

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EFEITO DE UMA FOSFOLIPASE A₂ LISINA49, ACL
MIOTOXINA, DO VENENO DA SERPENTE *Agkistrodon*
contortrix laticinctus SOBRE O TRANSPORTE DE ÁGUA EM
BEXIGA URINÁRIA ISOLADA DE SAPO

Renner de Souza Leite

Tese apresentada ao Programa de
pós-graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade
Federal de São Carlos, como
requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Fisiológicas.

SÃO CARLOS - SP
2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

L533ef

Leite, Renner de Souza.

Efeito de uma fosfolipase A₂ Lisina 49, ACL miotoxina, do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* sobre o transporte de água em bexiga urinária isolada de sapo / Renner de Souza Leite . -- São Carlos : UFSCar, 2004.

99 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Toxinas. 2. Membranas (biologia). 3. Transporte de água. 4. Veneno de serpente. 5. Miotoxina. I. Título.

CDD: 615.373(20^a)

Queremos saber
O que vão fazer
Com as novas invenções
Queremos notícias mais sérias
Sobre a descoberta da antimatéria
E suas implicações
Na emancipação do homem
Das grandes populações
Homens pobres das cidades
Das estepes dos sertões
Queremos saber,
Quando vamos ter
Raio laser mais barato
Queremos, de fato, um relato
Retrato mais sério do mistério da luz
Luz do disco voador
Pra iluminação do homem
Tão carente, sofredor
Tão perdido na distância
Da morada do senhor
Queremos saber, queremos saber
Confiantes no futuro
Por isso se faz necessário prever
Qual o itinerário da ilusão
A ilusão do poder
Pois se foi permitido ao homem
Tantas coisas conhecer
É melhor que todos saibam
O que pode acontecer
Queremos saber, queremos saber
Queremos saber, todos queremos saber

Gilberto Gil

Dedico
aos meus pais,
Renato e Shirley,
e ao meu irmão Renato Jr.

ORIENTADORA

Prof. Dra. Heloísa S.S. de Araujo

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Heloísa S. Selistre de Araujo, pela orientação, pela conduta ética e profissional.

Ao Prof. Dr. Wilson Franco, pelas sugestões e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, pela contribuição à minha formação acadêmica.

Aos amigos que me acompanharam na tarefa de coletar os animais, em particular, Alcides, Nei e Bertazzi.

A Gláucia Cristina da Silva, pelo incentivo e companheirismo.

Aos amigos de laboratório com os quais foram compartilhados conhecimentos e experiências: Ana Flávia, Cristina Terrugi, Márcia Cominetti, Sabrina e Juliana.

A Kátia S. Tavares, pelo auxílio artístico e pela paciência e amizade.

A Oscar e ao Marcelo Rossa, não apenas pelo auxílio recebido para a realização deste projeto, mas principalmente pela convivência, amizade, disponibilidade e incentivo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACLMT: PLA₂ Lys49 miotoxina do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*

ACLMTrec: ACL miotoxina recombinante

AC: adenilato ciclase

AMPc: 3'5' monofosfato de adenosina cíclico

PLA₂ Asp49: fosfolipase A₂ com resíduo de ácido aspártico na posição 49

ATP: trifosfato de adenosina

AVP: arginina-vasopressina

BthTX-I: PLA₂ Lys49 miotóxica do veneno da *Bothrops jararacussu*

Bmtx-I: PLA₂ Lys49 isolada do veneno da serpente *Bothrops moojeni*

Carb: carbacol

Colch: colchicina

8-CPT-AMPc: 8-clorofeniltiomonofosfato de adenosina cíclico

DAG: diacilglicerol

Ind: indometacina

IP₃: fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato

Lant: lantânio

Lys49 PLA₂: fosfolipase A₂ com resíduo de lisina na posição 49

MBP: proteína ligadora de maltose (maltose binding protein)

PLA₂: fosfolipase A₂

p-ACLLys49: peptídeo derivado da região 115-129 da PLA₂ Lys49 do veneno da *Agkistrodon contortrix laticinctus*

p-AppLys49: peptídeo derivado da região 115-129 da PLA₂ Lys49 do veneno da *Agkistrodon piscivorus piscivorus*

TFP: trifluoperazina

RESUMO

ACL miotoxina (ACLMT) é uma fosfolipase A₂ miotóxica com um resíduo de lisina na posição 49, isolada do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*. O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da ACLMT sobre o transporte de água em bexiga de sapo. O fluxo de água através da membrana foi mensurado gravimetricamente por meio da técnica de Bentley (1958), em preparações com a bexiga em forma de lobos. A ACLMT aumentou o fluxo basal de água e diminuiu parcialmente o fluxo de água estimulado pela vasopressina, AMP cíclico, 8-clorofeniltiemonofosfato de adenosina cíclico e forskolina. O efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água foi reduzido na presença de lanthanum, nifedipina e trifluoperazina, sugerindo um papel para o cálcio citossólico e para o complexo cálcio-calmodulina nesse efeito. A colchicina também diminuiu o efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água, sugerindo que a ação da ACLMT é dependente da integridade dos microtúbulos. O lantânio reduziu o efeito inibitório da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina, sugerindo um papel para o cálcio citossólico nesse efeito. O carbacol é capaz de aumentar o fluxo basal de água e diminuir o fluxo de água estimulado pela vasopressina por meio de um aumento da concentração do cálcio intracelular. Os efeitos da ACLMT e do carbacol sobre o transporte de água não foram aditivos, sugerindo que esses agentes alteram a permeabilidade da membrana por um mecanismo similar. A indometacina reduziu o efeito da ACLMT sobre o fluxo de água estimulado pela forskolina, sugerindo um papel adicional para as prostaglandinas no efeito da ACLMT sobre a ação da vasopressina. Por outro lado, o efeito inibitório da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina foi potencializado na presença de trifluoperazina. Similarmente, o efeito inibitório da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina e do AMP cíclico foi potencializado na presença da colchicina. Nossos resultados sugerem que o efeito da ACLMT sobre o transporte de água pode ser mediado pelo aumento no cálcio intracelular e pela ativação do complexo cálcio-calmodulina, sugerindo também um papel adicional para as prostaglandinas no efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina. Além disso, o efeito da ACLMT sobre o transporte de água parece ser dependente da integridade dos microtúbulos.

ABSTRACT

ACL myotoxin (ACLMT) is a Lys49 phospholipase A₂-like protein isolated from the venom of the snake *Agkistrodon contortrix laticinctus*. The aim of this work was to study the effect of ACLMT on water transport in the toad urinary bladder. Water flow through the membrane was measured gravimetrically in bag preparations of the bladder. ACLMT increased the baseline water flow and partially inhibited the water permeability stimulated by arginine-vasopressin (AVP), cyclic AMP, 8-chlorophenylthio-cAMP and forskolin. The effect of ACLMT on baseline water flow was prevented by lanthanum, nifedipine, and trifluoperazine. These results suggest that the effect of ACLMT on baseline water flow could be mediated either by an increase in intracellular calcium or by the activation of the calcium-calmodulin. Colchicine reduced the effect of ACLMT on baseline water permeability. Carbachol has been shown to enhance baseline water flow while inhibiting AVP-stimulated water flow by increase in intracellular calcium. The effects of ACLMT and carbachol on baseline and AVP-stimulated water flow were not additive, suggesting that both agents alter the water transport by a similar mechanism. Lanthanum reduced the inhibitory effect of ACLMT on AVP-stimulated water permeability, suggesting the participation of intracellular calcium in this effect. Indomethacin reduced the effect of ACLMT on forskolin-stimulated water flow, suggesting a role for prostaglandin in the effect of ACLMT on AVP-stimulated water permeability. However, the inhibitory effect of ACLMT on AVP-stimulated water flow was enhanced in the presence of trifluoperazine. Similarly, the inhibitory effect of ACLMT on AVP and cAMP-stimulated water flow was enhanced in the presence of colchicine. Therefore, the results of present study suggest that the effects of ACLMT on water permeability could be mediated either by an increase in intracellular calcium or by the activation of the calcium-calmodulin, and also suggests a role additional for prostaglandin in effect of ACLMT on AVP-stimulated water transport. In addition, the effect of ACLMT on water transport seems be dependent of integrity of microtubules.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
MORFOLOGIA DA BEXIGA URINÁRIA DE SAPO.....	2
HORMÔNIO ANTIDIURÉTICO E O BALANÇO HÍDRICO.....	3
VASOPRESSINA E SEUS RECEPTORES.....	4
RECEPTORES V ₁	4
RECEPTORES V ₂	5
AÇÕES RENAIS DO HORMÔNIO ANTIDIURÉTICO.....	6
AGENTES FARMACOLÓGICOS QUE INTERFEREM NA AÇÃO HIDROSMÓTICA DA VASOPRESSINA.....	7
MIOTOXINAS DE VENENO DE SERPENTES.....	10
PEPTÍDEOS MIOTÓXICOS.....	11
CARDIOTOXINAS.....	12
FOSFOLIPASES A ₂ MIOTÓXICAS.....	13
MIOTOXINAS NEUROTÓXICAS COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A ₂	17
MIOTOXINAS NÃO-NEUROTÓXICAS COM E SEM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A ₂ ..	18
PLA ₂ s LYS49 MIOTÓXICAS.....	20
OBJETIVOS.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
MATERIAL.....	33
ANIMAL.....	33
SOLUÇÕES E DROGAS.....	33
MÉTODOS.....	34
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	39
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	39
RESULTADOS.....	40
EFEITO DA ACL MIOTOXINA (ACLMT) SOBRE O TRANSPORTE DE ÁGUA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE VASOPRESSINA.....	40
EFEITO DA ACLMT SOBRE A AÇÃO HIDROSMÓTICA DA FORSCOLINA, AMP _c E 8-CPT-AMP _c	44
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ACLMT COM LANTÂNIO SOBRE O FLUXO DE ÁGUA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE VASOPRESSINA.....	46
EFEITO DA ACLMT SOBRE O FLUXO BASAL DE ÁGUA NA PRESENÇA DE NIFEDIPINA.....	49
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ACLMT COM CARBACOL SOBRE O FLUXO DE ÁGUA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE VASOPRESSINA.....	51
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA ACLMT COM TRIFLUOPERAZINA SOBRE O FLUXO DE ÁGUA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE VASOPRESSINA.....	54

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA ACLMT COM COLCHICINA SOBRE O FLUXO DE ÁGUA NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE VASOPRESSINA.....	55
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA ACLMT COM COLCHICINA SOBRE A AÇÃO HIDROSMÓTICA DO AMP _C	58
EFEITO DA ACLMT SOBRE A AÇÃO HIDROSMÓTICA DA FORSCOLINA NA PRESENÇA DE INDOMETACINA.....	59
EFEITO DA ACLMT RECOMBINANTE SOBRE O FLUXO BASAL DE ÁGUA.....	61
EFEITO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DA REGIÃO C-TERMINAL DA ACLMT DO VENENO DA SERPENTE <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i> E DA PLA ₂ LYS49 DO VENENO DA <i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	63
EFEITO DA ACLMT SOBRE A BEXIGA URINÁRIA DE SAPO: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	65
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos locais de ação de agentes que interferem no efeito hidrosmótico do hormônio antidiurético na célula granular da bexiga urinária de sapo.....	9
Figura 2: Sítios de ação das fosfolipases. R ₁ e R ₂ referem-se aos ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-2 dos fosfoglicerídeos numerados estereoespecificamente. X refere-se aos grupos polares, sendo que os mais comuns são a colina, a etanolamina, a serina, o inositol e o glicerol.....	14
Figura 3: Interação de uma PLA ₂ com os fosfolipídios de membrana.....	28
Figura 4: Modelo molecular da ACL miotoxina, mostrando os aminoácidos envolvidos no centro ativo (H48 e D99) e no sítio de ligação ao cálcio (K49, G30 e G32). Modelo desenvolvido com o software Modeller e visualizado com o WebLab, usando como modelo a bothropstoxina.....	31
Figura 5: Esquema da montagem para a medida do fluxo de água através da bexiga de sapo (Técnica de Bentley, 1958).....	36
Figura 6: Secção transversal da bexiga urinária de sapo. Observa-se que o tecido epitelial exposto à ACLMT (B e D) apresenta aspecto aparentemente normal em relação ao grupo-controle (A e C). Nos locais marcados com flechas, notam-se nítidas lesões na musculatura lisa que recobre a bexiga; coloração com hematoxilina; A e B, escala em 10 µm; C e D escala em 20 µm.....	66
Figura 7: Célula muscular lisa da bexiga de sapo. Observa-se que a fibra muscular lisa exposta à ACLMT (B e D) apresenta sinais de necrose em relação ao grupo-controle (A e C). Flechas indicam as lesões na fibra muscular lisa. Em A e B secção longitudinal; C e D secção transversal; coloração com hematoxilina; escala em 100 µm.....	67
Figura 8: Esquema do mecanismo de ação da ACLMT sobre o transporte de água mediado pela vasopressina em células epiteliais da bexiga urinária de sapo. V ₂ = receptor para vasopressina do subtipo V ₂ ; AVP = arginina-vasopressina; AC = adenilato ciclase; AMPc = adenosina monofosfato cíclico; ATP = trifosfato de adenosina; PGs = prostaglandinas; RE = retículo endoplasmático; setas amarelas indicam inibição; setas vermelhas indicam estimulação.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os diferentes grupos de PLA ₂ s e suas características.....	17
Tabela 2: Miotoxinas PLA ₂ Lys49 isolada de veneno de serpente.....	22
Tabela 3: Seqüência dos aminoácidos da região C-terminal (resíduos 115-129)...	25
Tabela 4: Efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água em bexiga de sapo.....	42
Tabela 5: Efeito da ACLMT sobre o fluxo de água estimulado pela vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo.....	43
Tabela 6: Efeito da ACLMT (20 nM) sobre a ação hidrosmótica da forskolina (2 µM), AMPc (2 mM), 8-CTP-AMPc (0,1 mM) em bexiga de sapo.....	44
Tabela 7: Efeito da associação de ACLMT (20 nM) com lantânio (0.1 mM) sobre o fluxo de água, µl/min, na ausência e na presença de vasopressina (10 µM/ml de banho) em bexiga de sapo.....	47
Tabela 8: Efeito da ACLMT (20 nM) sobre o fluxo basal de água, µl/min, na presença de nifedipina (0,1 mM) em bexiga de sapo.....	49
Tabela 9: Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com carbacol (0.1 mM) sobre o fluxo de água, µl/min, na ausência e na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo.....	51
Tabela 10: Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com trifluoperazina (10 µM) sobre o fluxo de água, µl/min, na ausência e na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo.....	54
Tabela 11: Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com colchicina (10 ⁻⁵ M) sobre o fluxo de água, µl/min, na ausência e na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo.....	56
Tabela 12: Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com colchicina (10 ⁻⁵ M) sobre a ação hidrosmótica do AMPc (2 mM) em bexiga de sapo.....	58
Tabela 13: Efeito da ACLMT (20 nM) sobre a ação hidrosmótica da forskolina (2 µM) na presença de indometacina (10 µM) em bexiga de sapo.....	60
Tabela 14: Efeito da ACLMT recombinante o fluxo basal de água em bexiga de sapo.....	62
Tabela 15: Efeito dos peptídeos sintéticos derivados da ACLMT e da AppLys49 sobre o fluxo basal de água em bexiga de sapo.....	64

INTRODUÇÃO

É essencial para o funcionamento das células a manutenção de um ambiente com características constantes de uma série de parâmetros físicos e químicos, como volume, concentração, composição de solutos, pH e temperatura. Especificamente, a manutenção da homeostasia, dentro de certos limites, do volume e da composição dos fluidos do organismo, envolve mecanismos complexos, pois ocorrem trocas significativas de solvente e soluto tanto entre os diversos compartimentos hídricos do organismo como também entre o organismo e o ambiente que o cerca. Uma vez que tais trocas são realizadas e reguladas por mecanismos de transporte através das membranas que limitam os referidos compartimentos ou que constituem uma interface com o meio ambiente, o estudo dos mecanismos de transporte de água e solutos através das membranas celulares é de fundamental importância para o entendimento da biologia celular e do organismo.

Em vertebrados mais simples, em razão da incapacidade do rim de assegurar aos animais a homeostasia hidromineral, outras estruturas colaboram para essa tarefa. Assim, nos anfíbios, a bexiga urinária constitui uma extensão funcional do túbulo renal (PEACHEY & RASMUSSEN, 1961), seu epitélio é capaz de reabsorver água, sódio e uréia da urina e secretar prótons para a mesma (LEAF, 1982). Do ponto de vista da homeostasia hídrica, essa estrutura funciona como um reservatório do qual a água pode ser reabsorvida em períodos de

privação ou em resposta à presença do hormônio antidiurético na corrente sanguínea (HAYS & LEAF, 1962).

A facilidade na montagem de preparações com a bexiga urinária de sapo, a possibilidade de controlar uma série de variáveis nos experimentos *in vitro* e a analogia morfológica, filogenética e funcional dessa estrutura com o ducto coletor de mamíferos tornaram a utilização isolada desse epitélio uma importante ferramenta para estudar os fenômenos de transporte de água e solutos através das membranas e o mecanismo de ação de hormônios e outros agentes químicos e físicos que possam afetar os mecanismos de transporte (VERKMAN *et al.*, 1996).

MORFOLOGIA DA BEXIGA URINÁRIA DE SAPO

A bexiga urinária de sapo é uma estrutura bilobada e, no animal bem hidratado, pode ocupar 1/3 da cavidade abdominal, contendo 15-30 ml ou mais de urina hipotônica em relação ao plasma.

Sua membrana é delgada e transparente, consistindo em uma simples camada de células epiteliais em contato com o meio urinário (mucoso) de um lado, e com a membrana basal, do lado oposto (DIBONA, CIVAN & LEAF, 1969). Abaixo da membrana basal há uma porção intermediária (camada submucosa) constituída de fibras musculares lisas, fibras de colágeno e vasos sanguíneos recobertos por uma fina camada serosa formada por células mesoteliais voltadas para a cavidade abdominal, que também recobre a superfície das vísceras. Há quatro tipos celulares no epitélio. As células granulares, predominantes, ocupam cerca de 80% da superfície do epitélio e têm sido apontadas como as

responsáveis pelo transporte de água, sódio e uréia (BORYCKI *et al.*, 1981). Outro tipo, as células ricas em mitocôndrias, que nos sapos do gênero *Bufo marinus* (na Colômbia e no Brasil) ocupam cerca de 15% a 18% da área do epitélio, são as secretoras de hidrogênio e responsáveis pela acidificação da urina. O terceiro tipo celular são as células produtoras de muco. O quarto tipo, as células basais, são encontradas interpostas entre as células granulares e a membrana basal em grande parte do epitélio (DIBONA, CIVAN & LEAF, 1969).

Apesar do elevado gradiente osmótico normalmente existente entre o meio interno (face serosa) e o meio externo (face mucosa) do epitélio, em condições normais, essa membrana apresenta baixa permeabilidade à água, de forma que o fluxo de água é pequeno (HAYS & LEAF, 1962).

HORMÔNIO ANTIDIURÉTICO E O BALANÇO HÍDRICO

O hormônio antidiurético (AVP) exerce papel fundamental na homeostasia hídrica dos vertebrados (HAYS & LEAF, 1962). As características renais e neuroendócrinas básicas dos anfíbios contemporâneos, provavelmente, refletem fenômenos associados à radiação adaptativa para a terra (JO & HARRIS, 1995). Em relação aos anfíbios, o sistema de conservação de água é completo: há síntese de vasotocina no sistema nervoso central (núcleos supraópticos e paraventriculares do hipotálamo), liberação na neurohipófise, transporte no sangue e ligação a receptores na pele e na bexiga.

Nos mamíferos, os receptores estão presentes no ducto coletor renal e, qualquer que seja a espécie, a ação da vasopressina é a mesma: reabsorção rápida de água através da célula. Na maioria, se não em todas as espécies, ocorre aumento da reabsorção de sódio e uréia (LEAF, 1982).

VASOPRESSINA E SEUS RECEPTORES

Os efeitos celulares da vasopressina são mediados pela interação do hormônio com dois tipos principais de receptores: V_1 e V_2 . Os receptores V_1 podem ser subdivididos em V_{1a} e V_{1b} . O receptor V_{1a} é o mais difundido para vasopressina. Sua distribuição ocorre basicamente em tecidos musculares liso (vascular, uterino), hepatócitos, plaquetas, células epiteliais do ducto coletor cortical renal e do sistema nervoso central, enquanto os receptores do tipo V_{1b} são localizados exclusivamente na adenohipófise. Em relação ao tipo V_2 , sua localização ocorre, preferencialmente, nas células principais do ducto coletor renal (BAULIEU & KELLY, 1990).

RECEPTORES V_1

Quando a vasopressina se liga ao receptor V_1 ocorre ativação, mediada por uma proteína G, de várias fosfolipases ligadas à membrana. A ativação da fosfolipase C, provavelmente por intermédio de G_q , que é responsável pela hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, gera fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). IP_3 liga-se a um receptor localizado nos canais liberadores de Ca^{+2} nos depósitos

intracelulares de Ca^{+2} sensíveis ao IP_3 , que dispara a liberação intracelular de cálcio. Esse íon pode ativar diversas proteínas intracelulares que contribuem para a resposta celular final (BERRIDGE, 1993). A ativação de uma fosfolipase D causa hidrólise de outros fosfolípidios para produzir ácido fosfatídico, que, posteriormente, é metabolizado em DAG. A ativação de uma proteína quinase C pelo DAG induz a fosforilação de diversas proteínas-alvo, e essas fosfoproteínas também contribuem para a resposta biológica (HOLTZMAN & AUSIELLO, 1994). Finalmente, a estimulação da fosfolipase A_2 mobiliza o ácido araquidônico dos fosfolípidios da membrana, e esse ácido graxo é metabolizado em prostaglandinas e ácidos epoxieicosatrienóides por meio da atividade enzimática da cicloxigenase e epoxigenase, respectivamente. Os metabólitos do ácido araquidônico inibem a resposta hidrosmótica da vasopressina (HANDLER, 1981). Os efeitos biológicos mediados pelo receptor V_1 incluem vasoconstrição, glicogenólise, agregação de plaquetas e crescimento de células do músculo liso vascular (HOLTZMAN & AUSIELLO, 1994).

RECEPTORES V_2

As células principais no ducto coletor renal possuem receptores V_2 em suas membranas basolaterais, que se acoplam à adenilciclase por intermédio de uma proteína G estimuladora, a G_s . Conseqüentemente, quando a vasopressina se liga aos receptores V_2 , a adenilciclase é ativada, produzindo rápido aumento dos níveis intracelulares de AMPc (HARRIS & HANDLER, 1988; HAYS, 1996). O

nível intracelular do AMPc pode ser regulado pela enzima fosfodiesterase-nucleotídeos, pelo cálcio intracelular livre e, também, pela atividade do complexo cálcio-calmodulina (CHEUNG, 1982).

O AMPc ativa uma proteína quinase A (SNYDER, NOLAND & BREYER, 1992), que, por sua vez, pode causar a fosforilação de estruturas citoesqueléticas (microtúbulos e microfilamentos) e de proteínas associadas ao citoesqueleto, induzindo transporte e a fusão de vesículas portadoras de canais de água (aquaporina-2-proteína) na face interna da membrana apical das células granulares (HARRIS & HANDLER, 1988). Os canais de água estão armazenados em vesículas tubulares, localizadas no citoplasma subapical das células epiteliais do ducto coletor de mamíferos, da pele e da bexiga urinária de anfíbios (HAYS, 1996). Para a resposta do tecido à vasopressina, tanto os microtúbulos como os microfilamentos são independentemente necessários para o início da incorporação dos canais de água e do concomitante aumento da permeabilidade à água. Entretanto, somente os microfilamentos são necessários para a manutenção da resposta do tecido à vasopressina (PEARL & TAYLOR, 1985).

AÇÕES RENAIIS DO HORMÔNIO ANTIDIURÉTICO

Os efeitos renais da vasopressina são mediados pelos receptores V_1 e V_2 . Os receptores V_1 controlam a contração das células mesangiais no glomérulo e a contração da musculatura lisa vascular dos vasos retos e da arteríola eferente (EDWARDS, TRIZNA & KINTER, 1989), entretanto, a importância fisiológica dessas ações ainda não foi conclusivamente

definida. Os receptores V_1 também aumentam a síntese de prostaglandinas nas células intersticiais medulares. Como a prostaglandina E_2 inibe a enzima adenilato ciclase no ducto coletor, a estimulação da síntese de prostaglandinas pelos receptores V_1 limita a antidiurese mediada pelo receptor V_2 (SONNENBERG & SMITH, 1988). Esse fenômeno também ocorre na bexiga urinária de sapo (HANDLER, 1981). Os receptores V_1 , nas células principais no ducto coletor cortical, também podem inibir diretamente o fluxo de água mediado pelo receptor V_2 por meio da ativação da proteína quinase C (SCHLONDORFF & LEVINE, 1985).

Os receptores V_2 são responsáveis pela resposta mais proeminente à vasopressina, isto é, o aumento da permeabilidade do ducto coletor à água. Outras ações renais mediadas pelos receptores V_2 incluem a reabsorção de sódio e uréia, ambos mediados pelo AMPc (STAR *et al.*, 1988; SCHAFER & TROUTMAN, 1990).

AGENTES FARMACOLÓGICOS QUE INTERFEREM NA AÇÃO HIDROSMÓTICA DA VASOPRESSINA

Tem sido descrita a interferência de um grande número de drogas, com as mais diversas características químicas e farmacológicas, que atuam em diferentes pontos da cadeia de eventos desencadeada pela interação da vasopressina com os receptores na membrana basolateral da bexiga de sapo, como prostaglandinas (PARNOVA *et al.*, 1997), agentes antimitóticos (TAYLOR *et al.*, 1978), agentes colinérgicos (ARRUDA & SABATINI, 1980), catecolaminas (HANDLER, BESINGER &

ORLOFF, 1968), anestésicos locais (LEVINE *et al.*, 1979) e cálcio (HARDY & DIBONA, 1982). A Figura 1 esquematiza os possíveis locais de ação das drogas citadas anteriormente, ao nível celular da bexiga de sapo.

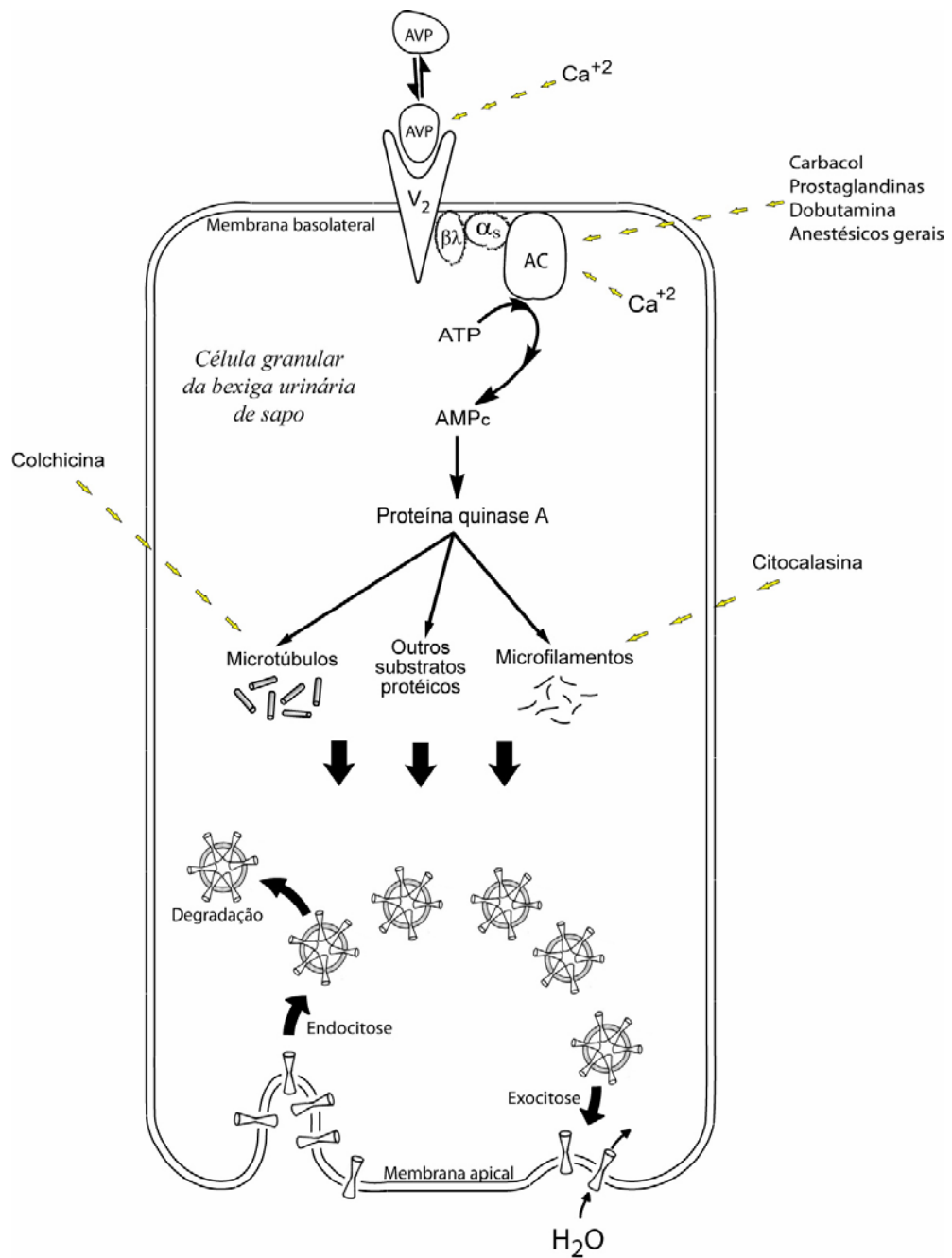


Figura 1: Esquema dos locais de ação de agentes que interferem no efeito hidrosmótico do hormônio antidiurético na célula granular da bexiga urinária de sapo; V_2 = receptor para vasopressina do subtipo V_2 ; AVP = arginina-vasopressina; AC = adenilato ciclase; AMPc = adenosina monofosfato cíclico; ATP = trifosfato de adenosina; setas amarelas indicam inibição.

Como se pode observar, muitos trabalhos foram realizados com a finalidade de verificar a interferência de agentes químicos e farmacológicos sobre o transporte de água e eletrólitos em bexiga de sapo. Entretanto, a interferência de toxinas isoladas de serpente sobre esses fenômenos de transporte é ainda pouco conhecida e, muitas vezes, nem sequer é identificada na literatura. Entre as toxinas de serpentes, podemos citar as miotoxinas.

MIOTOXINAS DO VENENO DE SERPENTES

As miotoxinas dos venenos das serpentes constituem um grupo heterogêneo de toxinas que atuam primariamente no tecido muscular, causando mionecrose (MEBS & OWNBY, 1990). As miotoxinas dos venenos são componentes extremamente potentes, sendo incluídas na categoria dos produtos naturais mais ativos, uma vez que quantidades de 1 µg injetadas experimentalmente em geral causam notável dano às fibras musculares esqueléticas de camundongos e de ratos.

A necrose muscular é uma seqüela comum, causada, muitas vezes, por diversos componentes do veneno que agem sinergicamente, razão pela qual as tentativas de prevenção desses efeitos são infrutíferas, mesmo porque ocorrem de forma muito rápida, logo após a picada desses animais. A pele e a musculatura esquelética são os primeiros tecidos corporais afetados nos acidentes ofídicos. Em certos casos, o dano local pode levar a uma marcante diminuição funcional ou, em acidentes graves, à amputação do membro afetado (ROSENFELD, 1971). Além disso, a

miotoxicidade sistêmica pode causar comprometimento renal, freqüente causa de morte nas vítimas de picada de serpentes (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985).

As miotoxinas descritas em veneno de serpente podem ser classificadas em 3 principais grupos, constituídos por famílias de proteínas estruturalmente distintas: peptídeos miotóxicos, cardiotoxinas e fosfolipases A₂ miotóxicas. Um quarto grupo de proteínas miotóxicas tem sido considerado, incluindo uma variedade de componentes do veneno que podem danificar o músculo esquelético por mecanismos indiretos. Como, por exemplo, toxinas hemorrágicas, que causam dano ao fluxo de sangue local, isquemia e mionecrose secundária, são consideradas fatores miotóxicos indiretos.

PEPTÍDEOS MIOTÓXICOS

Incluem polipeptídeos básicos de pequena massa molecular, da ordem de 4.000 daltons, com 43 a 45 resíduos de aminoácidos, exibindo homologia seqüencial, ligados por três pontes dissulfeto (FOX, ELZINGA & TU, 1979), como a miotoxina *a* do veneno da *Crotalus viridis viridis* (OWNBY, CAMERON & TU, 1976), o peptídeo *c* do veneno da *Crotalus viridis helleri* (MAEDA *et al.*, 1978), a crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (LAURE, 1975), miotoxina I e II do veneno de *Crotalus viridis concolor* (ENGLE *et al.*, 1983; BIEBER, MCPARLAND & BECKER, 1987), toxina III do veneno de *Crotalus horridus horridus* (MEBS, EHRENFELD & SAMEJIMA, 1983) e toxina CAM do veneno de *Crotalus adamanteus* (SAMEJIMA, AOKI & MEBS, 1988). Essas miotoxinas não

exibem atividade enzimática. A crotamina e a miotoxina *a* atuam nos canais de sódio, promovendo maior influxo desse íon para dentro das células musculares, sem afetar a integridade do sarcolema. No entanto, alteram o equilíbrio hidroeletrolítico celular, com dilatação das cisternas do retículo sarcoplasmático e prejuízo da função da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. Histologicamente, aparecem inúmeros vacúolos entre as miofibrilas, em razão do desequilíbrio funcional do retículo sarcoplasmático, cujo papel é manter a homeostasia iônica citossólica juntamente com as mitocôndrias.

CARDIOTOXINAS

São proteínas básicas de baixa massa molecular, de 6.000 a 7.000 daltons, desprovidas de atividade enzimática e que possuem de 60 a 62 resíduos de aminoácidos interligados por 4 pontes dissulfeto. Apresentam uma variedade de ações em diferentes tipos de células: causam hemólise, despolarização e contratura nas células musculares esqueléticas com conseqüente necrose (HARVEY, 1985; FLETCHER & LIZZO, 1987). Essas miotoxinas foram originariamente assim chamadas por sua ação *in vivo* sobre o coração, causando arritmias cardíacas (CONDREA, 1974). OWNBY, FLETCHER & COLBERG (1993) demonstraram que a cardiotoxina I do veneno da serpente *Naja naja atra* pode causar necrose *in vivo* da musculatura esquelética, porém esse efeito já havia sido relatado por DUCHEN *et al.* (1974), com a cardiotoxina do veneno de *Naja mossambica mossambica*.

As cardiotoxinas alteram a função dos canais de sódio, semelhante à miotoxina *a* e à crotamina. No entanto, os efeitos morfológicos não se

assemelham aos induzidos por essas toxinas, mas são similares aos produzidos pelas miotoxinas com e sem atividade PLA₂ (OWNBY, FLETCHER & COLBERG, 1993). As cardiotoxinas são proteínas altamente básicas, com grande porção de sua superfície carregada positivamente. O sítio real de interação das cardiotoxinas com as membranas das células musculares ainda é obscuro, porém podem ser sugeridos: (a) sítios na membrana carregados negativamente, (b) sítios de ligação de cálcio e (c) proteínas integrais da membrana (HARVEY, 1985). Os possíveis modos de ação das cardiotoxinas incluem: (1) ação direta sobre a membrana plasmática, promovendo a ruptura da mesma, acompanhada por despolarização, (2) ação indireta por meio da ativação de fosfolipases C endógena do tecido, ou (3) uma combinação dos dois mecanismos e (4) uma possibilidade adicional para o mecanismo de ação seria pela inibição da Na⁺/K⁺ATPase, seguida do aumento da concentração osmótica de Na⁺ e de edema celular por influxo passivo de água para a célula (OWNBY, FLETCHER & COLBERG, 1993).

FOSFOLIPASES A₂ MIOTÓXICAS

As fosfolipases A₂ miotóxicas encontradas nos venenos de serpentes podem ser divididas em neurotóxicas e não-neurotóxicas (MEBS & OWNBY, 1990). No grupo das fosfolipases A₂ miotóxicas não-neurotóxicas há uma subdivisão entre as miotoxinas com alta atividade enzimática (PLA₂ Asp49) e as com baixa ou nenhuma atividade enzimática (PLA₂ Lys49).

As fosfolipases A₂ são enzimas interfaciais dependentes de cálcio, que hidrolisam especificamente a posição sn-2 dos fosfolipídeos de membrana, liberando quantidades equimolares de ácidos graxos e lisofosfolipídeos (Figura 2). As fosfolipases A₂ estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas tanto no interior como no exterior da célula (KUDO & MURAKAMI, 2002).

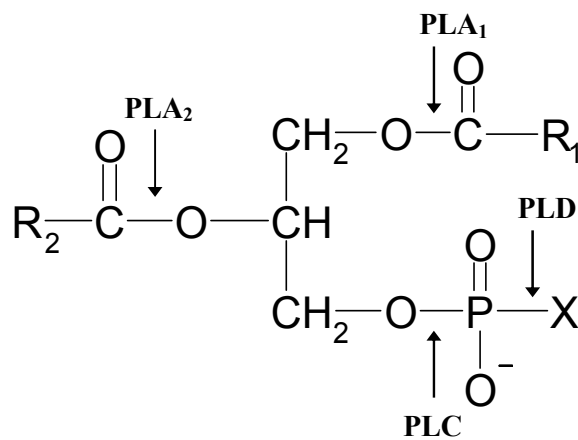


Figura 2: Sítios de ação das fosfolipases. R₁ e R₂ referem-se aos ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-2 dos fosfoglicerídeos numerados estereoespecificamente. X refere-se aos grupos polares, sendo que os mais comuns são a colina, a etanolamina, a serina, o inositol e o glicerol; PLA₂: fosfolipase A₂, PLA₁: fosfolipase A₁, PLC: fosfolipase C, PLD: fosfolipase D.

Essas enzimas participam de diversos processos fisiológicos, como o remodelamento de membranas, a digestão de fosfolipídeos e os mecanismos de transdução de sinais. Além disso, as fosfolipases A₂ hidrolisam fosfolipídeos de membrana, liberando ácido araquidônico, o que pode induzir à síntese secundária de compostos endógenos como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, os quais participam

diretamente da resposta inflamatória (KUDO & MURAKAMI, 2002). A produção de mediadores lipídicos pró-inflamatórios torna essa enzima um importante alvo terapêutico para o tratamento das doenças inflamatórias. Assim, as fosfolipases A_2 são enzimas de grande interesse médico e científico em razão de seu envolvimento em uma variedade de doenças inflamatórias humanas e nos envenenamentos ofídicos e de abelhas.

A quantidade de informação já obtida sobre essas enzimas permitiu o conhecimento detalhado do mecanismo de catálise. A unidade catalítica compreende os resíduos His48, Asp99 e uma molécula de água. A hipótese de catálise interfacial assume a transferência de um fosfolípido de um substrato agregado (membrana ou lipossoma) para o sítio catalítico através de um canal hidrofóbico na enzima, formado principalmente pela hélice N-terminal (SCOTT & SIGLER, 1994). O sítio de ligação do cálcio é formado pelos resíduos Tyr28, Gly30, Gly32, duas moléculas de água e Asp49. O papel do íon cálcio provavelmente envolve a estabilização do complexo tetraédrico intermediário formado (VERHEIJ *et al.*, 1980). O cálcio é um cofator essencial para a atividade catalítica das PLA₂s e sua substituição por outros íons divalentes, como o bário ou cádmio, inibidores competitivos, resulta em significativa redução da atividade (YU, BERG & JAIN, 1993). As PLA₂s enzimaticamente ativas requerem cálcio para a estabilização de uma conformação catalítica, apresentando um sítio de ligação para o cálcio (VERHEIJ *et al.*, 1980), que é formado pelo grupo β -carboxílico do Asp49 e pelo grupo C=O carbonílicos da Tyr28, Gly30 e Gly32 (FLEER, VERHEIJ & HAAS, 1981). Além disso, duas moléculas de

água estruturalmente conservadas completam o sítio de ligação do cálcio, formando uma bipirâmide pentagonal (SCOTT & SIGLER, 1994).

O resíduo de aspartato na posição 49 é fundamental para a ligação do cálcio, pois a substituição conservativa Asp49→Glu49 reduz em 12 vezes a afinidade pelo cálcio, com concomitante perda da atividade enzimática, enquanto outras substituições por Asn, Gln, Lys ou Ala, nesta mesma posição, por meio de mutagênese sítio-dirigida, demonstraram que todas as linhagens mutantes perdiam a afinidade ligante de cálcio, mas mantinham a estabilidade conformacional das proteínas mutantes similar à da proteína nativa. Portanto, o resíduo Asp49 tem importância funcional no mecanismo catalítico da PLA₂s, provavelmente pela capacidade de ligar e orientar corretamente o íon cálcio, no entanto, esse aminoácido não tem relevância na estabilidade da conformação estrutural dessa enzima (LI *et al.*, 1994).

As PLA₂s foram classificadas em 11 grupos principais com base em critérios estruturais, funcionais, dependência de cálcio para atividade e localização subcelular (SIX & DENNIS, 2000) (Tabela 1). Os venenos de serpentes são ricos em fosfolipases A₂ dos grupos I e II e sua atividade catalítica sobre as membranas celulares de tecidos específicos sugere um importante papel para essas enzimas na toxicidade dos venenos. Independentemente de sua função catalítica primária, as fosfolipases A₂ encontradas nos venenos podem induzir diversos efeitos farmacológicos adicionais, como neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, cardiotoxicidade, miotoxicidade, edema, hemólise, anticoagulação, convulsão, hipotensão e

efeito bactericida (OWNBY *et al.*, 1999; LOMONTE, ÂNGULO & CALDERÓN, 2003).

Tabela 1. Os diferentes grupos de PLA₂s e suas características.

Grupo	Fonte	Localização	Tamanho (kDa)	Requerimento de Ca ⁺⁺	Pontes dissulfeto
I					
A	Venenos elapídicos	Secretada	13 -15	mM	7
B	Pâncreas	Secretada	13 -15	mM	7
II					
A	Venenos viperídicos, líquido sinovial, plaquetas	Secretada	13 -15	mM	7
B	Veneno de <i>Bitis gabonica</i>	Secretada	13 -15	mM	6
C	Testículo de rato e camundongo	Secretada	15	mM	8
III	Venenos de abelhas e lagartos	Secretada	16 -18	mM	-
IV	Rim e plaquetas	Citossólica	85	< μM	
V	Coração, pulmão	Secretada	14	mM	6
VI	Macrófagos	Citossólica	80 - 85	Não há	-
VII	Plasma humano	Secretada	45	Não há	-
VIII	Cérebro de boi	Citossólica	29	Não há	-
IX	Lesma marinha	Secretada	14	< mM	6
X	Pulmão fetal humano	Secretada	13,6	mM	8
XI					
A	Broto de arroz	Citossólica	12,4	mM	6
B	Broto de arroz	Citossólica	12,9	mM	6

MIOTOXINAS NEUROTÓXICAS COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A₂

São toxinas potentes, com atividade fosfolipásica A₂, e incluem a notexina do veneno de *Notechis scutatus scutatus* (HARRIS, JOHNSON & KARLSSON, 1975), a crotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (GAPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984), a taipoxina do veneno da *Oxyuranus scutellatus* (HARRIS & MALTIN, 1982) e a toxina mojave do veneno de *Crotalus scutulatus scutulatus* (CATE & BIEBER, 1978).

As alterações patológicas produzidas por essas miotoxinas nas células musculares caracterizam-se por hipercontração dos miofilamentos, levando à agregação das miofibrilas, acompanhada de despolarização e necrose da célula. O mecanismo proposto para explicar essas alterações tem sido o de que haveria hidrólise dos fosfolipídeos da membrana em razão da atividade enzimática, da ruptura do sarcolema e da perda da capacidade da célula em regular o fluxo de cálcio extracelular (GUTIÉRREZ, OWNBY & ODELL, 1984), o que levaria às alterações patológicas observadas.

MIOTOXINAS NÃO-NEUROTÓXICAS COM E SEM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A₂

Essas toxinas causam danos musculares idênticos aos anteriormente mencionados, porém não causam sintomas neurotóxicos. Provocam intensa mioglobínúria com conseqüente falência renal, responsável pelo efeito letal em camundongos (FOHLMAN & EAKER, 1977). Dentre as proteínas dos venenos de serpentes com atividade miotóxica estão algumas fosfolipases A₂.

As fosfolipases A₂ miotóxicas encontradas nos venenos de serpentes podem ser divididas em duas subclasses: (a) as que possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49 (PLA₂s Asp49) e alta atividade enzimática e (b) as que possuem um resíduo de lisina na posição 49 (PLA₂s Lys49) e muito baixa ou nenhuma atividade enzimática (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; ARNI & WARD, 1996). A ausência

de atividade enzimática é justificada pela substituição do resíduo de Asp49 por Lys49, o que impede a ligação do íon de cálcio catalítico.

No veneno das serpentes do grupo IIA estão presentes:

1) As fosfolipases A_2 com resíduo de aspartato na posição 49 (PLA_{2s} Asp49), que são cataliticamente ativas e incluem a miotoxina I do veneno de *Bothrops asper* (GUTIERREZ, OWNBY & ODELL, 1984) e as miotoxinas dos venenos de *Naja nigricollis*, *Naja haje haje* e *Naja nivea* (MEBS, 1986).

2) As fosfolipases A_2 inativas ou pouco ativas enzimaticamente (SELISTRE-DE-ARAUJO, WHITE & OWNBY, 1996) incluem a bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1995), a miotoxina II (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989) do veneno de *Bothrops asper* e a miotoxina II de *Bothrops godmani* (DÍAZ, GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1992), entre outras.

PLA_{2s} LYS49 MIOTÓXICAS

As primeiras proteínas dessa classe a serem descritas foram a bothropstoxina-I, do veneno de *Bothrops jararacussu* (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988), e a miotoxina II de *Bothrops asper* (LOMONTE & GUTIERREZ, 1989). Outras proteínas dessa família foram descritas nos venenos das serpentes do gênero *Agkistrodon* (MARAGANORE *et al.*, 1984; JOHNSON & OWNBY, 1993), *Trimeresurus* (LIU *et al.*, 1990) e *Crotalus* (TSAI *et al.*, 2001). No entanto, a única fonte conhecida das PLA_{2s} Lys49 são os venenos de serpentes da família *Viperidae* (OWNBY *et al.*, 1999).

Algumas PLA_{2s} Lys49 já tiveram seu cDNA clonado (WARD *et al.*, 1995; SELISTRE-DE-ARAUJO, WHITE & OWNBY, 1996a), a partir de bibliotecas geradas das glândulas veneníferas de serpentes. Além disso, diversas PLA_{2s} miotóxicas de veneno de serpente já foram expressas em *E. coli*, incluindo a ACLMT (GIULIANI *et al.*, 2001; CHIATO & WARD, 2003). Estudos sobre evolução sugerem que as PLA_{2s} Lys49 surgiram da duplicação do gene ancestral de PLA_{2s} em uma forma acelerada de evolução, preservando uma mutação crucial para a atividade catalítica na estrutura da enzima PLA₂ Asp49 (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1995).

A análise comparativa da seqüência de aminoácidos mostrou claramente que as PLA_{2s} Lys49 constituem uma subfamília de PLA_{2s}, com alto grau de similaridade em sua estrutura primária, o que não é observado nas PLA_{2s} Asp49 (SELISTRE-DE-ARAUJO, WHITE & OWNBY, 1996b). As PLA_{2s} Lys49 apresentam cerca de 75% de

similaridade entre si, no entanto, em relação às PLA₂s Asp49, o grau de identidade diminui em média 50%.

A estrutura cristalográfica de diversas PLA₂s K49 já foi determinada em razão de sua facilidade de cristalização e alto grau de conservação de estrutura terciária em relação às outras PLA₂s D49 (ARNI *et al.*, 1995; DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; DE AZEVEDO JR. *et al.*, 1999). Analisando diversas destas estruturas, Falconi *et al.* (2000) observaram que as miotoxinas PLA₂s K49 apresentam no mínimo duas áreas superficiais altamente carregadas com cargas positivas, ao contrário da PLA₂s D49, que possuem apenas uma dessas áreas. Esses autores propuseram um modelo em que essa ligação de dupla face altamente positiva poderia desestabilizar a bicamada lipídica e gerar um poro estável, em decorrência das porções hidrofóbicas que flanqueiam os sítios catiônicos. Nos últimos anos, houve crescente interesse no estudo dos componentes do veneno responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação, resultando no isolamento e na caracterização de diversas miotoxinas com estrutura de PLA₂. Assim, a família das PLA₂s Lys49 vem sendo gradualmente expandida (Tabela 2).

Tabela 2. Miotoxinas PLA₂s Lys49 isolada de veneno de serpente.

Espécie	Denominação	Referências
<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	AppK49	Maraganore <i>et al.</i> , 1984
<i>Agkistrodon bilineatus</i>	PLA ₂ -II	Nikai <i>et al.</i> , 1994
<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	ACL myotoxin	Johnson & Ownby, 1993
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Myotoxin I	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1986
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Miotoxina Ih	Rojas <i>et al.</i> , 2001
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Miotoxina II	Angulo <i>et al.</i> , 2000
<i>Bothrops asper</i>	Miotoxina II	Lomonte & Gutiérrez, 1989
<i>Bothrops asper</i>	Miotoxina IV	Díaz <i>et al.</i> , 1995
<i>Bothrops asper</i>	Miotoxina IVa	Lizano <i>et al.</i> , 2001
<i>Bothrops atrox</i>	Ba-K49	Maraganore <i>et al.</i> , 1984
<i>Bothrops atrox</i>	BaPLA ₂ -I	Kanashiro <i>et al.</i> , 2002
<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxin I	Homsi-Brandeburgo <i>et al.</i> , 1988
<i>Bothrops moojeni</i>	Miotoxina I	Lomonte <i>et al.</i> , 1990
<i>Bothrops moojeni</i>	Miotoxina II	Lomonte <i>et al.</i> , 1990
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Miotoxina I	Geoghegan <i>et al.</i> , 1999
<i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>	BnSP-7	Rodrigues <i>et al.</i> , 1998
<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxina I	Toyama <i>et al.</i> , 1995
<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxina II	Toyama <i>et al.</i> , 1995
<i>Bothrops pradoi</i>	PRA-1	Moura-da-Silva <i>et al.</i> , 1991
<i>Bothriechis (Bothrops) schlegelli</i>	Miotoxina I	Angulo <i>et al.</i> , 1997
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	CRV-K49	Tsai <i>et al.</i> , 2000
<i>Cerrophidion (Bothrops) godmani</i>	Miotoxina II	Diaz <i>et al.</i> , 1992
<i>Cerrophidion (Bothrops) godmani</i>	PgoK49	Tsai <i>et al.</i> , 2001
<i>Crotalus atrox</i>	Cax-K49	Tsai <i>et al.</i> , 2001
<i>Crotalus molossus molossus</i>	Cmm-K49	Tsai <i>et al.</i> , 2001
<i>Deinagkistrodon (Agkistrodon) acutus</i>	Dac-K49	Wang <i>et al.</i> , 1996
<i>Deinagkistrodon (Agkistrodon) acutus</i>	Dac-K49b	Tsai <i>et al.</i> , 2001
<i>Trimeresurus albolabris</i>	Tal-K49	Tsai <i>et al.</i> , 2001
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	BP-I	Yoshizumi <i>et al.</i> , 1990
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	BP-II	Liu <i>et al.</i> , 1990
<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA ₂ -V	Nakai <i>et al.</i> , 1995
<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA ₂ -VII	Nakashima <i>et al.</i> , 1995
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	TMV-K49	Wang <i>et al.</i> , 1996
<i>Trimeresurus okinavensis</i>	To3	Nobuhisa <i>et al.</i> , 1996
<i>Trimeresurus puniceus</i>	Tpu-K49	Tsai <i>et al.</i> , 2001

As PLA₂s Lys49 têm sido descritas como enzimaticamente inativas contra a maioria dos substratos usualmente testados para as PLA₂s, como lecitina de gema de ovo e fosfolipídios isolados. No entanto, recentemente alguns autores observaram que as PLA₂s Lys49 são capazes de hidrolisar fosfolipídeos em situações especiais, liberando ácido araquidônico (YAMAGUCHI *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2002).

A baixa atividade enzimática detectada em algumas preparações de PLA₂s Lys49 poderia ser decorrente da presença de pequenas quantidades de PLA₂ Asp49 ativa contaminante, uma vez que os venenos normalmente são ricos em isoformas de fosfolipases. A produção e o uso de PLA₂s Lys49 recombinantes poderão eliminar a contaminação e tornar a interpretação dos resultados de atividade enzimática mais consistentes. Foi demonstrado que uma forma recombinante da bothropstoxina I não apresenta atividade catalítica *in vitro*, no entanto, observou-se baixa atividade enzimática em substratos naturais (WARD *et al.*, 2002). Entretanto, ainda não foi definido o papel da atividade enzimática no mecanismo tóxico das PLA₂s Lys49.

Uma possível explicação para a baixa atividade enzimática das PLA₂s Lys49 foi sugerida por LEE *et al.* (2001), que, estudando estruturas cristalográficas de Lys49 PLA₂s, observaram que algumas dessas proteínas possuíam uma molécula de ácido graxo co-cristalizada, ligada ao “centro ativo”. Esses autores propuseram um mecanismo por meio do qual as PLA₂s Lys49 poderiam promover a hidrólise de alguns fosfolipídeos, principalmente aqueles carregados negativamente, assim o ácido graxo livre produzido na reação não se deslocaria do centro ativo,

inibindo a enzima para reações posteriores. Embora não haja dados experimentais que comprovem essa hipótese, ela parece bastante plausível e de acordo com os resultados descritos na literatura. No entanto, havendo ou não hidrólise, essas enzimas se ligam fortemente às membranas e são capazes de produzir lise da célula.

Duas características marcantes das PLA₂s Lys49 é a presença de 15% de resíduos básicos e o domínio C-terminal altamente rico em lisina, formando nesse domínio uma seqüência de ligação para heparina (OWNBY *et al.*, 1999). A heparina é um glicosaminoglicano sulfatado, composto por ácido hexurônico ou idurônico alternado com glicosamina. Os substituintes sulfatados são principalmente grupos N-sulfatados ou O-sulfatados (KJELLÉN & LINDAHL, 1991). Experimentos realizados com miotoxina II do veneno de *Bothrops asper* demonstraram que a ligação da heparina inibe sua atividade citotóxica sobre células endoteliais (LOMONTE *et al.*, 1994a).

Um peptídeo sintético correspondente à região C-terminal (resíduos 115-129) da miotoxina II, em altas concentrações, reproduziu o efeito citolítico da toxina nativa, e esse efeito foi inibido pela heparina (LOMONTE *et al.*, 1994a). Esses resultados sugerem que a região C-terminal (resíduos 115-129) é parte do sítio de ligação da heparina na miotoxina II, o qual está envolvido com a atividade citotóxica.

NÚNEZ, ÂNGULO & LOMONTE (2001) demonstraram que um peptídeo sintético, correspondente à região C-terminal (resíduos 115-129) de uma PLA₂ Lys49 miotóxica da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, foi capaz de causar lise de células musculares esqueléticas

em cultura e induzir edema em pata de camundongos *in vivo*. Essas evidências mostram que a região C-terminal (resíduos 115-129) da PLA₂ Lys49 miotóxica do veneno da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus* está diretamente relacionada a seus efeitos miotóxicos. Recentemente, LOMONTE, ÂNGULO & SANTAMARÍA (2003) observaram que o peptídeo correspondente à região C-terminal (resíduos 115-129) da ACL miotoxina do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* também foi capaz de exercer citotoxicidade *in vitro* e miotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. A Tabela 3 mostra a seqüência de aminoácidos da região C-terminal (resíduos 115-129) de algumas PLA₂s Lys49 miotoxinas.

Tabela 3. Seqüência dos aminoácidos da região C-terminal (resíduos 115-129).

Serpente	Seqüência de aminoácidos
<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	KKYKAYFKFKCKK
<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	KKYKAYFKLKCKK
<i>Bothrops asper</i>	KKYRYYLKPLCKK

A mais bem documentada atividade biológica exercida pelas PLA₂s Lys49 é sua capacidade de induzir necrose em células musculares esqueléticas *in vivo*. Essas proteínas induzem mionecrose de forma bastante rápida, cerca de 5 minutos após injeção intramuscular ou subcutânea (JOHNSON & OWNBY, 1993). As alterações patológicas observadas incluem, inicialmente, a presença de vacúolos no citoplasma e expansão do retículo sarcoplasmático e, posteriormente, a formação de lesões delta e a presença de miofilamentos hipercontraídos (JOHNSON & OWNBY, 1993). Esse quadro evolui para uma desorganização miofibrilar generalizada, com a separação anormal das miofibrilas, que apresentam

aspecto necrótico (OWNBY *et al.*, 1999). A atividade miotóxica das PLA₂s Lys49 tem sido geralmente estudada em camundongos, utilizando técnicas histológicas e ultraestruturais (GUTIÉRREZ, LOMONTE & CERDAS, 1986; HOMSI-BRANDERBURGO *et al.*, 1988), microscopia intravital (LOMONTE *et al.*, 1994b) e ensaios de liberação de creatina kinase plasmática (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989). *In vivo*, a miotoxicidade local é acompanhada por outros efeitos tóxicos, incluindo edema moderado (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989), hiperalgesia (CHACUR *et al.*, 2003) e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, a interleucina-6 (LOMONTE, TARKOWSKI & HANSON, 1993). A capacidade de algumas PLA₂s Lys49 em recrutar leucócitos para a cavidade pleural em modelo *in vivo* também tem sido descrita (DE CASTRO *et al.*, 2000).

In vitro, os efeitos tóxicos das miotoxinas sobre as preparações neuromusculares diafragma-frênico isolada de camundongos têm sido caracterizados para diferentes PLA₂s Lys49 (DHILLON *et al.*, 1987; HELUANY *et al.*, 1992). Além disso, ensaios *in vitro* utilizando diferentes linhagens de células têm demonstrado ampla especificidade na ação citolítica das PLA₂s Lys49 (LOMONTE, TARKOWSKI & HANSON, 1994). No entanto, as culturas de células musculares se revelaram mais suscetíveis à ação tóxica dessas miotoxinas (LOMONTE *et al.*, 1999). Tanto a miotoxina III (Asp49PLA₂) como a miotoxina II (Lys49PLA₂) de *B. asper* possuem atividade bactericida contra um amplo espectro de bactérias (PÁRAMO *et al.*, 1998). Foi demonstrado que o peptídeo sintético correspondente à região C-terminal (115-129 resíduos) da

mitoxina II também apresenta atividade bactericida. Essa atividade também tem sido observada em outras PLA₂s Lys49 (SOARES *et al.*, 2002), sugerindo que a atividade bactericida deve ser uma propriedade dessa família de proteínas.

Estudos com lipossomos multilamelares demonstraram que somente as vesículas de carga negativa eram afetadas pelas PLA₂s Lys49 (DÍAZ *et al.*, 1991). Esses experimentos mostraram que essas miotoxinas afetam preferencialmente as bicamadas carregadas negativamente, sugerindo o envolvimento de aminoácidos básicos no mecanismo “danificador” de membranas biológicas. A força de interação da miotoxina II de *Bothrops asper* com sua membrana-alvo é reduzida a 4°C, sugerindo que, além de uma interação eletrostática, uma penetração hidrofóbica seria requerida no mecanismo citolítico (LOMONTE *et al.*, 1994a). A ruptura de lipossomos por miotoxinas sem atividade enzimática também sugere que as PLA₂s Lys49 são capazes de romper as bicamadas por um mecanismo “independente” da hidrólise de fosfolípidos (DÍAZ *et al.*, 1991). Além disso, estudos realizados com sistemas artificiais de lipossomas contendo fosfolípidos não hidrolizáveis mostraram que a miotoxina II de *Bothrops asper* é capaz de induzir ruptura de lipossoma sem a necessidade de hidrólise (FALCONI, DESIDERI & RUFINI, 2000).

Foi sugerido que as PLA₂s Lys49 podem interagir com as membranas biológicas por meio da ligação com alta afinidade a um receptor (HANASAKI & ARITA, 2002). A figura 3 mostra a interação de uma PLA₂ com o fosfolípido de membrana.

De fato, diversos receptores para PLA₂s foram descritos em alguns tecidos de mamíferos, com os quais as toxinas com estrutura de PLA₂ se ligam com alta afinidade (LAMBEAU & LAZDUNSKI, 1999). A homologia entre PLA₂s de venenos e mamíferos sugere que os efeitos patológicos dessas toxinas poderiam ser mediados por meio da interação com esses receptores, justificando assim a alta afinidade por certos tipos de membranas (VALENTIN & LAMBEAU, 2000).



Figura 3: Interação de uma PLA₂ com os fosfolipídios de membrana.

Evidências histológicas e bioquímicas indicam que a membrana plasmática das células musculares é a primeira estrutura afetada por essas toxinas (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995). A mionecrose causada por toxinas com estrutura de fosfolipase A₂ caracteriza-se pela ruptura da

membrana plasmática e pela hipercontração de miofibrilas, seguida da dissolução dos componentes celulares (OWNBY, 1990). Ainda não foi determinado se as alterações provocadas por essas miotoxinas nas células musculares que levam à necrose são resultado somente da ruptura da membrana plasmática ou se a miotoxina exerce sua ação dentro célula, por internalização ou por transdução de sinais.

Foi demonstrado que as PLA₂s Lys49 induzem a despolarização da membrana, o que não foi observado para as PLA₂ Asp49. A despolarização é dependente de cálcio, mas não é necessária para os efeitos miotóxicos (KIHARA *et al.*, 1992; HELUANY *et al.*, 1992). Além disso, os ácidos graxos, que são os principais produtos da atividade enzimática dessas proteínas, potencialmente podem alterar a corrente iônica (WIELAND, FLETCHER & GONG, 1992) e, com isso, produzir uma corrente de íons independente nos canais iônicos preexistentes na membrana, os quais poderiam ou não participar dos efeitos farmacológicos dessas enzimas (ALIX & WOODBURY, 1997). Essas enzimas mostraram-se capazes de estimular a abertura de canais liberadores de cálcio em frações de retículo endoplasmático de células musculares esqueléticas (FLETCHER *et al.*, 1996). O influxo de cálcio do meio extracelular e a liberação de cálcio dos estoques intracelulares provavelmente seriam a consequência mais relevante dos distúrbios na membrana, resultando em alterações no citoesqueleto, dano mitocondrial e ativação de fosfolipases cálcio dependentes (JOHNSON & OWNBY, 1994).

A toxina estudada no presente trabalho é uma PLA₂ Lys49 miotóxica conhecida como ACL miotóxica (ACLMT), encontrada no veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, comumente conhecida como Broad-banded copperhead. Essa serpente habita apenas a América do Norte, mais especificamente a região centro-oeste do Estado do Texas, centro-norte de Oklahoma e sul do Estado de Kansas, sendo geralmente encontrada em regiões úmidas, arborizadas e rochosas (FOSTER & CARAS, 1994).

Embora seu mecanismo de ação não seja totalmente compreendido, a ACLMT vem sendo utilizada como um excelente modelo de indução de lesão em músculo esquelético para posteriores estudos de regeneração muscular. MORINI *et al.* (1998) demonstraram que a ACLMT foi capaz de induzir necrose de fibras musculares dos tipos I e II e remodelamento axonal. A Figura 4 mostra a estrutura molecular da ACLMT.

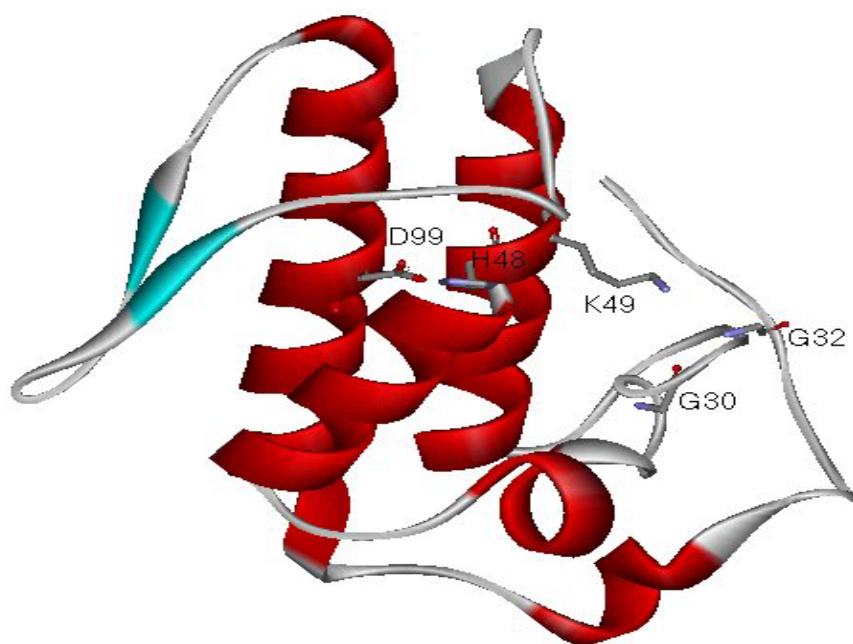


Figura 4: Modelo molecular da ACL miotoxina, mostrando os aminoácidos envolvidos no centro ativo (H48 e D99) e no sítio de ligação ao cálcio (K49, G30 e G32). Modelo desenvolvido com o software Modeller e visualizado com o WebLab, usando como modelo a bothropstoxina.

OBJETIVOS

Na tentativa de contribuir de alguma forma para a compreensão do complexo mecanismo de ação das PLA₂s Lys49 miotóxicas, o presente trabalho teve por objetivo geral estudar o efeito da ACLMT sobre o transporte de água em bexiga urinária de sapo, abordando os seguintes aspectos:

- O papel do cálcio intracelular, do complexo cálcio-calmodulina e das prostaglandinas no efeito da ACLMT sobre o transporte de água.
- A participação de estruturas citoesqueléticas (microtúbulos) no efeito da ACLMT sobre o transporte de água.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

ANIMAL

Foram utilizados sapos, *Bufo marinus*, adultos, sadios, de ambos os sexos, pesando em média 250 gramas. Bexigas com aderências ou parasitadas não foram utilizadas. Os sapos foram coletados semanalmente, permanecendo no sapário, no máximo 7 dias, com água e alimento em abundância, à temperatura ambiente, de onde eram levados para o laboratório para sua utilização.

SOLUÇÕES E DROGAS

Solução isotônica de Ringer Fosfato (1*) com osmolaridade de 250 mOsm/l, contendo: 110 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 0,5 mM MgCl₂.6H₂O; 2,0 mM Na₂HPO₄.12H₂O; 1,8 mM CaCl₂.2H₂O; 10,0 mM C₆H₁₂O₆.H₂O; com pH final da solução de 7,4.

Solução de Ringer Fosfato (2*) diluída (1:5) em água destilada, com osmolaridade de 50 mOsm/l.

Arginina-vasopressina, 3'5' AMP_c, 8-clorofeniltiomonofosfato de adenosina cíclico, forskolina, lantânio, nifedipina, carbacol, trifluoperazina, colchicina, indometacina, todos esses agentes foram adquiridos da Sigma - USA.

A ACLMT foi purificada como previamente descrito por JONHNSON & OWNBY (1993). A proteína de fusão MBP-ACLMT foi expressa em nosso laboratório por Carla Denari Giuliani e gentilmente cedida para o presente estudo.

Os peptídeos sintéticos correspondentes à região C-terminal da ACLMT e da PLA₂ Lys49 miotóxica do veneno da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Bruno Lomonte, da Faculdade de Microbiologia, Instituto Clodomiro Picado, Universidade da Costa Rica. Os peptídeos foram solubilizados em água Milli-Q imediatamente antes dos experimentos.

MÉTODOS

Foi utilizada a técnica descrita por BENTLEY (1958) para a determinação do fluxo de água. Após a destruição do encéfalo e da medula por meio de um estilete, procedia-se à exposição da bexiga bilobada, por meio de incisão no abdômen e retirada de uma porção desse tecido para lavagem em solução de Ringer Fosfato (1*). A manipulação da bexiga requer certos cuidados, como: a ponta dos dedos do manipulador e o fio de algodão que serão utilizados devem ser previamente umedecidos em solução fisiológica a fim de não lesar o tecido. Em seguida, foram separados os dois lobos, sendo introduzido em cada um deles um tubo de polietileno rígido, com 4 mm de diâmetro, amarrando-se firmemente o tecido em volta do tubo, de modo a formar uma pequena bolsa com o tecido na extremidade do tubo.

Essa pequena bolsa de tecido, em cujo interior encontra-se a face mucosa do epitélio (correspondente ao compartimento urinário), era separado do resto da bexiga, tendo-se o cuidado de deixar o mínimo possível de tecido remanescente para facilitar a secagem e a pesagem. A bolsa de tecido foi submetido à lavagem.

A lavagem da face serosa foi realizada com solução de Ringer Fosfato (1*), enquanto o interior (face mucosa) foi lavado com solução de Ringer Fosfato diluída (2*). Foi introduzida por meio do tubo uma cânula de polietileno conectada a uma seringa; injetando 5 ml em cada bolsa de bexiga.

A membrana foi mergulhada em um béquer contendo 40 ml de solução de Ringer Fosfato (1*), sendo totalmente coberta pela solução a fim de evitar perda de peso por evaporação, e fez-se coincidir o nível da solução externa com o menisco da solução interna Ringer Fosfato diluído (2*), a fim de não criar um gradiente de pressão hidrostática entre as duas soluções.

As diferenças ocasionais entre o nível da solução externa e o menisco da solução interna no tubo, provocadas pela variação do tônus da musculatura lisa da bexiga, não desempenham papel significativo algum sobre o fluxo de água nessa estrutura (HANDLER, BESINGER & ORLOFF, 1968).

Os experimentos foram conduzidos em banho-maria com temperatura controlada por meio de um termostato e de um termômetro, a fim de manter a temperatura do sistema em torno de 23°C. Durante os experimentos, o compartimento seroso foi mantido sob borbulhamento de ar saturado com vapor de água (bomba de aquário) para oxigenar o meio e proporcionar agitação constante das soluções (Figura 5).

Os resultados obtidos com as variações de peso (mg) da bexiga foram expressos como variações de volume (μ l).

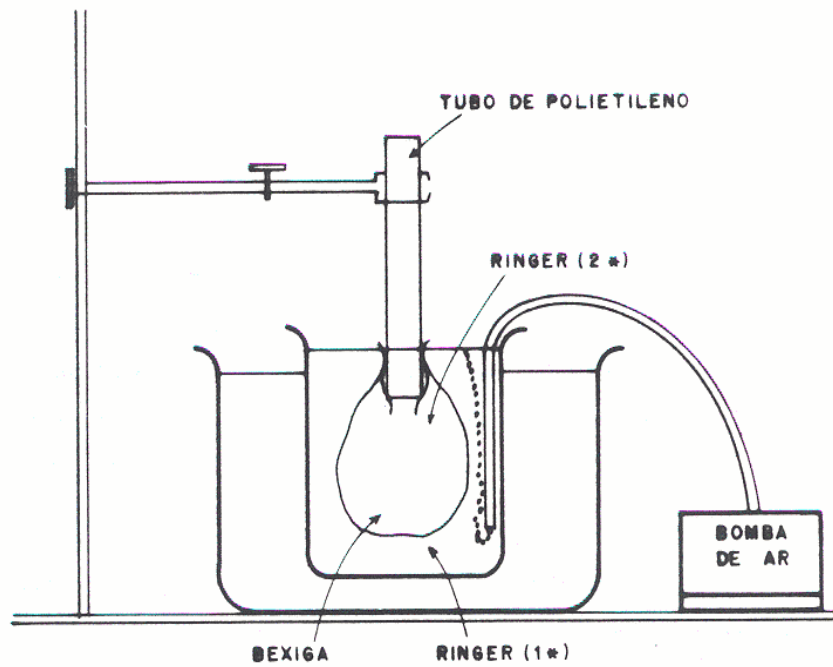


FIGURA 5: Esquema da montagem para a medida do fluxo de água através da bexiga de sapo (Técnica de Bentley, 1958).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As bexigas foram deixadas em repouso na solução isotônica de Ringer Fosfato (1*) por aproximadamente 60 minutos (período de incubação) para se adaptarem às condições *in vitro*, enquanto os períodos experimentais tiveram duração de 30 minutos cada. Após o período de incubação das bexigas, iniciou-se o período experimental: as bexigas foram esvaziadas, lavadas e preenchidas com solução de Ringer Fosfato diluída (2*).

A bexiga foi então pesado em uma balança de precisão (CHYO-JK-180), efetuando-se, assim, a pesagem inicial. Em seguida foi mergulhado na solução de banho (40 ml), cuja solução Ringer Fosfato (1*) também havia sido trocada (Figura 5).

Após 30 minutos, retira-se a hemi-bexiga da solução de banho e procede-se à secagem e à pesagem final. A diferença entre as duas pesagens é decorrente do fluxo de água, que é movido pelo gradiente osmótico entre as duas faces da membrana. Esse fluxo foi chamado de fluxo basal. Em seguida, foram realizados os outros períodos experimentais, introduzindo-se, então, os agentes farmacológicos na solução de banho.

Uma observação importante, que deve ser destacada ainda no procedimento experimental, diz respeito à utilização dos agentes farmacológicos. Esses agentes, com exceção da vasopressina, do AMP_c, do 8-clorofeniltio-AMPc e da forskolina, foram adicionados na solução de banho 30 minutos antes do período subsequente, a fim de fornecer tempo suficiente para ocorrer sua difusão pelas estruturas teciduais até atingir

seus locais de ação. Como o fluxo de água foi determinado a cada 30 minutos, o peso inicial das bexigas do período subsequente coincidia com o peso final do período precedente. Nos experimentos conduzidos com a colchicina, o período de incubação desse agente foi de 4 horas, como descrito por TAYLOR *et al.* (1978).

Em alguns experimentos a toxina foi adicionada dentro da bolsa de tecido, isto é, em contato com a face mucosa do epitélio, sendo introduzida, através do tubo de polietileno, uma cânula conectada a uma seringa, por meio da qual se injetou a toxina na concentração de 20 nM em 5 ml de Ringer Fosfato diluída (2*).

Ressalta-se que todos os protocolos experimentais selecionados sempre permitiram a utilização de experimentos pareados, os quais foram conduzidos em bexigas oriundas do mesmo animal. Desse modo, foi possível comparar os valores obtidos no período inicial (controle) com os do período experimental realizado posteriormente na mesma bexiga, ou, então, comparar as bexigas gêmeas, em que uma foi utilizada como controle e a outra, como experimental. Dessa forma, as comparações puderam ser utilizadas no sentido "horizontal", entre os períodos realizados na mesma bexiga, ou no sentido "vertical", entre os períodos realizados concomitantemente na bexiga controle e na bexiga experimental.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

As bexigas foram incubadas por 30 minutos com ACLMT na concentração de 20nM. Após essa incubação, as bexigas foram imediatamente fixadas em solução de Bouin. Para análise histológica da bexiga urinária de sapo, o tecido foi incluído em parafina, os cortes foram corados com hematoxilina para a avaliação por meio de um microscópio de luz. As lâminas foram gentilmente elaboradas e cedidas pela Profa Nelcy F. Verani, do Departamento de Hidrobiologia da UFSCar.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados são apresentados em termos de Média \pm Erro-Padrão (EPM) e a Significância (p) foi verificada a partir da aplicação do Teste T (Student) para amostras pareadas e não pareadas (SNEDECOR & COCHRAN, 1978).

RESULTADOS

Efeito da ACL miotoxina (ACLMT) sobre o transporte de água na ausência e na presença de vasopressina (AVP)

Para estudar o efeito da ACLMT sobre o transporte de água em bexiga urinária de sapo, diversos experimentos foram conduzidos em bexigas gêmeas provenientes do mesmo animal. A Tabela 4 elaborada a partir do protocolo Experimental descrito no Quadro 1, mostra os resultados obtidos com várias concentrações de ACLMT (1 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM e 100 nM) adicionadas ao banho de Ringer Fosfato na ausência de vasopressina. Observa-se que, em todas as concentrações utilizadas, a ACLMT aumentou significativamente o fluxo basal de água nas bexigas experimentais em relação às bexigas controle ($p < 0,01$). No entanto, o efeito hidrosmótico da ACLMT não variou significativamente em relação às diferentes concentrações utilizadas.

Para verificar se o efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água é reversível, foram conduzidos experimentos de acordo com o protocolo experimental descrito no Quadro 1. Nesse grupo de experimentos, as bexigas experimentais foram tratadas com ACLMT no período anterior (2^o período). Então, permaneceram 30 minutos na solução de banho sem a presença da toxina. Os valores para fluxo basal de água não foram estatisticamente significativos em relação às bexigas que não receberam o prévio tratamento com ACLMT ($1,60 \pm 0,15 \mu\text{l}/\text{min}$ vs $1,25 \pm 0,15 \mu\text{l}/\text{min}$; $n = 6$; amostras pareadas). Este resultado mostra a total reversibilidade do efeito estimulatório da ACLMT sobre o fluxo basal de água.

A Tabela 5, elaborada a partir do protocolo experimental descrito no Quadro 1, mostra o efeito da ACLMT sobre o fluxo de água na presença de vasopressina. A ACLMT foi adicionada 30 minutos antes da adição do hormônio antidiurético. Os resultados foram analisados 30 minutos após a adição de vasopressina. O grupo controle recebeu vasopressina (10 mU/ml de banho) e o experimental, vasopressina (10 mU/ml de banho) com ACLMT (1 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM e 100 nM) em diferentes concentrações. Observa-se que, em todas as concentrações utilizadas, a ACLMT inibiu parcialmente o fluxo de água na presença de vasopressina ($p < 0,01$, amostras pareadas).

Foram conduzidos diversos experimentos a fim de verificar se o efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina é reversível. Os resultados foram obtidos a partir do protocolo experimental descrito no Quadro 1. Os valores observados para o fluxo de água em presença do hormônio antidiurético, após a bexiga ter sido submetida à lavagem posterior ao tratamento por ACLMT associada à vasopressina, foram de $29,50 \pm 2,60 \mu\text{l}/\text{min}$, enquanto nas bexigas pareadas o fluxo de água estimulado pela vasopressina foi de $30,20 \pm 2,50 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 6$; amostras pareadas), sendo essa diferença estatisticamente não significativa. Esse resultado mostra a total reversibilidade do efeito bloqueador da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina.

A adição de 20 nM de ACLMT na solução dentro da preparação, isto é, em contato com a face mucosa do epitélio, não afetou o fluxo basal de água ($1,15 \pm 0,07 \mu\text{l}/\text{min}$ vs $1,14 \pm 0,03 \mu\text{l}/\text{min}$; $n = 7$; amostras

pareadas), nem o fluxo de água estimulado pela vasopressina ($36,20 \pm 1,92 \mu\text{l}/\text{min}$ vs $37,46 \pm 2,45 \mu\text{l}/\text{min}$; $n = 6$; amostras pareadas).

Quadro 1

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos					
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o
CONTROLE	Basal	Basal	Basal	Basal	AVP	AVP
EXPERIMENTAL	Basal	ACLMT	Basal	ACLMT	AVP + ACLMT	AVP

Basal = Ringer Fosfato (250 mOsm/l).

Tabela 4. Efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água em bexiga de sapo

n	ACLMT [nM]	Grupo controle	Grupo experimental	p	% aumento
Fluxo de água ($\mu\text{l}/\text{min}$)					
7	1	$1,35 \pm 0,17$	$2,23 \pm 0,36$	< 0,01	65,18
7	10	$1,25 \pm 0,14$	$2,10 \pm 0,31$	< 0,01	68,00
7	20	$1,40 \pm 0,22$	$2,37 \pm 0,40$	< 0,01	69,28
5	40	$1,25 \pm 0,07$	$2,10 \pm 0,06$	< 0,01	68,0
7	100	$1,31 \pm 0,10$	$2,20 \pm 0,14$	< 0,01	67,93

ACLMT = ACL miotoxina; n = número de experimentos.

Tabela 5. Efeito da ACLMT sobre o fluxo de água estimulado pela vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo

n	ACLMT [nM]	Grupo controle (AVP)	Grupo experimental (AVP+ACLMT)	p	% inibição
Fluxo de água ($\mu\text{l}/\text{min}$)					
7	1	30,91 \pm 2,19	26,11 \pm 1,99	< 0,01	15,52
8	10	34,81 \pm 2,54	28,70 \pm 3,00	< 0,01	17,55
7	20	33,77 \pm 2,51	26,05 \pm 3,17	< 0,01	22,86
5	40	33,96 \pm 2,28	25,85 \pm 2,44	< 0,01	23,88
7	100	37,50 \pm 2,41	29,79 \pm 2,50	< 0,01	20,56

AVP = vasopressina; ACLMT = ACL miotoxina; n = número de experimentos.

Efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da forskolina, AMPc e 8-CPT-AMPc

Para obter outros detalhes sobre o efeito bloqueador da ACLMT na cadeia de eventos que se segue à interação da vasopressina com seus receptores na membrana basolateral da bexiga urinária de sapo, foram realizados diversos experimentos com agentes hidrosmóticos que mimetizam o efeito hidrosmótico do hormônio antidiurético. A Tabela 6 elaborada a partir do protocolo experimental descrito no Quadro 2 mostra esses resultados.

Quadro 2

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos			
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o
CONTROLE	Basal	Basal	Ag. hidrosmótico	Basal
EXPERIMENTAL	Basal	ACLMT	ACLMT+ Ag. hidrosmótico	Basal

Tabela 6. Efeito da ACLMT (20 nM) sobre a ação hidrosmótica da forskolina (2 μ M), AMPc (2 mM), 8-CTP-AMPc (0,1 mM) em bexiga de sapo

Agentes hidrosmóticos	Fluxo de água (μ l/min)			
	n	Grupo controle	ACLMT	p
Forskolina	7	28,41 \pm 1,92	22,54 \pm 1,71 *	< 0,01
AMPc	6	9,69 \pm 0,95	7,18 \pm 0,77 **	< 0,01
8-CTP-AMPc	6	26,03 \pm 2,87	22,80 \pm 3,61 ***	< 0,01

* % inibição = 20,66 em relação ao grupo controle; ** % inibição = 25,90 em relação ao grupo controle; *** % inibição = 12,40 em relação ao grupo controle; AMPc = monofosfato de adenosina cíclico; 8-CTP-AMPc = 8-clorofeniltiomonofosfato de adenosina cíclico; n = número de experimentos.

ACLMT (20 nM) foi adicionada ao banho na presença de forskolina (2 μ M), 8-CPT-AMPc (0,1 mM) e AMPc (2 mM). A concentração desses agentes hidrosmóticos foi extensivamente utilizada por outros autores (HANDLER, BESINGER & ORLOFF, 1968; SCHOLONDORFF & LEVINE, 1985; PARNOVA *et al.*, 1997). Pode ser observado na Tabela 6 que, na presença de forskolina, o fluxo de água nas bexigas controle foi de $28,41 \pm 1,92 \mu\text{l}/\text{min}$ (n = 7), enquanto nas bexigas experimentais (ACLMT associada com forskolina) o fluxo foi de $22,54 \pm 1,71 \mu\text{l}/\text{min}$ (n = 7), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas).

A ACLMT inibiu parcialmente a ação hidrosmótica do AMPc. A adição isolada do nucleotídeo nas bexigas controle resultou em valores para o fluxo de água de $9,69 \pm 0,95 \mu\text{l}/\text{min}$ (n = 6), enquanto nas bexigas experimentais, que receberam ACLMT associada com AMPc, o fluxo de água foi de $7,18 \pm 0,77 \mu\text{l}/\text{min}$, sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas).

Nessa mesma tabela também pode ser verificado um significativo bloqueio do efeito hidrosmótico do 8-CPT-AMPc pela ACLMT, os valores para o fluxo de água nas bexigas controle foi de $26,03 \pm 2,87 \mu\text{l}/\text{min}$ (n = 6), enquanto no grupo das bexigas experimentais tratadas com ACLMT o fluxo de água foi de $22,80 \pm 3,61 \mu\text{l}/\text{min}$ (n = 6), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas). O 8-CPT-AMPc é um análogo do AMP_c, no entanto, ele é mais lipossolúvel do que o AMPc, assim, atravessa com mais facilidade as membranas celulares.

Certamente, a diferença no fluxo de água estimulado pelo AMPc e pelo 8-CPT-AMPc pode ser explicada pela alta lipossolubilidade do análogo.

Efeito da associação de ACLMT com lantânio sobre o fluxo de água na ausência e na presença de vasopressina

Para verificar se o efeito da ACLMT sobre o transporte de água é mediado pelo aumento do cálcio intracelular diversos experimentos foram conduzidos na presença de lantânio. Esse agente é um inibidor do aumento da concentração do cálcio citossólico (ARRUDA & SABATINI, 1980). A Tabela 7 foi elaborada a partir do Protocolo Experimental descrito no Quadro 3.

Quadro 3

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
CONTROLE	Basal	Basal	ACLMT	Basal	ACLMT	ACLMT + AVP
EXPERIMENTAL	Basal	Lant	Lant + ACLMT	Basal	Lant + ACLMT	Lant+ACLMT + AVP

Lant = lantânio.

Tabela 7. Efeito da associação de ACLMT (20 nM) com lantânio (0.1 mM) sobre o fluxo de água, $\mu\text{l}/\text{min}$, na ausência e na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo

n	Grupo controle	Fluxo	Grupo experimental	Fluxo	p
7	Basal	1,84 \pm 0,39	Lant	2,03 \pm 0,31	N.S
8	ACLMT	2,90 \pm 0,25	ACLMT+Lant	2,00 \pm 0,20 *	< 0,01
8	ACLMT+AVP	33,30 \pm 1,77	ACLMT+Lant+AVP	41,43 \pm 2,31	< 0,01

* % inibição = 31,0 em relação ao grupo controle; N.S. = não significativa em relação ao grupo controle; Lant = lantânio.

A Tabela 7 mostra os resultados quando o lantânio (0,1 mM) foi adicionado isoladamente ao banho, e o fluxo de água nas bexigas experimentais foi de $1,84 \pm 0,39 \mu\text{l}/\text{min}$ e nas bexigas controle, de $2,03 \pm 0,31 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 7$), sendo essa diferença estatisticamente não significativa (amostras pareadas). A associação de ACLMT (20 nM) com lantânio (0,1 mM) alterou o fluxo de água de $2,00 \pm 0,20 \mu\text{l}/\text{min}$ nas bexigas experimentais para $2,90 \pm 0,25 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 8$) nas bexigas controle, sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas).

Pode-se observar nessa mesma tabela que a presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) nas bexigas experimentais, tratadas com lantânio (0,1 mM) associado com ACLMT (20 nM), resultou em valores para o fluxo de água de $41,43 \pm 2,31 \mu\text{l}/\text{min}$, enquanto nas bexigas controle tratadas somente com ACLMT o fluxo de água foi de $33,30 \pm 1,77 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 8$), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas).

Efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água na presença de nifedipina

A Tabela 8 elaborada a partir do Protocolo Experimental descrito no Quadro 4, ilustra os resultados obtidos com nifedipina.

Quadro 4

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos					
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o
CONTROLE	Basal	Basal	ACLMT	Basal	Basal	ACLMT
EXPERIMENTAL	Basal	Nif	ACLMT + Nif	Basal	Nif + Lant	ACLMT + Nif + Lant

Nif = nifedipina.

Tabela 8. Efeito da ACLMT (20 nM) sobre o fluxo basal de água ($\mu\text{l}/\text{min}$) na

n	Grupo controle	Fluxo	Grupo experimental	Fluxo	p	% inibição
6	Basal	$1,07 \pm 0,05$	Nif	$0,95 \pm 0,05$	N,S	---
8	ACLMT	$2,45 \pm 0,23$	ACLMT+Nif	$1,89 \pm 0,17$	< 0,01	22,85
6	ACLMT	$2,64 \pm 0,43$	ACLMT+Nif+Lant	$1,66 \pm 0,33$	< 0,01	37,12

N.S. = não significativo em relação ao grupo controle; Nif = nifedipina; Lanth = lanthanum.

A nifedipina é um inibidor de canais lentos de cálcio (NATOCHIN *et al.*, 1991). Pode ser observado que a adição de nifedipina (0,1 mM) ao banho não alterou o fluxo basal de água. No entanto, nas bexigas experimentais que receberam ACLMT (20 nM) associada com nifedipina (0,1 mM) o fluxo de água foi de $1,89 \pm 0,17 \mu\text{l}/\text{min}$, enquanto nas bexigas

controle tratadas somente com ACLMT o valor observado para o fluxo de água foi de $2,45 \pm 0,23 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 7$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas).

Nessa mesma tabela também pode-se observar que a associação de lantânio (0,1 mM) com nifedipina (0,1 mM) inibiu significativamente o efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água. Nas bexigas controle que receberam somente ACLMT, o fluxo de água foi de $2,64 \pm 0,43 \mu\text{l}/\text{min}$, enquanto nas bexigas experimentais tratadas com ACLMT (20 nM) associada com lantânio (0,1 mM) e nifedipina (0,1 mM) o fluxo de água foi de $1,66 \pm 0,33 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 6$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa (amostras pareadas).

Efeito da associação de ACLMT com carbacol sobre o fluxo de água na ausência e na presença de vasopressina

Utilizamos o carbacol em nossos experimentos pelo fato de esse agente colinérgico afetar o transporte de água por meio de um mecanismo mediado pelo aumento da concentração do cálcio intracelular (ARRUDA & SABATINI, 1980). A Tabela 9 foi construída a partir do Protocolo Experimental descrito no Quadro 5.

Quadro 5

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
CONTROLE	Basal	Basal	ACLMT	Basal	ACLMT	ACLMT + AVP
EXPERIMENTAL	Basal	Carb	ACLMT + Carb	Basal	ACLMT + Carb	ACLMT + Carb + AVP

Carb = carbacol.

Tabela 9. Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com carbacol (0,1 mM) sobre o fluxo de água ($\mu\text{l}/\text{min}$) na ausência e na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo

n	Grupo controle	Fluxo	Grupo experimental	Fluxo	p
7	Basal	1,51 \pm 0,10	Carbacol *	2,61 \pm 0,42	< 0,01
8	ACLMT	2,65 \pm 0,43	ACLMT+Carb	2,64 \pm 0,40	N.S.
6	AVP	33,77 \pm 2,51	Carb+AVP **	26,05 \pm 3,17	< 0,01
6	ACLMT+AVP	22,50 \pm 2,30	ACLMT+Carb+AVP	22,80 \pm 3,27	N.S.

* % estimulação = 72,84 em relação ao grupo controle; ** % inibição = 22,86 em relação ao grupo controle; N.S. = não significativo em relação ao grupo controle; Carb = carbacol.

A Tabela 9 mostra que a adição isolada de carbacol (0,1 mM) ao banho das bexigas experimentais aumentou o fluxo de água de $1,51 \pm 0,10 \mu\text{l}/\text{min}$ para $2,61 \pm 0,42 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 7$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativo ($p < 0,01$; amostras pareadas). Nessa mesma tabela pode-se observar que o tratamento do grupo controle com ACLMT (20 nM) resultou em valores para o fluxo de água de $2,65 \pm 0,43 \mu\text{l}/\text{min}$, enquanto nas bexigas experimentais tratadas com ACLMT (20 nM) associada com carbacol (0,1 mM) o fluxo de água foi de $2,64 \pm 0,40 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 8$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente não significativa (amostras pareadas).

Utilizando-se o Protocolo Experimental descrito no Quadro 7, a Tabela 9 mostra que o carbacol (0,1 mM) adicionado isoladamente ao banho das bexigas experimentais causou significativo bloqueio da ação hidrosmótica da vasopressina (10 mU/ml de banho), e o fluxo de água nas hemi-bexigas controle foi de $33,77 \pm 2,51 \mu\text{l}/\text{min}$, enquanto o fluxo de água nas bexigas experimentais foi de $22,80 \pm 3,27 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 6$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas).

Nessa mesma tabela pode ser observado que na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) o fluxo de água foi de $22,80 \pm 3,27 \mu\text{l}/\text{min}$ nas bexigas experimentais tratadas com ACLMT (20 nM) associada com carbacol (0,1 mM), enquanto nas bexigas controle, que receberam somente ACLMT (20 nM), o fluxo de água foi de $22,50 \pm$

2,30 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 6$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente não significativa (amostras não pareadas).

Efeito da associação da ACLMT com trifluoperazina sobre o fluxo de água na ausência e na presença de vasopressina

Para verificar a possível participação do complexo cálcio-calmodulina no efeito da ACLMT sobre o transporte de água, foi utilizado trifluoperazina (TFP), um antagonista de calmodulina (LEVINE, KACHADORIAN & LEVIN, 1981). A Tabela 10 foi elaborada a partir do Protocolo Experimental descrito no Quadro 7.

Quadro 7

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos					
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o
CONTROLE	Basal	Basal	ACLMT	Basal	TFP	TFP + AVP
EXPERIMENTAL	Basal	TFP	ACLMT + TFP	Basal	ACLMT + TFP	TFP + ACLMT + AVP

TFP = trifluoperazina.

Tabela 10. Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com trifluoperazina (10 µM) sobre o fluxo de água (µl/min) na ausência e na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo

n	Grupo controle	Fluxo	Grupo experimental	Fluxo	p	% inibição
7	Basal	1,33 ± 0,17	Trifluoperazina	1,05 ± 0,13	N.S	---
7	ACLMT	2,40 ± 0,21	TFP+ACLMT	2,13 ± 0,17	< 0,01	11,25
6	AVP	31.94 ± 1.70	AVP+TFP	16.02 ± 1.50	< 0,01	49,60
6	ACLMT+AVP	26.40 ± 2.03	AVP+TFP+ACLMT	10.36 ± 1.15	< 0,01	60,70

N.S. = não significativo em relação ao grupo controle; TFP = trifluoperazina.

A Tabela 10 mostra que a adição isolada de trifluoperazina não modificou o fluxo basal de água. No entanto, quando ACLMT (20 nM) associado com TFP (10 μ M) foi adicionado ao banho das bexigas experimentais, o fluxo de água foi de $2,13 \pm 0,17$ μ l/min, enquanto nas bexigas controle tratadas somente com ACLMT (20 nM) o fluxo de água foi de $2,40 \pm 0,21$ μ l/min (n = 7), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa.

Essa mesma tabela mostra que TFP (10 μ M) reduziu significativamente o transporte de água mediado pela vasopressina, como anteriormente descrito por LEVINE, KACHADORIAN & LEVIN (1981). Quando foi adicionada ACLMT (20 nM) associada com TFP (10 μ M) ao banho das bexigas experimentais, o fluxo de água foi de $10,36 \pm 1,15$ μ l/min, enquanto nas bexigas controle tratadas somente com ACLMT o fluxo de água foi de $26,40 \pm 2,03$ μ l/min, sendo a diferença entre as médias estatisticamente diferente ($p < 0,01$; amostras pareadas). A inibição observada nas bexigas tratadas com ACLMT + TFP foi maior do que em relação a inibição causada pela TFP isolada ($P < 0,01$; amostras não-pareadas).

Efeito da associação da ACLMT com colchicina sobre o fluxo de água na ausência e na presença de vasopressina

Para verificar o possível envolvimento dos microtúbulos no efeito da ACLMT sobre o transporte de água, foi utilizado colchicina, um agente conhecido por sua capacidade de inibir a polimerização dos microtúbulos

das células granulares da bexiga urinária de sapo (TAYLOR *et al.*, 1978). A Tabela 11, elaborada a partir do Protocolo Experimental descrito no Quadro 8, mostra que a colchicina (10^{-5} M) não alterou o fluxo basal de água. No entanto, a colchicina (10^{-5} M) reduziu significativamente o efeito da ACLMT (20 nM) sobre a permeabilidade da membrana para água ($p < 0,05$; amostras pareadas).

Quadro 8

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
CONTROLE	Basal	Basal	ACLMT	Basal	Colch	Colch + AVP
EXPERIMENTAL	Basal	Colch	ACLMT + Colch	Basal	ACLMT + Colch	Colch + ACLMT + AVP

Colch = colchicina.

Tabela 11. Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com colchicina (10^{-5} M) sobre o fluxo de água ($\mu\text{l}/\text{min}$) na ausência e na presença de vasopressina (10 mU/ml de banho) em bexiga de sapo

n	Grupo controle	Fluxo	Grupo experimental	Fluxo	p	% inibição
6	Basal	$1,07 \pm 0,35$	Colchicina	$1,13 \pm 0,16$	N.S	---
7	ACLMT	$2,42 \pm 0,17$	Colchicina+ACLMT	$1,91 \pm 0,09$	$< 0,05$	21,07
6	AVP	$33,23 \pm 1,93$	AVP+Colchicina	$15,90 \pm 1,80$	$< 0,01$	52,20
8	AVP + ACLMT	$25,55 \pm 1,60$	AVP+Colch+ACLMT	$8,40 \pm 1,86$	$< 0,01$	67,10

N.S. = não significativo em relação ao grupo controle; Colch = colchicina.

Essa mesma tabela mostra que a colchicina (10^{-5} M) reduziu o efeito hidrosmótico da vasopressina (10 mU/ml de banho), de acordo com os resultados anteriormente descritos por outros autores (TAYLOR *et al.*, 1978). O efeito inibitório da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina foi potencializado na presença de colchicina (10^{-5} M). O fluxo de água estimulado pelo hormônio antidiurético nas bexigas controle tratadas somente com ACLMT foi de 25.55 ± 1.60 μ l/min, enquanto nas bexigas experimentais tratadas com ACLMT + colchicina o fluxo de água foi de 8.40 ± 1.86 μ l/min (n = 8), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativo (p < 0,01; amostras pareadas). A inibição observada nas bexigas tratadas com ACLMT + colchicina foi maior do que em relação à inibição causada pela colchicina isolada (P < 0,01; amostras não-pareadas).

Efeito da associação da ACLMT com colchicina sobre a ação hidrosmótica do AMPc

A Tabela 12, elaborada a partir do Protocolo Experimental descrito no Quadro 9, mostra que a colchicina (10^{-5} M) reduziu o efeito hidrosmótico do AMPc (2 mM). Esses dados estão de acordo com os resultados anteriormente descritos por TAYLOR *et al.* (1978). Pode ser observado nessa mesma tabela que, na presença do nucleotídeo (2 mM), a adição de ACLMT (20 nM) associada com colchicina (10^{-5} M) ao banho das bexigas experimentais resultou em valores para o fluxo de água de 3.00 ± 1.35 μ l/min, enquanto nas bexigas controle o fluxo de água foi de 7.77 ± 1.57 μ l/min ($n = 7$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente diferente ($p < 0,01$; amostras pareadas). A inibição observada nas bexigas tratadas com ACLMT + colchicina foi maior do que em relação à inibição causada pela colchicina isolada ($P < 0,01$; amostras não-pareadas).

Quadro 9

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos			
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o
CONTROLE	Basal	Colch	Colch+AMPc	Basal
EXPERIMENTAL	Basal	Colch+ACLMT	Colch+ACLMT+AMPc	Basal

Colch = colchicina.

Tabela 12. Efeito da associação da ACLMT (20 nM) com colchicina (10^{-5} M) sobre a ação hidrosmótica do AMPc (2 mM) em bexiga de sapo. Fluxo de água em μ l/min

n	Grupo controle	Fluxo	Grupo experimental	Fluxo	p	% inibição
6	AMPc	$9,12 \pm 0,67$	Colchicina+AMPc *	$4,58 \pm 0,39$	$< 0,01$	49,78
7	ACLMT+AMPc	7.77 ± 1.57	Colch+ACLMT+AMPc **	3.00 ± 1.35	$< 0,01$	61.40

Colch = colchicina.

Efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da forskolina na presença de indometacina

A indometacina foi utilizada para verificar a possível participação das prostaglandinas na resposta da bexiga urinária de sapo para ACLMT. Esse agente é um conhecido inibidor das enzimas ciclooxygenases (BURCH & HALUSHKA, 1981). A Tabela 13 mostra os resultados obtidos de acordo com o Protocolo Experimental descrito no Quadro 10.

A adição isolada de indometacina (10 μ M) não modificou o fluxo basal de água. A indometacina também não alterou o efeito da ACLMT (20 nM) sobre o fluxo basal de água. Entretanto, quando o fluxo de água foi estimulado com forskolina (2 μ M), as bexigas controles tratadas com ACLMT (20 nM) apresentaram fluxo de água de $22,45 \pm 3,25$ μ l/min, enquanto as bexigas experimentais, que foram tratadas com ACLMT (20 nM) associada com indometacina (10 μ M), apresentaram fluxo de água de $27,85 \pm 2,70$ μ l/min (n = 8), sendo essa diferença estatisticamente significativa (p < 0,01; amostras pareadas).

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
CONTROLE	Basal	Basal	ACLMT	Basal	ACLMT	ACLMT + Forscolina
EXPERIMENTAL	Basal	Ind	Ind + ACLMT	Basal	Ind + ACLMT	ACLMT + Ind + Forscolina

Quadro 10

Ind = indometacina.

Tabela 13. Efeito da ACLMT (20 nM) sobre a ação hidrosmótica da forscolina (2 µM) na presença de indometacina (10 µM) em bexiga de sapo. Fluxo de água em µl/min

n	Grupo controle	Fluxo	Grupo experimental	Fluxo	p
9	Basal	1,35 ± 0,20	Indometacina	1,65 ± 0,20	N.S
7	ACLMT	2,62 ± 0,30	ACLMT+Ind	2,47 ± 0,27	N.S.
8	ACLMT+Forscolina	22,45 ± 3,25	ACLMT+Ind+Forscolina	27,85 ± 2,70	< 0,01

N.S. = não significativo em relação ao grupo controle; Ind = indometacina.

Efeito da ACLMT recombinante sobre o fluxo basal de água

Utilizando-se o Protocolo Experimental descrito no Quadro 10, a Tabela 14 mostra que a ACLMT recombinante (10 nM) na forma de proteína de fusão (MBP-ACLMT) aumentou significativamente o fluxo basal de água. A adição isolada da toxina recombinante (10 nM) ao banho das bexigas experimentais resultou em valores para o fluxo de água de $2,28 \pm 0,22 \mu\text{l}/\text{min}$, enquanto nas bexigas controle o fluxo de água foi de $1,21 \pm 0,07 \mu\text{l}/\text{min}$ ($n = 8$), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ($p < 0,01$; amostras pareadas). Pode-se observar nessa mesma tabela que a adição isolada de 10 nM da proteína ligadora de maltose (MBP) não modificou o fluxo basal de água (amostras pareadas).

Quadro 10

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos				
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o
CONTROLE	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal
EXPERIMENTAL	Basal	ACLMTrec	Basal	MBP	Basal

ACLMTrec = ACL miotoxina recombinante; MBP = proteína ligadora de maltose.

ACLMTrec = ACL miotoxina recombinante; MBP = proteína ligadora de maltose

Tabela 14. Efeito da ACLMT recombinante sobre o fluxo basal de água em bexiga de sapo

n	Concentração na solução de banho	Fluxo de água ($\mu\text{l}/\text{min}$)		p	% aumento
		Control	ACLMTrec		
MBP-rACLMT					
8	10 nM	1,21 \pm 0,07	2,28 \pm 0,22**	< 0,01	88,42
MBP					
8	10 nM	1,33 \pm 0,05	1,30 \pm 0,03	N.S.	---

(maltose binding protein); N.S. = não significativa em relação ao grupo controle

Efeito dos peptídeos sintéticos derivados da região C-terminal da ACLMT do veneno da serpente Agkistrodon contortrix laticinctus e da PLA₂ Lys49 do veneno da Agkistrodon piscivorus piscivorus

Para verificar se a região C-terminal (resíduos 115-129) das PLA₂ Lys49 miotoxinas afeta o transporte de água foram utilizados peptídeos sintéticos correspondentes à região C-terminal de duas miotoxinas isoladas de serpentes da espécie *Agkistrodon*: um peptídeo derivado da ACLMT (p-ACLLys49) e um peptídeo da PLA₂ Lys49 do veneno da *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (p-AppLys49). Conforme o Protocolo Experimental descrito no Quadro 11, a Tabela 15 mostra que a adição 10 µM do peptídeo (p-ACLLys49) não modificou o fluxo basal de água em relação ao grupo controle (amostras pareadas). Essa tabela mostra ainda que o peptídeo (p-AppLys49) adicionado em várias concentrações (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM e 5 µM) também não modificou o transporte de água.

Quadro 11

HEMI-BEXIGAS	Período de 30 minutos		
	1 ^o	2 ^o	3 ^o
CONTROLE	Basal	Basal	Basal
EXPERIMENTAL	Basal	Peptídeo	Basal

Tabela 15. Efeito dos peptídeos sintéticos derivados da ACLMT e da AppLys49 sobre o fluxo basal de água em bexiga de sapo

n	Concentração na solução de banho	Fluxo de água (µl/min)		p	% aumento
6	p-ACLLys49	Controle	p-ACLLys49		
	10 µM	1,19 ± 0,21	1,20 ± 0,14	N.S.	---
	p-AppLys49	Controle	p-AppLys49		
6	1 nM	1,10 ± 0,20	1,15 ± 0,25	N.S.	---
6	10 nM	1,30 ± 0,15	1,15 ± 0,10	N.S.	---
7	100 nM	1,02 ± 0,11	1,05 ± 0,06	N.S.	---
8	1000 nM	1,27 ± 0,07	1,46 ± 0,06	N.S.	---
6	5 µM	1,30 ± 0,10	1,26 ± 0,14	N.S.	---

p-ACLLys49 = peptídeo derivado da região 115-129 da PLA₂Lys49 do veneno da *Agkistrodon contortrix laticinctus*; p-AppLys49 = peptídeo derivado da região 115-129 da PLA₂Lys49 do veneno da *Agkistrodon piscivorus piscivorus*.

Efeito da ACLMT sobre a bexiga urinária de sapo: Análise histopatológica

Aparentemente não houve mudança no aspecto morfológico do tecido epitelial exposto a ACLMT (Figuras 6B e D). No entanto, nas bexigas expostas à toxina, as fibras musculares lisas que recobrem o tecido mostraram desorganização miofibrilar com hipercontração das miofibrilas, sugerindo necrose (Figuras 7B e D).

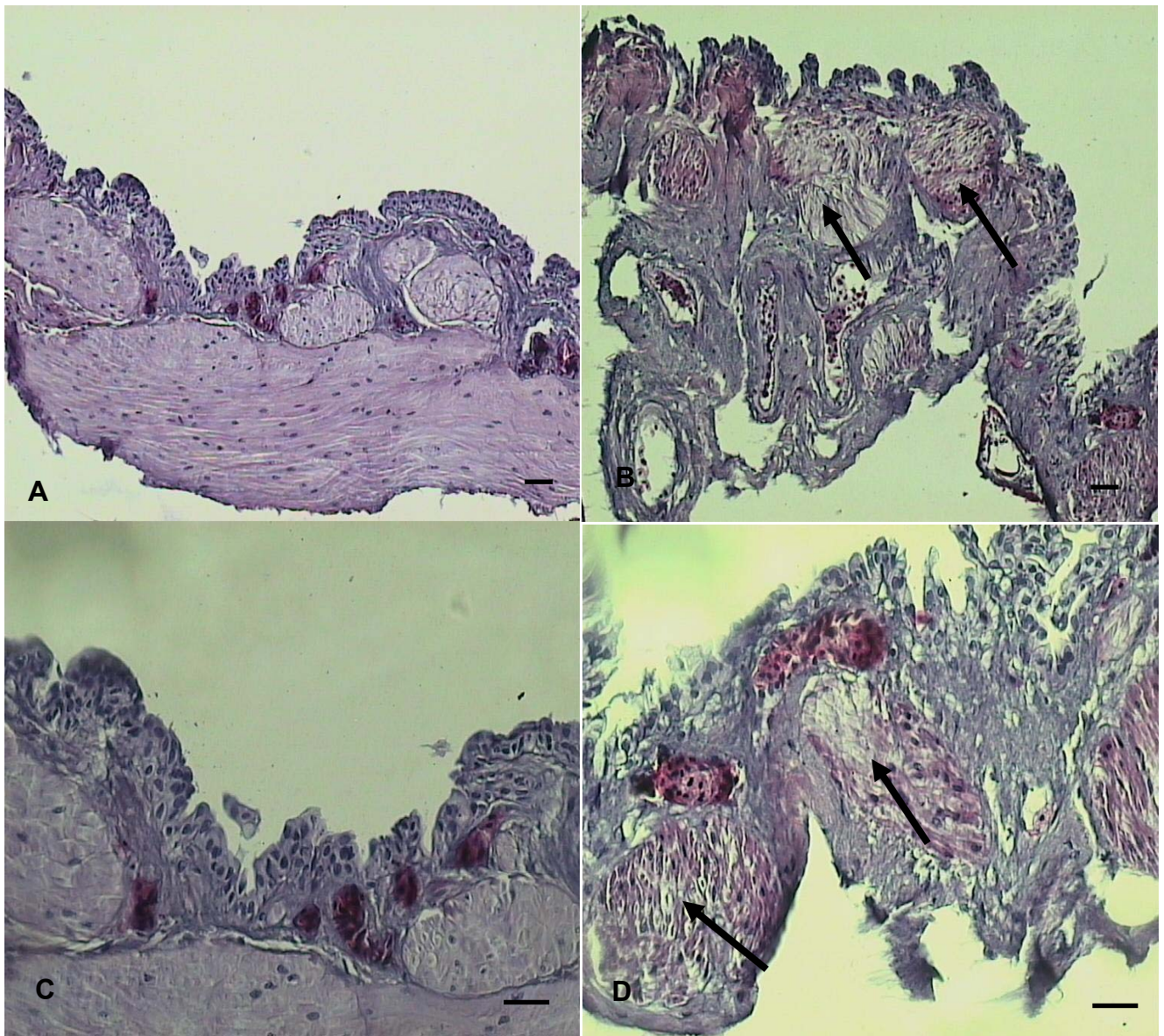


Figura 6: Secção transversal da bexiga urinária de sapo. A e C grupo controle; B e D bexiga exposta a ACLMT. Note que o tecido epitelial não apresenta diferença em relação ao controle, enquanto que as alterações são observadas no tecido muscular (setas). Coloração com hematoxilina-eosina. Barra de escala: 10 μ m em A e B e 20 μ m em C e D.

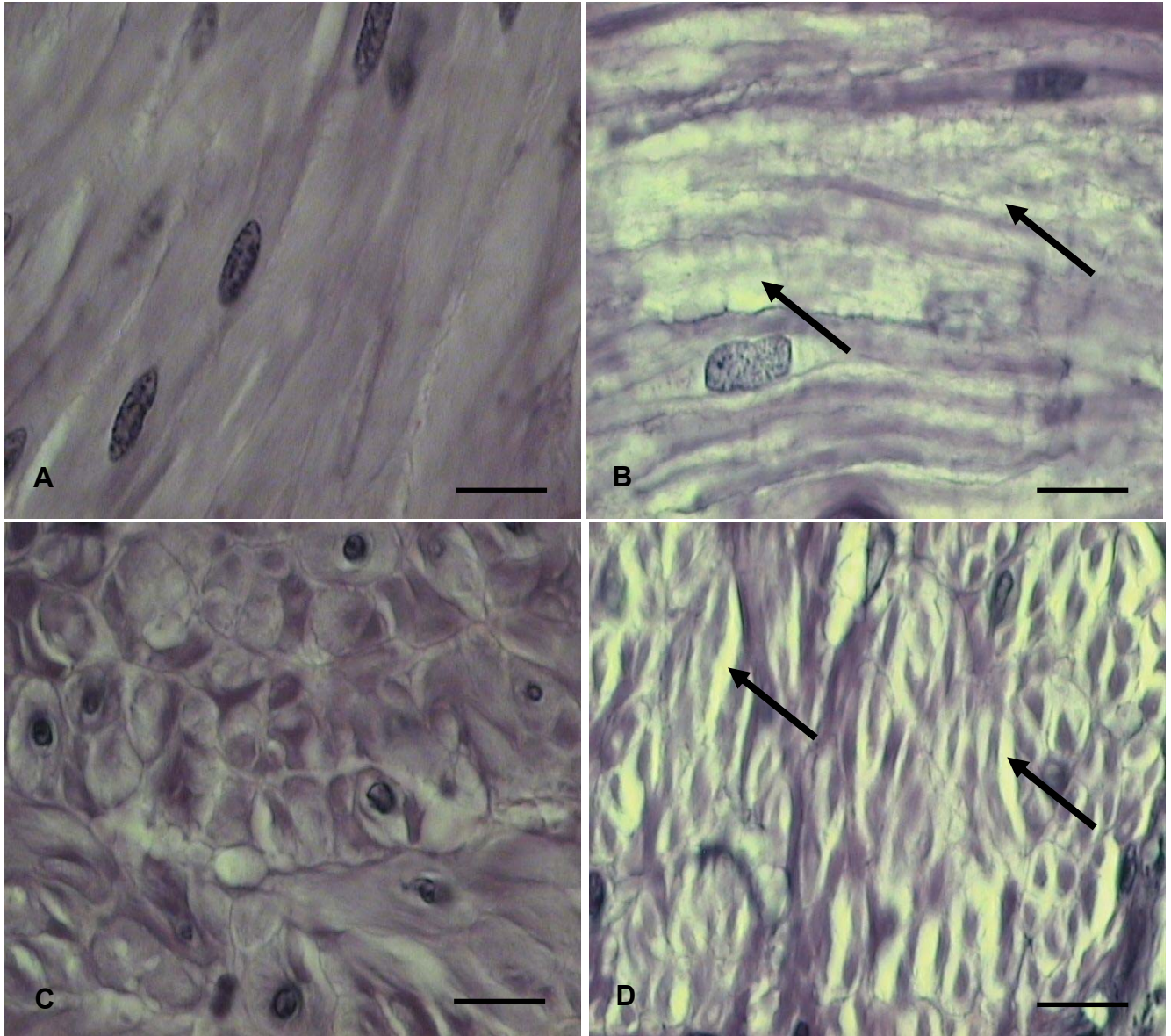


Figura 7: Secção longitudinal (A e B) e transversal (C e D) do tecido muscular liso da bexiga de sapo. Grupo controle (A e C) e exposto a ACLMT (B e D). Note que a fibra muscular lisa exposta a ACLMT (B e D) apresenta sinais de necrose em relação ao grupo controle (A e C). As setas indicam lesões na fibra muscular lisa; Coloração com hematoxilina-eosina; escala em 100 μm .

DISCUSSÃO

A analogia morfológica, filogenética e funcional existente entre a porção distal (ducto coletor) do néfron dos mamíferos e a bexiga urinária dos anfíbios possibilita o uso desse epitélio como modelo para o estudo do transporte de água e eletrólitos através de membranas biológicas (VERKMAN *et al.*, 1996).

Em relação à metodologia utilizada para a determinação do fluxo de água, pode-se afirmar que a técnica de Bentley, em razão da simplicidade e, principalmente, de sua reprodutibilidade, vem sendo largamente empregada. Possíveis fontes de erro, como a secagem durante as pesagens e as variações do tônus muscular da bexiga, não levam a alterações significativas da medida do fluxo, visto que a variação de peso decorrente do transporte da água é bem maior que a variação decorrente das citadas interferências (HANDLER, BESINGER & ORLOFF, 1968).

Uma crítica que pode ser feita a esse sistema é que ele trabalha com um gradiente de pressão osmótica que não é mantido constante, o qual poderia ser reduzido durante o próprio período experimental. Entretanto, em nossos experimentos foi verificado que no intervalo de 30 minutos o gradiente osmótico inicialmente estabelecido não se alterou significativamente, pois o fluxo seguiu proporcionalmente o período de leitura, confirmando, assim, os dados encontrados na literatura (SILVEIRA *et al.*, 1975).

Outra crítica em relação à técnica de Bentley é a não utilização de bexigas do mesmo porte (presumivelmente da mesma área) para comparar os resultados. A metodologia proposta por FRANCO (1991) utilizou o epitélio urinário de bexiga na forma de lâmina, o que permitiu quantificar com exatidão a área da membrana disponível para o transporte de água, possibilitando, então, a obtenção de valores mais precisos para o coeficiente de permeabilidade osmótica, mostrando, quando comparada com o estudo na forma de "lobos", a consolidação dos resultados obtidos pela técnica de BENTLEY.

Miotoxicidade, bem como outras atividades tóxicas das Lys49 PLA₂s, são atribuídas a sua capacidade de alterar a integridade da membrana em uma variedade de alvos naturais e artificiais (LOMONTE, ÂNGULO & CALDERÓN, 2003). Entretanto, o mecanismo de ação das PLA₂s Lys49 miotoxinas na indução de necrose das células musculares não tem sido conclusivamente determinado (OWNBY *et al.*, 1999). Tem sido proposto que as PLA₂s Lys49 miotoxinas podem danificar a membrana, desorganizando a bicamada lipídica e, conseqüentemente, afetando o influxo de Na⁺ e Ca⁺, promovendo a mionecrose (OWNBY *et al.*, 1999).

Uma PLA₂ Lys49 miotóxica do veneno da *Trimeresurus flavoviridis* e BthTX-I despolarizam células musculares esqueléticas. A despolarização é dependente de cálcio, porém não é necessária para a miotoxicidade, uma vez que algumas miotoxinas, como uma PLA₂ Asp49 miotoxina do veneno da *Trimeresurus flavoviridis*, não causam despolarização. A miotoxicidade da ACLMT e de uma PLA₂ Lys49 do

veneno da serpente *Bothrops nummifer* tem-se mostrado dependente de Na^+ , sugerindo um papel para os canais de sódio no efeito tóxico das PLA_2 s Lys49 miotoxinas (JOHNSON & OWNBY, 1993).

ACLMT e BthTX-I (uma PLA_2 Lys49 miotóxica do veneno da *Bothrops jararacussu*) têm-se mostrado capazes de alterar a regulação do cálcio em preparações de retículo sarcoplasmático isolado de músculo esquelético por um mecanismo ainda não muito bem definido. Ruthenium red, um bloqueador do receptor ryanodine, inibiu a ação da ACLMT e da BthTX-I sobre a regulação do cálcio, sugerindo que essas miotoxinas estimulam a abertura dos canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático (FLETCHER *et al.*, 1996; RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 1995).

Bmtx-I é uma PLA_2 Lys49 isolada do veneno da serpente *Bothrops moojeni*. Foi demonstrado que essa miotoxina provoca intensas alterações na fisiologia de rim isolado de rato, incluindo diminuição da resistência vascular associada com diurese, natriurese e kaliurese (BARBOSA *et al.*, 2002). Entretanto, o efeito das PLA_2 s Lys49 miotoxinas sobre o transporte de água e eletrólitos através de membranas biológicas é pouco conhecido.

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que uma PLA_2 Lys49 miotóxica, a ACLMT, modifica o transporte de água em tecido epitelial isolado, a bexiga urinária de sapo. A ACLMT aumenta o fluxo basal de água e inibe parcialmente a ação hidrosmótica da vasopressina. Uma vez que esses efeitos foram totalmente reversíveis, nossos resultados sugerem que o efeito da ACLMT sobre o transporte de água

pode ser mediado por eventos moleculares reversíveis, os quais interferem nos mecanismos de transporte sem afetar a integridade funcional do epitélio urinário de sapo. Além disso, o efeito da ACLMT sobre o transporte de água ocorre somente quando a toxina é adicionada à solução de banho, ou seja, em contato com a face serosa do epitélio. Quando a toxina foi adicionada dentro da preparação, isto é, em contato com a face mucosa do epitélio, não houve alteração significativa do transporte água nem na ausência nem na presença de vasopressina. Uma vez que um único tipo de célula é responsável pelo transporte de água e eletrólitos nesse epitélio (LEAF, 1982; TAYLOR *et al.*, 1987), a superfície da membrana das células granulares pode ser o sítio de interação da ACLMT com a bexiga urinária de sapo.

A análise histológica da bexiga de sapo revelou que a ACLMT causou hipercontração das miofibrilas com aparente necrose das células musculares lisas que recobrem a bexiga urinária de sapo. No entanto, o epitélio parece não ser afetado pela toxina. Além disso, o efeito da ACLMT sobre o transporte de água na bexiga de sapo foi mostrado ser reversível. Esses resultados sugerem que os efeitos da ACLMT sobre o transporte de água em bexiga urinária de sapo se devem principalmente à atuação da toxina sobre a maquinaria bioquímica do tecido. Foi demonstrado que as alterações no tônus da musculatura lisa da bexiga não levam a significativas mudanças na medida do fluxo de água através da bexiga urinária de sapo (HANDLER, BESINGER & ORLOFF, 1968; HARDY & DIBONA, 1982), essas observações reforçam a sugestão que a

ACLMT afeta as vias bioquímicas das células responsáveis pelo transporte de água na bexiga urinária de sapo.

A vasopressina exerce seu efeito sobre a permeabilidade à água via receptor acoplado a adenilato ciclase com subsequente geração de AMPc (HAYS, 1996). Se a ACLMT agisse unicamente inibindo a geração de AMPc estimulada pela vasopressina, então ela não deveria ter efeito sobre a resposta hidrosmótica para o AMPc e para o 8-CPT-AMPc. Esses nucleotídeos mimetizam o efeito hidrosmótico da vasopressina, estimulando o transporte de água em um passo posterior à ativação de adenilciclase. Se, por outro lado, o efeito da ACLMT ocorrer após a geração do AMPc, então a ACLMT também deveria inibir o efeito desses agentes hidrosmóticos. A ACLMT inibiu significativamente a ação hidrosmótica de ambos os nucleotídeos (AMPc e 8-CPT-cAMP). Esses resultados sugerem que o efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina na bexiga de sapo ocorre em um passo posterior à geração do AMPc.

Para verificar se o efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina também ocorre em um passo anterior à formação do AMPc, foi utilizado forskolina, um ativador de adenilato ciclase. A resposta hidrosmótica da bexiga de sapo para forskolina foi significativamente reduzida na presença de ACLMT, sugerindo que o efeito inibitório da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina pode ocorrer em um passo anterior à formação do AMPc. Portanto, nossos resultados sugerem que o efeito inibitório da ACLMT sobre o transporte de água mediado

pelos agentes hidrosmóticos pode ocorrer em sítios antes e após a formação do AMPc.

Para determinar o mecanismo pelo qual a ACLMT afeta o transporte de água, o papel do cálcio foi investigado. Em muitos sistemas biológicos, lantânio antagoniza os efeitos do cálcio, por isso tornou-se uma útil ferramenta para estudar o papel do cálcio em diversos processos fisiológicos, incluindo fenômenos de transporte em bexiga urinária de sapo (HARDY, 1978; LEITE & FRANCO, 2001). O efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água e sobre a ação hidrosmótica da vasopressina foi reduzido na presença de lantânio. Esses resultados sugerem que o efeito da ACLMT sobre transporte de água pode ser mediado pelo aumento do cálcio citossólico. Além disso, o efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água foi significativamente reduzido na presença de nifedipine, um bloqueador de canais lentos de cálcio (NATOCHIN *et al.*, 1991), sugerindo que pode ocorrer a estimulação do influxo de cálcio via canais sensíveis à nifedipina. Esses resultados sugerem que o cálcio do meio externo também está envolvido no efeito da ACLMT. Portanto, esse efeito parece ser mediado pelo aumento da liberação de cálcio dos estoques intracelulares e pela estimulação do influxo de cálcio através da membrana das células granulares da bexiga de sapo.

A bexiga urinária de anfíbios contém uma população heterôgenea de receptores, com as mais diversas funções. Os receptores muscarínicos dos subtipos M₁ e M₃, envolvidos na mobilização do cálcio intracelular (via cascata fosfoinositídeo), estão presentes nesse epitélio (LEITE & FRANCO, 2001). Carbacol é um agonista colinérgico inespecífico. Esse

agente liga-se aos receptores muscarínicos M_1 e M_3 , causando a elevação do cálcio citossólico, que, por sua vez, aumenta o fluxo basal de água e reduz parcialmente a ação hidrosmótica do hormônio antidiurético na bexiga de sapo (ARRUDA & SABATINI, 1982). Se a ACLMT modula o transporte de água aumentando o cálcio citossólico, então os efeitos da ACLMT e do carbacol não deveriam ser aditivos. Por outro lado, se a ACLMT age por meio de um mecanismo não relacionado ao aumento do cálcio citossólico, então os efeitos desses dois agentes deveriam ser aditivos. Entretanto, nossos resultados mostraram que os efeitos da ACLMT e do carbacol não foram aditivos, sugerindo que ACLMT e carbacol agem por meio de um mecanismo similar.

Exocitose é uma característica comum da liberação de neurotransmissores e da secreção de glândulas, as quais têm sido descritas como fenômenos mediados pelo cálcio. Alguns autores têm sugerido que o comportamento da bexiga urinária de sapo é semelhante ao de uma glândula, e a exocitose está relacionada às mudanças na permeabilidade induzida pelo hormônio (MASUR, HOLTZMAN & WALTER, 1972; HAYS, FRANKI & SIMON, 1994).

O cálcio citossólico está envolvido no controle da permeabilidade basal de água e na ação hidrosmótica da vasopressina em bexiga urinária de sapo e ducto coletor de mamíferos (HARDY, 1978; TAYLOR *et al.*, 1987). O aumento da concentração do cálcio intracelular liberado do retículo endoplasmático pelo mensageiro inositol trifosfato, ou pelo ionóforo de cátions A-23187, provoca aumento no transporte de água independente do AMP_c em bexiga de sapo (HARDY, 1978; TAYLOR *et*

al., 1987). Por outro lado, quando o cálcio citossólico é aumentado, esse íon passa a atuar como modulador negativo da ação hidrosmótica do hormônio antidiurético, inibindo a síntese e os efeitos do AMPc (SCHOLONDORFF & LEVINE, 1985; LEVINE *et al.*, 1981). Além disso, o íon cálcio intracelular está envolvido no controle de processos dependentes de estruturas citoesqueléticas em células epiteliais, exercendo importante papel no controle da polimerização de microtúbulos e microfilamentos, como também em suas interações e organização tridimensional (TAYLOR *et al.*, 1987). A concentração de cálcio *in vitro* abaixo de 10^{-6} M induz a polimerização de microtúbulos, a estabilização e a ligação cruzada dos microfilamentos de actina, enquanto a concentração acima de 10^{-6} M induz a despolimerização de microtúbulos, o corte e a interrupção das redes de actina (DEDMAN, BRINKLEY & MEANS, 1979; PEARL & TAYLOR, 1985). Tem sido descrito que a elevação da concentração do cálcio citossólico acima de 10^{-6} M pode interromper a barreira de microfilamentos de actina localizada abaixo da membrana apical das células granulares, onde se encontram as vesículas portadoras de canais de água (HOLMGREN, MAGNUSSON & FRANKI HOLMGREN, 1992). Com base nessas observações, nossos resultados sugerem que a ACLMT, por meio do cálcio, poderia induzir a incorporação dos canais de água na face interna da membrana apical das células granulares da bexiga urinária de sapo e, com isso, aumentar a permeabilidade da membrana à água.

O efeito inibitório da ACLMT sobre resposta hidrosmótica da bexiga para vasopressina pode ser explicado assumindo que o prévio aumento

na concentração do cálcio citossólico nas células granulares da bexiga urinária de sapo faz com que o hormônio cause poucas mudanças no cálcio citossólico, o que poderia reduzir parcialmente o efeito hidrosmótico da vasopressina.

A participação do complexo cálcio-calmodulina na ação hidrosmótica do hormônio antidiurético em bexiga de sapo tem sido descrita (ISHIKAWA, SAITO & KUZUYA, 1985). A inibição da calmodulina na bexiga de sapo por trifluoperazina diminui a atividade hidrosmótica do hormônio antidiurético e do AMP_c (LEVINE, KACHADORIAN & LEVIN, 1981), o que sugere a ação dessa droga após a formação do nucleotídeo.

Examinamos o papel do complexo cálcio-calmodulina no efeito da ACLMT sobre o transporte de água. A trifluoperazina, um inibidor específico de calmodulina, não modificou o fluxo basal de água. Por outro lado, a trifluoperazina reduziu significativamente o efeito da ACLMT sobre o transporte basal de água. Esses resultados sugerem que o efeito hidrosmótico da ACLMT pode ser mediado pela ativação do complexo cálcio-calmodulina. Além disso, é a primeira evidência, embora indireta, de que a ACLMT ativa o complexo cálcio-calmodulina em um tecido biológico *in vitro*. Assim, o aumento do cálcio citossólico induzido pela ACLMT, provavelmente, pode reorganizar as estruturas citoesqueléticas, microtúbulos e microfilamentos, promovendo a fusão das vesículas portadoras de canais de água na face interna da membrana apical e assim aumentando sua permeabilidade à água.

O complexo cálcio-calmodulina está envolvido nos processos de fusão dos canais de água dentro da membrana apical da bexiga de sapo

(LEVINE, KACHADORIAN & LEVIN, 1981; CHOU *et al.*, 2000). É provável que a ativação do complexo cálcio-calmodulina por ACLMT possa induzir a inserção de canais de água na membrana apical, aumentando sua permeabilidade à água. O complexo cálcio-calmodulina está envolvido em diversos processos regulatórios, incluindo ativação de proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina, ativação de quinase de cadeia leve, regulação de calcineurina e outras fosfatases e estimulação dos tipos I, III e VIII de adenilato ciclase (CHOU *et al.*, 2000). O complexo cálcio-calmodulina tem vários alvos regulatórios na célula, o que poderia envolver muitas vias de sinalização no mecanismo de ação da ACLMT sobre o transporte de água. Portanto, seria infrutífero buscar um papel específico para a calmodulina no efeito da ACLMT sobre o transporte de água.

Para verificar se o efeito inibitório do cálcio citossólico é mediado por calmodulina, examinamos o efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina na presença de trifluoperazina. Nossos resultados mostraram que a trifluoperazina inibe o efeito hidrosmótico da vasopressina, como descrito por outros autores (LEVINE, KACHADORIAN & LEVIN, 1981). No entanto, o efeito inibitório da ACLMT foi potencializado na presença de trifluoperazina, indicando que os efeitos de ambas sobre a ação hidrosmótica da vasopressina foram aditivos. Portanto, essas observações são consistentes com a visão de que o efeito inibitório do cálcio citossólico sobre a ação hidrosmótica da vasopressina não parece ser diretamente dependente de calmodulina.

Foi utilizada colchicina para estudar o papel dos microtúbulos no efeito da ACLMT sobre o transporte de água. A colchicina afeta a polimerização e a despolimerização de microtúbulos, bem como suas interações e sua organização tridimensional. Nossos resultados mostraram que a colchicina isolada não afeta o fluxo basal de água, porém o efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água foi reduzido na presença de colchicina. Esses resultados sugerem que o efeito da ACLMT sobre o transporte basal de água é dependente da integridade de microtúbulos.

Tem sido descrito que a colchicina inibe a resposta da bexiga de sapo para a vasopressina e para o AMPc (TAYLOR *et al.*, 1978). Os resultados do presente estudo confirmam essas observações. Os efeitos da colchicina e da ACLMT sobre o transporte de água mediado pela vasopressina são aditivos, sugerindo que seus mecanismos de ação na bexiga de sapo são independentes. Com base nesses resultados, o presente estudo sugere que o efeito da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina parece não depender da integridade dos microtúbulos.

Alguns autores descreveram que as PLA₂s Lys49 miotóxicas possuem atividade catalítica em condições especiais. Esses autores demonstraram a hidrólise de ácido araquidônico em membranas de fosfolípidios artificiais por diversas PLA₂s Lys49 miotóxicas, incluindo ACLMT, demonstrando, portanto, que essas miotoxinas são cataliticamente ativas (YAMAGUCHI *et al.*, 1997; FLETCHER & JIANG, 1998). Foi demonstrado que a ACLMT apresenta atividade enzimática

sobre membranas de células em cultura. Além disso, a ACLMT aumentou os níveis de ácidos graxos livres e de lisofosfatidilcolina sem efeito sobre o diacilglicerol (FLETCHER *et al.*, 1996).

As prostaglandinas participam da atividade regulatória da homeostasia hídrica em células epiteliais renais regulando a cascata de eventos gerada pela vasopressina por um mecanismo de feed-back negativo (HANDLER, 1981). Tem sido descrito em ducto coletor de mamíferos e bexiga urinária de sapo que as prostaglandinas regulam a atividade da adenilato ciclase por meio do farmacologicamente distinto receptor inibitório (EP₃) acoplado a proteínas G, a fim de inibir a formação do AMPc (PARNOVA *et al.*, 1997). Tem sido demonstrado que a prostaglandina E₂ exógena diminui o transporte de água mediado pela vasopressina em epitélio renal de mamíferos e em bexiga de sapo, inibindo a síntese de AMPc por meio de um receptor PGE acoplado à proteína G_i (SCHLONDORFF *et al.*, 1987; PARNOVA *et al.*, 1997). Nossos resultados mostram que as prostaglandinas não apresentam papel no efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água, visto que a indometacina não inibiu o efeito da ACLMT. No entanto, a ACLMT inibiu o transporte de água mediado pela forskolina e esse efeito foi significativamente reduzido na presença de indometacina. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório da ACLMT sobre a ação hidrosmótica da vasopressina pode ser mediado pelo aumento na síntese de prostaglandinas, as quais, por sua vez, interferem na geração de AMPc, provavelmente inibindo a atividade do complexo adenilato ciclase (PARNOVA *et al.*, 1997).

Os ácidos graxos são os principais produtos da atividade PLA₂, que altera a função de um grande número de íons, incluindo Na⁺, Ca⁺², Cl⁻ e K⁺ (WIELAND *et al.*, 1992). A atividade catalítica das PLA₂ Lys49 miotóxicas suporta diversos mecanismos de ação, os quais poderiam diminuir o efeito hidrosmótico da vasopressina. É difícil determinar quais eventos são causados diretamente pela miotoxina e quais são causados indiretamente pela liberação de ácidos graxos. Provavelmente, a atividade catalítica da ACLMT libera ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana das células da bexiga de sapo. Assim, a ciclooxigenase poderia metabolizar o ácido araquidônico em prostaglandinas, as quais modulam a ação hidrosmótica da vasopressina (SCHLONDORFF *et al.*, 1987). Nossos resultados sugerem que os ácidos graxos produzidos pela atividade catalítica da ACLMT podem afetar o transporte de água mediado pela vasopressina.

No entanto, o exato mecanismo de ação da ACLMT sobre o transporte de água mediado pela vasopressina não está conclusivamente determinado.

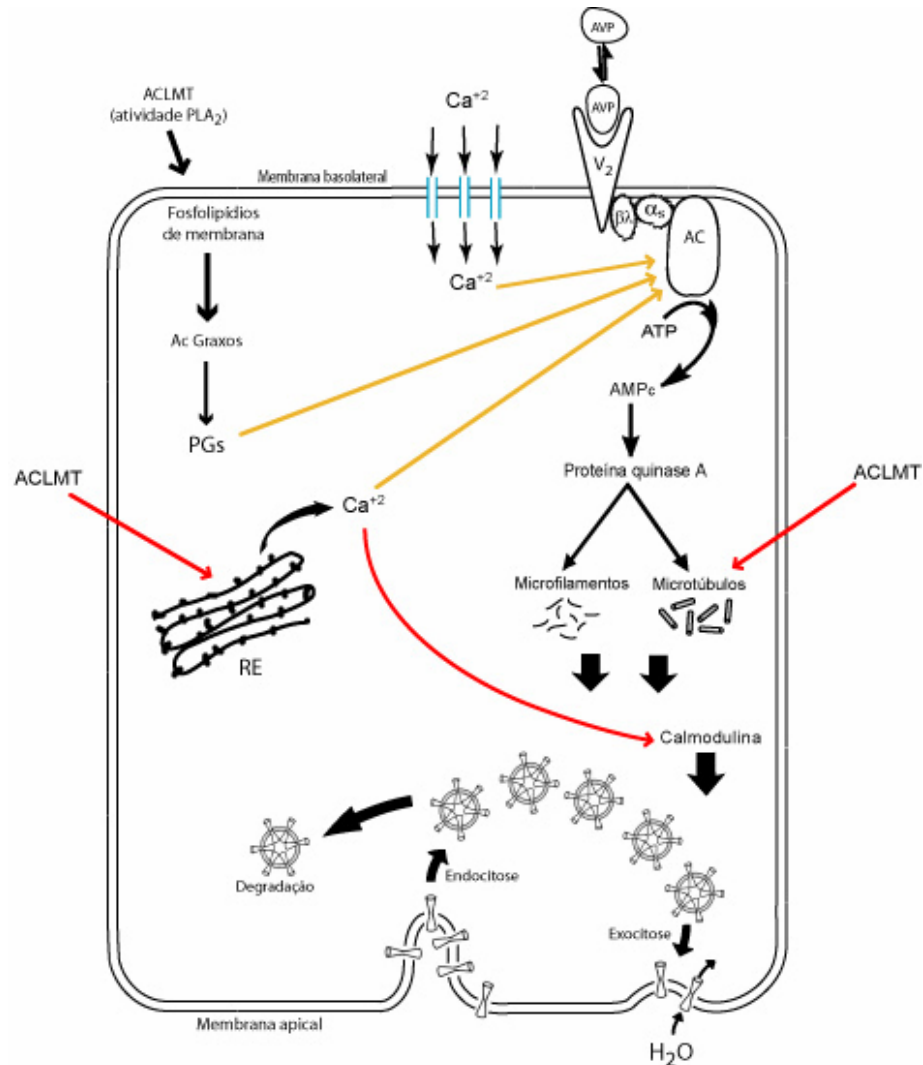


Figura 8: Esquema do mecanismo de ação da ACLMT sobre o transporte de água mediado pela vasopressina em células epiteliais da bexiga urinária de sapo. V₂ = receptor para vasopressina do subtipo V₂; AVP = arginina-vasopressina; AC = adenilato ciclase; AMPc = adenosina monofosfato cíclico; ATP = trifosfato de adenosina; PGs = prostaglandinas; RE = retículo endoplasmático; setas amarelas indicam inibição; setas vermelhas indicam estimulação.

Em nosso laboratório, foi desenvolvido um sistema de expressão em *E. coli* para a produção de formas recombinantes da ACLMT, como uma proteína de fusão com proteína ligadora de maltose. Essa proteína recombinante induziu um quadro de lesão bastante semelhante ao produzido pela toxina ACLMT nativa (GIULIANI *et al.*, 2001). Nossos experimentos mostraram que a adição da toxina recombinante (10 nM) ao banho das hemi-bexigas experimentais aumentou significativamente o fluxo basal de água. A adição de 10 nM da proteína ligadora de maltose (MBP) não modificou o fluxo basal de água, confirmando, assim, que o efeito sobre o transporte de água se deve à ACLMT recombinante e não à MBP. Esses resultados sugerem que a ACLMT recombinante foi expressa em uma forma ativa que possui atividade hidrosmótica sobre a bexiga de sapo, semelhante à ACLMT nativa.

Alguns autores têm sugerido que a região C-terminal (resíduos 115-129) das PLA₂s Lys49 miotoxinas tem importante papel no mecanismo de ação tóxico dessa família de proteínas (LOMONTE, ÂNGULO & SANTAMARÍA, 2003). Tem sido demonstrado que os peptídeos correspondentes à região C-terminal (resíduos 115-129) da PLA₂ Lys49 miotóxica do veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Agkistrodon piscivorus piscivorus* e *Agkistrodon contortrix laticinctus* exercem atividade citotóxica *in vitro* com concentrações na faixa de 95-580 µM. No entanto, somente os peptídeos das duas espécies de *Agkistrodon* foram capazes de reproduzir o efeito miotóxico das miotoxinas naturais *in vivo*. Por outro lado, nesse mesmo estudo, os peptídeos correspondentes à região C-terminal (resíduos 115-129) das

PLA₂s Lys49 miotóxicas do veneno de *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *Atropoides nummifer*, *Cerrophidion godmani* e *Vipera ammodytes ammodytes* não reproduziram o efeito citotóxico de suas respectivas toxinas naturais, o que levou esses autores a sugerirem que as atividades tóxicas das PLA₂ Lys49 miotoxinas não podem ser sempre reproduzidas pelos peptídeos derivados da região C-terminal. No entanto, suas atividades deveriam ser testadas em diferentes modelos experimentais, em cada caso particular, em razão da significativa variação na seqüência da região C-terminal dessas proteínas (LOMONTE, ÂNGULO & SANTAMARÍA, 2003).

Para verificar se a região C-terminal (resíduos 115-129) da ACLMT exerce alguma função em seu efeito sobre o transporte de água na bexiga de sapo diversos experimentos foram conduzidos com um peptídeo derivado da ACLMT (p-ACLLys49). Nesses experimentos, a adição ao banho do peptídeo numa concentração de 10 µM não modificou o fluxo basal de água. Portanto, esses resultados sugerem que a região C-terminal da ACLMT não tem papel relevante no efeito da ACLMT sobre o transporte de água na bexiga de sapo. Em outro grupo de experimentos foi testada a atividade de um peptídeo derivado da região C-terminal da PLA₂ Lys49 do veneno da *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (p-AppLys49). Os peptídeos foram avaliados em diferentes concentrações (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM, 5 µM), no entanto, não houve alteração significativa do fluxo basal de água. Esses resultados sugerem que a região C-terminal das PLA₂s Lys49 miotóxicas do veneno de serpentes da espécie *Agkistrodon* não afeta o transporte de água de células epiteliais *in*

vitro. Uma possível explicação seria que os peptídeos livres na solução de Ringer poderiam adotar uma conformação desfavorável para seu efeito sobre o transporte de água através da bexiga de sapo. Além disso, a participação de outras regiões da proteína (próximas ou distantes) no efeito sobre o transporte de água não pode ser excluída.

Há muitas semelhanças estruturais e funcionais entre a ACLMT, a miotoxina II do veneno da *Bothrops asper* e a miotoxina do veneno de *Bothrops nummifer*, sugerindo que essas toxinas devem ser quimicamente similares e, portanto, apresentar um mecanismo de ação também similar (JOHNSON & OWNBY, 1993). Isso é interessante, uma vez que a ACLMT foi isolada do veneno da *Agkistrodon contortrix laticinctus*, que pertence a um gênero diferente. É possível que miotoxinas com mecanismo de ação semelhante estejam presentes em um grande número de serpentes venenosas. Esse fato tem implicações no tratamento de tecido danificado pela picada de serpente, visto que se deseja obter soro antiveneno capaz de neutralizar esse dano, o qual pode ser causado por um grande número de espécies de serpentes. Além disso, seria possível antagonizar a mionecrose produzida pelas miotoxinas utilizando tratamento sem anticorpos se seu mecanismo de ação fosse conclusivamente determinado. O estudo do efeito das PLA₂s Lys49 miotoxinas sobre os fenômenos de transporte através de membranas biológicas pode abrir novas estratégias na pesquisa de um tratamento clinicamente útil para ajudar vítimas de acidentes ofídicos.

CONCLUSÕES

- A ACLMT aumenta a permeabilidade da membrana à água e diminui parcialmente a ação hidrosmótica da vasopressina, do AMPc e da forskolina.
- A ACLMT altera o transporte de água através do epitélio urinário de sapo por meio de eventos moleculares reversíveis sem afetar a integridade funcional do tecido.
- O efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água é mediado pelo aumento do cálcio citossólico e por calmodulina. Esse cálcio é proveniente do retículo endoplasmático e do meio externo, via canais sensíveis a nifedipina.
- O efeito da ACLMT sobre o fluxo basal de água depende da integridade do citoesqueleto, em particular dos microtúbulos.
- O efeito da ACLMT sobre o transporte de água em presença de vasopressina é mediado pelo aumento do cálcio citossólico e por prostaglandinas.
- O efeito da ACLMT sobre o transporte de água mediado pela vasopressina parece não depender da integridade dos microtúbulos e não está diretamente relacionado a calmodulina.
- A ACLMT recombinante reproduz o efeito hidrosmótico da ACLMT nativa.
- Os peptídeos correspondentes à região C-terminal das miotoxinas de duas espécies de *Agkistrodon* não afetam o transporte de água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIX, S.N. & WOODBURY, D.J. Phospholipase A₂ action on planer lipid bilayers generates a small, transitory current that is voltage independent. **Biophys. J.** v. 72, p. 247-253, 1997.
- ANGULO, Y. *et al.* Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 32, p. 63-71, 2000.
- ANGULO, Y. *et al.* Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 339, p. 260-267, 1997.
- ANGULO, Y. *et al.* Purification, sequencing, and phylogenetic analyses of novel Lys49 phospholipases A₂ from the venoms of rattlesnake and other pit vipers. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 394, p. 236-244, 2001.
- ANGULO, Y. *et al.* Phospholipases A₂ from *Callosellasma rhodostoma* venom gland. Cloning and sequencing of 10 of the cDNAs, three-dimensional modelling and chemical modifications of the major isozyme. **Eur. J. Biochem.** v. 267, p. 6684-6691, 2000.
- ARNI, R.K. *et al.* Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 366, p. 177-182, 1999.
- ARNI, R.K. & WARD, R.J. Phospholipase A₂ - A Structural Review. **Toxicon** v. 34, p. 827-841, 1996.
- ARRUDA, J.A.L. & SABATINI, S. Cholinergic modulation of water transport in the toad bladder. **Am. J. Physiol.** v. 239, (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 8), p. F154-F159, 1980.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M. *et al.* Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon** v. 23, p. 613-636, 1985.
- BARBOSA, P.S.F. *et al.* Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon** v. 40, p. 1427-1435, 2002.

- BAULIEU, E.E. & KELLY, P.A. Vasopressin and Ocitocin. In: **Hormones - From molecules to disease**. N.Y., Hermann Publishers, p. 283-301, 1990.
- BENTLEY, P.J. The effects of neurohypophysial extracts on the water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of toad, *Bufo Marinus*. **J. Endocrinol.** v. 17, p. 201-209, 1958.
- BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate and calcium signalling. **Nature.** p. 361-315, 1993.
- BIEBER, A.L., MCPARLAND, R.H. & BECKER, E.R. Amino acid sequence of myotoxins from *Crotalus viridis concolor*. **Toxicon** v. 25, p. 667-680, 1987.
- BORYCKI, V.A. *et al.* Structural responses to voltage clamping in the toad urinary bladder: The principal role in granular cells in the active transport of sodium. **J. Memb. Biol.** v. 60, p. 21-34, 1981.
- BURCH, R.M. & HALUSHKA, P.V. Inhibition of prostaglandin synthesis antagonizes the colchicines-induced reduction of vasopressin-stimulated water flow in the toad urinary bladder. **Mol. Pharmacol.** v. 21, p. 142-149, 1981.
- CATE, R.L. & BIEBER, A.L. Purification and characterization of Mojave (*Crotalus scutulatus*) toxin and its subunits. **Archs. Biochem. Biophys.** v. 189, p. 397-408, 1978.
- CHACUR, M. *et al.* Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon** v. 41, p. 667-678, 2003.
- CHEUNG, W.Y. Calmodulin: an overview. **Fed. Proc.** v. 41, p. 2253-2257, 1982.
- CHIOATO, L & WARD, R.J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon** v. 42, p. 869-883, 2003.
- CHOU, C.L. *et al.* Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct, **J. Biol. Chem.** v. 47, p. 36839-36846, 2000.
- CONDREA, E. Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins. **Experientia** v. 30, p. 121-129, 1974.

- DA SILVA GIOTTO, M.T. *et al.* Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologue. **Proteins-Structure Function and Genetics** v. 30, p. 442-454, 1998.
- DE AZEVEDO JR., W.F. *et al.* Structure of a Lys-49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper). **Toxicon** v. 37, p. 371-384, 1999.
- DE CASTRO, R.C. *et al.* Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon** v. 38, p. 1773-1785, 2000.
- DEDMAN, J.R., BRINKLEY, B.R. & MEANS, A.R. Regulation of microfilaments and microtubules by calcium and cyclic AMP. **Adv. Cyclic. Nucleotide Res.** v. 11, p. 131-174, 1979.
- DÍAZ, C. *et al.* The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochemic. Biophys. Acta** v. 1070, p. 455-460, 1991.
- DÍAZ, C., GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic PLA₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Archs. Biochem. Biophys.** v. 298, p. 135-142, 1992.
- DÍAZ, C. *et al.* Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Nat. Toxins** v. 3, p. 26-31, 1995.
- DIBONA, D.R., CIVAN, M.M. & LEAF, A. The anatomic sites of transepithelial permeability barriers of toad bladder. **J. Cell Biol.** v. 40, p. 1-7, 1969.
- DHILLON, D.S. *et al.* Comparison of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 phospholipases A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom. **Biochem. Pharmacol.** v. 36, p. 1723-1730, 1987.
- DUCHEN L. W. *et al.* Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre and regeneration. A light and electron microscopic study of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. **J. Neurol. Sci.** v. 21, p. 391-417, 1974.
- EDWARDS, R., TRIZNA, W. & KINTER, L. Renal microvascular effects of vasopressin and vasopressin antagonists. **Am. J. Physiol.** v. 256, p. F274-F278, 1989.

- ENGLE, M.L. *et al.* Characterization of two myotoxic proteins from the venom of *Crotalus viridis concolor*. **J. Toxicol.** v. 2, p. 267-283, 1983.
- FALCONI, M., DESIDERI, A. & RUFINI, S. Membrane-perturbing activity of *Viperidae* myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem. **J. Mol. Recognit.** v. 13, p. 14-19, 2000.
- FRANCO, W. Estudo do efeito da dobutamina (Dobutrex)^R e da radiação laser sobre a ação hidrosmótica da vasopressina em bexiga de sapo in vitro. **Tese de Doutorado** - Faculdade de Odontologia da UNICAMP, S.P., 1991.
- FLEER, E.A.M., VERHEIJ, H.M. & HAAS, G.H. Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂. **Europ. J. Biochem.** v. 113, p. 283-288, 1981.
- FLETCHER, J.E. & LIZZO, F.H. Contracture induction by snake venom cardiotoxin in skeletal muscle from humans and rats. **Toxicon** v. 25, p. 1003-1010, 1987.
- FLETCHER, J.E. *et al.* Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. **Toxicon** v. 34, p. 1301-1311, 1996.
- FLETCHER, J.E. & JIANG, M.S. Lys49 phospholipase A₂ myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. **Toxicon** v. 36, p. 1549-1555, 1998.
- FOHLMAN, J. & EAKER, D. Isolation and characterization of a lethal myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the common sea snake *Enhydrina schisotosa* causing myoglobinuria in mice. **Toxicon** v. 15, p. 385-393, 1977.
- FOSTER, S. & CARAS, A.R. A field guide to venomous animals and poisonous plants, **Houghton Mifflin Company**, Boston, N.Y., 1994.
- FOX, J.W., ELZINGA, M. & TU, A.T. Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin a isolated from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Biochemistry** v. 15, p. 678-684, 1979.
- GEOGHEGAN, *et al.* Characterization of a basic phospholipase A₂-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina. **Toxicon** v. 37, p. 1735-1746, 1999.

- GIULIANI, C.D. *et al.* Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A₂ myotoxin in bacteria. **Toxicon** v. 39, p. 1595-1600, 2001.
- GOPALAKRISSHNAKONE, P. *et al.* Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon** v. 22, p. 85-98, 1984.
- GUTIERREZ, J.M. & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** v. 33, p. 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M., OWNBY, C.L. & ODELL, G.V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** v. 22, p. 115-128, 1984.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. & CERDAS, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon** v. 24, p. 885-894, 1986.
- HANASAKI, K. & ARITA, H. Phospholipase A₂ receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A₂. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** v. 68-69, p. 71-82, 2002.
- HANDLER, J.S., BESINGER, R. & ORLOFF, J. Effect of adrenergic agents on toad bladder response to ADH, 3'5'cAMP, and theophylline. **Am. J. Physiol.** v. 215, p. 1024-1031, 1968.
- HANDLER, J.S. Vasopressin-prostaglandin interactions in the regulation of epithelial cell permeability to water. **Kidney Int.** v. 19, p. 831-838, 1981.
- HARDY, M.A. Intracellular calcium as a modulator of transepithelial permeability to water in frog urinary bladder. **The Journal of Cell Biology.** v. 76, p. 787-791, 1978.
- HARDY, M.A. & DIBONA, D.R. Extracellular Ca⁺² and the effect of antidiuretic hormone on the water permeability of the toad urinary bladder: An example of flow induced alteration of flow. **J. Memb. Biol.** v. 67, p. 27-44, 1982.
- HARVEY, A.L. Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanism of action. **J. Toxicol. Toxin. Rev.** v. 4, p. 41-69, 1985.
- HARRIS, J.B., JOHNSON, M.A. & KARLSSON, E. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v. 2, p. 383-404, 1975.

- HARRIS, J. B. & MALTIN, C.A. Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin, of the Australian taipan, *Oxyranus scutellatus*. **Br. J. Pharmac.** v. 76, p. 61-75, 1982.
- HAYS, R.M. & LEAF, A. Studies on the movement of water through the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. **J.Gen. Physiol.** v. 45, p. 905-912, 1962.
- HAYS, R.M., FRANKI, N. & SIMON, H. Antidiuretic hormone and exocytosis: Lessons from neurosecretion. **Am. J. Physiol.** v. 267 (Cell Physiol. 36), p. C1507-C1524, 1994.
- HAYS, R.M. Cellular and molecular events in the action of antidiuretic hormone. **Kidney International.** v. 49, p. 1700-1705, 1996.
- HARRIS, H.W.Jr & HANDLER, J.S. The role of membrane turnover in the water permeability response to antidiuretic hormone. **J. Memb. Biol.** v. 103, p. 207-216, 1988.
- HELUANY, N.F. *et al.* Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon** v. 30, p. 1203, 1992.
- HOLMGREN, K., MAGNUSSON, K. E. & FRANKI, N. ADH-induced depolymerization of F-actin in toad bladder granular cell: A confocal microscope study. **Am. J. Physiol.** v. 262 (Cell. Physiol. 31) p. C672-C677, 1992.
- HOLTZMAN, E.J. & AUSIELLO, D.A. Nephrogenic diabetes insipidus: causes revealed. **Hosp. Pract.** v. 15, p. 89-104, 1994.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. *et al.* Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** v. 26, p. 615-627, 1988.
- ISHIKAWA, S., SAITO, T. & KUZUYA, T. Calmodulin regulation of cellular AMPc production in response to arginine vasopressin, prostaglandin E₂, forskolin in rat renal papillary collecting tubule cells in culture. **J. Endocrinol.** v. 107, p. 15-22, 1985.
- JO, I. & HARRIS, H.W.JR. Molecular mechanisms for the regulation of water transport in amphibian epithelia by antidiuretic hormone. **Kidney Int.** v. 48, p. 1088-1096, 1995.
- JOHNSON, E.K. & OWNBY, C.L. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. **Toxicon** v. 31, p. 243-255, 1993.

- JOHNSON, E.K. & OWNBY, C.L. The role of extracellular ions in the pathogenesis of myonecrosis induced by a myotoxin isolated from broad-banded copperhead (*Agkistrodon contortrix laticinctus*). **Comp. Biochem. Physiol.** (Part C) v. 107, p. 359-366, 1994.
- KANASHIRO, M.M. *et al.* Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem. Pharmacol.** v. 64, p. 1179-1186, 2002.
- KJELLÉN, L. & LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annu Review Biochem.** v. 60, p. 443-475, 1991.
- KIHARA, H. *et al.* Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipases A₂. **Biochem. Int.** v. 28, p. 895-903, 1992.
- KUDO, I. & MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostag. Lipid Mediators** v. 68-69, p. 3-58, 2002.
- LAMBEAU, G & LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. **Tips** v. 20, p. 162-170, 1999.
- LAURE, C.J. Die primärstruktur des crotamins. Hoppe-Seyler's Z. **Physiol. Chem.** v. 356, p. 213-215, 1975.
- LEAF, A. From toad bladder to kidney. **Am. J. Physiol.** v. 242 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 11), p. 103F-111F, 1982.
- LEE, W. H. *et al.* Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂, a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry** v. 40, p. 28-36, 2001.
- LEITE, R. S. & FRANCO, W. Effects of cholinergic agents on the vasopressin-mediated water transport in the isolated toad bladder. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 129, p. 129-136. 2001.
- LEVINE, S.D., WEBER, H. & SCHLONDORFF, D. Inhibition of adenylate cyclase by general anesthetics in toad urinary bladder. **Am. J. Physiol.** v. 327, p. 372-378, 1979.
- LEVINE, S.D., KACHADORIAN, W.A. & LEVIN, D. N. Effects of trifluoperazine on function and structure of toad urinary bladder. **J. Clin. Invest.** v. 67, p. 662-672, 1981.
- LI, Y. *et al.* Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. **Biochemistry** v. 33, p. 14714-14722, 1994.

- LIU, S.Y. *et al.* Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49 phospholipase A₂ with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem.** v. 107, p. 400-408, 1990.
- LIZANO, S., LAMBEAU, G. & LAZDUNSKI, M. Cloning and cDNA sequence analysis of Lys49 and Asp49 basic phospholipase A₂ myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 33, p. 127-132, 2001.
- LOMONTE, B., ANGULO, Y. & CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.
- LOMONTE, B., ANGULO, Y. & SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon** v. 42, p. 307-312, 2003.
- LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** v. 26, p. 725-733, 1989.
- LOMONTE, B., TARKOWSKI, A. & HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analyses of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** v. 17, p. 93-105, 1993.
- LOMONTE, B. *et al.* Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 29867-29873, 1994a.
- LOMONTE, B., TARKOWSKI, A. & HANSON, L.A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon** v. 32, p. 1359-1369, 1994.
- LOMONTE, B. *et al.* Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. **Toxicon** v. 30, p. 239-245, 1992.
- LOMONTE, B. *et al.* The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. **Toxicon** v. 32, p. 41-55, 1994b.
- LOMONTE, B. *et al.* Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. **Toxicon** v. 37, p. 145-158, 1999.

- LOMONTE, B. *et al.* Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon** v. 28, p. 1137-1146, 1990.
- MAEDA, N. *et al.* Some chemical properties of the venom of the rattlesnake *Crotalus viridis helleri*. **Toxicon** v. 16, p. 431-441, 1978.
- MARAGANORE, J.M. *et al.* A new class of phospholipase A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J. Biol. Chem.** v. 259, p. 13839, 1984.
- MASUR, S., HOLTZMA, E. & WALTER, R. Hormone-stimulated exocytosis in the toad urinary bladder. **J. Cell. Biol.** v. 52, p. 211-219, 1972.
- MEBS, D. Myotoxic activity of phospholipase A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon** v. 24, p. 1001-1008, 1986.
- MEBS, D. & OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol. Ther.** v. 48, p. 223-236, 1990.
- MEBS, D., EHRENFELD, M. & SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon** v. 21, p. 393-404, 1983.
- MORINI, C.C. *et al.* Injury and recovery of fast and skeletal muscle fibers affected by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-banded copperhead) venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1007-1024, 1998.
- MOURA-DA-SILVA, A.M. *et al.* The molecular cloning of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J. Mol. Evol.** v. 41, p. 174-179, 1995.
- MOURA-DA-SILVA, A.M. *et al.* Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** v. 29, p. 713-723, 1991.
- NATOCHIN, Y.V. *et al.* The influence of amlodipine and verapamil on ion and water transport in the nephron, skin and urinary bladder of amphibians. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 98C, p. 317-322, 1991.
- NAKAI, M. *et al.* Purification and primary structure of a myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ with low lipolytic activity from *Trimeresurus gramineus* venom. **Toxicon** v. 33, p. 1469-1478, 1995.

- NAKASHIMA, K.L. *et al.* Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A₂ isoenzyme genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 92, p. 5605-5609, 1995.
- NIKAI, M. *et al.* Characterization and amino-terminal sequence of phospholipase A₂-II from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil). **Int. J. Biochem.** v. 26, p. 43-48, 1994.
- NOBUHISA, I. *et al.* Accelerated evolution of *Trimeresurus okinavensis* venom gland phospholipase A₂ isozyme-encoding genes. **Gene** v. 172, p. 267-272, 1996.
- NÚÑEZ, C.E., ANGULO, Y. & LOMONTE, B., Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon** v. 39, p. 1587-1594, 2001.
- OWNBY, C.L. Locally acting agents: Myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: **Handbook of Toxinology**, (Shier, W.T. and Mebs, D., eds.) p.601-654, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1990.
- OWNBY, C.L., CAMERON, D. & TU, A.T. Isolation of a myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Am. J. Pathol.** v. 85, p. 149-158, 1976.
- OWNBY, C.L. *et al.* Lysine 49 Phospholipase A₂ Proteins. **Toxicon** v. 37, p. 411-445, 1999.
- OWNBY, C.L., FLETCHER, E. & COLBERG, T.R. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle in vivo. **Toxicon** v. 31, p. 697-709, 1993.
- PARNOVA, R.A. *et al.* Role of prostaglandin E₂ in regulation of low and high water osmotic permeability in frog urinary bladder. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1356, p. 160-170, 1997.
- PÁRAMO, L. *et al.* Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Synthetic Lys49 myotoxin II (115-129) peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.** v. 253, p. 452-461, 1998.
- PEARL, M. & TAYLOR, A. Role of the cytoskeleton in the control of transcellular water flow by vasopressin in amphibian urinary bladder. **Biol. Cell** v. 55, p. 163-172, 1985.

- PETERSEN, M. J. & ELDEMAN, I.S. Calcium inhibition of the action of vasopressin on the urinary bladder of the vasopressin. **Journal of Clinical Investigation**. v. 43, p. 583-594, 1964.
- PEACHEY, L.D. & RASMUSSEN, H. Structure of the toad's as related to its physiology. **J. Biophys. Biochem.** v.10, p. 529-553, 1961.
- RODRIGUES-SIMIONI, L. *et al.* No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{+2} stores in the muscular effects of Bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A_2 myotoxin. **Toxicon** v. 33, p. 1479-1489, 1995.
- RODRIGUES, V.M. *et al.* Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 121, p. 215-222, 1998.
- ROJAS, E. *et al.* Venom of the crotaline snake *Atropoides nummifer* (jumping viper) from Guatemala and Honduras: comparative toxicological characterization, isoaltion of the myotoxic phospholipase A_2 homologue and neutralization by two antivenoms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 129, p. 151-162, 2001.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous Animals and their Venoms** v. 2, p. 345-403, 1971.
- RUFINI, S. Proliferative effect of ammodytin L from the venom of *Vipera ammodytes* on 208F rat fibroblasts in culture. **Biochem. J.** v. 320, p. 467- 472, 1996.
- SAMEJIMA, Y., AOKI, Y. & MEBS, D. Structural studies on a myotoxin from *Crotalus adamanteus* venom. In: **Progress in Venom and Toxin Research**, National Singapore University, p. 186-187, 1988.
- SILVEIRA, J.E.N., PEREZ, S.E.A. & CIRNE, B.R. Effect of nonelectrolytes and tonicity on hydrosmotic properties of toad bladder. **Acta Physiol. Latnoam.** v. 25, p. 399-411, 1975.
- SCHAFER, J. & TROUTMAN, S. cAMP mediates the increase in apical membrane Na^+ conductance produced in rat CCD by vasopressin. **Am. J. Physiol.** v. 259, p. F823-F831, 1990.
- SCHOLONDORFF, D. & LEVINE, S.D. Inhibition of vasopressin-stimulated water flow in toad bladder by Phorbol Myristate Acetate, Dioctanoglycerol and RHC-80267. **J. Clin. Invest.** v. 76, p. 1071-1078, 1985.

- SCHLONDORFF, D. *et al.* Epoxygenase metabolites of arachidonic acid inhibit vasopressin response in toad bladder. **Am. J. Physiol.** v. 253 (Renal fluid Electrolyte Physiol. 22), p. F464 - F470, 1987.
- SCOTT, D.L. & SIGLER, P.B. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂. **Adv Prot. Chem.** v. 43, p. 53-88, 1994.
- SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., WHITE, S.P. & OWNBY, C.L. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 326, p. 21-30, 1996a.
- SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., WHITE, S.P. & OWNBY, C.L. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A₂ myotoxins: A highly conserved class of proteins. **Toxicon** v. 34, p. 1237-1242, 1996b.
- SIX, D.A. & DENNIS, E.A., The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1488, p. 1-19, 2000.
- SNYDER, H.M., NOLAND, T.D. & BREYER, M.D. cAMP dependent protein kinase mediates hydrosmotic effect of vasopressin in collecting duct. **Am. J. Physiol.** v. 263 (Cell Physiol. 32), p. C147-C153, 1992.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, G.W. IN: **Statistical Methods.** 7^a edição, USA, The IOWA State University Press, 1978.
- SOARES, A.M. *et al.* Mn⁺² ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 34, p. 668-677, 2002.
- SONNENBURG, W. & SMITH, W. Regulation of cyclic AMP metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 6155-6160, 1988.
- STAR, R.A. *et al.* Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct. **J. Clin. Invest.** v. 81, p. 1879 - 888, 1988.
- TAYLOR, A. *et al.* Evidence for involvement of microtubules in the action of vasopressin in toad urinary bladder. **J. Membrane Biol.** v. 40, p. 213-235, 1978.
- TAYLOR, A. *et al.* Cytossolic calcium and the action of vasopressin in toad urinary bladder. **Am. J. Physiol.** v. 252 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 21), p. F1028-F1041, 1987.

- TSAI, L.H. *et al.* Phospholipase A₂ from *Callosellasma rhodostoma* venom gland. Cloning and sequencing of 10 of the DNAs, three-dimensional modelling and chemical modification of the major isozyme. **Eur. J. Biochem.** v. 267, p. 6684-6691, 2000.
- TSAI, L.H. *et al.* Purification, sequencing, and phylogenetic analyses of novel Lys-49 phospholipases A₂ from the venoms of rattlesnakes and other pit vipers. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 394, p. 236-244, 2001.
- TOYAMA, M.H. *et al.* Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **J. Protein Chem.** v. 17, p. 713-728, 1998.
- VALENTIN, E. & LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂. **Biochimie** v. 82, p. 815-831, 2000.
- VERHEIJ, H.M. *et al.* Methylation of Histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of Histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry** v. 19, p. 743-750, 1980.
- VERKMAN, A.S. *et al.* Water transport across mammalian cell membranes. **Am. J. Physiol.** v. 270 (Cell Physiol. 39), p. C12-C30, 1996.
- WANG, Y.M. *et al.* Lys49 phospholipase A₂ homologs from venoms of *Deinagkistrodon acutus* and *Trimeresurus mucrosquamatus* have identical protein sequence. **Toxicon** v. 34, p. 485-489, 1996.
- WARD, R.J. *et al.* Active-site mutagenesis of a lys49-phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** v. 21, p. 134-140, 2002.
- WIELAND, S.J., FLETCHER, J.E. & GONG, Q.H. Differential modulation of a sodium conductance in skeletal muscle by intracellular and extracellular fatty acids. **Am. J. Physiol.** v. 263, p. C308-C312, 1992.
- YAMAGUCHI, Y. *et al.* Lys49-phospholipases A₂ as active enzyme for β -arachidonoyl phospholipid bilayer membranes. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v. 43, p. 19-26, 1997.
- YOSHIZUMI, K. *et al.* Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49 phospholipase A₂ with low activity from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). **Toxicon** v. 28, p. 43-54, 1990.

YU, B.Z, BERG, O.G. & JAIN, M.K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted PLA₂. **Biochemic.** v. 32, p. 6484-6492, 1993.