetic actions of β -bungarotoxin , dendrotoxin and bee-venom phospholipase A₂on guinea-pig synaptossomes. **Biochemistry Journal**, 229:653-62, 1985.

NIRTHAN, S.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; GWEE, M. C. E.; KHOO, H. E.; KINI, R. M. Non conventional toxins from Elapid venoms. Toxicon, 41: 397-407, 2003.

OKAMOTO, T.; SCHLEGEL, A.; SCHERER, P. E.; LISANTI, M. P. Caveolins, a family of a scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. **J Biol Chem**, 273: 5419-22, 1998.

OTHMAN, I. B.;SPOKES, J. W.; DOLLY, J. O. Preparation of neurotoxic 3 H- β bungarotoxin : demonstration of binding to brain synapses and its inhibition by toxin I. **Eur J Biochem**, 128: 267-726, 1982.

PALADE, G. E.; PALAY, S. L. Electron microscope observed observations of interneuronal and neurumuscular synapses. Anat Rec, 118: 335-6, 1954.

PARSONS, S. M.; PRIOR, C.;MARSHALL, I. G. The acetylcholine transporter and storage system. **Int. Rev. Neurobiol.**, 279-390, 1993.

PATERSON, D.; NORDBERG, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. **Prog Neurobiol**, 61: 75-111, 2000.

PEDERSEN, S. E.; COHEN, J. B. d-Tubocurarine biding sites are located at the α - γ and α - δ subunit interphases of the nicotinic acetylcholine receptor. **Proc Natl Acad Sci**, 87: 2785-9, 1990.

PENNER, R.; DREYER, F. Two different presynaptic calcium current in mouse nerve terminals. **Pflugers Arch**, 406: 190-7, 1986.

PERKINS, J. R.; TOMER, K. B. Characterization of the lower-molecular-mass fraction of venoms from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* and *Micrurus fulvius* using capillary-electrophoresiselectrospray mass spectrometry. **Eur J Biochem**, 233: 815-27, 1995.

PETERSEN, R.; PENNER, F. K.; PIERAU, F.; DREYER, F. β -bungarotoxin inhibits a non-inactivating potassium current in guinea pig dorsal root ganglion neurons. **Neurosc** Lett, 68: 141-45, 1986.

PILLET, L.; TRÉMEAU, O; DUCANCEL, F. Genetic engineering of snake toxins: Role of invariant residues in the structural and functional properties of a curaremimétic toxin, as probed by site-direct mutagenisis. **J Biol Chem**, 268: 909-16, 1993.

PRIOR, C., DEMPSTER, J., MARSHALL, G. Electrophysiological analysis of transmission at the skeletal neuromuscular junction. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 30: 1-17, 1993.

PROTTI, D. A.; REISING, R.; MACKINLEY, T. A.; UCHITEL, O. D. Calcium channels blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. **Neurology**, 46: 1391-6, 1996.

RADVANYI, F.; KEIL, A., SALIOU, B.; LEMBEZAT, M. P.; BON, C. Binding of divalent and trivalent cations with crotoxin and with its phospholipase and its non-catalytic subunits: effects on enzymatic activity and the interaction of phospholipase component with phospholipids. **Biochem Biophys Acta**, 1006:183-92, 1989.

RASBAND, M. N.; PARK, E. W.; VANDERAH, T. W.; LAI, J.; PORRECA, F.; TRIMMER, S. J. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. Neurobiology, 6: 13373-8, 2001

REHN, H.; BETZ, H. Binding of β -bungarotoxin to synaptic membrane fractions of chick brain. J. Biol. Chem. 257: 10015-10022, 1982.

RENETSEDER, R. BRUNIE, S., DKJSTRA, B.W., DRENTH, J., SIEGLER, B. B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J Biol Chem** 260: 11627-11634, 1985.

RIGDEN, D. J.; JEDRZEJAS, M. J.; GALPERIN, M. Y. An extracellular calcium- binding domain in bacteria with a distant relationship to EF-hands. FEMS Microbiol Lett, 221: 103-10, 2003.

ROSSO, J. P.; VARGAS-ROSSO, O.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P. E. Characterization of α-neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. **Eur J Biochem**, 238: 231-39, 1996.

ROSENBERG, P. Phospholipases. In: SHIER, T. W.; MEBS, D. Handbook of toxicology. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 68-223.

ROWAN, E. G.; HARVEY, A. L. Potassium channel blocking actions of β -bungarotoxin and related toxins on mouse and frog motor nerve terminals. **Br J Pharmacol**, 94: 839-47, 1988.

RUGOLO, M.; DOLLY, J. O.; NICHOLLS, D. G. The mechanism of action of β -bungarotoxin at the presynaptic plasma membrane. **Biochem J**, 233: 519-23, 1986.

SAEZ-BRIONES, P.; KRAUSS, M., DREGER, M.; HERMANN, A.; TSETLIN VI, HUCHO, F. How do acetylcholine receptor lingands reach their binding sites? **Eur J Biochem**, 265: 902-10, 1999.

SAFRANOV, B. V.; BISCHOFF, U.; VOGEL, W. Single-voltage gated K⁺ channels and their functions in dorsal root ganglion neurons of rat. **J Physiol**, 493: 393-408, 1996.

SANCHES, E. F.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of the bush master snake, *Lachesis muta muta*. **Toxicon**, 25: 611-18, 1987.

SANO, K.; ENOMOTO, K.; MAENO, T. Effects on synthetic ω -conotoxin, a new type Ca⁺² on frog and mouse neuromuscular transmission. **Eur J Pharmacol**, 141:235-41, 1987.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis for the separtion of the proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem** 166: 368-379, 1987.

SCHIAVO, G.; METTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiol Rev**, 80: 717-66, 2000.

SCHOLZ, A.; GRUB, M.; VOGEL, V. Properties and functions of calcium-activated K⁺ channels in small neurons of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. **J Physiol**, 513: 1, 1998.

SCOTT, D. L.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M. H.; SIEGLER, B. P. Crystal structure of bee-venom phospholipase A₂ in complex with a transition-state analogue. **Science**, 250: 1563-66, 1990.

SEN, I.; GRANTHAN, P. A.; COOPER, J. R. Mechanism of β -bungarotoxin on synaptossomal preparations. **Proc Nat Acad Sci**, 73:2664-8, 1976.

SERAFIM, F. G.; REALI, M.; CRUZ-HÖFLING, M.; FONTANA, M. D. - Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. **Toxicon**, 40: 167-74, 2002.

SERVENT, D.; WINCKLER-DIETRICH, V.; HU, Y. Y. Only snake curare-mimetic toxins with a fifth dissulfid bond have high affinity for the neuronal α -7 nicotinic receptor. **J Biol Chem**, 272: 279-86, 1997.

SIMPSON, L. L.; LAUTENSLAGER, G. T.; KAISER, I. I.; MIDDLEBROOK, J. L. Identification of the site at which phospholipase A₂ neurotoxins localize to produce their neuromuscular blocking effects. **Toxicon**, 31: 13-26, 1993.

SINGH, G., GOURINATH, S., SHARMA, S., PARAMASIVAM, M., SRINIVASAN, A., SINGH, T.PSequence and crystal structure determinantion of basic phospholipase A₂ from common krait (Bungarus caeruleus) at 2.4 A resolution: idenmtification and charcterization of its pharmacological sites. **J Mol Biol**, 307: 1049-1059, 2001.

SLOTBOOM, A. J.; JANSEN, E. H. J. M.; VLIJM, H., PATTUS, F.; SOARES DE ARAÚJO, P.; de HAAS, G.H. Ca⁺² binding to porcine pancreatic Phospholipase A2 and its function in enzyme-lipid interaction. **Biochemistry**, 17: 4593-600, 1978.

STRONG, P. N.; GOERKE, J. OBERG, S. G., KELLY, R. B. β-bungarotoxin, a presynaptic toxin with enzymatic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 73: 178-82, 1976.

STRONG, P. N.; KELLY, R. B. Membranes undergoing phases transitions are preferentially hydrolyzed by beta-bungarotoxin. **Biochem Bioph Acta**, 469: 231-35, 1977.

SU, M. J.; CHANG, C. C. Effects of bivalent cations on the presynaptic actions and Phospholipases A_2 activity of notexin. A comparison with other complex presynaptic neurotoxins. **Proceedings of the National Science Council B**, 5: 82-90, 1981.

SU, M. J.; CHANG, C. C. Presynaptic effect of snake venom toxins which have phospholipase A_2 activity (β -bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). **Toxicon**, 22: 631-640, 1984.

SU, M. J.; COULTER, A. R.; SUTHERLAND, S. K.; CHANG, C. C. The presynaptic neuromuscular blocking effect and PLA₂ activity of textilotoxin, a potent toxin isolated from the venom of the australiam brown snake, *Psudonaja textillis* . **Toxicon**, 21: 143-51, 1983.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom that induces apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 224: 134-39, 1996.

TABTI, N.; BOURRET, C.; MALLART, A. Three potassium currents in mouse motor nerve terminals . **Pflueg Arch**, 413: 395-400, 1989.

TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. The biological properties of venoms of some American coral snakes (genus *Micrurus*). **Comp Biochem Physiol,** 101: 471-4, 1992.

TAN, N. H.; SAIFFUDIN, M. N. - Enzymatic and toxic properties of Ophiophagus Hannah (king cobra) venom and venom fractions. **Toxicon**, 27: 689-95, 1989.

THEO, P.; KRUCK, A.; LOGAN, M. Neurotoxins from bungarus fasciatus venom: A simple fractionation and separation of α - and β -type neurotoxins and their partial characterization. **Biochemistry** 21: 5302-9, 1982.

TRÉMEAU, O.; LEMAIRE, C.; DREVET, P. Genetic engineering of snake toxins: The functional site of erabutoxin A, as delineated by site-directed mutagenesis, includes variant residues. **J Biol Chem**, 270: 9362-9, 1995.

TOYAMA, M.H., OLIVEIRA, D.G., BERIAM, L.O.S., NOVELLO, J.C., RODRIGUES-SIMIONI, L., MARANGONI, S. Structural enzymatic and biological properties of a new PLA₂ isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, 41: 1033-45, 2003. TSENG, W. P.; LIN-SHIAU, S. Y. Activation of NMDA receptor partly involved in betabungarotoxin-induced neurotoxicity in cultured primary neurons. **Neurochem Int**, 42: 333-44, 2003.

TSETLIN, V. Snake venom α-neurotoxins and other three-finger proteins. **Eur J Biochem**, **264**: 281-6, 1999.

TU, A. T. Venoms of crotalidae (Crotalids, pit vipers). In: Venoms: Chemistry and Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, 1977. p. 211.

TU, A. T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: **Rattlesnake venoms, their actions and treatment**. New York: Marcel Dekker, 1982.

TU, A. T. Handbook of Natural Toxins. **Reptile Venoms and Toxins**. Marcel Dekker Ed. Vol. 5. 1991.

TU, A. T.; CHUA, A. Acid and alkaline phosphomonoesterases activity in snake venoms. **Comp Biochem Physiol,** 17: 297-307, 1966.

TURNER, T. J.; ADAMS, M. E.; DUNLAP, K. Multiple Ca⁺² channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 9518-22, 1993.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. Lab Invest, 55: 391-404, 1986.

VADAS, P.; BROWNING, J.; EDELSON, J.; PRUZANSKI, W. extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: the relationship with associated disease states. **J Lipid Mediators**, 8: 1-30, 1993.

VALENTIN, E.; GHOMASHCHI, F., GELB, M. H.; LAZDUNSKI, M.; LAMBEAU. On the diversity of secreted Phospholipases A₂. **J Biol Chem**, 274: 31195-202, 1999.

VALENTIN, E., LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A (2) and their receptors and binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1488, 59-70, 2000.

VATANPOUR, H.; HARVEY, A. L. Modulation of acetylcholine release at mouse neuromuscular junctions by interaction of three homologous scorpion toxins with K^+ channels. **Br J Pharmacol**, 114: 1502-06, 1995.

VERHEIJ, H. M.; SLOTBOOM, A. J.; JANSEN, E. H. J. M.; PUYK, W. C.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; DE HASS, G. H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, 19: 743-50, 1980.

VICK, J. A.; CIUCHTA, H. P.; POLLEY, E. H. The effect of cobra venom on the respiratory mechanism of the dog. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 153: 424-9, 1965.

VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev Ass Med Brasil, 26: 212-218, 1980.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: CORBETT, C. E. **Farmacodinâmica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 1044-74.

VITAL BRAZIL, O.; EXCELL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J Physiol**, 212: 34-5, 1970.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D., HELUANY, N. F. Mode of action of crotoxin at the guinea-pig neuromuscular junction. **Toxicon**, 17: (supple.1), 1979.

VITAL BRAZIL, O. FONTANA, M. D. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus coralinus* na junção neuromuscular. **Mem Inst Butantan**, 47/48: 13-26, 1983/1984.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; PELLEGRINI FILHO, A. Physiopatologie et thérapeutique de lénvenomation experimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. **Mem Inst. Butantan**, 40: 221-40, 1976.

VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J.; WAISBICH, E. Pharmacology of crystalline crotoxin. I Toxicity. **Mem. Inst. Butantan**, 33: 973-80, 1966.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D., HELUANY, N. F. Mode of action of the coral snake *Micrurus spixii* venom at the neuromuscular junction. **J Nat Toxins**, 4: 19-33, 1995.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D., HELUANY, N. F. Nature of the postsynaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. **J Nat Toxins**, 9: 33-41, 2000.

VOLWERK, J. J.; PIETERSON, W. A.; de HAAS, G. H. Histidine at the active site of phospholipase A₂. **Biochemistry**, 13: 14-43, 1974.

WAGNER, G. M.; MART, P. E.; KELLY, R. B. β-bungarotoxin inhibition of calcium accumulation by rat mitochondria . **Biochem Bioph Res Comm**, 58: 475-81, 1974.

WANG, S; WANG, G. K. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. **Cell Signal**, 15:151-59, 2003.

WERNICK, J. F.; VANKER, A. D.; HOWARD, B. D. The mechanism of action of β bungarotoxin. **J Neurochem**, 25: 483-96, 1975.

WEIS, R.; MCISAAC, R. J. Cardivascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. **Toxicon**, 9: 219-28, 1971.

WERNICKE, J. F.; VANKER, A. D.; HOWARD, B. D. The mechanism of action of β bungarotoxin. **J Neurochem**, 25: 483-96, 1975.

WICKRAMARATNA, J. C.; HODGSON, W. C. A pharmacological examination of venoms from three species of death adder (*Acanthophis antarcticus*, *Acanthophis praelongusand*, *Acanthophis pyrrhus*). **Toxicon**, 39: 209-16, 2001.

WILLIANS, E. J.; SUNG, S. C.; LASKOWSKI, M. Actions of venom phosphodiesterase on desoxyribonucleic acid. **J Biol Chem**, 236: 1130-4, 1961.

WU, Y.; WANG, Z. F.; SHI, Y. L. Beta-agkistrodotoxin inhibits large-conductance calcium-activated potassium channels in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Brain Research**, 940: 21-6, 2002.

XU, Y. F.; ATCHISON, W. D. Effects of ω -agatoxin-IVAand ω -conotoxin-MVIIC on perineural Ca⁺² and Ca⁺²-activated potassium currents of mouse motor nerve terminals. **J Pharmacol Exp Ther**, 279: 1229-36, 1996.

YANG, C. C. - Structure-function relationship of phospholipase A₂ from snake venoms. **J Toxicol**, 13: 125-77, 1994. YANG, C. C. Chemical modification and functional sites of phospholipases A2., edited by In: KINI, R. M. Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism.. Chichester, UK: Wiley, p. 185–204,1997.

YASHAR, P. R.; FRANSUA, M.; FRISHIMAN, W. H. The sodium-calcium ion membrane exchanger: physiologic significance and pharmacologic implications. J Clin Pharmacol, 38: 393-401, 1998.

ZADORI, Z., SZELEI, J., LACOSTE, M.C., LI, Y., GARIEPY, S., RAYMOND, P., ALLAIRE, M. NABI, I.R., TIJSSEN, P. A viral phospholipáse A_2 is required for parvovirus infectivity. **Dev Cell**, 1: 291-302, 2001.

8-ANEXOS



11

1 1

11

1 1

11 1

11 1

1 1

UNICAMP



Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº CruRU sob a responsabilidade de 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 1.D.1.2002. Este certificado expira em <u>GC 1011 200</u>2 CERTIFICATE 4-2., entitled " We certit that the protocol nº aume 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 0710112002 This certificate expires on 06101 (d) (m) (y)

Campinas, U.I. de

de

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

> TELEFONE 55 19 37887116 FAX 55 19 32893124

Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP -13 (81-970) - CAMPINAS - SP - BRASIL

Anexos