

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo da lesão tecidual local induzida por miotoxinas isoladas
da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada)

Carolina de Freitas Oliveira

Prof. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia - MG
Setembro - 2006

*Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida...
Amo muito vocês!*

Agradecimentos

À Deus, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Luiza e Júnior, aos meus irmãos, Flávia e Marco Paulo e ao Claudinho, pelos conselhos, pela paciência, pelo colo e por compreenderem minhas ausências. Obrigada por me cercarem de amor! Amo vocês!

À Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela orientação, confiança e oportunidades de crescimento. Obrigada pelo carinho, Veri!

À Dra. Tânia Machado de Alcântara, pela parceria e pelas sugestões. Obrigada pela confiança e pela paciência!

À Dra. Patrícia Bianca Clissa (Instituto Butantan), pela parceria, pelas sugestões e pela oportunidade de estágio sob sua orientação e auxílio. Obrigada por me receber tão bem!

À Dra. Ana Moura (Instituto Butantan), pela oportunidade de estágio em seu laboratório.

Ao Dr. Andreimar Martins Soares, por gentilmente doar as miotoxinas utilizadas neste trabalho.

À Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo, pelo o apoio financeiro.

À Dra. Amélia Hamaguchi, pelos ensinamentos técnicos no dia a dia no laboratório.

À Mirian, pelo auxílio essencial nos experimentos e análises. Obrigada pela amizade, carinho e por todos os ensinamentos!

À Daiana, por ser minha companheira e amiga fiel todos os dias e em todas as atividades acadêmicas durante esses 4 anos e meio. Obrigada por sermos a “dupla dinâmica”!

À Cristiani, por ser minha primeira “professora” no laboratório. Obrigada pelos conselhos!

À Janaína, pela amizade, carinho e preocupação durante esses 4 anos e meio de convivência. Saudades!

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Renata, Johara, Luiz Carlos, Luiz Fernando, Luiz Henrique, Mário, Fábio, Leonardo, Débora, Malson, Sâmela pela convivência agradável e pelo auxílio no dia a dia do laboratório.

Aos funcionários Tianinha, Marlene e D. Nenzinha pela disposição em ajudar sempre.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Envenenamentos por serpentes constituem um risco para a saúde pública relevante na América Latina. A maior parte dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil é causada por espécies do gênero *Bothrops*. Além de alterações sistêmicas, estes envenenamentos são caracterizados por lesão tecidual local proeminente devido a mionecrose, hemorragia e edema. Lesões musculares agudas induzidas por estas peçonhas são principalmente devido a fosfolipases A₂ (PLA₂). Este trabalho relata os danos teciduais locais induzidos pela peçonha bruta (PB) da serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis* e por duas miotoxinas previamente isoladas (BnSP-6 e BnSP-7) desta peçonha. A peçonha bruta e ambas miotoxinas causaram edema e aumento na liberação de creatina quinase no sangue atingindo valores máximos após 3 horas. Estas alterações foram confirmadas pelas análises morfológicas que mostraram edema, necrose e inflamação nas primeiras horas e regeneração 72 horas após a inoculação das toxinas. Além destes efeitos os músculos inoculados com PB também apresentaram hemorragia. Ambas miotoxinas induziram aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8 no exsudato das patas e de IL-6 e IL-8 no soro de camundongos, com valores máximos em 3 horas após a inoculação.

Palavras-chave: *Bothrops neuwiedi pauloensis*, miotoxinas, BnSP-6, BnSP-7.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Características epidemiológicas e biológicas do envenenamento ofídico	01
1.2. Alterações teciduais locais induzidas pelo envenenamento botrópico	02
1.3. Características estruturais e funcionais das PLA ₂ s: principal grupo responsável pelas alterações teciduais locais após o envenenamento botrópico	07
1.4. Importância de se estudar o mecanismo de ação de PLA ₂ s	09
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Obtenção da peçonha total de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> e das miotoxinas (PLA ₂ s Lys-49)	11
2.2. Animais	11
2.3. Determinação quantitativa de proteínas	12
2.4. Atividade edematogênica	12
2.5. Estudo do efeito miotóxico em músculo gastrocnêmio	12
2.5.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina quinase no plasma	12
2.5.2. Análise morfológica por microscopia óptica	13
2.6. Quantificação de citocinas	14
2.7. Análise estatística	15
3. RESULTADOS	16
3.1. Atividade edematogênica	16
3.2. Estudo do efeito miotóxico em músculo gastrocnêmio	18
3.2.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina quinase (CK) no plasma	18
3.2.2. Análise morfológica por microscopia óptica	20
3.3. Quantificação de citocinas	27
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Asp: Aspartato

BSA: Soroalbumina bovina

CK: Creatina quinase

ELISA: Enzyme Linked Immunoasorbent Assay (Ensaio Imuno-enzimático)

Lys: Lisina

PB: Peçonha bruta

PBS: Tampão fosfato de sódio

PLA₂: Fosfolipase A₂

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

v/v: volume por volume

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características epidemiológicas e biológicas do envenenamento ofídico

Os acidentes ocasionados por animais peçonhentos constituem problema de saúde pública (Soerensen, 1990) nos países tropicais em desenvolvimento, dadas a incidência, a gravidade e as seqüelas deixadas nos acidentados (Barraviera, 1991; Pinho & Pereira, 2001). No Brasil, ocorrem entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos por ano, com letalidade ao redor de 0,45% (Ministério da Saúde, 2001).

Das 11 famílias de serpentes conhecidas no mundo, nove são encontradas no Brasil, sendo as principais Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae. Destas, somente a Elapidae e a Viperidae são consideradas peçonhentas. A família Viperidae, maior responsável pelos acidentes ofídicos (Barraviera, 1990), é representada por três gêneros, *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*, serpentes conhecidas popularmente como surucucus, cascavéis e jararacas, respectivamente.

As serpentes do gênero *Bothrops sp.* são as principais responsáveis por acidentes ofídicos no Brasil (90%), mas com reduzidos índices de letalidade (Ministério da Saúde, 2001; Silva et al., 2003).

A subespécie *Bothrops neuwiedi pauloensis*, conhecida como jararaca pintada ou boca de sapo, descrita por Amaral em 1925, habita preferencialmente áreas secas, campos e cerrados (Peters & Orejas, 1970). Uma revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* foi realizada por Silva (2000) e resultou na modificação das doze subespécies existentes para sete espécies distintas. Nessa reclassificação *Bothrops neuwiedi pauloensis* passou a ser denominada *Bothrops pauloensis*. Esta nova classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia – SBH (2005). A serpente *Bothrops pauloensis* é encontrada nos estados de São Paulo, Sul de Goiás e Triângulo Mineiro (Campbell & Lamar, 1989).

A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* induz um quadro fisiopatológico caracterizado por efeitos locais e/ou sistêmicos (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Kamiguti et al., 1996). Os efeitos

locais frequentemente incluem dor, edema, hemorragia local, inflamação e equimose (Mandelbaum et al., 1988; Mebs & Ownby, 1990; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Voronov et al., 1999). Este quadro clínico na maioria das vezes evolui para necrose tecidual (Gutiérrez & Lomonte, 1989). Efeitos sistêmicos são representados por alterações na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico, alterações renais e hemorragias distantes dos locais da picada tais como hemorragia gengival, macro-hematúria, hemorragia uterina e gastrointestinal (Kamiguti et al., 1996).

Estes efeitos do envenenamento botrópico são atribuídos a uma variedade de toxinas presentes na peçonha, as quais incluem metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, miotoxinas, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase, arginina esterase, hialuronidase e 5'-nucleotidase (Russel, 1980; Tu, 1988; Meier, 1990; Stocker, 1990).

1.2. Alterações teciduais locais induzidas pelo envenenamento botrópico

A lesão tecidual local induzida pelo envenenamento botrópico caracteriza-se por hemorragia, edema, inflamação e mionecrose. A magnitude destes efeitos depende do tipo de peçonha, da dose injetada e do hospedeiro. Em muitos casos, o dano tecidual é tão intenso, que leva a severas conseqüências como lesão vascular e isquemia, as quais podem culminar com a amputação do membro afetado (Nishioka et al., 1992). Estes efeitos são causados pela ação combinada de vários componentes das peçonhas tais como metaloproteases, fosfolipases A₂ (PLA₂S) e também pela ação de mediadores endógenos liberados pela ação da resposta inflamatória (Gutiérrez, et al., 1989; Gutiérrez & Rucavado, 2000).

A necrose muscular ou mionecrose, efeito bastante comum após envenenamento botrópico, pode ocorrer devido à ação direta de fosfolipases A₂ miotóxicas sobre as membranas plasmáticas de células musculares, ou indireta, como conseqüência de lesões vasculares e isquemia, causadas por metaloproteases hemorrágicas presentes nas peçonhas de serpentes.

O mecanismo pelo qual as metaloproteases hemorrágicas causam danos teciduais locais e ou sistêmicos se deve à sua ação proteolítica sobre componentes da matriz extracelular e membrana basal, que envolvem os capilares sanguíneos. Conseqüentemente, a integridade celular é comprometida ocorrendo o desenvolvimento de “gaps” através dos quais os componentes do sangue extravasam e atingem o espaço intersticial, levando a hipóxia tecidual e, conseqüentemente, a morte celular (Bjarnason & Fox, 1994; Kamiguti et al., 1996; Gutiérrez & Rucavado, 2000). A ação hemorrágica é freqüentemente exacerbada devido a alterações no mecanismo da agregação plaquetária (Bjarnason & Fox, 1994, Kamiguti, et al., 2003).

Estudos para a compreensão dos mecanismos de ação das PLA₂s de peçonhas botrópicas sobre o tecido muscular vêm sendo realizados desde as duas últimas décadas. Alguns trabalhos demonstraram que estas enzimas podem induzir mionecrose por agirem na membrana sarcoplasmática, induzindo desorganização dos componentes fosfolipídicos, que permitiriam a saída de moléculas intracelulares, como a creatina e a creatina quinase (Gutiérrez et al., 1986; Gutiérrez et al., 1989). Os efeitos celulares causados por fosfolipases A₂ miotóxicas, segundo Harris (1991), são: (a) 0-1 hora: edema confinado ao espaço extravascular; (b) 1-3 horas: degeneração e hipercontração das miofibrilas e acúmulo de fagócitos na luz dos vasos sanguíneos e no espaço perivascular; (c) 3-6 horas: invasão das fibras musculares necrosadas pelas células fagocíticas, colapso do potencial das fibras musculares e rompimento da membrana sarcoplasmática; (d) 6-24 horas: degeneração total das fibras musculares individuais. Estas enzimas podem destruir os terminais nervo-motores dos músculos, mas não interferem com as arteríolas, capilares, vênulas ou nervos intramusculares, o que permite a regeneração das fibras musculares lesionadas, por estas toxinas, a partir de células satélites.

As células satélites fazem parte de uma população de células com grande atividade mitogênica que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, o reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto. São células indiferenciadas e mononucleadas, cuja membrana basal está em continuidade com a membrana basal da fibra muscular (Harris, 2003; Foschini et al., 2004). Em resposta a estímulos como crescimento, remodelação ou trauma, as células satélites são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores da linhagem miogênica, como MyoD, Myf-5, MNF, c-Met e Miogenina. Neste estado, também são denominadas mioblastos. Essas células se fundem a fibras musculares já existentes ou se fundem a células satélites vizinhas para gerar novas fibras musculares. Além disso, fatores de

crescimento como HGF, FGF, IGF e TGF- β também estão relacionados com a ativação e a regulação das células satélites (Foschini et al., 2004).

O mecanismo molecular pelo qual as PLA₂s induzem mionecrose foi inicialmente proposto por Gutiérrez e Lomonte em 1995. Estes autores propuseram um modelo hipotético para o entendimento do mecanismo de ação das miotoxinas Lys-49, que pode ser descrito da seguinte forma: 1- ligação da miotoxina a um sítio não identificado localizado na membrana sarcoplasmática; 2- interação eletrostática entre o sítio catiônico da toxina e grupos carregados negativamente na membrana; 3- penetração da miotoxina na bicamada lipídica por interação hidrofóbica mediada pela região citotóxica da molécula; 4- penetração da região citotóxica no centro da bicamada lipídica (o efeito seria a desorganização e ruptura da membrana, com conseqüente prejuízo na regulação da permeabilidade seletiva); 5- grande influxo de íons cálcio e início de uma variedade de mecanismos degenerativos.

Atualmente, muitos autores buscam esclarecer uma via intracelular e um possível sítio de ligação na membrana plasmática que poderia ser alvo dessas PLA₂s. Dessa forma, vários estudos visam identificar na estrutura das PLA₂s resíduos de aminoácidos específicos que estariam envolvidos no reconhecimento celular, permitindo ação catalítica local da enzima a fim de iniciar o processo de transdução de sinais, o que levaria a formação de mensageiros celulares que modulariam a ação dessas enzimas ao nível celular. Kini (2003) propôs que as diferentes ações farmacológicas induzidas pelas PLA₂s se devem à capacidade que estas enzimas possuem de se ligar com alta afinidade a aceptores celulares, por meio de interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals. Uma vez ligada ao seu alvo, essas enzimas podem induzir seus efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade catalítica. Devido ao largo espectro de alvos específicos em vários tecidos e órgãos, a identificação destes sítios farmacológicos presentes na estrutura dessas enzimas se torna um campo vasto de investigações para as áreas da saúde e biotecnologia.

Envenenamentos botrópicos também são caracterizados pelo rápido desenvolvimento de edema e inflamação no local da picada. O edema induzido pelas peçonhas de serpentes é bioquimicamente heterogêneo e pode agravar ainda mais o dano tecidual local. Em maior magnitude, o edema pode acentuar o efeito hipovolêmico e hipotensivo da peçonha e culminar em choque cardiovascular (Lomonte et al., 1993). O edema é provavelmente causado pelo efeito direto de toxinas hemorrágicas nos vasos sangüíneos, induzindo a liberação de mediadores endógenos,

como a histamina, cininas, prostaglandinas, devido à ação de componentes da peçonha em mastócitos, cininogênio e fosfolipídios, respectivamente. Além disso, fosfolipases A₂, esterases e aminas biogênicas podem estar envolvidas na indução do edema (Gutiérrez, 1990).

Entre os vários mecanismos descritos na indução do edema podemos citar: a degranulação de mastócitos, com liberação de histamina e serotonina, recrutamento de células polimorfonucleares, com formação de radical superóxido, produção de prostaglandinas e leucotrienos (LTB₄), liberação de bradicinina e óxido nítrico, potencialização da atividade da bradicinina por peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina, ativação do sistema complemento e liberação das anafilotoxinas C3a e C5a (Lomonte et al., 1993).

A resposta inflamatória que se estabelece logo após o envenenamento também é de relevância para o progresso da lesão tecidual. A inflamação é a reação do organismo à invasão por agente infeccioso, por desafio com antígeno ou mesmo apenas uma lesão física. A resposta inflamatória compreende três eventos principais: (1) aumento do suprimento sanguíneo para a área; (2) aumento da permeabilidade capilar, ocasionado pela retração das células endoteliais, com conseqüente escape de moléculas maiores, permitindo, então, que os mediadores solúveis da imunidade atinjam o local da infecção; (3) migração de leucócitos dos capilares para os tecidos circundantes, sendo que na fase inicial da inflamação, os neutrófilos são particularmente prevalentes e, mais tardiamente no processo, os monócitos e linfócitos também migram para o local inflamado. (Roitt et al., 2003; Rosenfeld, 1971).

Dependendo da sua duração, as inflamações podem ser divididas em agudas e crônicas. Assim, as inflamações que duram desde poucos minutos até poucos dias são chamadas de agudas, enquanto as que persistem por semanas e meses são chamadas de crônicas. Do ponto de vista funcional e morfológico, as inflamações agudas caracterizam-se pelo predomínio de fenômenos exsudativos, ou seja, conseqüentes alterações na permeabilidade vascular, permitindo o acúmulo de líquido na região inflamada (edema), fibrina, leucócitos, especialmente neutrófilos, e hemácias. Nas inflamações crônicas, além destes elementos, ocorre proliferação de vasos, migração e proliferação de monócitos e linfócitos (Montenegro et al., 1999).

A resposta inflamatória envolve a sinalização entre os vários leucócitos, além das células teciduais, que ocorrem tanto por interações diretas célula-célula, envolvendo moléculas da superfície celular, quanto por citocinas. (Roitt et al., 2003).

As citocinas são pequenas “proteínas mensageiras” (8-80 kDa), mediadores solúveis da comunicação intercelular que, em associação aos hormônios e neurotransmissores, constituem uma linguagem química de sinalização que controla o desenvolvimento, o reparo tecidual e a resposta imune em organismos multicelulares. Paralelamente a outros sinais oriundos do contato célula-célula ou célula-antígeno, as citocinas propiciam uma rede de controle das respostas imunes inatas e específicas, incluindo a inflamação, a defesa contra infecções virais, a proliferação de clones específicos e células T e B e o controle de suas funções. Elas atuam através da ligação a receptores específicos na membrana celular, estabelecendo uma cascata que leva à indução, ao favorecimento ou à inibição de inúmeros genes citocina-regulados no núcleo celular (Roitt et al., 2003).

A lesão tecidual local observada no envenenamento botrópico desencadeia uma cascata de eventos iniciados pelo recrutamento de leucócitos para o local da picada. Leucócitos ativados liberam um amplo espectro de citocinas tais como IL-1, IL-6 e IL-8, que amplificam a resposta inflamatória contribuindo para o processo de necrose (Voronov et al., 1999).

A IL-1 é produzida principalmente por fagócitos mononucleares (macrófagos e monócitos) e ocorre em duas formas moleculares: IL-1 α e IL-1 β (Voronov et al., 1999; Roitt et al., 2003). Apesar da baixa homologia entre as duas formas (menos de 30%), se ligam ao mesmo receptor e desencadeiam atividades biológicas semelhantes (Cybulsky et al., 1998). A IL-1 atua na ativação de linfócitos, estimulação de macrófagos e adesão de leucócitos e células endoteliais. Além disso, ela regula a síntese de prostaglandinas, IL-6 e IL-8 (Roitt et al., 2003).

A IL-6 é produzida por células T e B (linfócitos T e B) e macrófagos. Na imunidade inata, a IL-6 estimula a síntese de proteínas da fase aguda por hepatócitos durante o processo inflamatório. Na imunidade adaptativa, ela estimula o crescimento e diferenciação de linfócitos B (Roitt et al., 2003).

A IL-8 é liberada pelos monócitos e atua na ativação de neutrófilos, na quimiotaxia, na angiogênese e na liberação de grânulos e superóxidos (Sandra et al., 1995).

Além da ação das citocinas, a resposta inflamatória é mediada por uma variedade de moléculas tais como prostaglandinas, radicais de oxigênio, óxido nítrico, tromboxanas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária (PAF). Estes mediadores são liberados por

macrófagos, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e plaquetas (Voronov et al., 1999).

1.3. Características estruturais e funcionais das PLA₂s: Principal grupo responsável pelas alterações teciduais locais após o envenenamento botrópico

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas de grande interesse médico-científico, devido ao seu envolvimento em grande variedade de doenças inflamatórias humanas e nos envenenamentos ofídicos e de abelhas. Possuem importantes papéis no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares. Com a ação dessas enzimas, os fosfolipídeos são hidrolisados, desestruturando a membrana e comprometendo a sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especificamente na ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos (Arni & Ward, 1996; Kini, 2003). Os ácidos graxos liberados, como ácido araquidônico e ácido oléico, podem ser importantes na estocagem de energia. O ácido araquidônico pode também funcionar como segundo mensageiro e como precursor de eicosanóides, que são potentes mediadores da inflamação e transdução de sinais (Dennis, 1997). Estas enzimas, amplamente distribuídas na natureza, são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (Dennis, 1994). As PLA₂s intracelulares estão frequentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolipídeos e outras funções celulares (Mukheerjee et al., 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exsudados inflamatórios e nas peçonhas de serpentes e artrópodes.

De acordo com Six e Dennis (2000) e Ward et al. (2001) as fosfolipases A₂ extracelulares foram divididas em dez classes I a XII, com base no número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto. As fosfolipases A₂ de serpentes estão todas reunidas nos grupos I e II, sendo estas proteínas de 119 a 143 resíduos de aminoácidos, com peso molecular variando entre 13 e 18 kDa. As enzimas da classe I são encontradas em peçonhas de serpentes do gênero *Elapidae* e *Hydrophidae*, enquanto as da classe II são encontradas principalmente em peçonha de

serpentes crotálicas e viperídeas (Ward et al., 2001). As enzimas da classe III apresentam um menor grau de similaridade seqüencial em relação às classes I e II das PLA₂s.

As PLA₂s representam uma classe de enzimas versáteis, considerando sua função, localização, regulação, mecanismo de ação, seqüência, estrutura e papel dos íons metálicos divalentes. A seqüência de aminoácidos de mais de 280 fosfolipases já foi determinada e algumas de suas estruturas tridimensionais foram resolvidas por cristalografia de raios X e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Arni & Ward, 1996; Balsinde et al., 1999; Six & Dennis, 2000; Kini, 2003). A análise destas estruturas primárias possibilitou a sugestão e a predição de determinantes estruturais de algumas atividades farmacológicas (Kini & Iwanaga, 1986; Kini & Evans, 1989; Ward et al., 1988). E agora, associada com resolução de estruturas tridimensionais, ampliou-se ainda mais o conhecimento das bases moleculares do mecanismo de ação destas toxinas.

A grande maioria das PLA₂s miotóxicas isoladas de peçonhas de serpentes botrópicas, descritas até agora, são proteínas de caráter básico, ponto isoelétrico variando entre 7.0 e 10.0, que possuem atividade catalítica ou “não”, sobre substratos artificiais. As análises da composição em aminoácidos indicaram que essas miotoxinas são ricas em aminoácidos básicos e hidrofóbicos (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Selistre et al., 1990; Lomonte et al., 1990; Díaz et al., 1995; Mancuso et al., 1995; Angulo et al., 1997). Apresentam também um alto número de resíduos de meia-cistina, o que sugere a presença de várias pontes dissulfeto intracadeia. As PLA₂s tóxicas são muito estáveis, provavelmente como resultado da extensa ligação cruzada, tornando-as ativas em uma ampla faixa de pH e temperatura. Entretanto, várias PLA₂s ácidas também já foram isoladas das peçonhas botrópicas (Ketelhut et al., 2003; Daniele et al., 1995).

As miotoxinas isoladas dos venenos botrópicos pertencem ao grupo II das fosfolipases e podem ser subdivididas em dois subgrupos: (i) Asp-49 que são as miotoxinas com atividade enzimática alta, cataliticamente ativas e (ii) Lys-49 que são as miotoxinas que possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (Ownby et al., 1999). A diferença nas propriedades enzimáticas das duas classes de proteínas está baseada principalmente na presença do resíduo de aspartato (Asp) na posição 49 no primeiro grupo, quando comparado com a presença de lisina (Lys) na mesma posição da cadeia polipeptídica no outro grupo. A troca de aminoácidos é suficiente para causar a perda da habilidade da proteína em se ligar ao cálcio (Ca²⁺), um cofator essencial para fazer com que a enzima expresse sua atividade catalítica.

Independentemente da sua função catalítica primária, as fosfolipases A₂ de venenos de serpentes podem induzir diversos efeitos farmacológicos adicionais, como neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, cardiotoxicidade, miotoxicidade, indução e/ou inibição da agregação plaquetária, edema, hemólise, anticoagulação, convulsão, hipotensão, efeito bactericida e anti-HIV (Bon et al., 1979; Fletcher et al., 1980; Fletcher et al., 1981; Huang, 1984; Alvarado & Gutiérrez, 1988; Lloret & Moreno, 1993; Yuan et al., 1993; Fuly et al., 1997; Páramo et al., 1998; Ownby, 1998; Soares et al., 1998; Fenard et al., 1999).

Durante os últimos 15-20 anos houve um grande interesse em se estudar componentes da peçonha que são responsáveis pela mionecrose, resultando no isolamento e caracterização estrutural e funcional de várias PLA₂ miotóxicas de peçonhas do gênero *Bothrops* (Ownby, 1998; Ownby et al., 1999; Arni & Ward, 1996; Gutiérrez & Lomonte, 1997; Andrião-escarso et al., 2000; Rodrigues et al., 2004).

Da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* já foram isoladas várias PLA₂s. Duas fosfolipases A₂ Asp-49 (Rodrigues et al., 2004), duas miotoxinas Lys-49, BnSP-6 e BnSP-7 (Rodrigues et al., 1998) e uma fosfolipase A₂ ácida (Rodrigues, 2006).

As PLA₂s denominadas BnSP-6 e BnSP-7 (Rodrigues et al., 1998) são proteínas com peso molecular entre 13,5 e 14 kDa, podendo apresentar-se na forma dimérica, e suas estruturas são essencialmente idênticas às estruturas das outras PLA₂s Lys-49 miotóxicas. Apresentam uma composição de aminoácidos bastante similar, com alto conteúdo de resíduos básicos e hidrofóbicos, sendo uma serina o resíduo de aminoácido N-terminal. Seus pontos isoelétricos são 8,6 e 8,8, respectivamente. Ambas são capazes de produzir necrose das fibras musculares de camundongos e não apresentam atividades fosfolipásica ou coagulante (Rodrigues et al., 1998; Soares et al., 2000; Magro et al., 2003).

1.4. A importância de se estudar o mecanismo de ação de PLA₂s

O reconhecimento da importância clínica do dano tecidual local em envenenamentos tem motivado um grande número de estudos sobre sua patogênese. Estes podem levar a uma melhor compreensão dos mecanismos que levam a necrose tecidual, o que poderia inspirar a criação de

novos métodos terapêuticos. Em adição, o entendimento do mecanismo de ação de toxinas pode revelar mecanismos e injúria celular e tecidual, que são comuns a outras condições patológicas.

Este trabalho teve como objetivo estudar a patogênese da lesão tecidual local induzida pela peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e por duas miotoxinas, BnSP-6 e BnSP-7, previamente isoladas desta peçonha.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção da peçonha total de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e das miotoxinas (PLA_{2s} Lys-49)

A peçonha da serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi cedida pela Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação Ltda. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo, em temperatura ambiente e conservada a -20°C.

As miotoxinas (BnSP-6 e BnSP-7) foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Estas toxinas foram obtidas a partir de dois passos cromatográficos: (1) a peçonha bruta de *B. neuwiedi pauloensis* foi submetida a uma cromatografia com a resina de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow, que resultou em 7 picos; o pico 7 foi recromatografado sob estas mesmas condições, resultando na purificação da miotoxina BnSP-7 (DL₅₀ 7,75 mg/kg); (2) o pico 6 foi recromatografado em uma coluna RP-HPLC (Shimadzu C₁₈ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography), resultando na purificação da miotoxina BnSP-6 (Rodrigues et al., 1998).

2.2. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica BALBc, que foram mantidos “Ad libitum” no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

2.3. Determinação quantitativa de proteínas

A concentração de proteínas da peçonha bruta e das frações isoladas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando como proteína padrão a soroalbumina bovina (Sigma).

2.4. Atividade edematogênica

Essa atividade foi realizada injetando-se na pata direita de camundongos isogênicos normais da linhagem BALBc (n=4, 18-22 g) 10 µg das miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 ou da peçonha bruta diluídos em 10 µl de PBS e a formação de edema foi avaliada em diferentes intervalos de tempo (30', 1h, 3h, 6h e 24h). O edema produzido foi mensurado (mm) utilizando-se um paquímetro (CALIPER). A atividade edematogênica da peçonha bruta e das miotoxinas foi expressa em termos de % de edema induzido.

2.5. Estudo do efeito miotóxico em músculo gastrocnêmio

2.5.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina quinase no plasma

Os camundongos isogênicos normais da linhagem BALBc (n=4, 18-22 g) foram injetados intramuscularmente, no músculo gastrocnêmio direito, com 25µg da peçonha bruta ou 50µg das miotoxinas diluídos em 25 µl de PBS. Após intervalos de 1, 3, 6 e 24 horas da inoculação, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado por punção cardíaca, utilizando-se EDTA, e imediatamente centrifugado a 2.500 rpm, por 10 minutos a 4⁰C (Laborcentrifugem 2K 15-Sigma). Os animais controles receberam somente 25 µl PBS. A atividade da enzima creatina quinase foi determinada utilizando-se 10 µl de plasma pelo kit CK-NAC Cinético da Bioclin. O princípio deste método consiste nas seguintes reações: 1) na reação entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP), catalisada pela enzima creatina quinase, formam-se a creatina e a adenosina trifosfato (ATP); 2) o ATP formado é utilizado para fosforilar a glicose, produzindo glicose 6-fosfato (G-6-P) na presença da hexoquinase; 3) a seguir a G-6-P é oxidada a 6-fosfogliconato na

presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD); esta reação é catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase; 4) durante esta oxidação, a quantidade equimolar de NAD^+ é reduzido a NADH aumentando a absorvância em 340 nm. A variação em absorvância é diretamente proporcional à atividade da enzima creatina quinase. O experimento consistiu em incubar 10 μl do plasma com 500 μl do reagente de trabalho por 3 min a 37°C. Em seguida foram realizadas leituras a 340 nm. Para leituras superiores a 250 nm foram realizadas diluições (1/10) da amostra em questão e o resultado foi multiplicado pelo fator de diluição (10). A atividade creatina quinase foi expressa em unidades/litro (U/L), constituindo uma unidade o resultado da fosforilação de um nanomol de creatina por minuto a 25°C.

2.5.2. Análise Morfológica por microscopia óptica

As análises morfológicas foram realizadas no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia com a colaboração da professora Dra. Tânia Machado de Alcântara.

Foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica BALBc. Os animais controles receberam injeção intramuscular, no músculo gastrocnêmio esquerdo, de 25 μg da peçonha bruta ou 50 μg de cada miotoxina diluídos em 25 μl de PBS. O animais controle receberam apenas 25 μl de PBS. Após 1, 3, 6, 24, 72 horas, 1 e 2 semanas os animais foram sacrificados e um pequeno fragmento da porção central do músculo foi retirado e fixado em solução de formalina a 10%.

Posteriormente, os músculos foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e, em seguida, incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo. Cortes com 6 μm (micra) de espessura foram aderidos a lâminas histológicas e então corados com hematoxilina-eosina (HE) ou Masson, montados com lamínula, utilizando-se como meio de montagem goma de Damar, examinados ao microscópio óptico e fotografados. A coloração de Masson foi realizada para a verificação de tecido de granulação (que cora em azul), que se transformará em tecido conjuntivo fibroso.

2.6. Quantificação de citocinas

As dosagens de citocinas foram realizadas no laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan - São Paulo, com a colaboração da professora Dra. Patrícia Bianca Clissa. Após 1, 3, 6 e 24 horas da inoculação de 10µg das miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7, diluídas em 10 µl de PBS, na pata direita de camundongos (n=3), os animais foram sacrificados e a pata retirada foi colocada em 200µl de tampão PBS, picotada e macerada. Posteriormente, acrescentou-se 300µl do mesmo tampão e centrifugou-se a amostra a 10000 rpm por 5 minutos (Laborzentrifugem 2K 15-Sigma). Os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C. Além disso, o sangue desses animais foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 2.500 rpm, por 10 minutos a 4°C (Laborzentrifugem 2K 15-Sigma), para a obtenção do soro. As dosagens das citocinas IL-1β, IL-6 e IL-8 no sobrenadante das patas e IL-6 e IL-8 no soro foram realizadas pelo método de ELISA.

Para este ensaio foram utilizados anticorpos monoclonais específicos de camundongos (RDI) anti-citocinas IL-1β, IL-6 e IL-8 para a captura de antígenos no exsudato das patas. Os anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS foram incubados durante a noite em placas próprias para o ELISA, à temperatura ambiente. No dia seguinte estas placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05% por 3 vezes e bloqueadas por duas horas com uma solução a 1% de BSA e 5% de sacarose em PBS. Após este período de bloqueio as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween e as amostras (ou a curva padrão de citocinas) foram colocadas para incubação por mais 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem foi adicionado o segundo anticorpo (anticorpo policlonal biotilado anti-citocinas de camundongo - RDI) e incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas novamente e incubadas com uma solução de Horseradish Peroxidase conjugada a avidina diluída em 1% BSA/PBS, durante 20 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS/Tween, foram adicionados 100 µL do reagente Tetrametilbenzidina (TMB® - Sigma) para revelar a reação. Após cerca de 30 minutos a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 30% e a absorbância lida em um comprimento de onda de 450 nm. A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão feita com as respectivas citocinas recombinantes, utilizadas em uma diluição seriada a partir de 2000 até 15,62 pg/mL. Os resultados da absorbância foram

analisados por regressão linear em um programa de análise de curvas GraphPad Software Versão 2.01.

2.7. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados pela média \pm SD. A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizadas com auxílio dos softwares Excel.

3. RESULTADOS

3.1. Atividade edematogênica

A figura 1 mostra que houve um aumento significativo das patas dos camundongos inoculados com peçonha bruta ou com as miotoxinas, evidenciando a presença de edema. A porcentagem de edema máxima obtida pela peçonha bruta foi de 79%, 30 minutos após sua inoculação, enquanto as miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 apresentaram um aumento máximo da pata após 15 minutos com 50% e 70%, respectivamente.

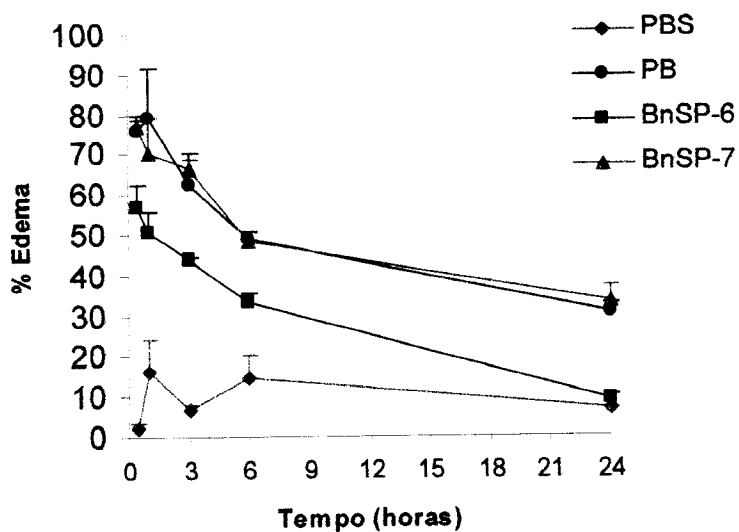


Figura 1: Indução de edema tempo-dependente em pata de camundongos. Após a inoculação de 25 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ da peçonha bruta (PB) de *Bothrops neuwiedi pauloensis* ou 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ das miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7, o aumento da área da pata foi mensurado com um paquímetro e expresso em porcentagem de edema induzido. Os resultados foram apresentados pela média \pm SD (n=4).

3.2. Estudo do efeito miotóxico em músculo gastrocnêmio

3.2.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina quinase (CK) no plasma

Atividade miotóxica foi realizada por dosagem dos níveis de creatina quinase no plasma de animais inoculados com 25 µg da peçonha bruta (PB) ou 50 µg das miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7. Como apresentado na figura 2, nota-se um significativo aumento na liberação de creatina quinase induzido pela PB e toxinas quando comparados ao controle. O pico de liberação foi observado após 3 horas da inoculação da PB e das miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7, correspondendo a 607,2, 2752,3 e 4147,5 U/L, respectivamente. A atividade de CK para o grupo controle foi de aproximadamente 47 U/L.

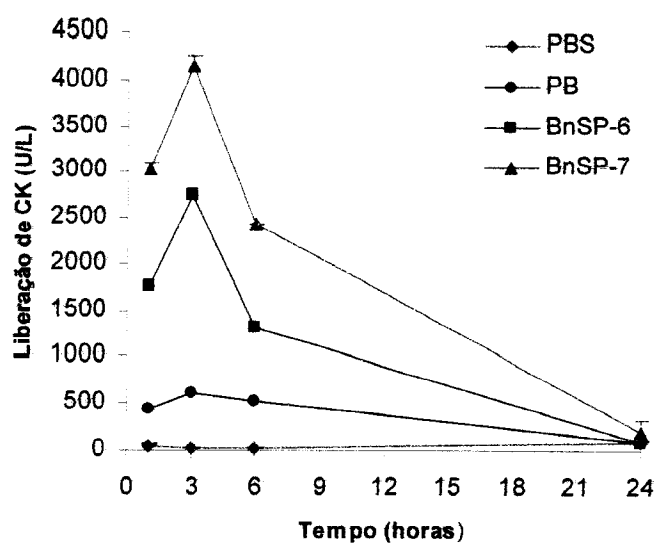


Figura 2 - Níveis plasmáticos de creatina quinase (CK) obtidos do plasma de camundongos injetados com 25 μg da peçonha bruta (PB) de *Bothrops neuwiedi pauloensis* ou 50 μg das miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 no músculo gastrocnêmio, sacrificados após 1, 3, 6 e 24 horas. Animais injetados com 50 μl de PBS foram utilizados como controle. A atividade foi expressa em U/L. Os resultados foram apresentados pela média \pm SD (n=3).

3.2.2. Análise Morfológica por microscopia óptica

As figuras 3, 4 e 5 mostram cortes histológicos de músculo gastrocnêmio de camundongos extraídos 1, 3, 6, 24, 72 horas, 1 e 2 semanas após a inoculação com PBS, 25 µg PB ou 50 µg BnSP-6 ou 50 µg BnSP-7, realizados para o estudo mais detalhado da lesão tecidual local provocada por estas toxinas.

Em comparação com o controle PBS, os músculos inoculados com a peçonha bruta (PB) apresentaram-se edemaciados e com grande extravasamento de hemácias, caracterizando o quadro hemorrágico. Após 3 horas, observou-se um infiltrado inflamatório, composto principalmente de neutrófilos, que aumentou progressivamente até 72 horas. A necrose tecidual foi evidenciada principalmente entre 24 e 72 horas. A partir de 1 semana observou-se regeneração de miócitos, havendo diminuição do edema, da hemorragia, da necrose e da inflamação, que passou a ser composta principalmente por macrófagos. As células musculares em regeneração mostraram-se diminuídas de tamanho e com núcleos grandes e centrais, vesiculosos, por vezes, com nucleólo proeminente. O processo de reparação das fibras musculares é seguido por formação de tecido conjuntivo fibroso, evidenciado pela presença de tecido de granulação nas lâminas coradas pelo Masson.

As miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 induziram alterações teciduais bastante semelhantes e por isso serão discutidas em conjunto. Em comparação com o controle PBS, nas primeiras 3 horas após a inoculação de ambas miotoxinas o músculo apresentou-se edemaciado (fibras espaçadas), com muitas células necróticas e discreto infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos. A partir das 6 horas, o edema diminuiu progressivamente, enquanto o exsudato inflamatório aumentou também progressivamente até 72 horas, localizando-se principalmente no endomísio. Após 24 horas, o número de células necróticas diminuiu. De 72 horas a 2 semanas o infiltrado inflamatório tornou-se multifocal, sendo caracterizado principalmente por macrófagos e o edema e a necrose praticamente desapareceram. Nesse período, foram visualizados miócitos em regeneração e presença de tecido de granulação (Masson).

Figura 3: Fotomicrografia de cortes finos transversais com 6,0 μm de espessura do músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos, após 1, 3, 6, 24 e 72 horas, 1 e 2 semanas. As alterações foram induzidas por 25 μg da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* dissolvidos em 50 μl de PBS. Aumento de 200x ou 400x.

A: PBS. 200x

B, C, D, E, F: PB → 1, 3, 6, 24 e 72 horas, respectivamente. 400x

G, H: PB → 1 e 2 semanas, respectivamente. 200x

I = Infiltrado inflamatório

H = Hemorragia

N = Necrose

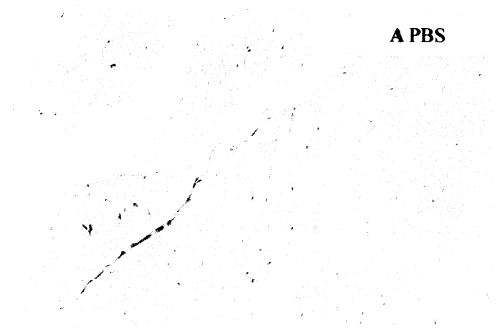
E = Edema

NC = Núcleo central

TG = Tecido conjuntivo de granulação

HE = Coloração hematoxilina e eosina

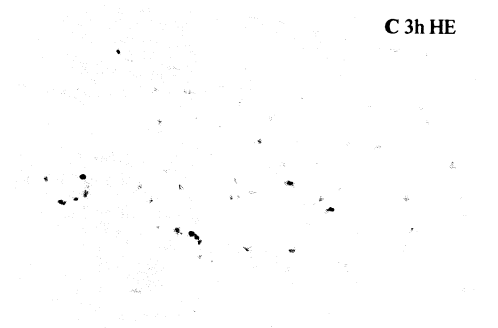
M = Coloração Masson



A PBS



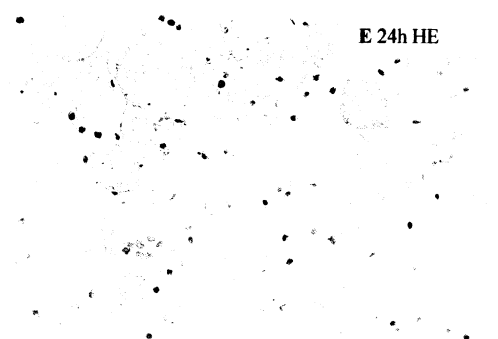
B 1h HE



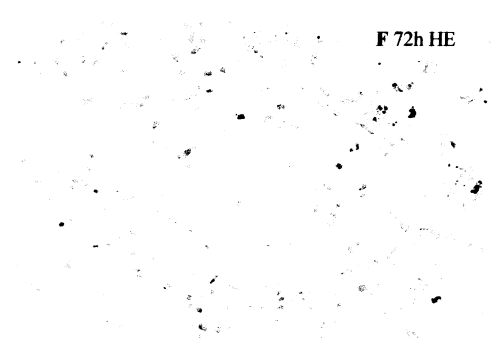
C 3h HE



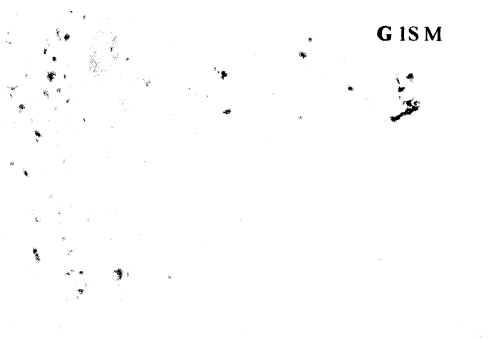
D 6h HE



E 24h HE



F 72h HE



G ISM



H 2S M

Figura 4: Fotomicrografia de cortes finos transversais com 6,0 μm de espessura do músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos, após 1, 3, 6, 24 e 72 horas, 1 e 2 semanas. As alterações foram induzidas por 50 μg da miotoxina BnSP-6 dissolvidos em 50 μl de PBS. Aumento de 200x ou 400x.

A, C: BnSP-6 \rightarrow 1 e 6 horas, respectivamente. 200x

B, D, E, F, G: BnSP-6 \rightarrow 3, 24 e 72 horas, 1 e 2 semanas, respectivamente. 400x

I = Infiltrado inflamatório

H = Hemorragia

N = Necrose

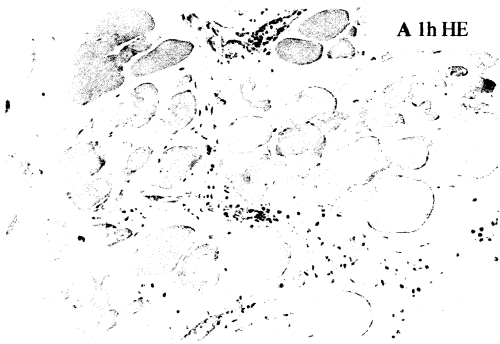
E = Edema

NC = Núcleo central

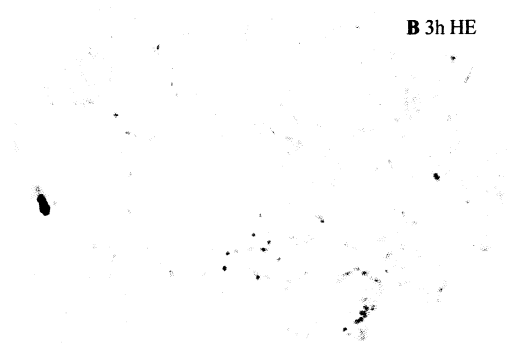
TG = Tecido conjuntivo de granulação

HE = Coloração hematoxilina e eosina

M = Coloração Masson



A 1h HE



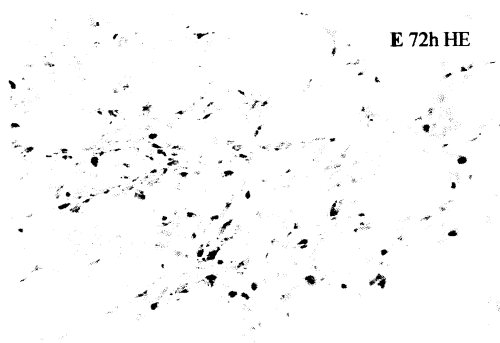
B 3h HE



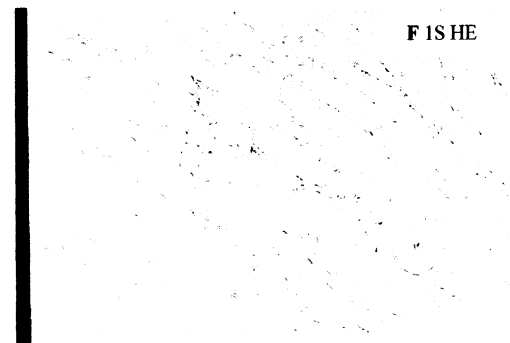
C 6h HE



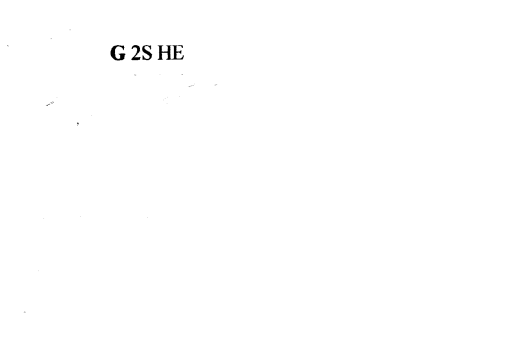
D 24h HE



E 72h HE



F 1S HE



G 2S HE

Figura 5: Fotomicrografia de cortes finos transversais com 6,0 μm de espessura do músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos, após 1, 3, 6, 24 e 72 horas, 1 e 2 semanas . As alterações foram induzidas por 50 μg da miotoxina BnSP-7 dissolvidos em 50 μl de PBS. Aumento de 200x ou 400x.

A, B, C, D, F: BnSP-7 → 1, 3, 6, 24 horas e 2 semanas, respectivamente. 200x

E, G: BnSP-7 → 72 horas e 1 semana, respectivamente. 400x

I = Infiltrado inflamatório

H = Hemorragia

N = Necrose

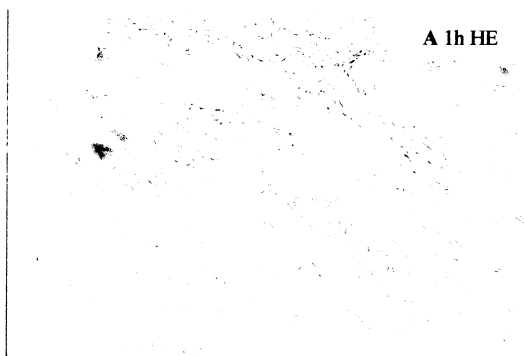
E = Edema

NC = Núcleo central

TG = Tecido conjuntivo de granulação

HE = Coloração hematoxilina e eosina

M = Coloração Masson



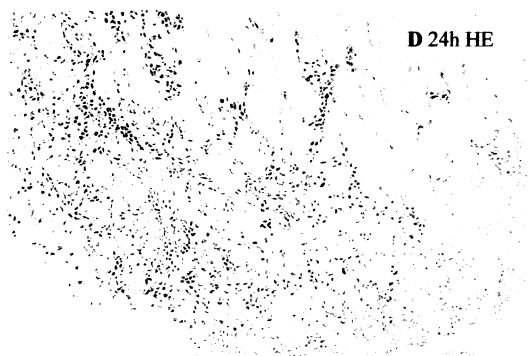
A 1h HE



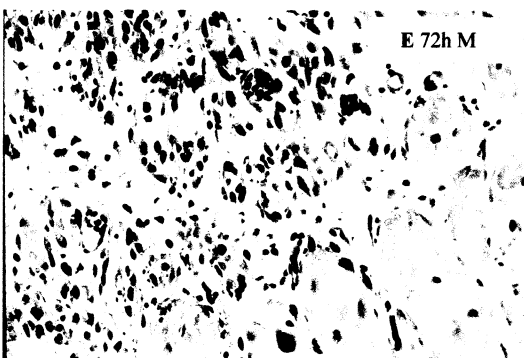
B 3h HE



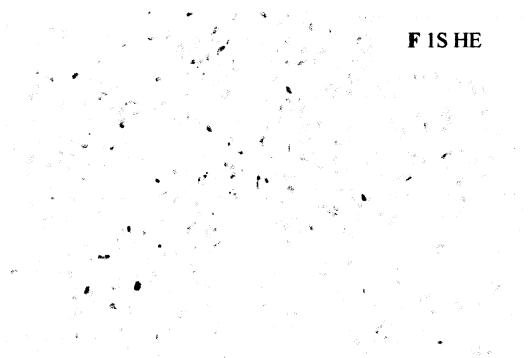
C 6h HE



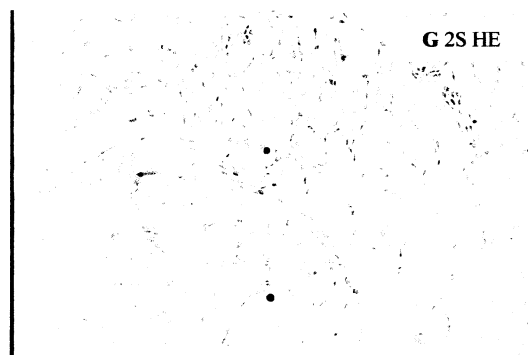
D 24h HE



E 72h M



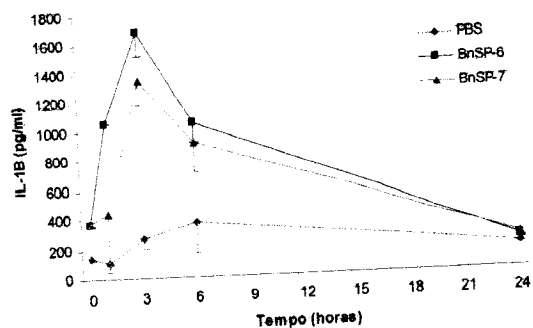
F 1S HE



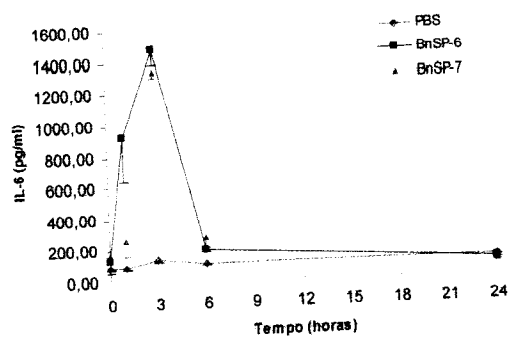
G 2S HE

3.3 Quantificação de citocinas

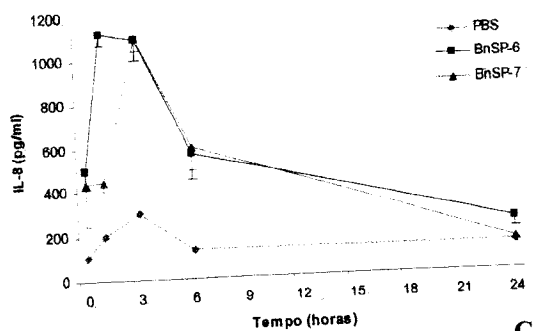
Ambas miotoxinas induziram um aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8 no exsudato das patas (Figura 6) e de IL-6 e IL-8 no soro de camundongos inoculados com as mesmas (Figura 7), com valores máximos em 3 horas após a inoculação. Os níveis de IL-1 β foram maiores no exsudato das patas e os níveis de IL-8 apresentaram-se mais elevados no soro em relação às outras citocinas quantificadas.



A



B



C

Figura 6: Quantificação de citocinas por ELISA do exsudato da pata nos intervalos de tempo de 0,5, 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação das miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 na pata de camundongos. Os resultados foram apresentados pela média \pm SD (n=3).

A: Quantificação de IL-1 β

B: Quantificação de IL-6

C: Quantificação de IL-8

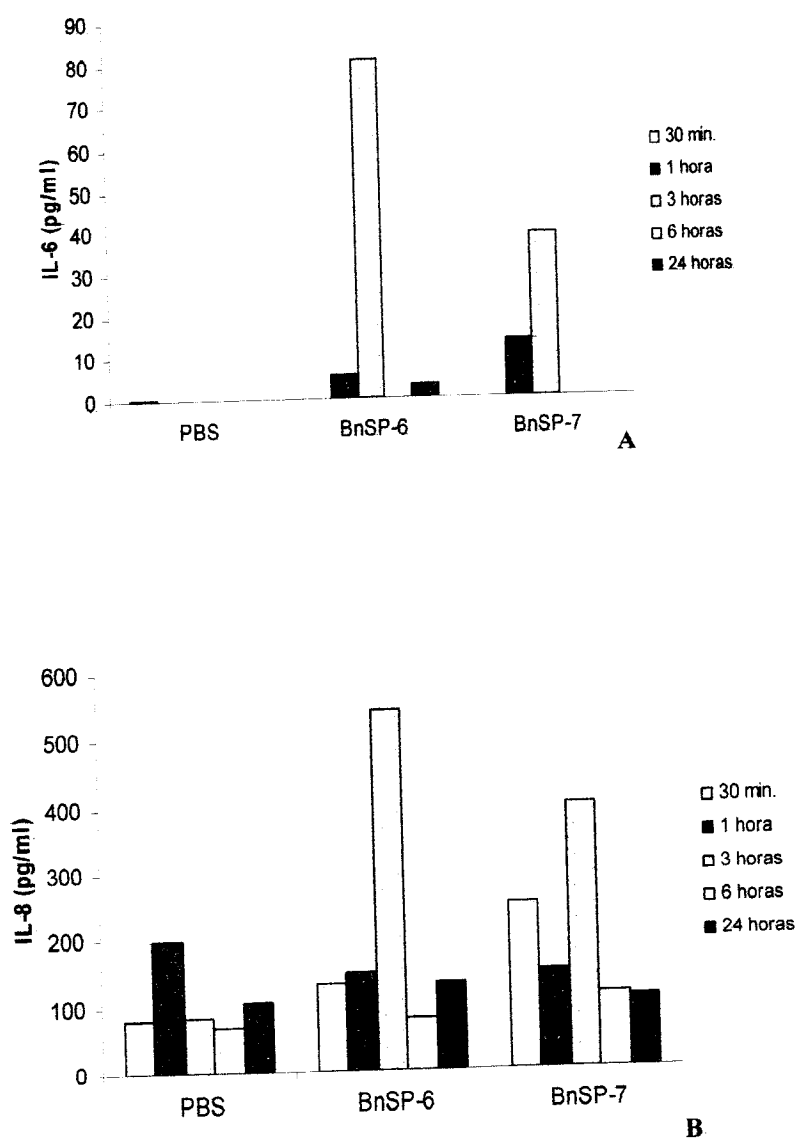


Figura 7: Quantificação de citocinas (IL-6 e IL-8) por ELISA no soro de camundongos. Os animais foram inoculados na pata direita com as miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 nos intervalos de tempo de 0,5, 1, 3, 6 e 24 horas. Os animais controle receberam PBS. Os resultados foram apresentados pela média \pm SD (n=3).

A: Quantificação de IL-6.

B: Quantificação de IL-8.

4. DISCUSSÃO

As miotoxinas botrópicas induzem sérias lesões musculares logo após a injeção intramuscular, caracterizadas principalmente por edema, inflamação e mionecrose. (Gutiérrez et al., 1989; Nishioka et al. 1992; Gutiérrez & Rucavado, 2000). Assim, a patogênese destes efeitos vem sendo muito estudada por meio das alterações morfológicas e bioquímicas no músculo afetado (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Harris, 2003).

Neste trabalho verificou-se que tanto a peçonha bruta quanto as miotoxinas testadas (BnSP-6 e BnSP-7) foram capazes de induzir aumento significativo das patas de camundongos, caracterizando o edema. Segundo Gutiérrez *et al.* (1986), as peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* são capazes de induzir edema local em humanos e em animais experimentais. O edema é caracterizado pelo extravasamento de líquido pelos vasos sanguíneos, que contribui com um infiltrado inflamatório local com a função de defesa do organismo contra a toxina inoculada. Para Zuliani et al. (2004) e Landucci et al. (1998) as fosfolipases A₂ aumentam a permeabilidade microvascular e o fluxo sanguíneo na pata de ratos e camundongos causando o edema. A formação de edema pode estar também largamente ligada à ativação de mastócitos (Cirino et al., 1989; Landucci et al., 1998). Os mastócitos são células inflamatórias, que se localizam próximo a vasos sanguíneos, nervos, epitélio e músculos lisos e expressam e liberam fosfolipases A₂ do tipo II, que têm a função de modular a degranulação de mastócitos (Zuliani et al., 2004). A descoberta de que a ativação de mastócitos pela bothropstoxin-I, uma fosfolipase A₂ Lys-49 isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* (Homsí-Brandeburgo et al., 1988), é inibida por heparina sugere que a carga positiva desta toxina é o principal fator responsável por suas propriedades farmacológicas (Landucci et al., 1998). Estudos realizados mostraram que o edema inicial (30 minutos) é inibido por pré-tratamento com ciproheptadina, indicando a participação de histamina e/ou serotonina no processo, enquanto o edema tardio (5 horas) é inibido com pré-tratamento com aspirina, sugerindo a participação de prostaglandinas (Gutiérrez et al., 1986). Além disso, Landucci et al. (1998) sugerem que a hidrólise de fosfolipídeos pelas fosfolipases A₂ não é essencial para a formação de edema, ou seja, nas fosfolipases deve existir um domínio farmacológico independente do sítio catalítico (Kini & Evans, 1989; Kini, 2003), explicando

assim a ação das PLA₂s Lys-49, cataliticamente inativas, como foi demonstrado para as miotoxinas Lys-49 BnSP-6 e BnSP-7.

Nos estudos histológicos da lesão muscular realizados neste trabalho, os primeiros intervalos de tempo após a inoculação da PB ou das miotoxinas caracterizam-se por edema, necrose e inflamação e, apenas para a PB, hemorragia. Esta hemorragia se deve à ação de toxinas hemorrágicas presentes na peçonha (Gutiérrez, 1995) que provocam lesões nas paredes dos pequenos vasos sanguíneos (Oshaka et al., 1979; Ownby et al., 1990). Investigações têm sido realizadas na tentativa de estabelecer se o mecanismo de extravasamento dos componentes do sangue ocorre devido à ruptura da membrana plasmática (hemorragia “per rhexis”) ou através das junções endoteliais (hemorragia “per diapedeses”). Na hemorragia “per rhexis” as células endoteliais são rapidamente afetadas devido à ação proteolítica sobre componentes da matriz extracelular, tais como colágeno tipo IV, fibronectina, laminina, etc. Conseqüentemente, a integridade celular é comprometida ocorrendo o desenvolvimento de “gaps” através dos quais os componentes do sangue extravasam e atingem o espaço intersticial. Nenhuma alteração no espaço intercelular é observada. Já no modelo “per diapedesis”, o extravasamento ocorre exclusivamente através das junções endoteliais e a viabilidade celular não é afetada (Gutiérrez & Rucavado, 2000). No entanto, é importante ressaltar que ambos mecanismos já foram descritos para diferentes toxinas (Kamiguti et al., 1996; Hati et al., 1999).

A miotoxicidade induzida por peçonhas de serpentes pode ser causada pela ação indireta de hemorraginas, que por causarem lesões nos vasos sanguíneos, provocam um quadro isquêmico e, conseqüentemente, morte celular; ou pode ser causada pela ação direta de fosfolipases A₂ que desestruturam as membranas plasmáticas dessas células levando a alteração da permeabilidade e, desta forma, provocam a lesão celular. A mionecrose induzida pela PB e pelas miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 inicia-se 1 hora após a inoculação. Este efeito observado nos músculos tratados com a PB também pode ser devido à ação direta dessas PLA₂s Lys49 sobre a membrana plasmática. Acredita-se que sua ação na membrana plasmática muscular se deve a regiões de sua estrutura que reconhecem sítios aceptores negativamente carregados, tanto de baixa, quanto de alta afinidade na membrana muscular, e a regiões que interagem e penetram na bicamada lipídica promovendo desestabilização da membrana por meio de um mecanismo independente da ação catalítica, praticamente ausente

nessas proteínas. Esta ação resulta num influxo de cálcio, que inicia uma variedade de mecanismos degenerativos, como alterações no citoesqueleto, danos mitocondriais, ativação de proteases e fosfolipases cálcio-dependentes e hipercontração das miofibrilas, que conseqüentemente causam mais danos celulares, levando à necrose das fibras musculares (Harris, 2003; Gutiérrez and Ownby, 2003). Esta mionecrose causada pela PB e pelas miotoxinas também foi comprovada por dosagens dos níveis de creatina quinase no soro de camundongos injetados com estas toxinas. A enzima creatina quinase é encontrada em altas concentrações nos músculos cardíaco e esquelético e no cérebro. Assim, quando o tecido muscular é lesionado de alguma forma os níveis de CK no sangue se elevam. As miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 induziram uma maior liberação da enzima creatina quinase em relação à peçonha bruta.

Nossos estudos histológicos, assim como em outros estudos (Gutiérrez et al., 1991; Gutiérrez & Lomonte, 1989; Harris, 1991), mostraram ainda que a mionecrose é seguida da invasão em abundância de infiltrado inflamatório no músculo afetado (a partir de 3 horas após a inoculação), caracterizado por leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, nas primeiras horas, e mais tarde por macrófagos, resultados também encontrados por Gutiérrez et al. (1991). Os neutrófilos e macrófagos recrutados exercem um papel fundamental para a regeneração, removendo, aos poucos, as células necróticas (Gutiérrez and Ownby, 2003).

As análises histológicas revelaram também que o tecido muscular inoculado com a peçonha bruta ou miotoxinas tem a capacidade de regeneração de suas fibras após 72 horas da inoculação das amostras. É possível que a própria peçonha e toxinas iniciem um vigoroso processo regenerativo das fibras musculares devido às suas propriedades quimiotáticas, recrutando macrófagos e ativando células satélites. As células satélites estão localizadas entre a membrana plasmática e a lâmina basal das fibras musculares e são precursoras das células musculares regeneradas. Estas células são muito resistentes a agressões de várias naturezas diferentes, permanecendo intactas ao ataque, por exemplo de fosfolipases A₂, e são ativadas e entram em divisão durante os processos degenerativos. A eficiência da circulação local também é essencial para que a regeneração muscular seja completa, uma vez que ela permite a chegada na região lesionada de macrófagos, que irão fagocitar as células necróticas, e de nutrientes e O₂ para suprir a intensa atividade metabólica da fase de regeneração (Harris,

2003). Uma vez que a PB causou hemorragia intensa, como mostrado anteriormente, a reinervação e a regeneração dos vasos sanguíneos no músculo são essenciais para o processo de regeneração (Vignaud et al., 2005; Harris, 2003). Além disso, neste processo mais lento de regeneração é comum o aparecimento de muitos fibroblastos e fibrose (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Já as miotoxinas não causam lesão nos vasos sanguíneos, nos nervos ou na lâmina basal, que permanece intacta na periferia das células musculares, favorecendo portando um processo regenerativo rápido e eficiente também evidenciado neste trabalho.

Envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* provocam também uma reação inflamatória complexa com liberação e ativação de citocinas pró-inflamatórias, mediadores quimiotáticos e infiltrado celular (Voronov et al., 1999). Neste trabalho foram realizados testes preliminares que revelaram a capacidade de indução da liberação de citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) pelas miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7. Estes resultados são semelhantes a dados encontrados por Zuliani et al. (2004), Chacur et al. (2004) e Zamuner et al. (2005). Desta forma, estas miotoxinas podem estar agindo como estímulos pró-inflamatórios, induzindo a produção e liberação de citocinas pelas células inflamatórias, que apresentam papel importante no processo inflamatório e, conseqüentemente, na evolução da lesão tecidual local. Estudos futuros utilizando-se anticorpos anti-citocinas ou antiinflamatórios são de extrema importância para a compreensão dos mecanismos inflamatórios induzidos por estas toxinas.

5. CONCLUSÃO

O estudo do efeito miotóxico revelou que as miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 induzem edema, necrose celular e grande concentração de infiltrado inflamatório, induzindo também a produção de citocinas. Apesar destes danos causados às fibras musculares, o processo de regeneração mostrou-se bastante eficaz.

Estudos futuros mais detalhados dos mecanismos de ação e dos efeitos causados por estas toxinas permitirão futuras aplicações na área farmacológica, contribuindo assim com o estudo e o tratamento de várias doenças.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* v. 36 p. 563-565, 1988.
- AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pit-vipers. *Contr. Harvard Inst. Trop. Biol. Med.* v. 2 p. 1-65, 1925.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; AGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothroprotoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie.* v. 82. p. 755-763, 2000.
- ANGULO, Y.; CHAVE, E.; ALAPE, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) scheledelii* from Costa Rica. *Arch Biochem Biophys.* v. 339 p. 260-266, 1997.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂- A structural review. *Toxicon.* v.34. p.827-841, 1996.
- BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* v.39. p.175-189, 1999.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. *Pharmac. Ther.* V.62. p. 325-372, 1994.
- BARRAVIERA, B. *Venenos Animais - Uma visão integrada*, Rio de Janeiro: EPUC: Ed. de Publicações Científicas, 1990 p.411.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. *Arq. Bras. Méd.* v.65(4) p.345-355, 1991.
- BON, C.; CHANGEAUX, J. P.; JENG, T. W. Post-synaptic effects of crotxin and its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* v. 99 p. 471-481, 1979.
- BRADFORD, M.; MARION. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPBELL, J. A; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of latin américa. *Cornell Univ. Press*, Ithaca.1989.

- CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R. J. A study of phospholipase A₂ induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.* v. 166 p. 505-510, 1989.
- CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; SLOAN, E. M.; WIESELER-FRANK, J.; BARRIENTOS, R. M.; MARTIN, D.; POOLE, S.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MAIER, S. F.; CURY, Y.; WATKINS, L. R. Snake venom phospholipase A₂ (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain.* v. 108 p. 180-191, 2004.
- CYBULSKY, M. I.; CHAN, M. K. W.; MOVAT, H. Z. Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor and the implications in gram-negative infection. *Lab. Invest.* v. 58 p. 365-371, 1998.
- DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; FIDELIO, G. D. Kinetic and pharmacological characterization of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. *Arch. Bioch. Bioph.* v. 318 p. 65-70, 1995.
- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. *Minireview J. Biol. Chem.* v. 269 p. 13057-13060, 1994.
- DENNIS, E. A. History, classification, structure and function of phospholipase A₂. Phospholipase A₂: Basic and clinical aspects in inflammatory diseases. p. 1-10, 1997.
- DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant from *Bothrops asper* snake venom. *Natural Toxins.* v. 3 p. 26-31, 1995.
- FERNARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, J. C.; LAZDUNSKI, M.; DOGLIO, A. Secreted phospholipase A₂ a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J. Clin. Invest.* v. 104 p. 611-618, 1999.
- FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A₂ from elapid snake venoms. *Toxic Appl. Pharmac.* v. 59 p. 375-382, 1981.
- FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C.; RYAN, M.; ROSENBERG, P. Comparison of relatively toxic phospholipase A₂ from *Naja nigricolis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A₂ from *Hemachatus hemachatus* snake venom II. *Biochem. Pharmac.* v. 29 p. 1565-1575, 1980.
- FULY, A.L.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Thromb. Haemost.* v. 78 p. 1372-1380, 1997.
- GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B., CHAVES, F., MORENO, E., CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 84C p. 159-164, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan.* v. 51. p.211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M., CHAVES, F., GENE, J. A., LOMONTE, B., CAMACHO, Z., SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by basic myotoxin isolated from the venom of snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon.* v.18, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan.* v. 52 p. 37-38, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; DÍAZ, C.; CINTRA, A. C. O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Mol. Pathol.* v. 55 p. 217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom, *Mem. Inst. Butantan.* v.33. p.1405-1474, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons.* eds J. Meier and J. White, p. 645-665. CRC Press, Boca Raton, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini Rm, editor. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism.* Chichester: Wiley & Sons. p. 321-52, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. *Biochemie.* v.82. p.841-850, 2000.

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

HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: *Snake Toxins.* (Harvey, A. L., Ed) p. 91-129, 1991.

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A₂ and regeneration of skeletal muscles. *Toxicon.* v. 42 p. 933-945, 2003.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol.* v. 29 p. 1-19, 1999.

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

- HUANG, H. C. Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A₂ of *Vipera russelli* snake venom. *Toxicon*. v. 22 p. 359-365, 1984.
- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. v.34 p.627-642, 1996.
- KAMIGUTI, A. S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *Medline*. v. 549 p. 129-134, 2003.
- KETELHUT, D. F. J.; HOMEM DE MELO, M.; VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie*. v. 85 p. 983-991, 2003.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*. Oxford, v.27. n.6, p.613-35, 1989.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of action of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*. v.24, p. 827-840, 2003.
- KINI, R. M.; IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon*. v. 24 p. 527-541, 1986.
- LANDUCCI, E. C. T.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; de NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.* v. 343 p. 257-263, 1998.
- LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon*. v. 31 p. 949-956, 1993.
- LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokines release in a mouse model. *Inflammation*. v. 17 p. 93-105, 1993.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*. v. 28 p. 1137-1146, 1990.
- MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A. B.; Lachat, J. J.; Selistre-de-Araujo, H. S.; Ownby, C. L.; Giglio, J. R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon*. v. 33 p. 615-626, 1995.

- MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnPS-7 and BnSP-6, two Lys-49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v. 311 p. 713-720, 2003.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venom of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*. v.26 p.379-385, 1988.
- MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmac. Ther.* v. 48. p. 223-236, 1990.
- MEIER, J. Venoms snakes. In: Medical use of snake proteins. p.1-32, 1990.
- MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia Processos Gerais. 4 ed, 1999. 320 p.
- MUKHERJEE, A. B., MIELE, L., PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes regulation and physiological role. *Biochem. Pharmacol.* v. 48 p. 1-10, 1994.
- NISHIOKA, S. A.; SILVERA, P. V. P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.47. p.805-810, 1992.
- OSHAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. *Hand. Exp. Pharmac.* v.52. p.480-546, 1979.
- OWNBY, C. L.; NIKAI, T.; IMAI, K.; SUGIHARA, H. Patogenesis of haemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrondon bilineatus bilineatus*). *Toxicon*. v.23. p.837-846, 1990.
- OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* V.17. p.1003-1009, 1998.
- OWNBY, C. L. ARAÚJO, H. S. De. WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon*. v.37. p.411-445, 1999.
- PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A. ; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Eur. J. Biochem.* v. 235 p. 452-461, 1998.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. *Rev. Assoc. Méd. Brás.* v. 47(1) p. 24-29, 2001.
- RODRIGUES, V. M., HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, *Toxicon*. v. 44 p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwied* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comparative Biochemistry Physiology*. v.121. p. 215-222, 1998.

RODRIGUES, R. S. *Purificação e caracterização de uma PLA₂ de Bothrops pauloensis*. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. São Paulo : Manole, 6. ed, 2003, 481p.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous and their venoms*. (BUCHERL, W. and BUCKLEY, E. E., eds). New York: Academic Press, v.2, p.345-403, 1971.

RUSSEL, F. E. Venoms. In: *Snake Venoms Poisoning*. p.139-234, 1980.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2001.

SANDRA, P. F.; SUZANA, B. V. M. Participação de moléculas de adesão no desenvolvimento da resposta inflamatória. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paul.* v. 1 p. 80-89, 1995.

SBH. 2005. Lista de espécie de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: <http://www2.Sbherpetologia.org.br/checklist/répteis.htm>, acessado em 30/05/2006.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P.; Giglio, J. R.. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*. v. 28 p. 261-273, 1990.

SILVA, X.V. *Revisão sistemática do complexo Bothrops neuwiedi (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)*. São Paulo. Tese de doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (1B-USP), 2000. 134p.

SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon*. v. 41 p. 251-255, 2003.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. v.1488: 1-19, 2000.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom: biochemical

characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon*. v.36. p.503-514, 1998.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Biochemistry and Biophysics*. v.378. P. 201-209, 2000.

SOERENSEN, B. *Animais Peçonhentos: Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento, Distribuição geográfica no Continente Americano*. São Paulo/Rio de Janeiro: Editora Livraria Atheneu, 1990. 138p.

STOCKER, K. Composition of venoms snakes. In: Medical use of snake proteins. p.33-56, 1990.

TU, A. T. Snake venoms: general background and composition. In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. p.1-19, 1988.

VIGNAUD, A.; HOURDÉ, C.; TORRES, S.; CARUELLE, J. P.; MARTELLY, I.; KELLER, A.; FERRY, A. Functional, cellular and molecular aspects of skeletal muscle recovery after injury induced by snake venom from *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon*. v. 45 p. 789-801, 2005.

VORONOV, E.; APTE, R. N.; SOLER, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation, *J. Venom. Anim. Toxins*, v.5, p 5-33, 1999.

WARD, R. J.; RODRIGUES ALVES, A.; RUGGIERO NETO, J.; ARNI, R. K.; CASARI, G. A sequencespace analysis of phospholipase A₂. *Prot. Eng.* v. 11 p. 285-294, 1988.

WARD, R. J., OLIVEIRA, A. H., BORTOLETO, R. K., ROSA, J. C., FACA, V. M., GREENE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys-49 phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Prto. Expr. Purif.* v. 21 p. 134-140, 2001.

YUAN, Y.; JACKSON, S. P.; MITCHELL, C. A.; SALEM, H. H. Purification and characterization of a snake venom phospholipase A₂: a potent inhibitor of aggregation platelet. *Thromb. Res.* v. 70 p. 471-481, 1993.

ZAMUNER, S. R.; ZULLIANI, J.P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*. v. 46 p. 806-813, 2005.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon*. p. 1-12, 2004.

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; SILVA, L. L. C.; SAMPAIO, S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. F. P. Activation of celular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. *Toxicon*. v. 46. p. 523-532., 2005.