

ANTONIO TENORIO LISBOA

**NEUROTOXINAS BmjeTX-I E BmjeTX-II DO VENENO DE
Bothrops marajoensis: ENTENDENDO O MECANISMO
PRÉ-SINÁPTICO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

BRAGANÇA PAULISTA

2014

ANTONIO TENORIO LISBOA

**NEUROTOXINAS BmjeTX-I E BmjeTX-II DO VENENO DE
Bothrops marajoensis: ENTENDENDO O MECANISMO
PRÉ-SINÁPTICO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós
Graduação da Universidade São
Francisco para a obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. THALITA ROCHA

BRAGANÇA PAULISTA

2014

QW 630.5.N4 Lisboa, Antonio Tenorio.
L75n Neurotoxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II do veneno de
Bothrops marajoensis: entendendo o mecanismo
pré-sináptico na junção neuromuscular / Antonio Tenorio
Lisboa -- Bragança Paulista, 2014.
45 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.
Orientação de: Thalita Rocha.

1. Toxinas botrópicas. 2. Neurotoxicidade. 3. Miografia.
4. Miotoxidade. 5. Microscopia. 6. Western blotting.
7. Sinaptobrevina. 8. Sinaptofisina. 9. SPNAP-25.
I. Rocha, Thalita. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

LISBOA, T., Antonio, "Neurotoxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II de Bothrops marajoensis: entendendo o mecanismo pré-sináptico na junção neuromuscular". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e três de janeiro de 2014 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Thalita Rocha
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo



Prof. Dr. Mário Angelo Claudino
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itaribá
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1826
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3379
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-000 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do O - CEP 02825-100 / Tel.: 11 3411.2960 / Fax: 3411.2978

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado aos MEUS PAIS e a DEUS,
por ter me trazido para essa família adorável.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais a Profa. Dra. Thalita Rocha, pela receptividade, pela paciência em conduzir seus alunos. Pela dedicação, inteligência emocional e doçura com que ajuda seus alunos a enfrentar as adversidades enfrentadas pelo pesquisador no país. Pela boa vontade e disposição em ajudar sempre. Pela fonte de conhecimento sempre disponível que representa para todos nós, alunos. Por me fazer voltar a acreditar que existe um novo horizonte, após a tempestade. Obrigado Professora Thalita Rocha, a vida do pesquisador fica muito mais suave, quando sob sua orientação.

Agradecemos aos professores da Universidade São Francisco, campus Bragança Paulista, pela contribuição na minha formação, como iniciante, à árdua vida acadêmica de pesquisador. Meus sinceros agradecimentos ao corpo docente desta instituição. Obrigado USF.

Agradecemos aos professores Dr. Luis A. Ponce-Soto e Dr. Sérgio Maragoni, Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling, do Instituto de Biologia, e Dra. Léa Rodrigues-Simioni da Faculdade de Medicina - UNICAMP.

Agradecimentos especiais ao Dr. Pedro Brewel, por sua contribuição especial na realização desse projeto. Obrigado Amigo.

Ao Dr. Walter Dal'Acqua, companheiro de muitos anos, suas palavras de apoio nas condições mais adversas, meu eterno agradecimento.

Ao meu Pai Antonio Lisboa da Silva "In Memoriam", pelo amor incondicional aos seus filhos.

À minha mãe Argélia Tenório Lisboa, pelos cuidados intensivos, conselhos e exemplo de integridade e vida humana. Obrigado Mãe.

Aos meus Irmãos e Irmãs: Benedito, Bernadete, Betilde, Bartoloméia, Benildo, Maria Betânia, Maria Bartolene, José Bernardo, Luiz e Petrócio e suas Famílias.

Às minhas amadas filhas: Carolina Lisboa e Isadora Lisboa, meu amor eterno e incondicional.

Aos meus amados sobrinhos e sobrinhas: às “Helenas”, “Rosas”, “Cleides”, “Lucianas” aqui representando simbolicamente todos os demais sobrinhos queridos, afortunadamente são muitos.

A duas pessoas muito especiais Almas iluminadas, espíritos de força e luz: “Méia” e “Tana” por me conduzirem pela mão desde o início dessa existência, principais responsáveis, que foram pela minha educação formal e moral, e que me acompanharão, estou certo, pela eternidade. Meu eterno e sincero amor e gratidão.

À Claudinéia Lisboa Daitx, pela dedicação, sacrificando seus finais de semana, pelo apoio e desprendimento na ajuda incondicional, à realização desse projeto. Obrigado Clau.

Aos meus mestres, professores dedicados, que me transmitiram seus ensinamentos de maneira amorosa, gentil e abnegada, minha eterna gratidão. Obrigado Mestres.

Aos amigos e companheiros de jornada, Marta, Jussara Ziegler, Sara, Laís, Thaís, Mari Ueda.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proc. 2011/00001-1) pelo fomento

Às alunas de Iniciação Científica Junia R. Brandão Franco (bolsista PIBIC/CNPq), Carolina Vespúcio Bis e Marta Rodrigues Gracia, por realizarem parte dos experimentos laboratoriais

Agradecimentos a todos aqueles que fizeram possível a realização desse projeto. Pessoal do biotério, do laboratório e todos os outros que compõem o quadro de funcionários do Campus USF Bragança. Muito obrigado.

SALMO 90

Tu reduces o homem à destruição; e dizes: Tornai-vos, filhos dos homens.
Porque mil anos são aos teus olhos como o dia de ontem que passou, e como a vigília da noite.

Tu os levas como uma corrente de água; são como um sono; de manhã são como a erva que cresce.

De madrugada floresce e cresce; à tarde corta-se e seca.

Pois somos consumidos pela tua ira, e pelo teu furor somos angustiados.
Diante de ti puseste as nossas iniquidades, os nossos pecados ocultos, à luz do teu rosto.

Pois todos os nossos dias vão passando na tua indignação; passamos os nossos anos como um conto que se conta.

Os dias da nossa vida chegam a setenta anos, e se alguns, pela sua robustez, chegam a oitenta anos, o orgulho deles é cansada e enfada, pois cedo se corta e vamos voando.

Quem conhece o poder da tua ira? Segundo és tremendo, assim é o teu furor.
Ensina-nos a contar os nossos dias, de tal maneira que alcancemos corações sábios.

Volta-te para nós, Senhor; até quando? Aplaca-te para com os teus servos.
Farta-nos de madrugada com a tua benignidade, para que nos regozijemos, e nos alegremos todos os nossos dias.

Alegra-nos pelos dias em que nos afligiste, e pelos anos em que vimos o mal.

Apareça a tua obra aos teus servos, e a tua glória sobre seus filhos.
E seja sobre nós a formosura do Senhor nosso Deus, e confirma sobre nós a obra das nossas mãos; sim, confirma a obra das nossas mãos.

"Viver é optar, discernir, criticar, analisar, deduzir, avaliar, abstrair criar. Acredito que nossas crianças precisam de: alimentação, desenvolvimento cognitivo, afetivo e psicomotores. A escola não precisa ser a convencional. É preciso, sim, ambientação educativa e facilitadores de aprendizagem dispostos, motivados e motivadores. Com vida! O essencial será a vida. Será a vivência da vida do pré-escolar, tudo mais virá por acréscimo."

Luiz Almeida Marins Filho

RESUMO:

O gênero *Bothrops* é o responsável pela maioria dos casos de envenenamento por serpente no Brasil. Sabe-se que os venenos destas serpentes ("jararaca", "jararacuçu", "urutu-cruzeiro", "cotiara", "jararaca-do-rabo-branco", "malha-de-sapo", "patrona", "surucucurana", "combóia", "caiçara"), bem como, a maioria de suas frações, tem ação miotóxica. Porém, alguns destes venenos e frações atuam sobre a junção neuromuscular, em sua porção pré-sináptica, através de mecanismos ainda não elucidados. O presente trabalho procurou esclarecer a ação molecular de alguns destes compostos (toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II do veneno de *B. marajoensis*) sobre a junção neuromuscular, na tentativa de descobrir se estes atuam de alguma forma no arranjo das vesículas sinápticas ou ainda nos mecanismos de exocitose e reciclagem do neurotransmissor. A realização das técnicas propostas permitiu caracterização ultraestrutural, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, da junção neuromuscular de ave e, a identificação por imunohistoquímica e western blotting, da presença ou ausência das proteínas relacionadas à junção neuromuscular, especificamente a proteína sinaptofisina, presente na vesícula sináptica, e as proteínas sinaptobrevina e SNAP-25, constituintes do complexo SNARE, presentes na vesícula sináptica e na membrana pré-sináptica da junção neuromuscular, viabilizando relacionar os achados de microscopia eletrônica, imunohistoquímica e western blotting aos dados miográficos que caracterizam tais toxinas como compostos de ação pré-sináptica. A marcação negativa para sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25, por imunohistoquímica e western blotting, bem como, os achados ultraestruturais, levam a concluir que a ação neurotóxica pré-sináptica das toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II é resultante da perda das vesículas sinápticas antes mesmo de sua ancoragem na membrana do neurônio para exocitose do neurotransmissor, dada a diminuição na densidade destas vesículas no botão nervoso e da perda das proteínas sinaptofisina, e de alterações na maquinaria da exocitose dada a perda de sinaptobrevina e SNAP-25, levando ao bloqueio da resposta contrátil, evidenciado pela miografia. Além disso, alterações na mielinização das Células de Schwann podem ser uma um indício de danos à estrutura do nervo, num efeito pós-sináptico independente.

Palavras-chave: toxinas botrópicas, neurotoxicidade, miotoxicidade, miografia, microscopia, western blotting, sinaptobrevina, sinaptofisina, SNAP-25.

ABSTRACT:

The genus *Bothrops* are responsible for the majority of snake envenoming cases in Brazil. It is known that the venom of these snakes ("pit viper", "jararacuçu", "urutu-cross", "cotiara", "pit viper-white tail", "frog-loop", "patron" "surucucurana", "combóia", "caiçara" as well as most of its fractions, have myotoxic effects. However some of these venoms and their fractions act on the neuromuscular junction through presynaptic mechanisms not yet elucidated. The present study aimed to understand the molecular effect of some of these compounds (BmjeTX-I and BmjeTX-II toxins isolated from *B. marajoensis* snake venom) on the neuromuscular junction trying to find out if these toxins affect somehow the arrangement of synaptic vesicles or the mechanisms of neurotransmitter exocytosis and recycling. The proposed techniques allowed the ultrastructural characterization of avian neuromuscular junction, by transmission electron microscopy and the investigation of these toxins effects on the pre-synaptic region of the neuromuscular junction, by immunohistochemistry and western blotting for the related neuromuscular junction proteins, as synaptophysin, a specific synaptic vesicle protein, synaptobrevin and SNAP-25, proteins from SNARE complex and constituents of the synaptic vesicle and the pre-synaptic membrane. The negative reaction for synaptophysin, synaptobrevin and SNAP-25, by western blotting and immunohistochemistry, and the ultrastructural findings lead the conclusion that the neurotoxic presynaptic effect of BmjeTX-I and BmjeTX-II toxins result from the loss of synaptic vesicles before their anchorage in the membrane of the neuron to neurotransmitter exocytosis, which can be explained by the decrease in the density of these vesicles into neuron button and the loss of synaptophysin, and by the damage of the exocytosis machinery explained by the loss of synaptobrevin and SNAP-25 proteins, resulting in the blockage of the contractile response evidenced by myography. In addition, changes in the ultrastructure of the Schwann cells, specifically in the myelination, indicated damage to the nerve structure parallely to changes in the muscle fibers, independently of the post-synaptic effect.

Key-words: bothropic toxins, neurotoxicity, myotoxicity, myography, microscopy, western blotting, synaptobrevin, synaptophysin, SNAP-25.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ACh – Acetilcolina
BmjeTX – *Bothrops* toxina (toxina isolada do veneno de *Bothrops marajoensis*)
CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
BC – *Biventer cervicis*
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA – Comitê de Ética em Uso Animal
CO₂ – Gás Carbônico
°C – Graus Celsius
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
GAPDH – Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
HE – Hematoxilina - eosina
HRP – Peróxido de Hidrogênio
IB – Instituto de Biologia
IHC – Imunohistoquímica
JNM – Junção neuromuscular
KCl – Cloreto de Potássio
KDa – Kilo Dalton
KH₂PO₄ – Dihidrogeniofosfato de Potássio
mA – Mili-Ampère
MEE – Músculo Estriado esquelético
MET – Microscópio Eletrônico de Transmissão
ML – Microscópio de luz
MS – Ministério da Saúde
NaCl – Cloreto de Sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio
O₂ – Oxigênio
OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – Potencial de Hidrogênio

PLA₂ – Fosfolipase A₂

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SDS PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide

SES/SP – Secretaria de Estado da Saúde/São Paulo

SINAN/MS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Ministério da Saúde

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SIM – Sistema de Informações sobre Mortalidade

SNAP 25 – Synaptosome Associated Protein 25KDa

SNARE – Soluble NSF Attachment Receptor

t-SNARE – Target SNARE

v-SNARE – Vesicle SNARE

VAMP – Vesicle Associated Membrane

V – Volt

WB – Western Blotting

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: *Bothrops marajoensis*: serpente adulta em cativeiro. Fonte: www.herpetofauna.at5

Figura 2: Esquema demonstrando o processo de organização da vesícula sináptica (*Vesicle set-up*), ancoragem (*Docking*) e preparo (*Priming*) para o processo de exocitose do neurotransmissor. Seguindo-se do processo regenerativo (*Endocytosis*) da vesícula sináptica auxiliado pela proteína clatrina (*Clathrin assembly*). O processo se segue da perda do revestimento de proteína clatrina (*Uncoating*), que recobria a vesícula sináptica. Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupob/trafego.html> 11

Figura 3: Figura esquemática representando uma vesícula sináptica expondo suas principais proteínas: sinaptobrevina - VAMPS (*synaptobrevins*) e sinaptofisina (*synaptophysins*) voltados para citoplasma do motoneurônio no botão sináptico. Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupob/trafego.html> 12

Figura 4: A Representação esquemática das proteínas do complexo v-SNARE (*vesicle SNARE*), sinaptobrevina (*synaptobrevin*) e sinaptogmina (*synaptogmin*); e do complexo t-SNARE, sintaxina (*syntaxin*). Fonte: (A) <http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/snare.htm>; 13

(B) Esquema mostra o enovelamento das proteínas sinaptobrevina (*synaptobrevin*), sintaxina (*syntaxin*) e SNAP-25 (*synaptosoma-associated protein 25 KDa*). Fonte: http://www3.mpibpc.mpg.de/groups/jahn/Jahn/Neuronal_SNARE.htm 13

Figura 5: Registro miográfico da preparação *biventer cervicis* de pintainhos (BC). A - Controle, B - preparação tratada com a toxina BmjeTX-I (10µg/mL), C - preparação tratada com a toxina BmjeTX-II (10ug/mL). Ambas as toxinas foram isoladas do veneno bruto de *B. marajoensis*. * - adição das toxinas, ** - lavagem e remoção das toxinas, ACh – adição de acetilcolina, KCl – adição de cloreto de potássio. O tempo de registro em minutos está representado no gráfico e corresponde ao momento da primeira adição de KCl (10 min), ACh (20 min) e o tempo final de bloqueio (120 min).22

Figura 6: Cortes longitudinais do tecido muscular estriado esquelético (MEE) corado com hematoxilina-eosina (HE). A – músculo controle: Nota-se a preservação da arquitetura histológica da musculatura *biventer cervicis* de pintainhos sem nenhum dano. B – músculo tratado com a toxina BmjeTX-I (10µg/ml) e C – músculo tratado com a toxina BmjeTX-II (10µg/ml). Em tais preparações observa-se extensa área de dano tecidual (espaços desprovidos de miofilamentos - seta); hipercontração dos

miofilamentos com retração (seta). * - núcleo. Aumento = 400X. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 7: Cortes histológicos das preparações BC controle (A, B, C) ou submetidas à ação das toxinas BmjeTX-I (D, E, F) e BmjeTX-II (G, H, I) isoladas do veneno bruto de *B. marajoensis*. Nota-se a imunomarcação positiva em verde intenso (fluorocromo FITC), evidenciando a presença das proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25 (seta) somente no grupo controle. A, C, D, G, I: 200X; B, E, F, H: 400X.25

Figura 8: Representação dos resultados de western blotting (WB) para as proteínas sinaptofisina (A), sinaptobrevina (B) e SNAP-25 (C) e para a proteína constitutiva GAPDH (D). Je1 - BmjeTX-I, Je2 - BmjeTX-II, CB - o grupo controle.....26

Figura 9: Análise quantitativa do WB por medida de densidade de pixel de cada proteína: sinaptofisina (Syf), sinaptobrevina (Syb) e SNAP-25 (S25). (A) Há diferença significativa entre as proteínas da junção neuromuscular nos grupos tratados (BmjeTX-I – Je1; BmjeTX-II – Je2) versus o grupo controle (CB); * $p < 0,05$ e # $p < 0,001$. (B) Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle para a proteína GAPDH.....26

Figura 10: Aspectos ultraestruturais da musculatura da preparação BC do grupo controle (A, B, C). Nota-se a morfologia inalterada da fibra muscular com sarcômeros (s) e os miofilamentos (mi) íntegros, núcleo periférico (N) e Célula de Schwann envolvendo concentricamente o axônio, com neurofilamentos (n), mitocôndrias, formando a bainha de mielina (**). Em relação à ultraestrutura da musculatura da preparação submetida à ação das toxinas BmjeTX-I (D, E, F) e BmjeTX-II (G, H, I) isoladas do veneno bruto de *B. marajoensis* nota-se a hipercontração dos miofilamentos (mi), o dano mitocondrial (m) e nuclear (N), espaços desprovidos de miofilamentos (#) além das alterações na mielinização (**) das Células de Schwann.28

Figura 11: (A) Ultraestrutura da junção neuromuscular (JNM) do músculo *biventer cervicis* na qual não há pregas juncionais (controle). Notar a diminuição (#) da concentração de vesículas sinápticas (*) no botão nervoso da JNM de preparações tratadas com BmjeTX-I (B) e BmjeTX-II (C). M = fibra muscular; m = mitocôndria; mi = miofilamentos; seta = membrana pré-sináptica; dupla seta = membrana pós-sináptica; * = vesícula sináptica.29

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Serpentes.....	3
2.2. <i>Bothrops marajoensis</i>	4
2.3. Envenenamento botrópico.....	5
2.4. Venenos e toxinas.....	7
2.5. Miotoxicidade.....	8
2.6. Neurotoxicidade.....	8
2.6.1. Neurotoxinas pré-sinápticas.....	9
2.6.2. Neurotoxinas pós-sinápticas.....	9
2.7. Junção neuromuscular (JNM).....	10
3. JUSTIFICATIVA DO PROJETO.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1. Animais.....	16
5.2. Toxinas utilizadas.....	16
5.3. Anticorpos utilizados.....	16
5.3.1. Anticorpos primários.....	16
5.3.2. Anticorpos secundários.....	17
5.4. Grupos experimentais.....	17
5.5. Miografia: preparação biventer cervicis de pintainho (BC).....	17
5.6. Histologia.....	18
5.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	19

5.8. Imunohistoquímica (IHC).....	19
5.9. Western Blotting (WB).....	20
5.10. Análise Estatística.....	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Miografia: preparação biventer cervicis de pintainho (BC)	22
6.2. Histologia.....	23
6.3. Imunohistoquímica (IHC).....	24
6.4. Western Blotting (WB).....	25
6.5. Microscopia Eletronica de Transmissão (MET)	27
7. DISCUSSÃO.....	30
8. CONCLUSÕES.....	35
9. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

As serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae) são uma das causas mais freqüentes de acidentes ofídicos na América Latina, sendo 87,5% dos casos de acidentes botrópicos contra 9,2% de acidentes crotálicos e 3,3% de acidentes atribuídos aos venenos laquéuticos (2,7%) e elapídicos (0,6%), com pequenas variações de acordo com distribuição geográficas das serpentes (BRASIL, 2008; Ribeiro e Jorge, 1997).

O gênero *Bothrops* apresenta 32 espécies e subespécies que estão distribuídas nas Américas, desde o México até a Argentina (Hoge e Romano, 1973). Em todo o território nacional foram identificadas 17 delas (Cardoso *et al.*, 2003).

As *Bothrops* são abundantes em regiões rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares, apresentam grande variedade de cores, de tamanhos variados (40 centímetros a 2 metros de comprimento) e podem apresentar comportamento agressivo quando ameaçadas desferindo botes sem produzir ruídos. Podem também ser encontradas em árvores, entocadas à beira de rios ou dentro d'água (Puerto, 1992). Tais características biológicas destas serpentes justificam a maior ocorrência de acidentes ofídicos nestas áreas, atingindo, em sua maioria, os membros inferiores de homens na faixa etária de 19 a 49 anos (FUNASA, 2009).

São conhecidas popularmente por “jararaca”, “jararacuçu”, “urutu-cruzeiro”, “cotiara”, “jararaca-do-rabo-branco”, “jararaca-pintada”, “malha-de-sapo”, “patrona”, “surucucurana”, “combóia”, “caiçara”, entre outras denominações (Melgarejo, 2003).

Ao longo da escala evolutiva, a saliva das serpentes foi sofrendo transformações químicas, adquirindo potencial de neutralizar e digerir suas presas. Qualitativamente os venenos de serpentes são compostos por uma mistura de compostos orgânicos de baixo peso molecular como carboidratos, serotonina, histamina, citrato e nucleosídeos; íons inorgânicos, como cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio manganês sódio, fósforo, cobalto e zinco (Kini, 2003).

Entretanto, a maior parte dos compostos presentes no veneno (90 a 95% do peso seco) é formada por proteínas (Tu, 1996), como fosfolipases A₂, proteases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C, lectinas, peptídios, representados principalmente por potencializadores de bradicinina e desintegrinas (Kini, 2003), metaloproteases e as serinoproteases (Matsui *et al.*, 2000).

Na América Latina, os envenenamentos por viperídios caracterizam-se por uma fisiopatologia complexa que inclui efeitos locais como mionecrose, dermatonecrose, hemorragia, edema, dor, e em casos moderados e severos, alterações sistêmicas como coagulopatias, sangria, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

Apesar dos venenos botrópicos, em geral, não produzem sinais aparentes de neurotoxicidade após o envenenamento, estudos *in vitro* indicam que vários desses venenos produziram bloqueio neuromuscular em preparações isoladas de anfíbios, aves e mamíferos (Cogo *et al.*, 1993; Costa *et al.*, 1999; Lôbo-Araújo *et al.*, 2002; Borja-Oliveira *et al.*, 2003; Galbiatti *et al.*, 2012, Oshima-Franco *et al.*, 2004).

Tais achados da literatura relacionados à neurotoxicidade dos compostos presentes nos venenos bothrópicos justifica a necessidade da sua caracterização objetivando indentificar os possíveis mecanismos de ação, pré e pós-sinápticos observados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Serpentes

As serpentes (Ordem Squamata) constituem o mais numeroso grupo de répteis com cerca de 3.000 espécies distribuídas em 465 gêneros. Estão inclusas na classe Reptilia, subclasse Lepdosauria, tendo cerca de 410 espécies venenosas, porém este número é bastante variável, reflexo da complexidade de formas e ausência de conhecimento profundo das relações filogenéticas destes animais (Barraviera, 1993; Melgarejo, 2003).

De acordo com McDowell *et al.*; (1987) estes animais são classificados em 2 subordens, 7 superfamílias e 19 famílias. A superfamília Colubridea abrange a maioria das espécies (BRASIL, 2001; Melgarejo, 2003). Com cerca de 250 espécies, a família Elapidae tem ampla distribuição mundial com representantes em todos os continentes. Na América, seus principais exemplares são as popularmente conhecidas “cobras corais”. Na fauna brasileira há cerca de 20 representantes desta família, sendo a maioria pertencente ao gênero *Micrurus* (Campbell e Lamar, 1989; Roze, 1996). A família Viperidae possui cerca de 34 gêneros e mais de 200 espécies de serpentes. A maioria destas espécies pertence ao gênero *Bothrops*, enquanto poucas fazem parte do gênero *Crotalus* e do gênero *Lachesis* (Jorge e Ribeiro, 1990).

No geral as serpentes apresentam uma distribuição territorial quase universal, mas habitam, principalmente, as regiões temperadas e tropicais. Apesar de sofrerem interferências morfológicas adaptativas aos diversos ambientes onde são encontradas, conservaram um padrão bastante homogêneo: o corpo extremamente alongado, sem apêndices locomotores e cintura escapular; perda da sínfise mandibular (perda da sutura óssea das hemimandíbulas, substituída por um ligamento) e perda de pálpebras móveis. Os órgãos internos são como os demais vertebrados, porém sempre conservando um formato alongado e a principal diferença reside na ausência de bexiga urinária. São quase exclusivamente carnívoras, alimentando-se de presas inteiras,

vertebrados e invertebrados, e caçam com o auxílio de estruturas quimiossensíveis, fossetas loreais (Wong *et al.*, 2009).

Algumas espécies são dotadas de glândulas produtoras de venenos e um aparato inocular com pressas (Russel e Dart, 1991), como as serpentes das famílias Elapidae e Viperidae (BRASIL, 2001; Melgarejo, 2003). Dentre as Elapidae destacam-se as najas, do continente asiático, e as mambas, do continente africano, cuja picada é fatal se não administrado o antiveneno rapidamente. O potente aparato inoculador das Viperidae, bem como, seus venenos (Campbell e Lamar, 1989), atribue a esta família um alto grau de importância do ponto de vista da saúde pública, uma vez que grande parte dos acidentes ofídicos registrados no continente americano envolve suas espécies (BRASIL, 2001).

2.2. *Bothrops marajoensis*

Bothrops marajoensis (Marajó lancehead) é encontrada na Ilha de Marajó (Pará, Brasil) e possivelmente em planícies costeiras do Delta do Amazonas (Hoge e Romano, 1973; Campbell e Lamar, 1989), Amapá e nas regiões equatoriais do estado do Maranhão (Hoge e Romano, 1973; Campbell e Lamar, 2004). Esta espécie é parte do complexo *Bothrops atrox*, que compreende populações de médio e de grande porte de serpentes distribuídas nas zonas tropicais desde a América Central à América do Sul (Wüster *et al.*, 1998).

Apesar de compor um dos gêneros mais importantes e bastante estudados na família dos viperídeos, esta espécie é ainda pouco conhecida, talvez pelas controvérsias em torno de sua classificação (Campbell e Lamar, 1989; Wolfgang *et al.*, 1996).

B. marajoensis é uma serpente terrestre de médio porte, com aproximadamente 1 metro e meio de comprimento e tonalidade marrom oliva, exibindo de marcas de cor marrom para preto sobre o corpo em formato triangular para trapezoide. Tem cabeça pontiaguda e íris bronze (Hoge e Romano, 1973; Campbell e Lamar, 1989).



Figura 1: *Bothrops marajoensis*: serpente adulta em cativeiro. Fonte: www.herpetofauna.at

2.3. Envenenamento botrópico

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que ocorram, em nível mundial, aproximadamente, 2.500.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 125.000 mortes (Chippaux, 1998).

No Japão a incidência é de aproximadamente 1/100.000 habitantes e a letalidade é inferior a 1%. Na Europa, Estados Unidos e Canadá, os acidentes ofídicos são relativamente raros, cerca de 90% dos 8.000 envenenamentos ocorridos por ano são hospitalizados, resultando entre 15 a 30 casos fatais. Na África, a frequência dos acidentes ofídicos é precariamente documentada. Dos 500.000 casos de acidentes ofídicos, 40% são hospitalizados, resultando em 20.000 óbitos por ano. Na Ásia os acidentes ofídicos provocam de 25.000 a 35.000 óbitos por ano (Chippaux, 1998).

Entre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de casos com cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano (Pereira e Pinho, 2001). Somente no ano de 2005 foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 97.244 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais

as serpentes contribuíram com 28.702 casos (29,52%) (BRASIL, 1998; Lemos *et al.*, 2009). Já no ano de 2009 foram 121.217 envenenamentos, 29.670 casos por serpentes (24,48%). De acordo com o Ministério da Saúde (MS), as serpentes do gênero *Bothrops* são as principais envolvidas nos acidentes ofídicos no país. No período de 1990 a 1993, foram responsáveis por 90,5% dos 65.911 casos de picadas de serpentes (BRASIL, 1998), com taxa de letalidade de 0,31%.

O perfil clínico-epidemiológico dos acidentes ofídicos depende da distribuição das espécies dentro de cada região, dos hábitos destes animais e do grau de exposição das populações humanas a estes agentes. Segundo Bochner e Struchiner (2002), a epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil se manteve inalterada nestes últimos 100 anos. Os dados demonstram que o sexo masculino é o mais acometido. A faixa etária coincide com a idade onde a força de trabalho no campo é maior (BRASIL, 2001).

As alterações clínicas decorrentes dos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* vão de complicações no local da picada, como edema, dor, hemorragia e mionecrose (Vital Brazil, 1972; Pellegrini Filho e Vital Brazil, 1976) até alterações sistêmicas (Málaque e França, 2003). O veneno botrópico, após a sua inoculação, permanece na pele (mais de 50% do volume total), sendo este o primeiro órgão acometido, agindo posteriormente nos músculos e rins (Feitosa *et al.*, 1997). Insuficiência renal aguda, glomerulonefrite, glomerulite e nefrite intersticial (Sant e Pundare, 1972), choque e *sepsis* foram as principais causas de morte nestes acidentes (BRASIL, 2001). Embora raros, são descritos na literatura casos de insuficiência respiratória (Ribeiro *et al.*, 1998) demonstrando que estes venenos podem ter também ação neurotóxica e não só miotóxica.

Em virtude da frequência com que ocorrem, os acidentes ofídicos constituem importante problema nas medicinas veterinária e humana nos países tropicais, por causa de sua elevada incidência e gravidade e das sequelas, exigindo até mesmo notificação obrigatória ao MS (Oliveira *et al.*, 2008).

2.4. Veneno e toxinas

Os venenos ofídicos são compostos por uma complexa mistura de moléculas de natureza química diversa como compostos inorgânicos; cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco; carboidratos, proteínas (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídios), aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos também são encontrados (Kini, 2003). A maior parte destes compostos são proteínas e peptídeos (Matsui *et al.*, 2000), aos quais são atribuídas as propriedades tóxicas dos venenos, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, além de ação proinflamatória, coagulante e agregante de plaquetas (Sai-Ngam *et al.*, 2008).

As miotoxinas fosfolipásicas foram classificadas quanto a presença ou ausência de atividade neurotóxica, sendo as miotoxinas sem atividade neurotóxica comuns em venenos crotálicos e botrópicos (Barbosa *et al.*, 2002).

As neurotoxinas são divididas, de acordo com o sítio de atuação, em pós-sinápticas e pré-sinápticas. As neurotoxinas pós-sinápticas se ligam aos receptores colinérgicos sem provocar despolarização, inibindo a transmissão neuromuscular. Ocorrem em venenos de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae (Zamunér *et al.*, 2004). As toxinas pré-sinápticas agem possivelmente inibindo o influxo de cálcio, evitando assim a liberação de acetilcolina, tem letalidade maior que as toxinas pós-sinápticas; são estruturalmente relacionadas à fosfolipase A₂ e podem agir como toxinas mionecróticas. Foram encontradas também em serpentes da família Crotalidae como, por exemplo, a crotoxina, isolada da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Beghini *et al.*, 2008). Estudos comparativos entre as espécies de *Bothrops insularis* e *Bothrops neuwiedi* e a espécie *Crotalus durissus cascavella* demonstraram uma ação pré-sináptica dos venenos botrópicos com variados graus de bloqueio neuromuscular (Zamunér, 2004).

2.5. Miotoxicidade

Diferentes fosfolipases A₂ com atividade miotóxica induzem um padrão similar de alterações morfológicas, independentemente de apresentarem atividade enzimática ou não (Gutiérrez *et al.*, 1991; Gutiérrez e Ownby, 2003).

A mionecrose tende a seguir um padrão, independentemente de seu agente causador. Inicialmente ocorre alteração da permeabilidade do sarcolema (Diaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997), e em seguida desequilíbrio iônico com aumento do influxo de cálcio, edema celular, hipercontração das miofibrilas, seguida pela perda de registro dos sarcômeros, aglutinação compacta dos miofilamentos e o desarranjo do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias (Harris, 2003). Os núcleos têm aspecto picnótico e as membranas intracelulares se alteram com formação de múltiplas vesículas no sarcoplasma (Harris e Culen, 1990; Mebs e Ownby, 1990; Gutiérrez e Lomonte, 2003).

Entretanto o mecanismo de ação dessas miotoxinas não se encontra elucidado plenamente do ponto de vista molecular. Estudos com lipossomas indicam que as toxinas são capazes de lesar diretamente a membrana plasmática (Diaz *et al.*, 1991).

Fosfolipases sem atividade catalítica, como a miotoxina II isolada de veneno de *Bothrops asper*, alteram a membrana plasmática sem necessariamente levar à hidrólise dos fosfolipídeos possivelmente por uma ação no domínio molecular, capaz de penetrar e desorganizar a bicamada lipídica (Lomonte *et al.*, 1994).

2.6. Neurotoxicidade

Neurotoxinas pré-sinápticas com atividade fosfolipásica são os componentes mais abundantes também nos venenos botrópicos. Algumas destas são neurotoxinas que causam bloqueio da junção neuromuscular, impedindo de alguma forma a exocitose dos neurotransmissores na fenda sináptica (Kini, 1997; Montecucco e Rossetto, 2000; Schiavo *et al.*, 2000) ocasionando, como descrito para outras espécies, ptosis, oftalmoplegia, paralisia respiratória, dor abdominal e efeitos no sistema nervoso autônomo (Connolly *et al.*, 1995; Theakston *et al.*, 1990; Warrell *et al.*, 1983).

Vários estudos tem mostrado este efeito paralelo para os venenos e toxinas de *B. jararacussu* (Heluany *et al.*, 1992; Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983, 1995; 2004), *B. moojeni* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1990), *B. insularis* (Cogo *et al.*, 1993; 1998), *B. lanceolatus* (Lôbo-Araújo *et al.*, 2002), *B. neuwiedi* (Borja-Oliveira *et al.*, 2003; Zamunér *et al.*, 1996), *B. marajoensis* (Cavalcante *et al.*; 2011) e *B. pirajai* (Costa *et al.*, 1999) evidenciando o bloqueio neuromuscular em preparações nervo-músculo *in vitro*. Essa ação sobre a junção neuromuscular tem sido caracterizada, em sua maioria, com base nos experimentos miográficos e eletrofisiográficos, como pré-sináptica (Borja-Oliveira *et al.*, 2003; Cogo *et al.*, 1993; 1998; Rodrigues-Simioni *et al.*, 2004).

2.6.1. Neurotoxinas pré-sinápticas

Denominadas como β neurotoxinas, as neurotoxinas pré-sinápticas apresentam atividade catalítica típica de fosfolipases B₂ e inibem o processo de liberação da acetilcolina (Chang *et al.*, 1973). A ação neurotóxica é caracterizada pelo bloqueio neuromuscular e não altera significativamente a sensibilidade da placa motora para a acetilcolina, ou seja, quando age uma neurotoxina pré-sináptica, não necessariamente, há destruição da fibra muscular (Harris, 1991).

Estas neurotoxinas podem ser polipeptídio de cadeia simples, como a notexina, ou podem apresentar múltiplas subunidades, como a crotoxina, taipoxina e textiloxina que apresentam duas, três e cinco subunidades, respectivamente (Harvey *et al.*, 1994). Tal neurotoxicidade não aparenta estar diretamente correlacionada a sua atividade fosfolipásica e à subsequente hidrólise de fosfolipídios de membrana (Rosenberg, 1990).

2.6.2. Neurotoxinas pós-sinápticas

Denominadas como α -neurotoxinas, estas toxinas se ligam aos receptores colinérgicos nicotínicos da região sub-sináptica da placa motora e bloqueiam de forma

reversível a transmissão nervosa, ligando-se competitivamente aos receptores colinérgicos nicotínicos da região pós-sináptica de músculos esqueléticos e neurônios, evitando a transmissão neuromuscular (Tselin e Hucho, 2004).

As neurotoxinas pós-sinápticas são peptídeos de baixa massa molecular (7 a 8 kDa), possuem entre 60 e 70 aminoácidos e são desprovidas de atividade enzimática (Karlsson, 1979).

Diferentemente da toxina botulínica, por exemplo, que atua diretamente sobre as proteínas sinaptobrevina (VAMP - “vesicle-associated membrane”, inserida na membrana da vesícula sináptica), SNAP-25 e sintaxina (inseridas na membrana pré-sináptica) clivando-as e impedindo a liberação do neurotransmissor da vesícula sináptica (Rossetto *et al.*, 2006), o que se sabe até o presente momento é que as neurotoxinas de venenos de serpentes não afetam as proteínas envolvidas no processo de neuroexocitose, mas somente os fosfolípidios, hidrolisando-os e inibindo a liberação dos neurotransmissores (Howard e Wu, 1976; Rigoni *et al.*, 2005).

2.7. Junção Neuromuscular (JNM)

A JNM, local onde se inicia a despolarização da membrana, consiste em uma junção entre nervo e músculo, situada na superfície da fibra muscular estriada esquelética, e comandada por nervos motores que se ramificam no tecido conjuntivo do perimísio. A despolarização, iniciada na placa, propaga-se ao longo da fibra muscular e penetra no sarcoplasma através dos túbulos T, determinando a contração uniforme da cada fibra muscular estriada esquelética (Simpson *et al.*, 1993).

O nervo perde a bainha de mielina e forma uma dilatação que se coloca dentro de uma depressão na superfície da fibra muscular estriada esquelética (terminal axônico). A JNM é constituída por um terminal pré-sináptico dotado de vesículas sinápticas contendo neurotransmissor (ACh), membrana pré-sináptica, uma fenda sináptica e um aparato de recepção pós-sináptico (membrana pós-sináptica). A região da membrana pré-sináptica na qual as vesículas sinápticas se ancoram e se fundem para a liberação de ACh é chamada de zona ativa. A membrana pós-sináptica,

justaposta às zonas ativas, apresenta receptores para estes neurotransmissores e canais iônicos e é referida como densidade pós-sináptica (Garner *et al.*, 2000).

A exocitose destas vesículas sinápticas ocorre na zona ativa e a subsequente recuperação endocítica dos componentes vesiculares pode ocorrer tanto na zona ativa quanto na área da zona peri ativa, garantindo a liberação exocitótica de neurotransmissores próxima a seus receptores pós-sinápticos (Murthy e De Camilli, 2003).

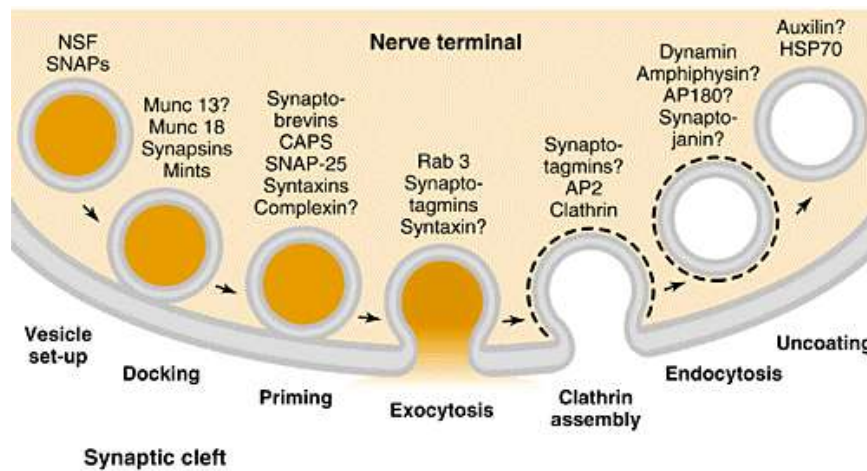


Figura 2: Esquema demonstrando o processo de organização da vesícula sináptica (*Vesicle set-up*), ancoragem (*Docking*) e preparo (*Priming*) para o processo de exocitose do neurotransmissor. Seguindo-se do processo regenerativo (*Endocytosis*) da vesícula sináptica auxiliado pela proteína clatrina (*Clathrin assembly*). O processo se segue da perda do revestimento de proteína clatrina (*Uncoating*), que recobria a vesícula sináptica. Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupob/trafeogo.html>

Vesículas sinápticas são estruturas membranosas com aproximadamente 40 nm, apresentando grande quantidade de proteínas essenciais a exocitose de seu conteúdo (neurotransmissor) (Takamori *et al.*, 2006).

A sinaptofisina é a mais abundante glicoproteína de membrana encontrada na vesícula sináptica. Apresenta 4 domínios transmembrana com ambas as extremidades N e C-terminal voltadas para o citoplasma. A sua presença está diretamente relacionada à integridade das vesículas sinápticas, sendo sua ausência um indício da exocitose de ACh (Simpson *et al.*, 1993).

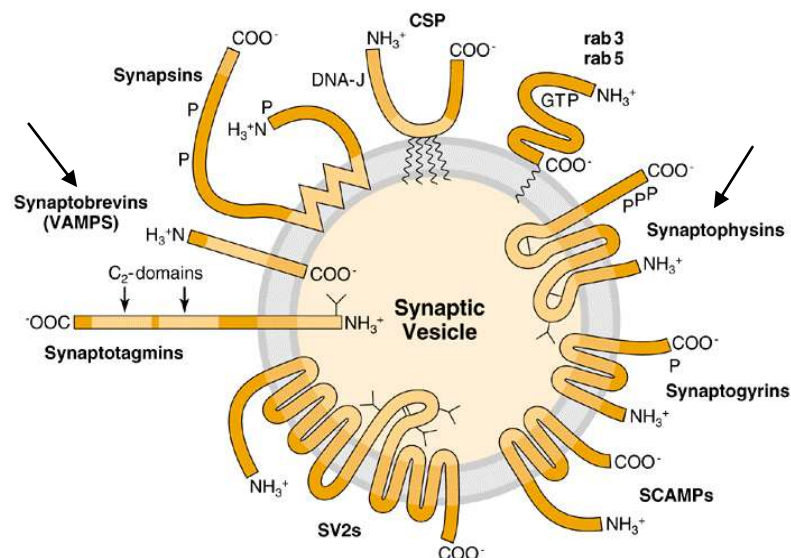


Figura 3: Figura esquemática representando uma vesícula sináptica expondo suas principais proteínas: sinaptobrevina - VAMPS (*synaptobrevins*) e sinaptofisina (*synaptophysins*) voltados para citoplasma do motoneurônio no botão sináptico. Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupob/trafego.html>

A proteína SNAP-25 (“synaptosome-associated protein” - 25 kDa) é uma proteína da membrana pré-sináptica e é designada t-SNAREs (“target” SNARE). Está ancorada na face citoplasmática e é necessária para o processo de exocitose do neurotransmissor (Dumitru e Amato, 2008).

Outra t-SNARE é a sintaxina 1, também conhecida como p35, uma pequena proteína integral de membrana que é abundantemente expressa em neurônios. É um componente essencial para a fusão da vesícula sináptica e interage com outras importantes proteínas, incluindo sinaptobrevina, SNAP-25, α -SNAP e sinaptotagmina I (Dumitru e Amato, 2008).

Já a sinaptobrevina (VAMP), v-SNARE ou “vesicular” SNARE, é uma proteína constituinte da vesícula sináptica representante da família de proteínas integrais de membrana com extremidade N-terminal voltada para a região citoplasmática e com a extremidade C-terminal inserida no domínio transmembrana. Duas isoformas foram identificadas em mamíferos, sendo elas, sinaptobrevina 1 (VAMP 1 ou p18-1) e sinaptobrevina 2 (VAMP 2 ou p18-2) que apresentam diferente distribuição no tecido

neural. É uma das proteínas essenciais no processo de exocitose (Ceccarelli *et al.*, 1973).

Após a exocitose de seu conteúdo, as vesículas sinápticas sofrem endocitose mediada por clatrina (Heuser e Reese, 1973; Richards *et al.*, 2000), através de invaginações de membrana e formação de cisternas (Richards *et al.*, 2000; 2003), ou ainda por endocitose designada como “Kiss and Run”, na qual vesículas liberam seu conteúdo sem integrarem completamente a membrana pré-sináptica, sendo reacidificadas e novamente preenchidas por neurotransmissores (Ceccarelli *et al.*, 1973; Gandhi e Stevens, 2003; Pyle *et al.*, 2000).

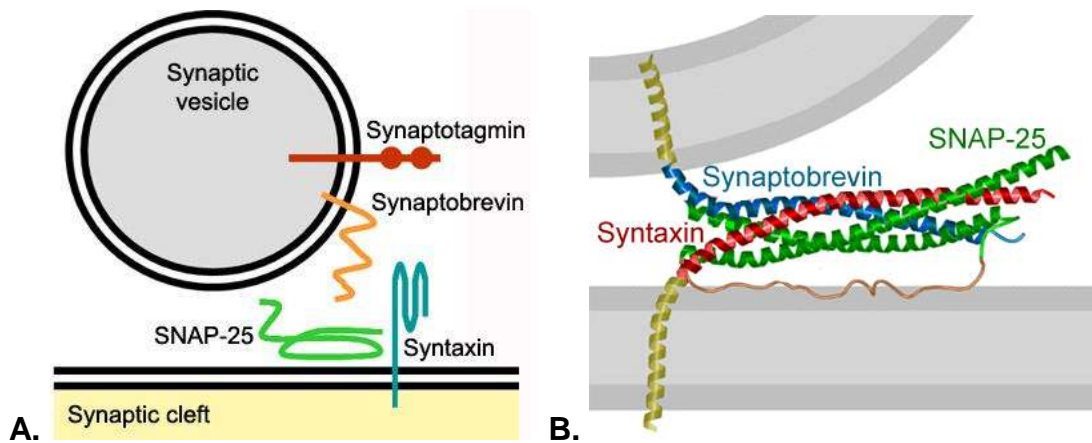


Figura 4: A Representação esquemática das proteínas do complexo v-SNARE (*vesicle* SNARE,) sinaptobrevina (*synaptobrevin*) e sinaptogmina (*synaptogmin*); e do complexo t-SNARE, sintaxina (*syntaxin*). Fonte: **(A)** <http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/snare.htm>;

(B) Esquema mostrando o enovelamento das proteínas sintaptobrevina (*synaptobrevin*), sintaxina (*syntaxin*) e SNAP-25 (*synaptosoma-associated protein 25* KDa). Fonte: http://www3.mpibpc.mpg.de/groups/jahn/Jahn/Neuronal_SNARE.htm

3. JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Sabe-se que os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, bem como a maioria de suas frações até então caracterizadas, têm ação miotóxicas. Porém, alguns destes compostos, como as toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II (obtidas do veneno bruto de *B. marajoensis*) atuam sobre a junção neuromuscular, em sua porção pré-sináptica, através de mecanismo(s) ainda não totalmente elucidado(s).

Desta forma a caracterização das proteínas envolvidas nos processos de exocitose de neurotransmissores no motoneurônio, proteínas estas presentes na vesícula sináptica e na membrana pré-sináptica, torna-se uma importante ferramenta para auxiliar na compreensão do mecanismo de ação molecular de neurotoxinas pré-sinápticas, como estas fosfolipases A_2 .

4. OBJETIVOS

1. Elucidar os possíveis mecanismos pré-sinápticos induzidos pelas neurotoxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II, obtidas do veneno total de *Bothrops marajoensis*, na JNM.
2. Identificar, por imunohistoquímica (IHC) e western blotting (WB), a presença ou ausência das proteínas relacionadas à junção neuromuscular, especificamente a proteína sinaptofisina, presente na vesícula sináptica, e as proteínas sinaptobrevina e SNAP-25, constituintes do complexo SNARE, participantes do processo de exocitose das vesículas sinápticas.
3. Relacionar os achados de histologia (HE), microscopia eletrônica de transmissão (MET), imunohistoquímica (IHC) e western blotting (WB), aos dados obtidos nos ensaios miográficos para precisa caracterização das toxinas como compostos de ação pré-sináptica.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Pintainhos da linhagem HY-Line W36 (4-8 dias de idade) foram obtidos da Globo Aves Agrovicola Ltda (Brasil). Os animais foram mantidos no biotério à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, com ciclos de 12 horas de claro/escuro, com livre acesso à ração apropriada e água.

Todos os experimentos estão de acordo com as normas já estabelecidas pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade São Francisco (USF) - Campus Bragança Paulista, sob número de protocolo 000.11.10, em concordância com as regras da Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) (anexo1).

5.2. Toxinas utilizadas

As toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II isoladas do veneno de *B. marajoensis* foram doadas, já purificadas e liofilizadas, pelos professores Luis A. Ponce-Soto e Sérgio Marangoni, do Instituto de Biologia da UNICAMP (IB//UNICAMP).

5.3. Anticorpos utilizados

5.3.1. Anticorpos primários

Anti-sinaptofisina produzido em coelho (Sigma Aldrich – cat. no. SAB4502906) – diluição para IHC = 1:150 e para WB = 1:1000

Anti-sinaptobrevina ou VAMP1 produzido em camundongo (Sigma Aldrich – cat. no. S5312) – diluição para IHC = 1:300 e para WB = 1:5000

Anti-SNAP-25 produzido em camundongo (Sigma Aldrich – cat. no. SAB2500965) – diluição para IHC = 1:250 e para WB = 1:1000

Anti-GAPDH produzido em camundongo (Santa Cruz – cat. no. G-9 – SC 25778) – diluição para WB = 1:1000

5.3.2. Anticorpos secundários

Anti-coelho IgG conjugado com FITC produzido em cabra (Sigma Aldrich – cat. no. F0382) – diluição para IHC = 1:80 e HRP (cat. no. A6154) – diluição para WB = 1:1000. Anti-camundongo IgG conjugado com FITC produzido em cabra (Sigma Aldrich – cat. no. F0257) – diluição para IHC = 1:150 e HRP produzido em coelho (cat. no. A9044) – diluição para WB = 1:3000

5.4. Grupos experimentais

Os experimentos propostos foram realizados com grupo experimental (n = 12 amostras):

Grupos controle (Krebs) - CB

Toxina BmjeTX-I do veneno de *B. marajoensis* – Je1

Toxina BmjeTX-II do veneno de *B. marajoensis* – Je2

5.5. Miografia: preparação biventer cervicis de pintainho (BC)

A preparação músculo biventer cervicis de pintainho foi isolada e montada de acordo como descrito por Ginsborg e Warriner (1960). Para tanto, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia por inalação de isoflurano. Após a afixação em placa de dissecação, em decúbito ventral, procedeu-se a dissecação para a retirada dos músculos *biventer cervicis*. Após a retirada, os músculos foram amarrados com linha de sutura em um transdutor isométrico e montados em uma cuba de registros de 5mL, em banho de órgão isolado.

Os músculos foram imersos em 5mL de solução nutritiva de Krebs, contendo em mM: (120 NaCl), (118,7 KCl), (4,7 CaCl₂), (1,8 NaHCO₃), (25 MgSO₄), (1,17 KH₂PO₄) e

11,65 de glicose; aerado constantemente com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantido a 37°C e pH 7.4.

Foram aplicados estímulos elétricos indiretos supramaximais (0.1Hz, 0.2 ms, 4-6V), por meio de eletrodos bipolares de prata cloretada, conectados a um estimulador elétrico (Grass S 48 – Grass Instrument Co., USA), posicionado na região entre o tendão e o músculo, com o objetivo de estabelecer uma estimulação de campo. Os registros das contrações musculares e das contraturas foram obtidos em fisiografo (Gould model RS 3400, USA). Antes da adição dos tratamentos, as preparações foram estimuladas durante 10 minutos para a estabilização dos registros, seguiu-se da adição de KCl (20mM) aos 10 minutos, posterior lavagem e adição de ACh (110mM) aos 20 minutos, prosseguindo com a adição de 10µg/mL das toxinas BmjeTX-I (preparação B) e BmjeTX-II (preparação C) seguindo-se os registros por 120 minutos. Para o grupo controle os registros foram realizados apenas em solução Krebs. Finalmente as preparações foram lavadas e tratadas novamente com ACh e KCl, seguindo-se os registros por mais 20 minutos após a adição e lavagem de cada um dos reagentes. Os registros foram feitos durante 120min ou até o bloqueio total.

5.6. Histologia

O material biológico destinado à histologia e imunohistoquímica foi preparado para microtomia em criostato, sendo os músculos (n = 4) montados sobre papel filtro com meio de montagem específico “OCT-Tissue Tek” e congelados em n-hexano resfriado em nitrogênio líquido.

Os criocortes longitudinais (10 µm) foram coletados em lâminas silanizadas, permeabilizados em etanol e metanol resfriado (-20°C) por 10 minutos, lavados em água destilada por 5 minutos, imersos em Hematoxilina por 5 minutos, lavados novamente em água destilada, contracorados em solução de Eosina, por 3 minutos e finalmente lavados em água destilada por 5 minutos.

As lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 95% por um minuto; etanol I e II a 100% por cinco minutos cada solução), imersas em xilol I

e II por 5 minutos e montadas com “Bálsamo do Canadá” sintético para posterior análise em microscópio óptico Olympus BX51-PH-III.

5.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Fragmentos dos músculos (n = 4) foram fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M) (pH 7,4) “overnight”. O material foi posteriormente lavado em tampão cacodilato de sódio 0,01M (3 banhos de 10 minutos cada), em seguida pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, e novamente lavado em tampão cacodilato de sódio 0,01M (2 banhos de 10 minutos cada) e água destilada (3 banhos de 10 minutos cada). A contrastação em bloco foi realizada em acetato de uranila a 5% por 1 hora. Logo após, o material foi lavado em água destilada (3 banhos de 10 minutos cada), e desidratado inicialmente em etanol 30% e 50% (10 minutos), 70% (“overnight”), e posteriormente em acetona 70%, 90% (10 minutos) e em acetona 100% (2 banhos de 30 minutos cada).

Os músculos foram embebidos em resina Epon-Araldite:acetona (1:2; 1:1; 2:1) por 1 hora, em Epon-Araldite 100% (“overnight” em rotor) e incluídos em Epon-Araldite 100%, sendo mantidos à 60°C, por 72 horas, para polimerização.

Os cortes semifinos foram coletados em lâminas de vidro e corados com Azul de Toluidina, e os cortes ultrafinos contrastado com acetato de uranila a 5% em tampão maleato 0,05M, pH 5,2 e citrato de chumbo.

A ultramicrotomia dos blocos foi realizada no Laboratório de Ultraestrutura Celular e a análise das amostras no Laboratório de Microscopia Eletrônica, ambos alocados no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

5.8. Imunohistoquímica (IHC)

Os criocortes (10µm) foram coletados em lâminas silanizadas, permeabilizados em etanol e metanol resfriado (-20°C) por 10 minutos, pré-incubados em Triton X-100 (0,1%), por 15 minutos, lavados em PBS 0,05M e incubados “overnight” em anticorpo

primário + PBS/BSA 1%. As lâminas foram lavadas (2 banhos de 15 minutos cada) para o período de incubação (2 horas) em anticorpo secundário. Os criocortes foram novamente lavados em PBS 0,05M e as lâminas montadas em gelatina glicerinada para análise ao microscópio de fluorescência.

5.9. Western Blotting (WB)

Para realização do WB adaptou-se o protocolo utilizado por Rocha *et al.* (2010). Músculos inteiros já tratados (n = 4) foram congelados em nitrogênio líquido, armazenados a -80°C, picotados e homogenizados em coquetel anti-protease específico. O extrato obtido foi centrifugado (10 minutos, 3000g, 4°C), e o sobrenadante aliqotado para dosagem de proteínas pelo Método de Biureto.

Alíquotas deste “pool” de amostra contendo 15µg de proteína foram aplicadas ao mini-gel de SDS-PAGE 12%. A eletroforese correu a 150V, por 110 minutos, e a transferência das proteínas do mini-gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos, a 400mA, em cuba específica.

As membranas foram incubadas em solução de leite desnatado a 5% durante 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, e posteriormente incubadas com os anticorpos primários em solução de leite desnatado a 3%, “overnight”.

Passado o período de incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal (6 banhos de 5 minutos cada) para incubação com o anticorpo secundário-HRP, por 2 horas, à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas em solução basal e incubadas com luminol (Bio-Rad Immun-Star HRP Substrate Kit), por 3 minutos, para revelação das bandas imunoreativas e posterior quantificação.

5.10. Análise Estatística

Todos os resultados foram representados pela média \pm desvio padrão. O teste ANOVA para múltiplas comparações, seguido pelo pós-teste de Tukey, foi utilizado para avaliar a interação entre os fatores tempo de sobrevida e grupo de tratamento, para a variável expressão de cada proteína. A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* GraphPad Prism, considerando significativas as diferenças com valor de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Miografia: preparação biventer cervicis de pintainho (BC)

As preparações BC do grupo controle Krebs **(A)** não apresentaram bloqueio neuromuscular. Já as preparações incubadas com as toxinas BmjeTX-I (10 μ g/mL) **(B)** e BmjeTX-II (10 μ g/mL) **(C)**, isoladas do veneno bruto de *B. marajoensis*, apresentaram bloqueio neuromuscular completo após 31,2 \pm 3,5 minutos e 30 \pm 8,1 minutos ($p < 0.05$), respectivamente. Nenhuma delas apresentou alteração na contratatura após aplicação exógena de ACh (110mM) e KCl (20mM), antes e após a adição das toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II, respectivamente nas preparações **B** e **C** (**Figura 5**).

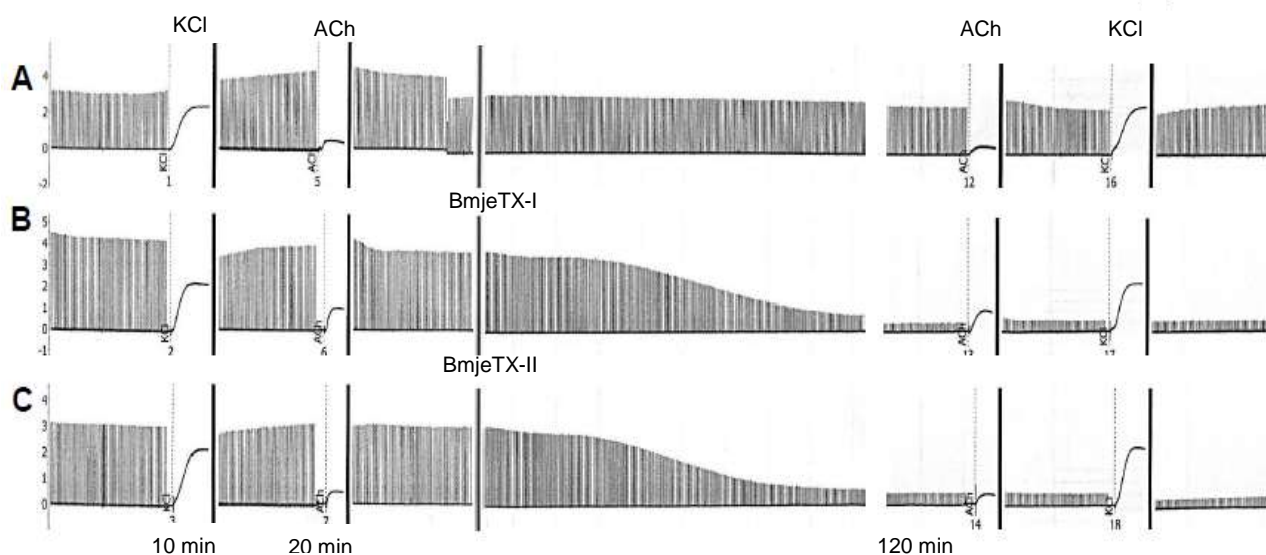


Figura 5: Registro miográfico da preparação *biventer cervicis* de pintainhos (BC). A - Controle, B - preparação tratada com a toxina BmjeTX-I (10 μ g/mL), C - preparação tratada com a toxina BmjeTX-II (10 μ g/mL). Ambas as toxinas foram isoladas do veneno bruto de *B. marajoensis*. * - adição das toxinas, ** - lavagem e remoção das toxinas, ACh – adição de acetilcolina, KCl – adição de cloreto de potássio. O tempo de registro em minutos está representado no gráfico e corresponde ao momento da primeira adição de KCl (10 min), ACh (20 min) e o tempo final de bloqueio (120 min).

6.2. Histologia

À coloração de hematoxilina-eosina (HE) as fibras musculares nos músculos do grupo controle **(A)** apresentaram morfologia preservada, com fibras alongadas (em corte longitudinal), com sarcoplasma contendo miofilamentos igualmente corados, alinhados e contínuos, distribuídos uniformemente e núcleos periféricos (*). A estrutura do tecido muscular estriado esquelético (MEE) apresentou-se totalmente preservada, conforme esperado, sem edema celular ou tecidual. Contrapondo-se ao tecido muscular íntegro do grupo controle, nas preparações submetidas ao tratamento com as toxinas BmjeTX-I **(B)** e BmjeTX-II **(C)** se observou diferentes estágios da patogênese muscular, tais como edema celular e tecidual, desalinhamento, hipercontração e envelhecimento dos miofilamentos, fibras vacuolizadas, lesões do tipo delta até a perda completa dos miofilamentos, nas chamadas “ghost fibers” **(Figura 6)**.

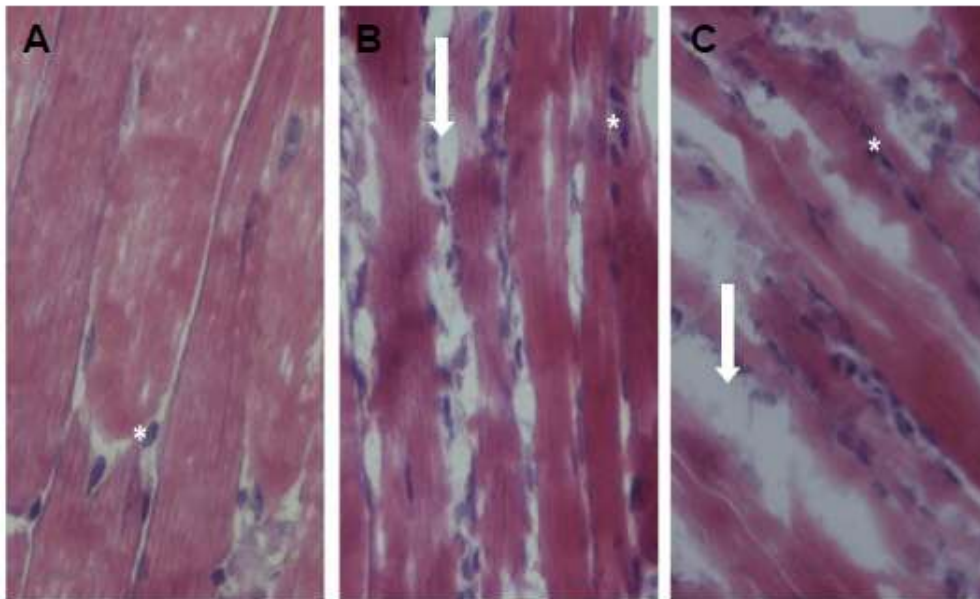


Figura 6: Cortes longitudinais do tecido muscular estriado esquelético (MEE) corado com hematoxilina-eosina (HE). A – músculo controle: Nota-se a preservação da arquitetura histológica da musculaturabiventer cervicis de pintainhos sem nenhum dano. B – músculo tratado com a toxina BmjeTX-

I (10µg/ml) e C – músculo tratado com a toxina BmjeTX-II (10µg/ml). Em tais preparações observa-se extensa área de dano tecidual (espaços desprovidos de miofilamentos - seta); hipercontração dos miofilamentos com retração (seta). * - núcleo. Aumento = 400X.

6.3. Imunohistoquímica (IHC)

Em todos os experimentos realizados apenas as amostras dos grupos controle apresentaram imuno-expressão positiva para as proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25. A imunohistoquímica para sinaptofisina (localização restrita à vesícula sináptica), sinaptobrevina (localização na vesícula sináptica) e SNAP-25 (localização restrita à membrana pré-sináptica) apresentou-se positiva na forma de uma marcação verde intensa nos cortes histológicos do músculo controle **(A-C)**. Já os cortes histológicos sob a ação das toxinas BmjeTX-I **(D-F)** e BmjeTX-II **(G-I)** não apresentaram imuno-expressão positiva, não sendo observadas marcações em verde **(Figura 7)**.

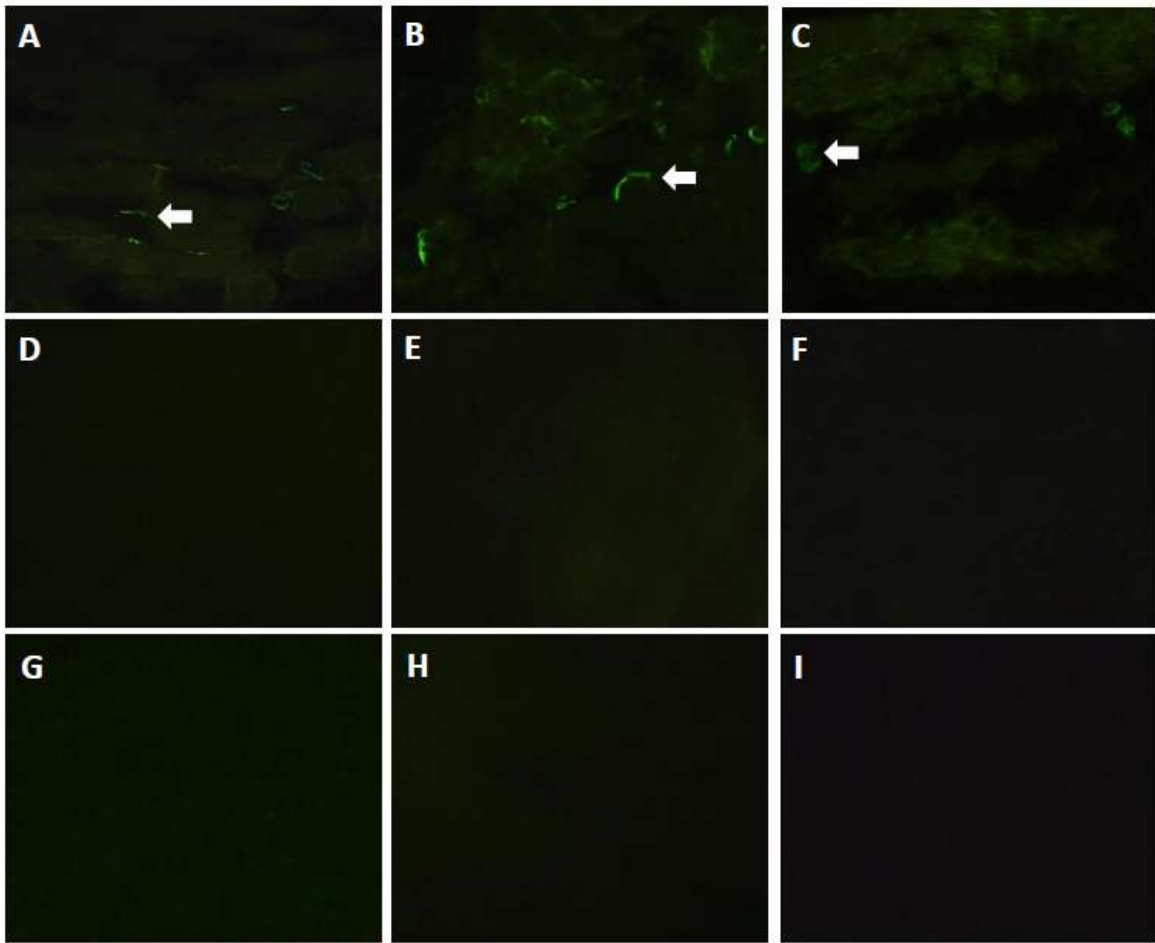


Figura 7: Cortes histológicos das preparações BC controle (A, B, C) ou submetidas à ação das toxinas BmjeTX-I (D, E, F) e BmjeTX-II (G, H, I) isoladas do veneno bruto de *B. marajoensis*. Nota-se a imunomarcção positiva em verde intenso (fluorocromo FITC), evidenciando a presença das proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25 (seta) somente no grupo controle. A, C, D, G, I: 200X; B, E, F, H: 400X.

6.4. Western Blotting (WB)

Os experimentos realizados com os músculos submetidos à ação de BmjeTX-I e BmjeTX-II não apresentaram imunomarcção positiva para as proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25. Já os músculos do grupo controle apresentaram bandas imunorreativas para as 3 proteínas em estudo. Todos os grupos apresentaram imunomarcção positiva para a proteína GAPDH, evidenciando a integridade das

amostras teciduais (**Figura 8**).

A quantificação por densidade de pixel mostrou diferença significativa entre as amostras dos grupos submetidos às toxinas BmjeTX-I (Je1) e BmjeTX-II (Je2), e o grupo controle (CB) para as proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25 (* $p < 0,05$ e # $p < 0,001$; **Figura 9A**). Não há diferenças significativas entre todos os grupos para a proteína GAPDH (**Figura 9B**).

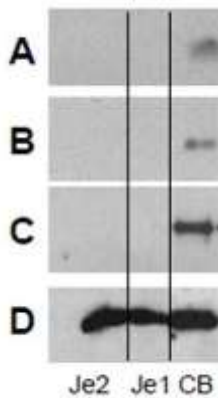


Figura 8: Representação dos resultados de western blotting (WB) para as proteínas sinaptofisina (A), sinaptobrevina (B) e SNAP-25 (C) e para a proteína constitutiva GAPDH (D). Je1 - BmjeTX-I, Je2 - BmjeTX-II, CB - o grupo controle.

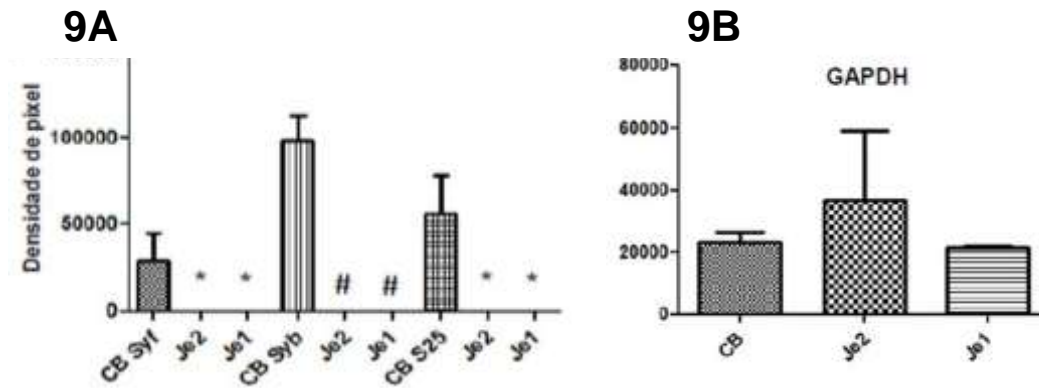


Figura 9: Análise quantitativa do WB por medida de densidade de pixel de cada proteína: sinaptofisina (Syf), sinaptobrevina (Syb) e SNAP-25 (S25). (A) Há diferença significativa entre as proteínas da junção neuromuscular nos grupos tratados (BmjeTX-I – Je1; BmjeTX-II – Je2) versus o grupo controle (CB); * $p < 0,05$ e # $p < 0,001$. (B) Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle para a proteína GAPDH.

6.5. Microscopia Eletronica de Transmissão (MET)

Os músculos biventer dos animais controle apresentaram fibras musculares inalteradas como visto ao HE, com sarcolema íntegro, sarcoplasma dotado de sarcômeros com miofilamentos de actina e miosina contínuos, mitocôndrias e retículos sarcoplasmáticos inalterados e núcleos periféricos (*). Nenhuma alteração morfológica foi observada nas Células de Schwann, bem como no processo de mielinização das fibras nervosas (**Figura 10A-C**). Já as fibras musculares tratadas com o BmjeTX-I e BmjeTX-II apresentaram hipercontração dos miofilamentos, com perda da organização dos sarcômeros, mitocôndrias e retículo sarcoplasmático edemaciados, núcleos apoptóticos, além de danos às Células de Schwann e falhas na disposição da bainha de mielina (**Figura 10 D-I**).

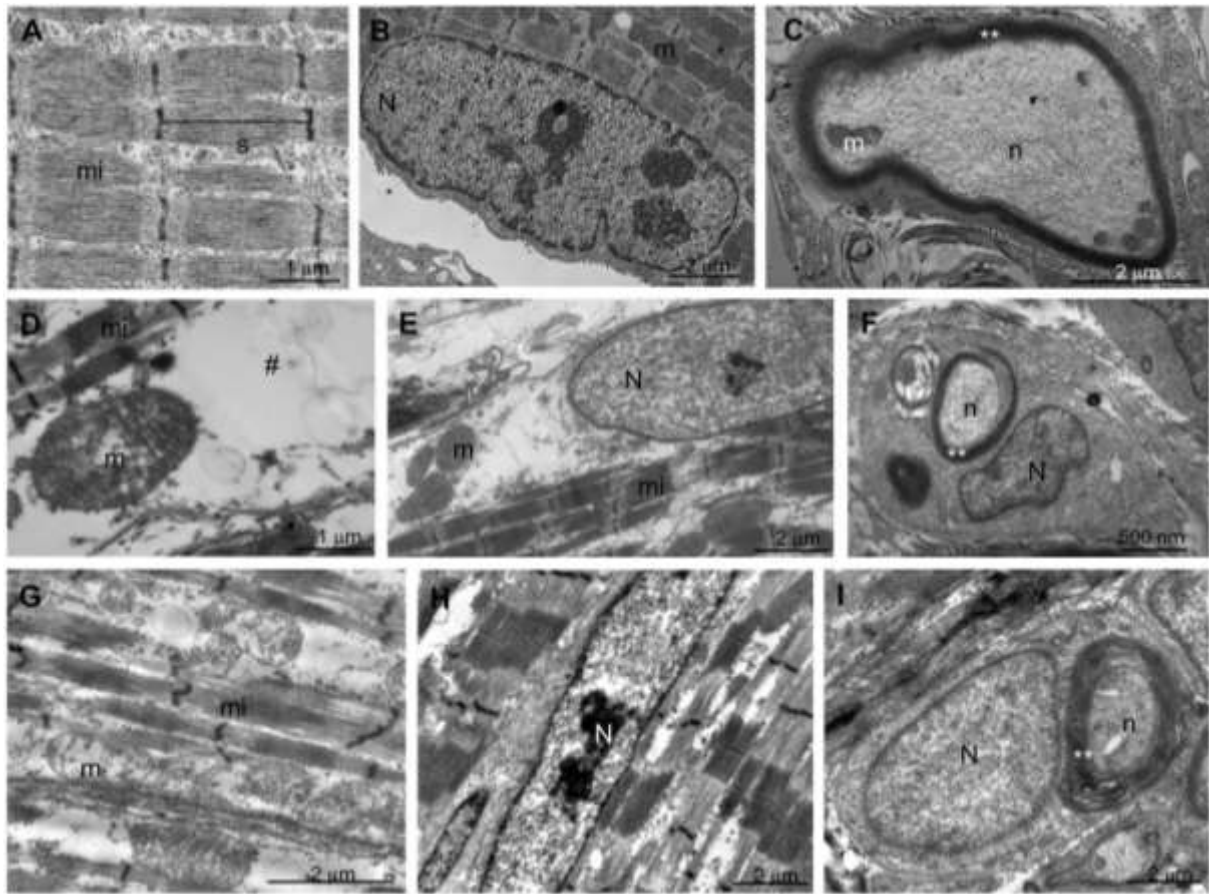


Figura 10: Aspectos ultraestruturais da musculatura da preparação BC do grupo controle (A, B, C). Nota-se a morfologia inalterada da fibra muscular com sarcômeros (s) e miofilamentos (mi) íntegros, núcleo periférico (N) e Célula de Schwann envolvendo concentricamente o axônio, com neurofilamentos (n) e mitocôndrias (m), formando a bainha de mielina (**). Em relação à ultraestrutura da musculatura da preparação submetida à ação das toxinas BmjeTX-I (D, E, F) e BmjeTX-II (G, H, I) isoladas do veneno bruto de *B. marajoensis* nota-se a hipercontração dos miofilamentos (mi), o dano mitocondrial (m) e nuclear (N), espaços desprovidos de miofilamentos (#), além das alterações na mielinização (**) das Células de Schwann.

A JNM em preparações BC é composta por botões nervosos localizados em uma área bem definida na fibra muscular estriada esquelética, sem qualquer dobramento da membrana pré- ou pós-sináptica. No caso da JNM dos músculos controle, os botões nervosos estavam dotados de muitas vesículas sinápticas (VS) uniformemente distribuídas na região do axoplasma, voltadas para a região da membrana pós-sináptica

da JNM, além de abundantes mitocôndrias inalteradas, retículo sarcoplasmático, neurofilamentos e processos terminais das Células de Schwann normais (**Figura 11A**).

Tanto nas JNMs nos músculos tratados com BmjeTX-I como nas tratadas com a toxina BmjeTX-II houve diminuição na concentração de VSs, bem como alterações mitocondriais. Entretanto não foram observadas lesões nas membranas pré e pós-sinápticas. As poucas VSs remanescentes apresentaram-se agrupadas em “clusters” no axoplasma. As Células de Schwann mostraram mitocôndrias alteradas, bem como processos infiltrativos entre os compartimentos pré- e pós-sinápticos (**Figura 11B-C**).

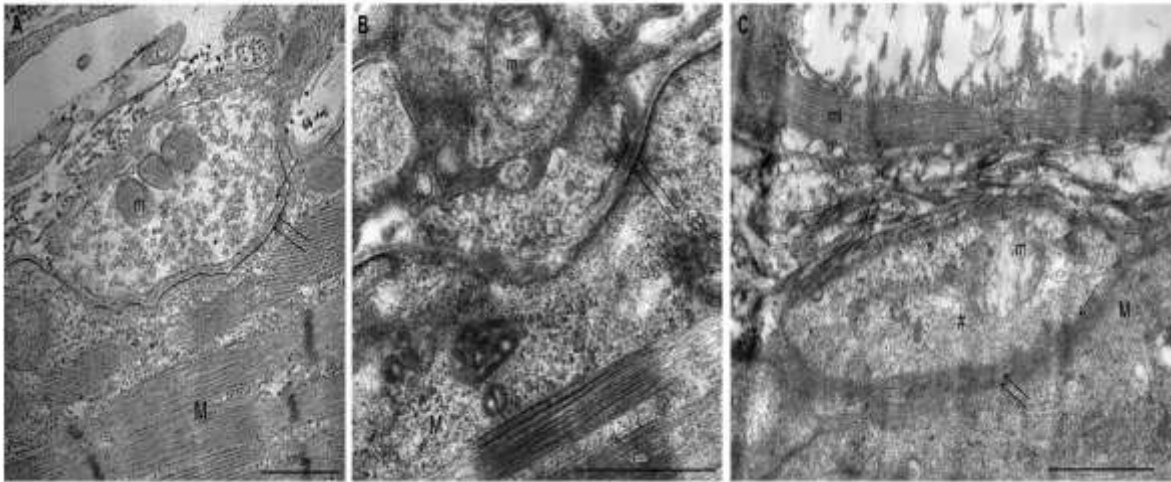


Figura 11: (A) Ultraestrutura da junção neuromuscular (JNM) do músculo *biverter cervicis* na qual não há pregas juncionais (controle). Notar a diminuição (#) da concentração de vesículas sinápticas (*) no botão nervoso da JNM de preparações tratadas com BmjeTX-I (B) e BmjeTX-II (C). M = fibra muscular; m = mitocôndria; mi = miofilamentos; seta = membrana pré-sináptica; dupla seta = membrana pós-sináptica; * = vesícula sináptica.

7. DISCUSSÃO

A experimentação miográfica realizada para as preparações BC do grupo controle Krebs mostra ausência de bloqueio neuromuscular, evidenciando a integridade da junção neuromuscular e da resposta muscular contrátil. Já as preparações incubadas com as toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II (10µg/mL) apresentaram bloqueio neuromuscular completo, com aumento na resposta contrátil ao estímulo indireto. Nenhuma das toxinas viabilizou a contração muscular após aplicação exógena de ACh e KCl.

Tais resultados corroboram com os achados descritos por Ponce-Soto *et al.* (2010), para estas mesmas toxinas, como também com os resultados descritos para o veneno bruto de *B. marajoensis* (Cavalcante *et al.*, 2011) e sua toxina Bmaj-9 (Galbiatti *et al.*, 2012), para os venenos de *B. insularis* (Cogo *et al.*, 1993; 1998), *B. lanceolatus* (Lôbo-Araújo *et al.*, 2002), *B. neuwiedi* (Borja-Oliveira *et al.*, 2003; Zamunér *et al.*, 1996), *B. pirajai* (Costa *et al.*, 1999), *B. jararacussu* e sua toxina BthTX-I (Gallacci *et al.*, 2006; Heluany *et al.*, 1992; Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; 1995). Todos estes estudos atestam a ação neurotóxica pré-sináptica destes compostos.

Alterações musculares como hipercontração e perda de miofilamentos foram observadas nos músculos das preparações BC após exposição às toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II (10µg/mL). Tal miotoxicidade também foi previamente relatada por Ponce-Soto *et al.* (2010) por liberação de Creatinokinase (CK) após injeção intramuscular de BmjeTX-I e BmjeTX-II.

O mesmo padrão de mionecrose, edema celular e hipercontração de miofilamentos, foi observado *in vitro* para veneno bruto de *B. marajoensis* (20µg/mL; Cavalcante *et al.*, 2011) e *in vivo* após injeção intramuscular de veneno de *B. jararacussu* (80µg/0.1mL; Queiroz *et al.*, 1984). Diferentemente do observado para as toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II, não foram observadas alterações musculares quando as preparações foram tratadas com o veneno bruto a 5µg/mL (Cavalcante *et al.*, 2011) ou com sua toxina Bmja-9 a 10µg/mL (Galbiatti *et al.*, 2012). Comprovando que a

miotoxicidade é dose-dependente para o veneno bruto e também específica para determinadas toxinas do veneno, como a BmjeTXI e -II.

À Microscopia Eletrônica de Transmissão, os músculos biventer dos animais controle apresentaram fibras musculares com sarcolema íntegro, sarcoplasma dotado de sarcômeros com miofilamentos de actina e miosina contínuos, mitocôndrias e retículos sarcoplasmáticos inalterados e núcleos periféricos, além de Células de Schwann com processos de mielinização das fibras nervosas inalterados. Por outro lado, as fibras musculares tratadas com as toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II apresentaram hipercontração dos miofilamentos com perda da organização dos sarcômeros, mitocôndrias e retículo sarcoplasmático edemaciados, núcleos apoptóticos, e Células de Schwann com falhas na disposição da bainha de mielina.

Tais observações confirmam os efeitos mionecróticos do envenenamento botrópico descritos por Vital Brazil (1972) e Pellegrini Filho e Vital Brazil (1976), bem como outros resultados já publicados em experimentação animal (Barbosa *et al.*, 2002, 2003; Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Selistre *et al.*, 1990).

A ultraestrutura da junção neuromuscular foi observada nas preparações controle e tratadas com as toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II e apresentou-se constituída por um terminal pré-sináptico dotado de neurofilamentos, mitocôndrias e vesículas sinápticas contendo neurotransmissor, membrana pré-sináptica, uma fenda sináptica e um aparato de recepção pós-sináptico (membrana pós-sináptica), como já bem caracterizada na literatura (Garner *et al.*, 2000; Murthy e De Camilli, 2003). Alterações estruturais podem influenciar nos efeitos neurotóxicos e miotóxicos de venenos e outros compostos, como descrito por Rodrigues-Simioni *et al.* (1983). As preparações submetidas à BmjeTX-I e BmjeTX-II revelaram alterações ultraestruturais mitocondriais, na porção pré-sináptica, bem como, a perda de vesículas sinápticas e danos musculares, na porção pós-sináptica, e alterações à mielinização nas Células de Schwann. Danos semelhantes foram observados em preparações tratadas com 10µg/mL do veneno de *B. jararacussu* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983).

Neurotoxinas pré-sinápticas paralisam a JNM por redução do conteúdo de vesículas sinápticas e, conseqüentemente de neurotransmissor. Estudos com culturas primárias de neurônios mostraram edema do terminal nervoso, com exposição da superfície luminal da vesícula sináptica e da proteína sinaptotagmina I, com exocitose do neurotransmissor. Outros estudos utilizando misturas equimolares de lisofosfolípidios e ácidos graxos, os quais mimetizam os efeitos das neurotoxinas, indicam a possibilidade de envolvimento de lipídios locais nas mudanças de conformação das vesículas sinápticas (Dumitru e Amato, 2008).

Considerando o processo de exocitose sabe-se que há uma grande quantidade de proteínas essenciais para a liberação do neurotransmissor (Takamori *et al.*, 2006), como a sinaptofisina (glicoproteína de membrana encontrada na vesícula sináptica, relacionada à integridade das vesículas), e as proteínas SNARE: sinaptobrevina (VAMP), sintaxina 1 e SNAP-25 (SNAP-25 e sintaxina presentes na membrana pré-sináptica e sinaptobrevina presente na membrana das vesículas) (Dumitru e Amato, 2008).

Os resultados de IHC e WB, para estas proteínas, mostraram-se positivos para as preparações BC dos grupos controle, evidenciando a integridade das vesículas sinápticas, pela presença de sinaptofisina e sinaptobrevina e do aparato ancorador da membrana pré-sináptica, pela presença de SNAP-25. Entretanto os resultados observados para as preparações BC submetidas à ação das toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II não apresentaram marcação para as proteínas estruturais da vesícula, sinaptofisina e sinaptobrevina, evidenciando a possível perda da integridade das vesículas sinápticas ainda no terminal sináptico e não na fenda sináptica, e para a proteína SNAP-25, sugerindo que tais toxinas BmjeTX afetam o funcionamento da maquinaria pré-sináptica.

A perda significativa de imunomarcação para sinaptofisina e a degeneração do terminal nervoso também foi observada em outros venenos e toxinas (Dixon e Harris, 1999). A inoculação do veneno de *Bungarus niger* resultou na perda de sinaptofisina e degeneração dos componentes do terminal nervoso, bem como na inervação de músculo estriado esquelético de ratos, sugerindo que a PLA₂ β-bungarotoxina (β-BTX)

contribuiu para a fraqueza neuromuscular observada nas vítimas, sem qualquer dano à membrana pós-sináptica (Faiz *et al.*, 2010). Sabe-se que a β -BTX causa paralisia neuromuscular prolongada, com depleção de vesículas sinápticas do terminal nervoso, seguido da destruição do mesmo e degeneração do citoesqueleto dos axônios intramusculares sem mudanças na arquitetura pós-sinápticas (Dixon and Harris, 1999). O mesmo foi relatado para outras miotoxinas de elapídes e para fosfolipases mio-neurotóxicas (Slater e Allen, 1985; Harris *et al.*, 2000).

A perda das proteínas da vesícula sináptica, e conseqüentemente das vesículas sinápticas, a perda de proteínas do complexo v-SNARE e as alterações à mielinização nas Células de Schwann estão diretamente relacionadas aos efeitos neurotóxicos observados uma vez que, neurotoxinas pré-sinápticas atuam sobre a JNM diminuindo a concentração de neurotransmissores e/ou atuando no processo de exocitose das vesículas sinápticas ainda existentes.

Dados da literatura afirmam que venenos e neurotoxinas induzem a hidrólise de fosfolipídios da superfície do neurônio inibindo a liberação dos neurotransmissores (Howard e Wu, 1976; Rigoni *et al.*, 2005). Entretanto, o que foi observado neste trabalho assemelha-se ao descrito para a toxina botulínica, que atua diretamente sobre as proteínas sinaptobrevina, SNAP-25 e sintaxina (inseridas na membrana pré-sináptica) clivando-as e impedindo a liberação do neurotransmissor da vesícula sináptica (Rossetto *et al.*, 2006). Porém as toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II têm sua ação limitada à vesícula sináptica, sem internalização na vesícula e, sem prejuízo ao complexo t-SNARE.

O bloqueio da junção neuromuscular observado após experimentação com as toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II nas preparações BC é resultado da não eliminação dos neurotransmissores na fenda sináptica (Kini, 1997; Montecucco e Rossetto, 2000; Schiavo *et al.*, 2000), sugerindo que estas toxinas atuam sobre a vesícula sináptica, de alguma forma sobre as proteínas estruturais sinaptofisina e sinaptobrevina, impedindo sua ancoragem à membrana pré-sináptica ou induzindo sua não formação ou ruptura no interior do terminal nervoso. A perda da sinaptofisina e da sinaptobrevina sugerem a

depleção da vesícula sináptica e a perda de SNAP-25 sugere efeito também na membrana pré-sináptica.

As alterações morfológicas observadas nas células de Schwann sugerem que estas células da glia podem mediar a transmissão neuromuscular, como relatado por Prasarnpun *et al.* (2005).

8. CONCLUSÕES

Tais resultados nos levam a concluir que a ação neurotóxica pré-sináptica das toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II é resultante da perda das vesículas sinápticas antes mesmo de sua ancoragem na membrana do neurônio para exocitose do neurotransmissor, dada a visível diminuição na densidade destas vesículas no botão nervoso e da perda das proteínas sinaptofisina, ou da alteração do complexo v-SNARE pela perda das proteínas sinaptobrevina e SNAP-25, levando ao bloqueio da resposta contrátil, evidenciado pela miografia.

Além disso, alterações na ultraestrutura da Célula de Schwann, bem como no processo de mielinização, podem ser um indício de danos à estrutura do nervo em paralelo a alterações às fibras musculares, num efeito pós-sináptico independente do efeito neurotóxico observado.

Estes achados experimentais permitiram o maior entendimento do mecanismo de ação das toxinas BmjeTX-I e BmjeTX-II, e confirmaram, estruturalmente e molecularmente seus efeitos pré-sinápticos.

9. REFERÊNCIAS

BARBOSA, A.M.; DO AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 42, 515-523, 2003.

BARBOSA, P. S.; HAVT, A.; FACO P. E.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MONTEIRO, H. S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon* 40, 1427-1435, 2002.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. *J. Bras. Med.* 65, 209-250, 1993.

BEGHINI, D. G.; DAMICO, D. C.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DELATORRE, M. C.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S. Ability of rabbit antiserum against crotopotin to neutralize the neurotoxic, myotoxic and phospholipase A₂ activities of crotoxin from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. *Toxicol In Vitro* 22, 240-248, 2008.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. *Cad. Saúde Pública* 18, 735-746, 2002.

BORJA-OLIVEIRA C.R.; DURIGON A.M.; VALLIN A.C.; TOYAMA, M. H.; SOUCCAR, C.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 617-624, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas e Manuais Técnicos de Acidentes por Animais Peçonhentos. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição. Fundação Nacional de Saúde, Brasil, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: MS/FUNASA, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Ação do Ministério da Saúde no controle dos acidentes por animais peçonhentos. Brasília. 1998.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR W.W. The venomous reptiles of Latin America. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca: New York, 425 p. 1989.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere: Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca: New York, p. 32-38, 2004.

CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; WEN, F.H.; BARBARO, K.C.; SANO-MARTINS I.S.; TOMY, S.C.; LOPES, M.H.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D. Envenoming by *Bothrops jararaca* in Brazil: association between venom antigenaemia and severity at admission to hospital. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 312-317, 2003.

CAVALCANTE, W.L.; HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; GALBIATTI, C.; RANDAZZO-MOURA, P.; ROCHA, T.; PONCE-SOTO, L.; MARANGONI, S.; PAI-SILVA, M.D.; GALLACCI, M.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom. *J. Venom Res.* 2, 37-41, 2011.

CECCARELLI, B.; HURLBUT, W.P.; MAURO, A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57, 499-524, 1973.

CHANG, C.C.; CHEN T.F.; LEE C.Y. Studies of the presynaptic effect of bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184, 339-345, 1973.

CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin World Health Organization* 76, 515-524, 1998.

COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J.R.; CORRADO, A.P.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; DONATO, J.L.; LEITE, G.B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. *Toxicon* 36, 1323-1332, 1998.

COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon*, 31, 1237-1247, 1993.

CONNOLLY, S.; TREVETT, A.J.; NWOKOLO, N.C.; LALLOO, D.G.; NARAQI, S.; MANTLE, D.; SCHOFIELD, I.S.; FAWCETT, P.R.; HARRIS, J.B.; WARRELL, D.A. Neuromuscular effects of *Papuan taipan* snake venom. *Ann. Neurol.* 38, 916-920, 1995.

COSTA, P.D.; TOYAMA M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. *Toxicon*, 37, 1143-1153, 1999.

DÍAZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35, 241-252, 1997.

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

DIXON, R.W.; HARRIS, J.B. Nerve terminal damage by beta-bungarotoxin: its clinical significance. *Am. J. Pathol.*; 154, 447-55, 1999.

DUMITRU, D.; AMATO, A. A. *Neuromuscular Disorders*. McGraw Hill Education, p.1127-1212, 2008.

FAIZ, M.A.; HARRIS J.B.; RAHMAN, M.R.; JALIL, M.M.; AHSAN, M.F.; THEAKSTON, R.D.; WARREL, D.A.; KUCH, U. Snake bite in Chittagong Division, Bangladesh: a study of bitten patients who developed no signs of systemic envenoming. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 320-327, 2010.

FEITOSA, R.F.; MELO, I.M.; MONTEIRO, H.S. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará - Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 95-330, 1997.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Ministério da Saúde. Brasília, p. 9-36, 2009.

GALBIATTI, C.; ROCHA, T.; RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Pharmacological and partial biochemical characterization of Bmaj-9 isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 18, 62-72, 2012.

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

GANDHI, S.P.; STEVENS, F. Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* 423, 607-613, 2003.

- GARNER, C.C.; KINDLER, S.; GUNDELFINGER, E.D. Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 321-327, 2000.
- GINSBORG, B.L.; WARRINER, J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 15, 410-411, 1960.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Efeitos Locais no Envenenamento Ofídico na America Latina - animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Ed Sarvier: São Paulo, 310-323, 2003.
- GUTIÉRREZ, J.M, OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931, 2003.
- GUTIÉRREZ, J.M.; NUNEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A.C.O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II a phospholipase A₂ isolated from de venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Mol. Pathol.* 55, 217-229, 1991.
- HARRIS, J.B. Toxic phospholipases in snake venom: an introductory review. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 70, 235-250, 2003.
- HARRIS J.B.; GRUBB, B.D.; MALTIN, C.A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂, notexin and taipoxin. *Exp. Neurol.* 161, 517-526, 2000.
- HARRIS, J.B. Phospholipases in snake venoms and their effect on the nerve and muscle, In: *Snake Toxins*, Harvey A.L. (Ed), p 91-129, 1991.
- HARRIS, J.B, CULLEN, M.J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron. Microsc. Rev.*3, 183-211, 1990.
- HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A.; THOMPSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS J.B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32, 257-265, 1994.
- HELUANY, N.F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon* 30, 1203-1210, 1992.
- HEUSER, J.E.; REESE, T.S. Evidence of recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57, 315-344, 1973.

- HOGUE, A.R.; ROMANO, A.S. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. Mem. Inst. Butantan 36, 109-207, 1973.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. Toxicon 26, 615-627, 1988.
- HOWARD, B.D.; WU, W.C. Evidence that beta-bungarotoxin acts at the exterior of nerve terminals. Brain Res. 103, 190-192, 1976.
- JORGE, M.T, RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. Revista da Assoc. Med. Bras. 36, 66-77, 1990.
- KARLSSON, E. Chemistry of protein toxic in snake venom. In Lee, C.Y. (Ed): Handbook of Experimental Pharmacology, Springer-Verlag: Berlin, p 159-212. 1979.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. Toxicon 42, 827-840, 2003.
- KINI, R. M. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism, Wiley, Chichester: England. p. 269-282, 1997.
- LEMOS, J. C.; ALMEIDA, T. A.; FOOK, S. M. L.; PAIVA, A. A.; SIMÕES, M. O. S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. Rev. Bras. Epidemiol. 12, 50-59, 2009.
- LÔBO-ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; FONTANA, M.D.; BON, C.; RODRIGUES - SIMIONI, L. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. Toxicon 40, 1283-1289, 2002.
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. J. Biol. Chem. 269, 29867-29873, 1994.
- MÁLAQUE, C.M.S.; FRANÇA, F.O.S. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: ARAÚJO, F.A.A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R.F. (Ed). Animais

Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477, 146-56, 2000.

MCDOWELL, S.S.; SEIGEL, R.A.; COLLINS, J.T.; NOVAK, S.S. (Ed.). *Snakes: ecology and evolutionary biology*. New York: McGraw-Hill, p. 3-50, 1987.

MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol. Ther.* 48, 223-236, 1990.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO JLC, FRANÇA FOS, WEN FH, MÁLAQUE CMS, HADDAD JÚNIOR V. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier; p.33-61, 2003.

MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O. How do presynaptic PLA₂ neurotoxins block nerve terminals? *Trends Biochem. Sci.* 25, 266-270, 2000.

MURTHY, N.V.; DE CAMILLI, P. Cell Biology of the Presynaptic Terminal. *Ann. Rev. Neurosc.* 26, 701-728, 2003.

OLIVEIRA, A.L.; PINTO, J.L.F.; FONSECA, A.L.A., CAPUTTO, L.Z.; FONSECA, F.L. A. Avaliação Epidemiológica e Laboratorial de Pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Miracatu (Vale do Ribeira, São Paulo). *Rev. Patol.Trop.* 37, 268-274, 2008.

PELLEGRINI FILHO, A., VITAL BRAZIL, O. Origem da paralisia respiratória determinada pela peçonha de *Micrurus frontalis*. *Ciênc. e Cult.*, 28, 199-202, 1976.

PEREIRA, I.D.; PINHO, F.M.O. Ofidismo. *Rev. Ass. Med. Brasil* 47, 24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; BONFIM, V.L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C. MARANGONI, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. *Protein J.* 25, 147-155, 2010.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta.* 770, 585-593, 2007.

- PRASARNPUN, S. WALSH, J.; AWAD, S.S.; HARRIS, J.B. Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain* 128, 2987-2996, 2005.
- PUORTO, G. Serpentes brasileiras de importância médica. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, p. 143-149, 1992.
- PYLE, J.L.; KAVALALI, E.T.; PIEDRAS-RENTERÍA, E.S.; TSIEN, R.W. Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*. 28, 221-231, 2000.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 22, 339-346, 1984.
- RIBEIRO, L.A.; ALBUQUERQUE, M.J.; DE CAMPOS, V.A.; KATZ, G.; TAKAOKA, N.Y.; LEBRAO, M.L.; JORGE, M.T. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 44, 312-318, 1998.
- RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. *Revista do Instituto de Ribeiro LA. Ep ophidic accidents. Mem. Inst. Butantan*: 52, 15-16, 1997.
- RICHARDS, D.A.; RIZZOLI, S.O.; BETZ, W.J. Monitoring synaptic vesicle recycling in frog motor nerve terminals with FM dyes. *J Neurocytol.* 32, 539-49, 2003.
- RICHARDS, D.A.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W.J. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron*. 27, 551-9, 2000.
- RIGONI, M.; CACCIN, P.; GSCHMEISSNER, S.; KOSTER, G.; POSTLE, A.D.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. Equivalent effects of snake PLA₂ neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. *Science* 310, 1678-1680, 2005.
- ROCHA, T.; de BARROS, L.L.; FONTANA, K.; de SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; da CRUZ-HÖFLING, M.A. Inflammation and apoptosis induced by mastoparan Polybia-MPII on skeletal muscle. *Toxicon* 55, 1213-1221, 2010.

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

RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; JIANG, M.S.; FLETCHER, J.E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A_2 myotoxin. *Toxicon* 11, 1479-1489, 1995.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; HAWGOOD, B.J.; SMITH, I.C.H. Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. *Toxicon* 28, 1479-1489, 1990.

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

ROSENBERG, P.; SHINA, R.; YATES, S. L.; GHASSEMI, A. CONDREA, E. Inhibitory effect of EDTA. Ca^{2+} on the hydrolysis of synaptosomal phospholipids by phospholipase A_2 toxins and enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2233-2239, 1990.

ROSSETTO, O.; MORBIATO, L.; CACCIN, P., RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J. Neuroch.* 97, 1534-1545, 2006.

ROZE, J. A. Coral snakes of the Americas. In: *Biology, identification, and venoms*. Malabar, Florida, USA: Krieger Publishing Company, 328p. 1996.

RUSSEL, F. E.; DART, R. C. Toxic effects of animal toxins. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. (Ed.). *Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poison*. New York: McGraw-Hill, p. 354-382, 1991.

SAI-NGAM, A. Phongtananant S, Nuchprayoon I. Phospholipase A_2 genes and their expressions in Thai Russell's viper venom glands. *Toxicon* 52, 395-399, 2008.

SANT, S. M.; PUNDARE, N. M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to the renal lesions. *J. Postgrad. Med.* 18, 181-188, 1972.

SCHIAVO, G.; MATTEILI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80, 717-766, 2000.

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

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

SLATER, C.R.; ALLEN, E.G. Acetylcholine receptor distribution on regenerating mammalian muscle fibers at sites of mature and developing nerve-muscle junctions. *J. Physiol.* 4, 238-246, 1985.

TAKAMORI, S.; HOLT, M.; STENIUS, K.; LEMKE, E.A.; GRONBORG, M.; RIEDEL, D.; URLAUB, H.; SCHENK, S.; BRÜGGER, B.; RINGLER, P.; MÜLLER, S.A.; RAMMUNER, B.; GRÄTER, F.; HUB, J.S.; DE GROOT, B.L.; MIESKES, G.; MORIYAMA, Y.; KLINGAUF, J.; GRUBMÜLLER, H.; HEUSER, J.; WIELAND, F.; JAHN, R. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* 127, 831-846, 2006.

THEAKSTON, R.D.; PHILLIPS, R.E.; WARRELL, D.A.; GALAGEDERA, Y.; ABEYSEKERA, D.T.; DISSANAYAKA, P.; DE SILVA, A.; ALOYSIUS, D.J. Envenoming by the common krait (*Bungarus caeruleus*) Sri Lankan cobra (*Naja naja naja*): efficacy complications of therapy with Haffkine antivenom. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 301-308, 1990.

TSELIN, V.I.; HUCHO, F. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* 557, 9-13, 2004.

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. *Adv Exp Med Biol.* 391, 37-62, 1996.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. *J. Formosan Med. Assoc.* 71, 394-400, 1972.

WARRELL, D.A.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J.; THEAKSTON, R.D.; WARRELL, M.J.; KOSAKARN, W.; REID, H.A. Severe neurotoxic envenoming by the Malayan krait *Bungarus candidus* (Linnaeus): response to antivenom and anticholinesterase. *Br. Med. J.* 286, 678-680, 1983.

WOLFGANG, W.; ROGER, S. T.; PUORTO, G. Systematics of the *Bothrops atrox* complex. *Herpetologica* 52, 263-271, 1996.

WONG, O. F.; HIN-TAT, F.; SHING-KIT-TOMMY, L.; KA-KEUNG, L.; CHAK-WAH, K.; SIMPSON, I. D. A preliminary survey of Hong Kong snake shops and the potential snake bite risks for the healthcare system. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 931-936, 2009.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, *Toxicon* 36, 299-307, 1998.

www.herpetofauna.at

www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupob/trafego.html

www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupob/trafego.html

www.neuromuscular.wustl.edu/pathol/snare.htm;

www3.mpibpc.mpg.de/groups/jahn/Jahn/Neuronal_SNARE.htm

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

ZAMUNÉR, S.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The screening of *Bothrops* venoms for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon* 34, 314-15, 1996.