

Lia Lôbo de Araújo

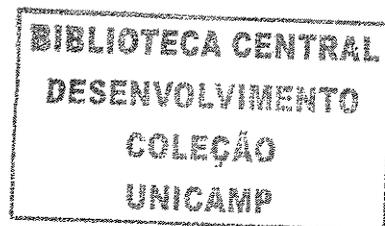
**AÇÃO DO VENENO DE BOTHROPS
LANCEOLATUS (FER DE LANCE)
NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E NO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
CAMUNDONGOS**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da
Cirurgia Dentista - Lia Lôbo de Araújo*

Campinas, 18 de janeiro de 2005.

*Prof. Dr. Marcos Dias Fontana
- Orientador -*

Campinas
2005



Lia Lôbo de Araújo

**AÇÃO DO VENENO DE BOTHROPS
LANCEOLATUS (FER DE LANCE)
NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E NO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
CAMUNDONGOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.**

Orientador : Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

**Campinas
2005**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	TIUNICAMP
	Ar15a
V	EX
TOMBO BCI	66556
PROC.	16-A-00000-25
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	14/12/05
Nº CPD	

BIB ID: 374310

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8º / 6044

Ar15a

Araújo, Lia Lobo de
 Ação do veneno de *Bothrops lanceolatus* (fer lance) na junção neuromuscular e no músculo esquelético de camundongos. / Lia Lobo de Araújo. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Marcos Dias Fontana
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neostigmina. 2. Aminupirudinas. 3. Animais venenosos. 4. Serpentes. I. Fontana, Marcos Dias. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(slp/fcm)

*Título +
proposito*

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Prof. Dr. Eloísa Helena Ferreira

Programa de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 18 /01/2005

200529114

**“A mente que se lança a uma nova idéia
jamais retorna à sua dimensão original”**

(Oliver Holmes)

Dedicatória

Aos meus pais,
Paulo e Albetiza pelo constante amor, carinho e apoio
em tudo que faço, em todos os momentos da minha vida

Aos meus irmãos,
Cecília e Leandro por serem meus melhores amigos

Ao **Marcelo**,
pelo companheirismo e incentivo

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Marcos Dias Fontana por ter me dado essa oportunidade, ter me acolhido e me ensinado muito além dos conhecimentos de farmacologia, lições para toda vida. Seu jeito de ser contagiava a todos no laboratório com um clima de alegria e descontração que deixará saudades. Obrigada Professor por ter sido muito mais que orientador um amigo

Á Prof. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga, pelo apoio, incentivo, convivência, preciosas sugestões e principalmente pela amizade

Aos Professores Edson Antunes e Eloísa Helena Ferreira, pelo empenho e disponibilidade em tornar possível a defesa desse trabalho

Aos técnicos, Antônio e Gildo pela ajuda e atenção em dividir seus conhecimentos, fundamentais para realização desse trabalho

Ás colegas de laboratório Yolanda, Thalita, Samantha, Carol e Silmara pela companhia e amizade

Aos docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo convívio e colaboração

Aos meus familiares pelo interesse e torcida para que tudo sempre dê certo

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro concedido

Á Deus por ser presença confortante e indispensável

“A felicidade não é a estação de chegada, mas um modo de viajar” (M. Ruberck)

ÍNDICE

	pág
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
1- INTRODUÇÃO	20
1.1 Gênero Bothrops	32
1.2 Bothrops lanceolatus	37
2- OBJETIVOS	46
3- MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 Animais	49
3.2 Veneno	49
3.3 Eleição da dose de veneno utilizada	50
3.4 Estudos biológicos	50
3.4.1 Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos	50
3.4.2 Preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongos	52
3.4.3 Preparação músculo biventer cêrvicis de pintainho	53
3.5 Estudos eletrofisiológicos	54
3.5.1 Descrição do circuito	54
3.5.2 Medida de resistência do microeletrodo	57
3.5.3 Potencial de membrana em repouso	57
3.5.4 Potencial de placa terminal em miniatura (pptm)	58
3.6 Análise estatística	58

4- RESULTADOS	59
4.1 Estudos miográficos	60
4.1.1 Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos	60
4.1.1.1 Estimulação elétrica indireta	60
4.1.1.2 Estimulação elétrica direta	65
4.1.2 Preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongos	67
4.1.3 Preparação músculo biventer cêrvicis de pintainho	69
4.2 Estudos eletrofisiológicos	71
4.2.1 Potencial de membrana em repouso	71
4.2.2 Potencial de placa terminal em miniatura (pptm)	73
5- DISCUSSÃO	76
6- CONCLUSÕES	86
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

µg: Micrograma

µM: Micromol

Ach: Acetilcolina

Neo: Neostigmina

4-AP: 4-aminopiridina

d-Tc: d-tubocurarina

KCl: Cloreto de potássio

K⁺: Potássio

NTXs: neurotoxinas

CTX: Cardiotoxinas

PLA2: Fosfolipase A2

PAF: Fator ativador de plaquetas

IgG: Imunoglobulinas

°C: Grau Celsius

h: Hora

min: minuto

seg: Segundo

ms: Milisegundo

Kg: Kilograma

mg: Miligramas

g: Grama

ml: mililitro

mV: milivolts

V: Volts

Hz: Hertz

cm: Centímetro

MΩ: Mega ohm

Me: Microeletrodo

pptm: Potencial de placa terminal em miniatura

DL 50: Dose letal 50

n: número de experimentos

e.p.: Erro padrão

LISTA DE MATERIAIS

Acetilcolina	Sigma Chem.Co.(St. Louis,MO,USA)
4-aminopiridina	Sigma Chem.Co.(St. Louis,MO,USA)
Neostigmina	Laboratórios Roche-Química
d-Tubocurarina	ABBOT – Laboratórios do Brasil Ltda
Álcool Etilico	LabSynth-Prod. Para Lab Ltda , Brasil
Éter etílico	Chemco Ind. Com. Ltda , Brasil
Bicarbonato de Sódio	Carlo Erba – Itália
Cloreto de cálcio	Merck do Brasil
Cloreto de magnésio	Merck do Brasil
Cloreto de potássio	Merck do Brasil
Cloreto de sódio	Merck do Brasil
Fosfato de potássio	Merck do Brasil
Fosfato de sódio	Merck do Brasil
Sulfato de magnésio	Merck do Brasil
Hidrato de cloral	Pentofarma Ltda , Brasil
Glicose	Merck do Brasil

ILUSTRAÇÕES

	pág
FIGURA 1 – Ilustração de uma Bothrops lanceolatus jovem	38
FIGURA 2 – Incidência da Bothrops lanceolatus nas encostas rochosas das florestas tropicais e úmidas da ilha da Martinica, no Caribe	39
FIGURA 3 – Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de repouso e de placa terminal em miniatura. A – Circuito simplificado; B – Circuito simplificado para obtenção de resistência do Me; C – Circuito para medida da resistência do Me	56
FIGURA 4 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=4)	61
FIGURA 5 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=4). Notar as contrações espontâneas	62
FIGURA 6 – Efeito da neostigmina sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=5)	63
FIGURA 7 – Efeito da 4-aminopiridina sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=5)	64
FIGURA 8 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo curarizada (d-tc 10 µg/ml) (n=4)	66

FIGURA 9 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) sobre a preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongo (n= 4)	68
FIGURA 10 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) sobre a preparação músculo biventer cervicis de pintainho (n = 8)	70
FIGURA 11 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) sobre o potencial de membrana , nas fibras musculares do diafragma de camundongo (n = 4)	72
FIGURA 12 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) sobre o potencial de placa terminal em miniatura (pptom) e efeito da neostigmina (5,8 µM) sobre as alterações causadas pelo veneno sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (n = 4)	74
FIGURA 13 – Efeito do veneno de Bothrops lanceolatus (20 µg/ml) sobre o potencial de placa terminal em miniatura e efeito da 4-aminopiridina (53,0 µM) sobre as alterações causadas pelo veneno sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (n = 4)	75

LISTA DE TABELAS

	pág
Tabela 1: Relação dos viperídeos da fauna brasileira	30
Tabela 2: Relação dos elapídeos da fauna brasileira	31
Tabela 3: Os acidentes Bothrópicos apresentam a seguinte classificação quanto à sua gravidade	32

Resumo

Resumo

As serpentes venenosas ou peçonhentas vulnerantes (inoculam o veneno na presa) correspondem a 450 espécies das 3000 conhecidas.

Os venenos de serpentes do gênero **Bothrops** induzem efeitos locais intensos tais como dor, edema, hemorragia e necrose.

Nesse trabalho investigamos a ação do veneno de **Bothrops lanceolatus** (espécie encontrada na Ilha da Martinica, América Central) na junção neuromuscular e no músculo esquelético de camundongos, a uma dose pré-estabelecida de 20 µg/ml (dose que apresentou efeitos mais constantes e nítidos com o mesmo padrão de resposta, depois de testarmos doses de 15 á 60 µg/ml).

Nas preparações nervo frênico-diafragma de camundongos, com estimulação elétrica indireta, o veneno de **Bothrops lanceolatus** induziu aumento inicial das contrações musculares e o aparecimento de contrações espontâneas (efeitos pré-sinápticos) seguido por bloqueio neuromuscular de 70 % em $182,6 \pm 15,7$ min (n=4). A Neostigmina (Neo, 5,8µM) e a 4-aminopiridina (4AP, 53 µM) antagonizaram o bloqueio produzido pelo veneno, nessa preparação, sendo que com a Neo o antagonismo foi parcial ($64,4\% \pm 9,2$) (n=5) e com a 4AP o antagonismo foi total (n=5).

Utilizando-se a estimulação elétrica direta, o veneno na dose estudada não alterou a amplitude da resposta contrátil (n=4), confirmando que sua ação provavelmente se dá na junção neuromuscular e não nas fibras musculares da preparação.

Nas preparações diafragma cronicamente desnervado de camundongos (n=4), a contratura induzida pela adição de acetilcolina (Ach, 36 µM) foi inibida pelo veneno, sugerindo uma ação nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos.

O estudo dos Potenciais Bioelétricos nas preparações nervo frênico-diafragma de camundongos, revelou ausência de alterações no estudo do potencial de membrana (n=4), portanto na dose estudada o veneno não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular do diafragma de camundongo.

Quanto ao estudo do potencial de placa terminal em miniatura (pptm), observou-se um progressivo decréscimo na amplitude e na frequência dos potenciais até seu total desaparecimento. Esse bloqueio é totalmente revertido tanto pela neostigmina (5,8 μ M) (em 11,6 \pm 3,6 min) (n=4) como pela 4-aminopiridina (53 μ M) (em 5,6 \pm 0,6 min) (n=4) . Isso vem confirmar, mais uma vez, que a ação do veneno tem grande probabilidade de ocorrer na região pós-sináptica, nos receptores colinérgicos nicotínicos.

Foram realizados também, experimentos com a preparação biventer cérvicis de pintainho (n=8), para comparar os resultados com aqueles obtidos com a preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongo (que desenvolve a neoformação de receptores ao longo de toda fibra muscular, semelhante às fibras das aves). A contratura induzida de acetilcolina (36 μ M) também foi inibida pelo veneno, confirmando os resultados obtidos nas preparações diafragma cronicamente desnervado, e sugerindo novamente que o veneno tenha uma ação nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos .

Com esse trabalho concluímos que o veneno de **Bothrops lanceolatus** (20 μ g/ml) provoca um bloqueio neuromuscular que é revertido parcialmente pela neostigmina e totalmente pela 4-aminopiridina e que não possui ação despolarizante nas fibras musculares. Embora esse veneno tenha apresentado tanto efeitos pré como pós-sinápticos, nos experimentos “in vitro”, com a dose estudada, os efeitos pós-sinápticos são mais evidentes.

Abstract

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

Abstract

Various **Bothrops** snake venoms cause neuromuscular blockade in avian and mammalian nerve-muscle preparations in vitro. In this work, we examined the neuromuscular action of **Bothrops lanceolatus** venom in mouse phrenic nerve-diaphragm muscle preparation.

In indirectly stimulated mouse phrenic nerve diaphragm muscle preparations, **B. lanceolatus** venom (20 µg/ml) caused an initial facilitation of the muscle contractions and induced spontaneous contractions followed by progressive neuromuscular blockade (70% in $182,6 \pm 15,7$ min, n=4). Neostigmine (5,8 µM) partially reversed this blockade ($64.4\% \pm 9,2$, n=5), whereas 4-aminopyridine (53 µM) totally reversed the blockade (n=5). In contrast, the twitch-tension responses in directly stimulated preparations were unaltered by the venom (20 µg/ml) after 30min.

In chronically denervated diaphragms, the contractile responses to acetylcholine (36µM) were inhibited by the venom (n=4) in 20/40min. Similar results was obtained using chick biventer cervicis preparations (n=4) in 20/60 min.

Bothrops lanceolatus venom (20 µg/ml) did cause membrane depolarization or alter the membrane resting potential in mouse hemi diaphragm preparations (n=4). However, the venom (20µg/ml) caused a progressive decrease in the amplitude and frequency of the miniature end-plate potentials that eventually resulted in total blockade. This blockade was totally reversed by neostigmine 5,8µM (in $11,6 \pm 3,6$ min, n = 4) and 4-aminopyridine 53µM (in $5,6 \pm 0,6$ min, n = 4). These results indicate that **B. lanceolatus** venom has pre and post-synaptic actions.

Introdução

1-Introdução

Ao longo da história das civilizações, as serpentes têm estimulado a mente e imaginação do homem, originando diversas lendas e crenças. Desde a antigüidade já havia relatos sobre o veneno de serpentes, sendo o mais antigo, escrito em papiro no Egito em 1600 a.c. e a primeira identificação do uso medicinal desses venenos foi observada na ilustração de **SUSTRATE e NAGARJUNA (800-700 a.c.)**.

REDI (1664) demonstrou que os venenos necessitavam ser injetados na pele para produzirem seus efeitos, mas foi em 1766 que **FELICE FONTANA** iniciou o estudo toxicológico e pesquisa científica sobre os venenos ofídicos. O início do estudo sistemático sobre os efeitos biológicos exercidos por esses venenos, foi feito por **FLEXNER e NOGUCHI** que descreveram o efeito hemolítico de alguns venenos (**DEVI, 1968; CONDREA, 1979**).

No Brasil, **JOÃO BATISTA DE LACERDA** foi o precursor ao estudo farmacológico dos venenos das serpentes brasileiras. Porém, o grande desenvolvimento no estudo de animais peçonhentos, na profilaxia e tratamento dos acidentes causados por serpentes, escorpiões e aranhas deve-se a **VITAL BRAZIL**.

Em 1949 a bradicinina (causador de hiperemia e permeabilidade vascular) foi descoberta no Brasil por **ROCHA e SILVA et al**, tendo sido uma das mais importantes contribuições brasileiras na área de venenos ofídicos.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos métodos e técnicas bioquímicas para o isolamento e purificação dos componentes dos venenos e o conseqüente uso de proteínas puras e bem caracterizadas nos estudos farmacológicos e fisiopatológicos, tem levado a resultados mais conclusivos e

a um melhor entendimento dos seus efeitos e de seu mecanismo de ação em nível molecular, permitindo seu uso como valiosos instrumentos de pesquisa.

Os venenos ofídicos são os mais complexos de todos os venenos conhecidos por serem constituídos de uma série de componentes que se originam a partir de uma síntese protéica altamente especializada. Sendo produzido por um par de glândulas veneníferas localizadas na boca da serpente venenosa, o veneno passa por um canal central e é injetado por um par de presas inoculadoras localizadas anteriormente no maxilar superior, apresentando uma coloração branca, amarela ou laranja. Nenhum outro produto natural apresenta uma mistura tão efetiva de diferentes fatores, exercendo simultaneamente efeitos tóxicos sobre os sistemas sanguíneo, respiratório, cardiovascular e/ou nervoso.

Os compostos dos venenos ofídicos são: uma **mistura complexa de proteínas** que correspondem a 90% do peso seco do veneno e possuem grande importância fisiopatológica, apresentando atividades enzimáticas e/ou tóxicas. Esses constituintes protéicos são; as enzimas (fosfolipases, fosfodiesterases, L-aminoácido oxidase, acetilcolinesterases, enzimas proteolíticas, metaloproteinases, entre outras), as neurotoxinas, as cardiotoxinas ou citotoxinas, **substâncias não protéicas orgânicas**, como peptídeos, aminoácidos livres, nucleotídeos, carboidratos, lipídeos e aminas biogênicas, e **substâncias não protéicas inorgânicas**, que são basicamente os íons: Ca^{++} , Cu^{+} , Fe^{++} , K^{+} , Mg^{++} , Na^{+} , P^{-} , Co^{++} e Zn^{++} que apresentam diversas atividades biológicas (VARANDA e GIANNINI, 1994). Acredita-se que alguns desses metais estejam relacionados com a estabilidade de certas proteínas, neutralizando suas cargas, enquanto que o Zn^{++} , Co^{++} , Fe^{++} e Cu^{+} sejam indispensáveis no processo catalítico de componentes enzimáticos, como as metaloproteinases (BJARNASON e FOX, 1994).

Outros compostos são encontrados nos venenos ofídicos em menor proporção, como os organofosforados, íons metálicos e outros materiais orgânicos.

As enzimas presentes nos venenos ofídicos têm as seguintes funções:

— Fosfolipases: hidrolizam fosfatidilcolina dos fosfolípidos das membranas celulares, resultando em lesão da membrana, causando vários efeitos farmacológicos e fisiopatológicos, caracterizados por mionecrose, neurotoxicidade e inflamação (SHARMA e TAYLOR, 1987; VARANDA e GIANNINI, 1994).

— Fosfodiesterases: são enzimas que hidrolisam ligações envolvendo grupos de fosfato (fosfomonoéster e fosfodiéster), atuando sobre ácidos nucleicos. São enzimas amplamente distribuídas entre os venenos das cinco famílias de serpentes venenosas (*hidrophidae*, *colubridae*, *antractaspididae*, *elapidae* e *viperidae*).

— L-aminoácido oxidase: enzima não hidrolítica, com propriedade de converter aminoácidos livres em α -cetoácido. Esta enzima tem papel importante na agregação de plaquetas, contribuindo na extensão do sangramento.

— Acetilcolinesterases: enzimas que atuam hidrolizando acetilcolina, podendo causar paralisia muscular. São encontradas nos venenos Elapidae e Hidrophidae.

— Metaloproteinases: são enzimas de massas moleculares diferentes (20-100kDa), dependentes de zinco e responsáveis pela hemorragia observada em envenenamentos viperídeos (BJARNASON e FOX, 1994; HATI et al, 1999; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000), estando também envolvidas na

patogênese da lesão local, como mionecrose, danificação da pele, edema e liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios (**GUTIÉRREZ E RUCAVADO, 2000; COSTA et al, 2002**).

Os venenos ofídicos também apresentam proteínas hemorrágicas chamadas de hemorraginas ou fatores hemorrágicos. Elas atuam degradando componentes da lâmina basal e da matriz extracelular como o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina, clivando seletivamente ligações peptídicas fundamentais para a organização estrutural/funcional da matriz extracelular, induzindo ao extravasamento de sangue dos capilares. Também podem atuar na cascata de coagulação e agregação plaquetária (**GUTIERREZ e RUCAVADO, 2000**).

Os venenos ofídicos possuem atividades neurotóxicas (pré/pós sinápticas), cardiotoxinas, miotóxicas, coagulantes, anticoagulantes, hemorrágicas e, direta ou indiretamente, nefrotóxicas ou hepatotóxicas. Estas atividades, tanto em acidentes humanos como nos causados experimentalmente, são devidos a efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos produzidos pelas enzimas e/ou toxinas presentes, que atuam para imobilizar, matar e digerir a presa, assim como para proteger a serpente contra seus predadores naturais. Essas ações dos venenos podem se dar **indiretamente**, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas ou **diretamente**, através de ações nas membranas celulares (**LEE e CHANG, 1966; IWANAGA e SUSUKI, 1979; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; HARRIS e CULLEN, 1990**).

Na junção neuromuscular, os venenos ofídicos provocam bloqueios neuromusculares que ocorrem pela presença de constituintes farmacológicos ativos presentes no veneno (proteínas, fosfolipases, cardiotoxinas e neurotoxinas). Nas preparações nervo-frênico diafragma de ratos ou camundongos, determinamos a diferenciação entre as cardiotoxinas e as

neurotoxinas quando utilizamos um veneno e observamos o bloqueio neuromuscular produzido.

As **cardiotoxinas** são capazes de causar contraturas antes de ocorrer o bloqueio neuromuscular (LEE, 1972). Após a contratura inicial, ela reduz progressivamente o tamanho das contrações até finalmente cessar a contratura no músculo em resposta a ambas estimulações (direta e indireta) ao mesmo tempo (LEE et al, 1968). Já as neurotoxinas produzem o bloqueio neuromuscular sem causar contraturas, bloqueando a resposta contrátil para estimulações elétricas indiretas, mas não alterando a resposta para estimulações elétricas diretas (TAMIYA e ARAI, 1966; SU et al, 1967).

As cardiotoxinas (CTX) são proteínas básicas tóxicas, de baixo peso molecular (6000 à 7000), constituídas de uma única cadeia polipeptídica (60-61 aminoácidos) interligada por 4 pontes dissulfídicas, tendo um alto teor de lisina e de aminoácidos hidrofóbicos. Elas não apresentam atividade enzimática e são também denominadas de citotoxinas, fatores líticos e toxinas de membrana (por causarem “in vitro” e “in vivo” parada cardíaca em sístole (CONDREA, 1974; HARRIS e CULLEN, 1990). Por apresentarem peptídeos de baixo peso molecular, induzem hemólise dos glóbulos vermelhos (CONDREA, 1974 ; HARVEY, 1985) e contrações do músculo esquelético (LEE et al, 1968; LIN et al 1975; FLETCHER e LIZZO, 1987). As CTX atuam em várias células do organismo, despolarizando suas membranas, acarretando distúrbio de função e estrutura e , em concentrações elevadas, causando necrose dos elementos celulares. Estudos recentes sugerem que sua ação é potencializada pela fosfolipase dos venenos (que tem ação mionecrosante). Em preparações neuromusculares isoladas de nervo-frênico diafragma, elas atuaram de modo não seletivo (na membrana das terminações nervosas e nas fibras musculares) despolarizando-as e provocando contratura do músculo, mesmo se curarizado (os curares ocupam os receptores colinérgicos nicotínicos, sem ativa-los).

As **neurotoxinas (NTX)** são constituintes que atuam na junção neuromuscular e são responsáveis pelos efeitos neurotóxicos (hipotonia muscular, paralisia flácida de músculos da face, pescoço, membros, tronco, laringe e respiração) produzidos pelos venenos ofídicos, especialmente pelas serpentes elapídicas (**VITAL BRAZIL, 1982; MEIER e STOCKER, 1995**). As NTX se dividem quanto ao seu modo de ação, podendo ser pré-sinápticas ou pós-sinápticas.

As **NTX pós-sinápticas** bloqueiam os receptores da acetilcolina, ocupando esses receptores colinérgicos da placa terminal, sem promover despolarização da membrana dessa região da fibra muscular. Elas são proteínas básicas (pH acima de 9,0) de pequeno peso molecular (7000 à 8000), constituídas de uma única cadeia peptídica interligada por pontes dissulfídicas, não apresentando atividade enzimática. Atuam de modo semelhante ao curare, bloqueando a interação entre a acetilcolina liberada da membrana pré-sináptica e a subunidade α do receptor nicotínico presente na junção, porém sua combinação com os receptores é sempre menos reversível e se processa lentamente. Quando um número suficiente de receptores esta ocupado pela NTX, a ligação da acetilcolina com aqueles receptores, ainda livres, não é mais capaz de provocar uma despolarização de intensidade suficiente para deflagrar o potencial de ação, estando a transmissão neuromuscular nesse momento inibida. Como consequência dessa ação, estas toxinas podem provocar parada muscular e falência respiratória por paralisia flácida do diafragma. Os anticolinesterásicos (como a neostigmina e o edrofônio) podem antagonizar esse bloqueio neuromuscular.

As **NTX pré-sinápticas** são proteínas básicas ou moderadamente ácidas, de massa molecular variada (entre 12000 e 56000 dáltons), que exercem atividade fosfolipásica A (pois evoluíram a partir dessa enzima) e são os componentes mais tóxicos dos venenos ofídicos (**VITAL BRAZIL, 1982; MEIER e STOCKER, 1995**). Elas atuam nas terminações nervosas motoras

das placas terminais, inibindo especificamente a liberação do mediador, a acetilcolina das sinapses colinérgicas periféricas, na fenda neuromuscular, pelos impulsos nervosos. Quando a quantidade de acetilcolina liberada não é capaz de produzir uma despolarização para deflagar o potencial de ação, a transmissão neuromuscular está interrompida. Essa ação pode causar parada respiratória e morte. Os anticolinesterásicos não antagonizam esse bloqueio, logo, em preparações isoladas, a ação dessas NTX pré-sinápticas é irreversível (VITAL BRAZIL, FONTANA, PELEGRINI, 1976; 1977; VITAL BRAZIL, 1980).

Algumas neurotoxinas apresentam, em doses maiores, ação miotóxica, inibindo a excitabilidade da membrana das fibras musculares.

As **miotoxinas** dos venenos ofídicos constituem um grupo heterogêneo, do ponto de vista bioquímico estrutural, de toxinas. Elas podem ser componentes extremamente tóxicos, ativos mesmo em pequenas doses. A ação miotóxica pode ocorrer **diretamente** sobre a fibra muscular, danificando-a ou **indiretamente**, ocasionando isquemia e levando o tecido à necrose (GUTIÉRREZ et al, 1984). Testada em animais experimentais, elas provocam quase sempre um grande dano às fibras musculares (MEBS e OWNBY, 1990; MELO e OWNBY, 1996), sendo que a mionecrose provocada é mais proeminente com venenos das serpentes pertencentes às sub-famílias *crotalinae* e *viperinae* (GUTIERREZ et al, 1983, 1986; TU, 1991). A miotoxina provoca uma redução na resposta à estimulação elétrica direta no músculo esquelético.

O índice de acidentes ofídicos humanos no mundo é de 5 milhões de casos por ano , com cerca de 50 mil óbitos (CHIPPAUX e GOYFFON, 1998).

Das 3000 espécies conhecidas de serpentes, 15% são venenosas (peçonhentos vulnerantes), pois inoculam o veneno na presa para alimentação ou defesa (OHSAKA, 1979). As serpentes são usualmente denominadas de

venenosas quando providas de um eficiente aparelho inoculador e quando apresentam importância médica por produzirem acidentes ofídicos de grande frequência e gravidade. Elas estão taxonomicamente divididas em 5 famílias: *hidrophidae*, *colubridae*, *antractaspididae*, *elapidae* e *viperidae*; esta última dividindo-se em 2 sub-famílias mais importantes: *crotalinae* e *viperinae* (WÜSTER, GOLAY, WARRELL, 1997).

Na sub-família *crotalinae* incluem-se as serpentes dos gêneros **Bothrops**, **Crotalus** e **Lachesis**, abundantes nas Américas.

O veneno da família *hydrophidae*, ou serpentes marinhas caracteriza-se por conter neurotoxinas que estão incluídas entre as substâncias mais tóxicas do mundo. São serpentes mais numerosas que as terrestres, sendo mais comuns nas regiões tropicais e subtropicais entre os oceanos Índicos e Pacífico (VARANDA e GIANNINI, 1994).

A família *colubridae* é caracterizada como uma das maiores famílias de serpentes, típica de todos os continentes, com exceção da Antártica. A maioria dessas serpentes é inofensiva, pois não possui aparelho inoculador eficiente e por isso pouco se conhece sobre seus venenos. Porém, trabalhos experimentais em animais, demonstraram que o veneno de **Phylodrias** possui atividade hemorrágica, edematogênica, fibrinogenolítica e fibrinolítica (VARANDA e GIANNINI, 1994).

Os membros da *antractaspididae* são denominados cobras de duas cabeças por não apresentarem cauda pontiaguda. Estas espécies estão distribuídas pela África central, atingindo o sul da África e o norte de Israel (MEIER e STOCKER, 1995).

A família *elapidae* se distribui amplamente, podendo ser encontrada na Ásia, África, Austrália e nas Américas. O veneno da *elapidae* contém potentes neurotoxinas, enzimas muito tóxicas em experimentos *in vitro*, e apresenta alta toxicidade e ausência ou baixa atividade proteolítica sobre substratos (VARANDA e GIANNINI, 1994).

A família *viperidae* se distribui na Ásia, Europa, África e nas Américas, sendo que a subfamília *viperinae* se concentra pelo território do velho mundo e a subfamília *crotalinae* se concentra pelo novo mundo e apresenta representantes dos gêneros **Trimeresurus** e **Agkistrodon** na África. Seu veneno caracteriza-se por induzir estado de choque, exercer intensa atividade proteolítica, coagular o plasma sangüíneo, produzir hemorragia, liberar bradicinina e causar um volumoso edema hemorrágico e necrose (VITAL BRAZIL, 1982). Embora esse veneno não produza os efeitos neurotóxicos do veneno da *elapidae*, os venenos **Bothrópicos** são capazes de induzir efeitos neurotóxicos em animais de experimentação (RODRIGUES-SIMIONI et al, 1983; OSHIMA-FRANCO et al, 2002).

São encontradas no Brasil aproximadamente 265 espécies de serpentes, das quais 58 espécies são venenosas e dessas 29 espécies pertencem ao gênero **Bothrops**. As serpentes brasileiras são distribuídas em nove famílias, das quais somente duas englobam os quatro gêneros peçonhentos. As serpentes venenosas encontradas no Brasil pertencem à família *elapidae* e à sub-família *crotalinae*. O único gênero da família *elapidae* no país é o **Micrurus**, cujas espécies são conhecidas popularmente por corais. Já da sub-família *crotalinae* estão presentes no país os gêneros **Bothrops** (ex: **jararaca**, **jararacussu**, **alternatus** e **neuvedi**), **Crotalus** (cascavéis) e **Lachesis** (**surucucus**) que apresenta 36 espécies e sub-espécies (CARDOSO et al, 2003).

No Brasil são notificados anualmente, pelo ministério da Saúde, cerca de 20.000 acidentes envolvendo serpentes, com cerca de 0,4% de índice de mortalidade. Deste total aproximadamente **90,5%** são causados por serpentes do gênero **Bothrops**, **7,7%** por **Crotalus**, **1,4%** por **Lachesis** e **0,4%** por **Micrurus** (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; ARAÚJO et al, 2003).

Tabela 1: Relação dos viperídeos da fauna brasileira.

Gênero Bothriopsis	<i>Bothriopsis bilineata bilineata</i> <i>Bothriopsis bilineata smaragdina</i> <i>Bothriopsis taeniata</i>
Gênero Bothrocophias	<i>Bothrocophias hyoprora</i> <i>Bothrocophias microphthalmus</i>
Gênero Bothrops	<i>Bothrops alcatraz</i> <i>Bothrops alternatus</i> <i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops brazili</i> <i>Bothrops cotiara</i> <i>Bothrops diporus*</i> <i>Bothrops erythromelas</i> <i>Bothrops fonsecai</i> <i>Bothrops insularis</i> <i>Bothrops itapetiningae</i> <i>Bothrops jararaca</i> <i>Bothrops jararacussu</i> <i>Bothrops leucurus</i> <i>Bothrops lutzi*</i> <i>Bothrops marajoensis</i> <i>Bothrops mattogrossensis*</i> <i>Bothrops moojeni</i> <i>Bothrops muriciensis</i> <i>Bothrops neuwiedi*</i> <i>Bothrops pauloensis*</i> <i>Bothrops pirajai</i> <i>Bothrops pradoi</i> <i>Bothrops pubescens*</i> <i>Bothrops sp*</i>
Gênero Crotalus	<i>Crotalus durissus cascavella</i> <i>Crotalus durissus collilineatus</i> <i>Crotalus durissus marajoensis</i> <i>Crotalus durissus ruruima</i> <i>Crotalus durissus terrificus</i>
Gênero Lachesis	<i>Lachesis muta muta</i> <i>Lachesis muta rhombeata</i>

* Espécies derivadas do complexo *B. neuwiedi* (segundo Silva³²).

Tabela 2: Relação dos elapídeos da fauna brasileira.

Micrurus albicinctus
Micrurus altirostris
Micrurus averyi
Micrurus brasiliensis
Micrurus corallinus
Micrurus decoratus
Micrurus filiformis
Micrurus frontalis
Micrurus hemprichii
Micrurus ibiboboca
Micrurus lemniscatus
Micrurus mipartitus
Micrurus ornatissimus
Micrurus paraensis
Micrurus putumayensis
Micrurus spixii
Micrurus surinamensis
Micrurus tricolor
Micrurus waehnerorum
Leptomicrurus collaris
Leptomicrurus narduccii
Leptomicrurus scutiventris

1.1 GÊNERO BOTHROPS

Os acidentes com o gênero **Bothrops** constituem um problema de saúde pública, devido à incidência, gravidade e seqüelas deixadas nos pacientes.

Tabela 3: Os acidentes **Bothrópicos** apresentam a seguinte classificação quanto à sua gravidade:

<i>Gênero da Serpente</i>	<i>Acidente leve</i>	<i>Acidente moderado</i>	<i>Acidente grave</i>
Bothrops	53,8%	39,5%	6.7%

As serpentes do gênero **Bothrops** vivem geralmente em locais úmidos, onde habitam roedores, porém podem ser encontradas também em zonas rurais e periferias de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos e são consideradas as serpentes mais agressivas encontradas no Brasil (FRANÇA e FAN, 1992).

O veneno das serpentes do gênero **Bothrops** apresenta uma mistura complexa de proteínas que podem causar hemorragia, diminuição circulatória e mionecrose em mamíferos.

Os sintomas clínicos do envenenamento **Bothrópico** são causados por componentes isolados do veneno (como fatores hemorrágicos, enzimas que atuam nos distúrbios de coagulação, enzimas proteolíticas, miotoxinas e neurotoxinas) e podem ser caracterizados pela presença de intensos efeitos locais e sistêmicos (algumas vezes letais) (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989). Isso difere dos gêneros **Micrurus** e **Crotalus** que são predominantemente neurotóxicos.

Uma das principais manifestações apresentadas pelos pacientes acidentados por serpentes do gênero **Bothrops** é a incoagulabilidade sangüínea, relacionada com a depleção do fibrinogênio e a hemorragia, que normalmente se restringe ao local da picada. Porém, nos casos mais graves, ela pode ser sistêmica, com hemorragias á distância como hematêmese, hematúria, epistaxes e gengivorragia (**BARRAVIERA e PEREIRA, 1994**).

Os efeitos locais presentes devido a um envenenamento **Bothrópico** são: dor intensa, edema acentuado e progressivo no local da picada, bolhas, equimoses, hemorragia, necrose e alterações do sistema coagulante, sendo que a hemorragia e a necrose são consideradas, até os dias atuais, como sérios problemas clínicos, já que só podem ser prevenidos se o soro for administrado logo após o acidente. Nos casos mais graves, podem ocorrer destruição e perda do membro atingido e até mesmo a morte, mesmo com administração do soro. Dentre os efeitos sistêmicos, as manifestações e complicações mais referidas como possíveis causas de óbito são insuficiência renal, septicemia e choque (**ROSENFELD, 1971; FAN E CARDOSO, 1995; RIBEIRO et al 1998; FRANÇA E MÁLAQUE, 2003; GUTIÉRREZ E LOMONTE, 2003**). Segundo **Vital Brazil (1982)** o choque destaca-se como a causa mais freqüente de morte. Clinicamente o choque é do tipo hipovolêmico e parece ser causado pelo extravasamento de sangue para os tecidos e órgãos internos (**KOUYOUMDJIAN et al, 1991**). A hipotensão inicial é conseqüência da vasodilatação que determina profundo decréscimo na resistência vascular periférica.

A ação de enzimas como proteases e fosfolipases contidas nos venenos liberam autacóides como bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandinas que podem contribuir para alterações circulatórias no choque (**ROTHSCHILD e ROTHSCHILD, 1979**).

A resposta inflamatória local vem da síntese e/ou liberação de mediadores endógenos como a histamina, eucosanóides, serotonina e fator ativador de

plaquetas, caracterizando-se pela exsudação de proteínas plasmáticas e presença de células inflamatórias (TREBIEN e CALIXTO, 1989; CHAVES et al, 1995; LÔBO DE ARAÚJO et al, 2000, 2001). O edema induzido ocorre pela liberação dessas substâncias farmacologicamente ativas no local da picada (cininas como a bradicinina, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase e histamina) (ROTHSCHILD e ROTHSCCHILD, 1979), como também pela presença de fosfolipases A2 do veneno (CHAVES et al, 1998).

A fosfolipase A2 (PLA2) ou Fosfaditil 2-acilhidrolase é uma enzima encontrada com frequência nos venenos ofídicos e tem peso molecular de 11000 – 15000 (ROSENBERG, 1990; DAVIDSON e DENNIS, 1991). Possuem estrutura variável, podendo apresentar-se com uma cadeia única ou com 2 a 4 subunidades. “In vivo” a PLA2 possui uma variedade de atividades, incluindo neurotoxicidade pré-sináptica, atividade de agregação plaquetária e nefrotoxicidade (HUANG e CHIANG, 1994; LANDUCCI et al, 1994), sendo largamente utilizada para investigar a interação lipídio-proteica. Injetada via intramuscular em doses subletais, em camundongos, provoca após 24 horas, necrose e completa desorganização da região da placa terminal das fibras musculares, e após 48 horas, provoca o desaparecimento do axoplasma e colapso da bainha de mielina (GOPALAKRISHNAKONE e HAWGOOD, 1979). As PLA2 ofídicas, com exceção das neurotoxinas pré-sinápticas, são pouco tóxicas, sendo que as ácidas e as neutras são menos tóxicas que as básicas. Elas induzem o edema por afetarem diretamente a microvasculatura (levando á exsudação do plasma) e também por liberarem o ácido araquidônico (devido à degradação enzimática da membrana fosfolipásica), que aumenta a biossíntese de eicosanóides.

Os venenos **Bothrópicos** são caracterizados por:

— exercer intensa atividade proteolítica, causada por um grupo de substâncias com atividade enzimática, agindo sobre diferentes substratos (**ROSENFELD, 1971**), atuando na necrose e no edema inflamatório no local da picada pela presença de proteases, fosfolipases, hialuronidasas e outras enzimas. Também pode haver liberação de autacóides endógenos, principalmente histamina, serotonina e bradicinina, que parecem estar relacionadas às manifestações sistêmicas como hipotensão e choque (**GUTIERREZ e LOMONTE, 1989**).

— coagular o plasma sangüíneo, onde o veneno transforma diretamente o fibrinogênio em fibrina (**ROSENFELD et al, 1959; LÔBO DE ARAÚJO et al, 2001**) principalmente pela presença de proteases que atuam em pontos específicos da cascata de coagulação (**NISHIDA et al, 1994**).

— produzir hemorragia local e sistêmica, que pode ocorrer nos pulmões, cérebro e rins. As toxinas hemorrágicas são bioquimicamente caracterizadas como zinco metaloproteinases, tendo sido isoladas de venenos de serpentes *crotalinae e viperidae* (**BORKOW et al, 1993; FRANCESCHI et al, 2000**). Trabalhos recentes têm evidenciado que a série de enzimas responsáveis pelo efeito hemorrágico também estão envolvidas na patogenia de mionecrose local, lesão tecidual, edema e outras reações associadas com inflamação. Algumas metaloproteinases induzem hemorragia por afetarem diretamente os capilares sangüíneos, destruindo a lâmina basal e a matriz extracelular, levando a rupturas vasculares e ao extravasamento de sangue dos capilares para o interstício da região da picada (**ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ et al 1981; BARRAVIERA e PEREIRA, 1994**). Elas também liberam cininas á partir do cininogênio, potencializando o efeito hemorrágico local e sistêmico, além de ocasionar uma série de alterações morfológicas e

funcionais em células endoteliais “in vivo” e prejudicar a regeneração do músculo esquelético afetado. Na resposta inflamatória local característica do envenenamento **Bothrópico**, as metaloproteinases induzem o edema (GUTIERREZ e RUCAVADO, 2000).

— causar pronunciado efeito local, como edema, dor, hemorragia e necrose tissular (ROSENFELD, 1971; BOLÁNÓS, 1982) que pode ocasionar seqüelas como perda de tecido e até amputação da extremidade afetada (BRAZIL, 1911; CHEYMOL et al, 1968).

— causar falência renal aguda, secundária à necrose tubular e ocasionalmente glomerulonefrite (AMARAL et al, 1986; REZENDE et al, 1989; BOER-LIMA et al, 1999).

— induzir um bloqueio neuromuscular do tipo não despolarizante, que se desenvolve lentamente, com antagonismo parcial ou imperfeito pelo anticolinesterásico e com vagarosa reversibilidade. Como a resposta contrátil à estimulação indireta é bloqueada antes da redução à resposta das estimulações diretas no músculo, o sítio de bloqueio primário ocorre certamente na junção neuromuscular (CHANG, 1979).

O veneno das **Bothrops jararacussu**, **Bothrops insularis** e **Bothrops neuwedi** causa um bloqueio neuromuscular nas preparações de nervo frênico diafragma de camundongos e de músculo biventer cervicis de pintainho (HELUANY et al, 1992; COGO et al, 1993; ZAMUNÉR et al, 1996).

O tratamento do acidente **Bothrópico** consiste em se internar o paciente, colocá-lo em repouso e na posição de drenagem postural para que ocorra a remissão mais rápida do edema. Quando necessário, deve ser feito o tratamento local das lesões com banhos anti-sépticos e quando houver

infecção secundária indica-se a terapia com antibióticos. Imunoprofilaxia contra o tétano deve ser realizada e o soro antiofídico deve ser administrado o mais precocemente possível, em dose única, por via intravenosa de preferência, com o objetivo de neutralizar o veneno antes que ele tenha causado dano (BARRAVIERA e PEREIRA, 1994).

O gênero **Bothrops** no continente americano apresenta 3 espécies endêmicas: **Bothrops insularis** (na ilha da Queimada Grande, costa do Brasil), **Bothrops carabeus** (em Santa Lúcia, nas Antilhas) e **Bothrops lanceolatus** (na ilha da Martinica, América Central) (HOGE e ROMANO, 1978,1979; WÜSTER et al, 1997).

1.2 BOTHROPS LANCEOLATUS

A **Bothrops lanceolatus** ou FER DE LANCE, foi descrita pela primeira vez por Lacépede em 1789. Ela é uma serpente de grande porte, com tendências arborícolas, habitante de encostas rochosas das florestas tropicais e úmidas da ilha da Martinica, no Caribe, América Central (CAMPBELL e LAMAR, 1989). Essa serpente é responsável, aproximadamente, por 20 envenenamentos ao ano, que correspondem a 20% dos acidentes ocorridos na ilha (THOMAS e TYBURN, 1996).

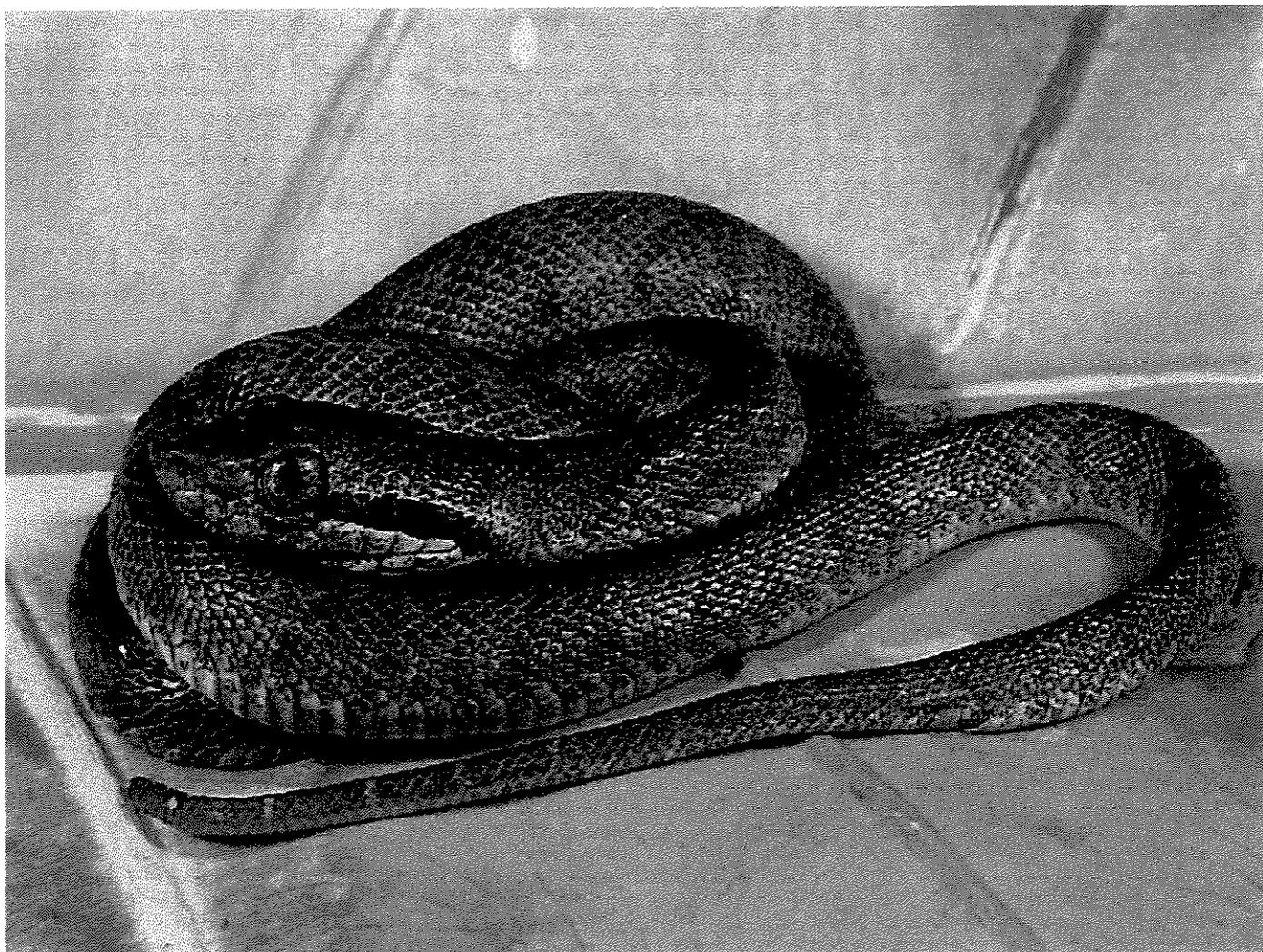


FIGURA 1 – Ilustração de uma *Bothrops lanceolatus* jovem

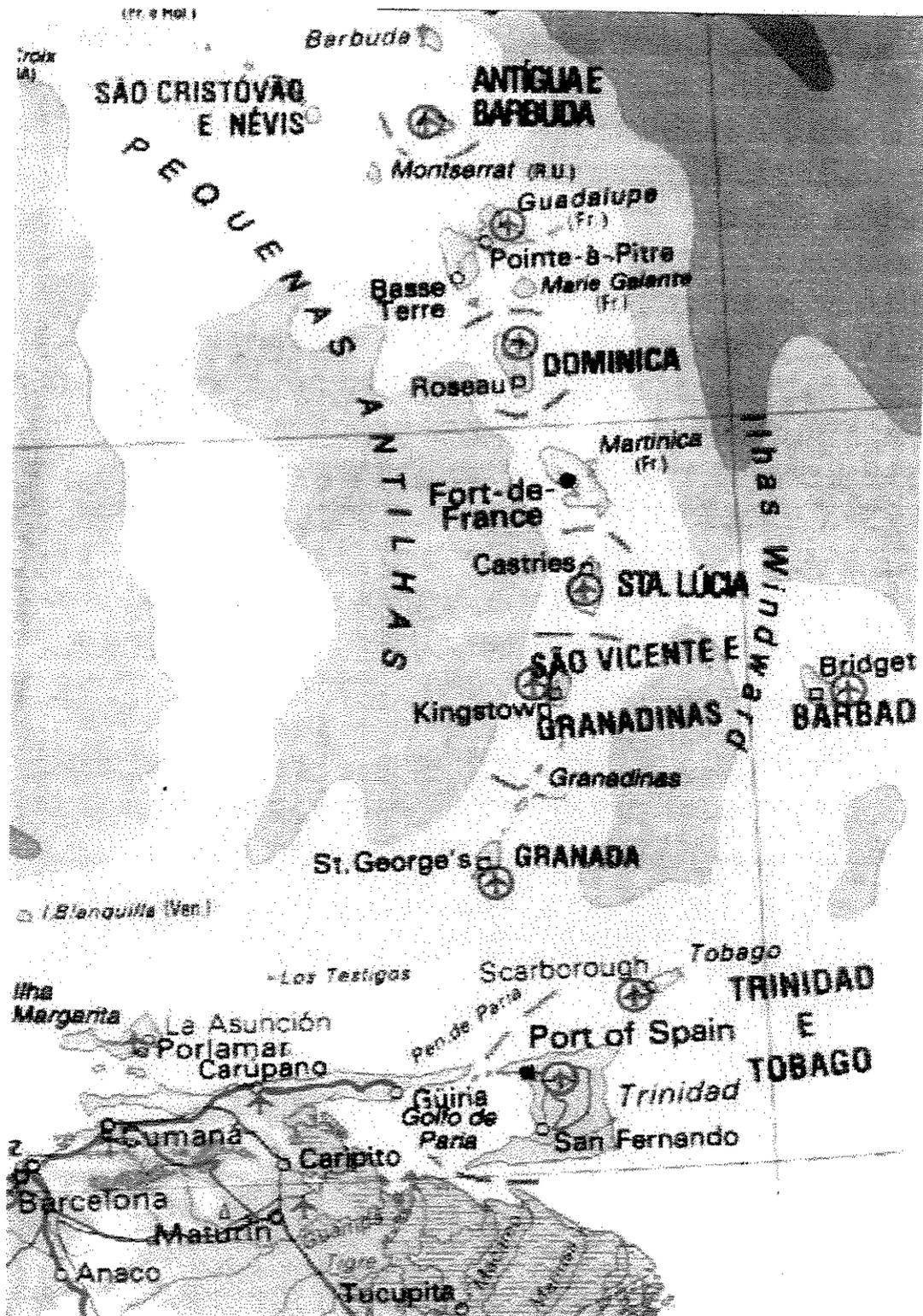


FIGURA 2 – Incidência da *Bothrops lanceolatus* nas encostas rochosas das florestas tropicais e úmidas da ilha da Martinica, no Caribe.

O envenenamento pela **Bothrops lanceolatus**, apresenta alterações locais como edema e dor, e alterações sistêmicas como embolia pulmonar, enfarte do miocárdio, enfarte cerebral, hemorragia, trombose, choque hipovolêmico e, ocasionalmente, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada. A terapia anticoagulante preventiva e a soroterapia específica apresentam eficácia limitada na prevenção dessas complicações, porém as alterações trombóticas não são observadas quando o antiveneno é administrado até seis horas após a picada (THOMAS et al, 1998).

Apesar de, até hoje, terem sido realizados poucos estudos experimentais com esse veneno, constatou-se que ele apresenta a maioria das atividades biológicas das **Bothrops brasileiras** e que o veneno bruto de **Bothrops lanceolatus** apresenta alta atividade caseinolítica, fosfolipásica, esterolítica e hemorrágica (LOBO DE ARAÚJO et al, 1990). Também foi identificada, isolada e caracterizada uma fosfolipase A2 ácida, não tóxica em camundongos e pintainhos e uma enzima fibrino(geno)lítica (não hemorrágica e com atividade esterolítica) (LÔBO DE ARAÚJO et al, 1994; LÔBO DE ARAÚJO et al, 1998). Além disso, em estudos recentes também foi purificada e caracterizada uma protease caseinolítica (LÔBO DE ARAÚJO et al, 2002) e uma metaloproteinase hemorrágica (STROKA et al, 2004).

A atividade fosfolipásica dos venenos de serpentes leva a importantes eventos celulares. Entre eles, temos a liberação de ácido araquidônico e lisofosfolipídeos de membranas celulares, levando à formação de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e o fator ativador de plaquetas (PAF). Além disso, a lesão tecidual feita por outros componentes do veneno podem ativar fosfolipases endógenas que também resulta na liberação de eicosanóides e PAF (GUTIERREZ e LOMONTE, 1989).

A fosfolipase A2 (PLA2) purificada do veneno de **Bothrops lanceolatus** apresenta uma atividade anticoagulante que explica vários dos efeitos desse veneno na coagulação sangüínea (**LÔBO DE ARAÚJO et al, 2001**). No entanto essa PLA2 não é tóxica quando injetada “in vivo” em camundongos ou pintainhos e não produz bloqueio neuromuscular na preparação músculo biventer cérvicis de pintainho (**LÔBO DE ARAÚJO, 1990**).

A protease caseinolítica caracterizada do veneno foi capaz de induzir um bloqueio neuromuscular na preparação músculo biventer cérvicis de pintainho e de causar uma despolarização na preparação nervo frênico-diafragma de camundongos. Essa proteína purificada apresentou esta atividade caseinolítica, mas não atividade fosfolipásica A2.

A preparação de pintainhos se mostrou mais sensível a essa proteína do que a preparação de camundongos, e essa baixa sensibilidade dos camundongos pode explicar essa pequena despolarização induzida na preparação nervo frênico-diafragma (**LÔBO DE ARAÚJO et al, 2002**).

Até agora essa é a primeira fração caseinolítica que apresentou atividade neuromuscular, o que sugere que possam existir muitas outras proteínas, ainda não isoladas nos venenos **Bothrópicos**, capazes de alterar as funções neuromusculares.

A dose letal 50 (DL 50) do veneno de **Bothrops lanceolatus** em camundongos e pintainhos foi determinada pelo método de **Weil (1952)**, segundo **LÔBO DE ARAÚJO (2002)** e apresentou os seguintes resultados:

Camundongos – 9,6 (8,1 a 11,4) mg/kg

Pintainhos – 6,2 (5,4 a 7,2) mg/kg

O veneno de **Bothrops lanceolatus** também foi injetado “in vivo” em camundongos. Ocorreu um aumento na permeabilidade vascular causando edema, mediado principalmente por produtos da lipo e cicloxigenase, também apresentou atividade coagulante, hipotensão por vasodilatação periférica, indução de migração leucocitária abundante e hemorragia (quando doses elevadas do veneno foram empregadas) (**LÔBO DE ARAÚJO et al, 2000; FARIA et al, 2001; GUIMARÃES et al, 2004**). A injeção intramuscular do veneno em pintainhos provocou perda de equilíbrio, parada respiratória e head drop (flacidez do pescoço) (**LÔBO DE ARAÚJO et al, 1995**).

Conseguiu-se obter um bloqueio da atividade hemorrágica, assim como uma redução do edema, em ratos, quando o veneno foi submetido, antes de injetado, a um tratamento físico (aquecimento) (**FARIA et al, 2001**) e também quando submetido a um tratamento químico (adição de EDTA) (**GUIMARÃES et al, 2002**). Diante disso podemos concluir que o componente hemorrágico do veneno é termo e quimio-sensível.

A preocupação e empenho no tratamento de envenenamentos causados por serpentes venenosas existem pelo grande número de pessoas envolvidas, chegando a ser um problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subdesenvolvidas.

Atualmente, o tratamento conhecido e eficiente nos casos de acidentes ofídicos é a soroterapia específica (**WARREL, 1992**) tendo sido introduzida por **Calmete em 1984**. Antivenenos ou os soros comerciais são na sua maioria produzidos por imunização de cavalos e são constituídos por imunoglobulinas (IgG) intactas ou fragmentos F (ab). De 5 a 13 % dos anticorpos ou seus fragmentos, ligam-se especificamente aos componentes do veneno usado para imunizar o cavalo. Apesar dos venenos serem muito tóxicos e apresentarem uma mistura complexa de macromoléculas, com

vários epítomos capazes de estimular vários clones de linfócitos, os anticorpos secretados são fracos imunógenos (SJOSTROM et al, 1994).

A especificidade dos soros antiofídicos foi constatada (VITAL BRAZIL, 1901), pois no mesmo gênero de serpentes existem diferenças significativas na composição dos venenos quanto à toxicidade, letalidade atividade enzimática, efeitos locais causados e aspectos imunológicos (CHIPPAUX et al, 1991). Estas variações devem-se em parte, às diferentes localizações geográficas e ontogênicas das serpentes, tendo implicações práticas no esquema de produção de antiveneno. Por isso é recomendada uma regionalização da produção desse antiveneno (GUTIÉRREZ et al, 1990), já que sua habilidade neutralizante contra um veneno específico, depende desse veneno incluído na mistura antigênica (GUTIÉRREZ et al, 1981) .

A variabilidade antigênica de venenos do gênero **Bothrops**, parece estar relacionada com as atividades: proteolítica, fosfolipásica e edematogênica. Embora o emprego da soroterapia seja eficaz no tratamento das alterações sistêmicas, decorrentes dos envenenamentos, as lesões locais são dificilmente neutralizadas por antivenenos específicos, mesmo logo após o acidente (GUTIÉRREZ et al, 1981; LOMONTE, 1985; LOMONTE et al, 1987), com isso existe a necessidade de alternativas complementares à soroterapia para o tratamento dessas lesões locais. Algumas hipóteses são sugeridas para explicar a ineficácia do antiveneno contra os efeitos locais:

- 1) os efeitos locais em geral instalam-se rapidamente, o que , mesmo com a administração do soro, dificultaria sua neutralização pelos anticorpos, que chegariam no local da picada depois que o efeito já se estabelecera (GUTIÉRREZ et al, 1987).

2) a maioria dos componentes do veneno, responsáveis pelos efeitos locais, são proteínas de baixo peso molecular (TU, 1982), sendo pouco imunogênicas em cavalos (GUTIÉRREZ et al, 1985).

Por isso os antivenenos convencionais não apresentariam anticorpos capazes de neutralizar os constituintes responsáveis por esses efeitos locais (FERREIRA et al, 1992).

Quando o soro específico não é imediatamente administrado ou quando é contra indicado devido a reações séricas tardias, usa-se anticolinesterásicos para reverter temporariamente os sinais de envenenamento, associado a pré tratamento com sulfato de atropina (6 mg/adulto) para bloquear os efeitos muscarínicos da acetilcolina (GOLD, 1995).

Em virtude da relevância do edema nos envenenamentos **Bothrópicos**, é necessário identificar e caracterizar os componentes responsáveis por esse efeito, como também estudar seu mecanismo de ação, a fim de verificar novas estratégias terapêuticas para confrontar com a ineficiência do antiveneno em neutralizar este significativo efeito local.

Antes da utilização da soroterapia, os envenenamentos por serpentes do gênero **Bothrops**, apresentavam prognóstico de morte de 2 a 3 %, já hoje com a terapia soroterápica, essa porcentagem caiu para 0,5 a 0,6 % de morte, demonstrando a importância desse tratamento.

A meta desse trabalho foi estudar o veneno de **Bothrops lanceolatus** e investigar seu modo de ação na junção neuromuscular e no músculo esquelético. Os resultados desse estudo contribuirão para a caracterização desse veneno e, com isso, sua comparação com a ação de outros venenos **Bothrópicos** já descritos. Isso poderá ser útil no tratamento de futuros acidentes envolvendo essa serpente, pois os estudos farmacológicos e

bioquímicos dos venenos e suas toxinas possibilitam adquirirmos conhecimentos da fisiopatologia dos envenenamentos e serem instituídas medidas racionais e eficientes a serem acrescentadas ao tratamento soroterápico.

Embora os venenos de Serpentes sempre tenham representado de certa forma uma ameaça, atualmente muitos deles tem sido empregados como agentes terapêuticos para tratamentos de várias patologias. Um exemplo disso foi a descoberta de **Ferreira e Rocha Silva em 1965** do fator potenciador de bradicinina (BPF) á partir do veneno de **Bothrops jararaca** que foi utilizado como modelo para a síntese de um medicamento utilizado contra a hipertensão , o Captopril®.

Além disso, componentes isolados de venenos ofídicos revelaram-se extremamente úteis em diferentes domínios biológicos como, por exemplo, foi o isolamento do ativador do fator x da coagulação do veneno da víbora de Russell, **Daboia (vipera) russelli**, que permite dosar o fator x plasmático humano (**BACHMAN et al, 1959; DENSON, 1961; AURELL et al; 1977**).

Seguindo esse pensamento, nosso estudo também pretende contribuir para esclarecer fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos do organismo, além das relações taxonômicas entre as serpentes venenosas, permitindo talvez o desenvolvimento de substâncias promissoras na terapêutica. Além disso, ele é mais uma ferramenta de trabalho em novas pesquisas, não só farmacológicas, como fisiológicas e patológicas.

Objetivos

2-Objetivos

Os objetivos desse estudo foram:

- verificar a ação do veneno de **Bothrops lanceolatus** na junção neuromuscular e no músculo esquelético de camundongos.
 - avaliar a capacidade do veneno de causar bloqueio neuromuscular, definindo sua ação pré e/ou pós sináptica.
 - avaliar se a ação desse veneno ocorre predominantemente nos receptores colinérgicos nicotínicos ou se também atua na fibra muscular.
 - avaliar se o bloqueio produzido pode ser revertido pela neostigmina e pela 4-aminopiridina.

Materiais e Métodos

3-Materiais e Métodos

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados:

- **CAMUNDONGOS** Balb/c machos, de 8 á 10 semanas de vida (20 á 25g de peso), provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) (Campinas SP), foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia, à temperatura ambiente de 24°C, com iluminação diária de 12h, água e ração ad libitum, até a realização dos experimentos.

- **PINTAINHOS** de linhagem HY line W36, de 4 á 8 dias de vida (40 á 50 g de peso) fornecidos pela Granja ITO S/A (Sumaré, SP), foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia, em gaiolas com água e ração ad libitum até a realização dos experimentos.

3.2 VENENO

O veneno de **Bothrops lanceolatus** foi gentilmente cedido, pela Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, sendo proveniente da Unité des Venins do Instituto PASTEUR (Paris, França).

O veneno foi dissolvido em solução nutritiva de Tyrode (solução mãe de 200mg/ml), estocado á -20°C e descongelado imediatamente antes do uso.

3.3 ELEIÇÃO DA DOSE DE VENENO UTILIZADA

Para eleger a dose adequada do veneno de **Bothrops lanceolatus** em nosso estudo, realizamos vários experimentos na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, utilizando doses de 15, 18, 20, 40 e 60 µg/ml. Avaliamos o bloqueio da transmissão neuromuscular e seu tempo de instalação.

Dentre as doses testadas, a dose de 20 µg/ml foi a menor dose que demonstrou efeitos constantes e resultados nítidos, num período de tempo viável.

3.4 ESTUDOS BIOLÓGICOS

3.4.1 PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO

Os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (de 3 a 5 mg) por via intraperitoneal e foram sacrificados pela sangria da secção dos vasos cervicais do pescoço. A retirada e montagem da preparação nervo frênico-diafragma seguiu a técnica descrita por **BÜLBRING (1946)** adaptada para camundongo. Através da abertura do tórax do camundongo, retira-se o hemidiafragma esquerdo com porção do nervo frênico correspondente (nas preparações destinadas à estimulação elétrica indireta). A preparação é fixada em uma cuba, mantida em um banho de 5 ml de solução de Tyrode como meio nutritivo, tendo composição em mM de: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 11,9; MgCl₂ 0,25; NaH₂PO₄ 0,3 e glicose 11,0. A solução é mantida a uma temperatura de 37°C e constantemente aerada com um borbulhamento de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). Um eletrodo bipolar é colocado em torno

do nervo frênico para a estimulação elétrica indireta, proveniente de um estimulador Grass S88 (0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração e voltagem maximal). A preparação é mantida com uma tensão de 2,5g. As contrações musculares são registradas em fisiógrafo Goud RS 3400, através de um transdutor isométrico Load Cell BG 50 GMS.

Nas preparações destinadas à estimulação elétrica direta do diafragma, o método utilizado para retirada e montagem da preparação foi o mesmo, porém não houve a preocupação em preservar e isolar o nervo frênico presente. Nesses experimentos foram utilizados pulsos supra maximais (0,1 Hz, 2ms, 80 V), que também foram registrados no fisiógrafo.

Em todos os experimentos, sob estimulação elétrica direta ou indireta, antes da adição do veneno ou de outros fármacos utilizados, esperou-se a estabilização das preparações por aproximadamente 10 minutos.

Utilizamos drogas como a neostigmina (Neo; 5,8 μ M) e a 4-aminopiridina (4AP; 53 μ M) após a adição do veneno, para observarmos suas capacidades de antagonizarem os efeitos produzidos pelo veneno na transmissão neuromuscular, sob estimulação elétrica indireta.

Investigamos se o veneno de **Bothrops lanceolatus** estaria causando algum dano (na dose estudada) nas fibras musculares (sob estimulação elétrica direta), ao ponto de alterar as contrações musculares apresentadas antes de sua adição. Para isso adicionamos primeiramente a d-tubocurarina (10 μ g/ml), estimulamos indiretamente até que ela tenha provocado o bloqueio neuromuscular característico (por ser um antagonista competitivo da acetilcolina, ela ocupa os receptores colinérgicos nicotínicos sem ativá-los) e então passamos à estimulação elétrica direta da preparação, com a certeza de que a transmissão sináptica está bloqueada.

3.4.2 PREPARAÇÃO DIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO DE CAMUNDONGO

Os camundongos foram desnervados pela técnica de **VITAL BRAZIL (1965)**. Foram mantidos anestesiados com éter etílico e colocados em posição decúbito lateral direito. Após prévia depilação local, faz-se uma incisão de aproximadamente 0,5 cm, perpendicular à linha mediana, no terço inferior da região lateral do tórax esquerdo. Essa incisão compreende a pele e a camada muscular delgada que recobre a região. No espaço intercostal, corta-se com uma tesoura uma pequena porção dos músculos intercostais e com o auxílio de um bastão de vidro de extremidade recurvada, prende-se e traciona-se o nervo, trazendo-o para as bordas da incisão, onde é cortado. Após isso sutura-se a pele com um ou dois pontos conforme o tamanho da incisão. Recuperados da anestesia os camundongos, após 15 a 20 dias da desnervação, são sacrificados para a montagem da preparação com o hemidiafragma esquerdo desnervado, através da técnica utilizada para a montagem da preparação nervo frênico-diafragma.

O diafragma cronicamente desnervado é mantido sob uma tensão constante de 2,5 g através de um fio preso à sua porção tendinosa e ao transdutor isométrico Myograph F-60 (Narco Bio-Systems, Inc) acoplado a um fisiógrafo Narcotrace 40 (Narco Bio-Sistemas, Inc).

Antes da adição do veneno adiciona-se acetilcolina (36 μ M) tendo com isso uma curva controle (contratura). Depois disso adicionamos o veneno, deixando-o incubado por 20 min e 40 min e após cada intervalo de incubação repete-se a adição de acetilcolina para comparar com a curva controle. Após cada adição de acetilcolina e observação da resposta na contração do diafragma, realizam-se lavagens sucessivas da preparação (cinco lavagens) com solução de Tyrode. A preparação é mantida sob

estimulação elétrica direta (estimulador Grass S 48; pulsos supra-maximais de $\pm 80V$ com 2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência) até a realização das curvas de acetilcolina, quando o estimulador é desligado . Ele é ligado novamente após o registro de cada curva de acetilcolina.

3.4.3 PREPARAÇÃO MÚSCULO BIVENTER CÉRVICIS DE PINTAINHO

A preparação músculo biventer cérvicis de pintainho seguiu o método descrito por **GINSBORG e WARRINER (1960)**. Pintainhos de 4 a 8 dias foram anestesiados com éter etílico e sacrificados. O músculo biventer cérvicis é isolado, retirado e fixado em uma cuba, onde é mantido em banho de 5 ml de Krebs como solução nutritiva, tendo composição em mM: NaCl 136; KCl 5,0; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,2. A solução foi mantida a 37°C e constantemente aerada com um borbulhamento de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). A preparação é submetida a uma tensão de 0,5 g, estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). A estimulação elétrica é feita através de estimulador Grass S88. Na estimulação elétrica indireta são aplicados pulsos supra maximais de 0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração e voltagem de 7V (para estimulação elétrica direta no músculo usou-se voltagem acima de 9V, pois a partir de 9V já é considerada estimulação elétrica direta).

Como na preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongo, adiciona-se acetilcolina (36 μ M) para obtenção de uma resposta contraturante controle. Após isso adiciona-se o veneno para ficar encubando e depois realizar nova contratura de acetilcolina e poder comparar o resultado com a curva controle.

3.5 ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS

Para o estudo dos potenciais bioelétricos de repouso de membrana e de placa terminal em miniatura (pptom), foram realizados experimentos utilizando as preparações nervo frênico-diafragma de camundongo.

A preparação é montada horizontalmente com a superfície torácica voltada para cima e fixada com alfinetes em uma cuba perspex “Dow Corning-Sylgard” (10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de altura) contendo 10 ml de solução nutritiva de Tyrode e aerada com carbogênio.

A realização das observações eletrofisiológicas é feita colocando-se a cuba na platina do microscópio, usando-se a técnica convencional de registros com microeletrodos de vidro (FATT e KATZ, 1951). Os microeletrodos são preparados no próprio laboratório, com o auxílio do “Microelectrode Puller” (modelo 8104, Palmer), são preenchidos com KCl 3M, tendo uma resistência de 5-20 M Ω e são conservados em geladeira. Para sua confecção utilizam-se tubos de vidro apropriados (capilares de vidro Clark com microcapilar interno que facilita o preenchimento com KCl).

3.5.1 DESCRIÇÃO DO CIRCUITO

O microeletrodo (Me) é fixado em sua extremidade posterior a um suporte apropriado de acrílico. A fixação do Me, na parte ântero-inferior do suporte, é feita através de um tubo de aço inox com rosca externa e porca cônica de metal com orifício central (suficiente para a introdução do Me), junto com um anel de vedação de polietileno. Na parte póstero-inferior do suporte, sai um fio de platina que é unido a um seguidor catódico através de

um fio condutor. A conexão entre Me e o fio de platina é feita através de um vaso comunicante preenchido com KCl (3 M). Na extremidade superior do suporte, os orifícios do vaso comunicante são vedados por uma lamínula, mediante uma delgada camada de vaselina em pasta. O suporte é fixado ao braço de um micromanipulador Jena (Alemanha) acoplado a um microscópio eletroscópico Zeiss com aumento de até 40 vezes. Este equipamento permite realizar pequenos deslocamentos horizontais e verticais, controlando a introdução do Me nas fibras musculares, para as medidas dos potenciais de repouso de membrana e captação dos potenciais de placa terminal em miniatura (mepp's ou pptm). O seguidor catódico é posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conecta-se ao canal do osciloscópio (Tektronix 5103N com módulo 5A 22N "Diferential Ampl" e 5B 12N "Dual time Base"). O eletrodo indiferente constitui-se de um fio de platina, incluído em tubo de vidro submerso em mercúrio vivo, onde se coloca um tubo curvo (para adaptação da cuba) preenchido com ágar-salina. A preparação e toda a aparelhagem empregada permanecem no interior de uma gaiola de Faraday, montada sobre uma mesa rígida, fixada no solo a fim de evitar vibrações. A descrição do circuito apresenta-se na página a seguir:

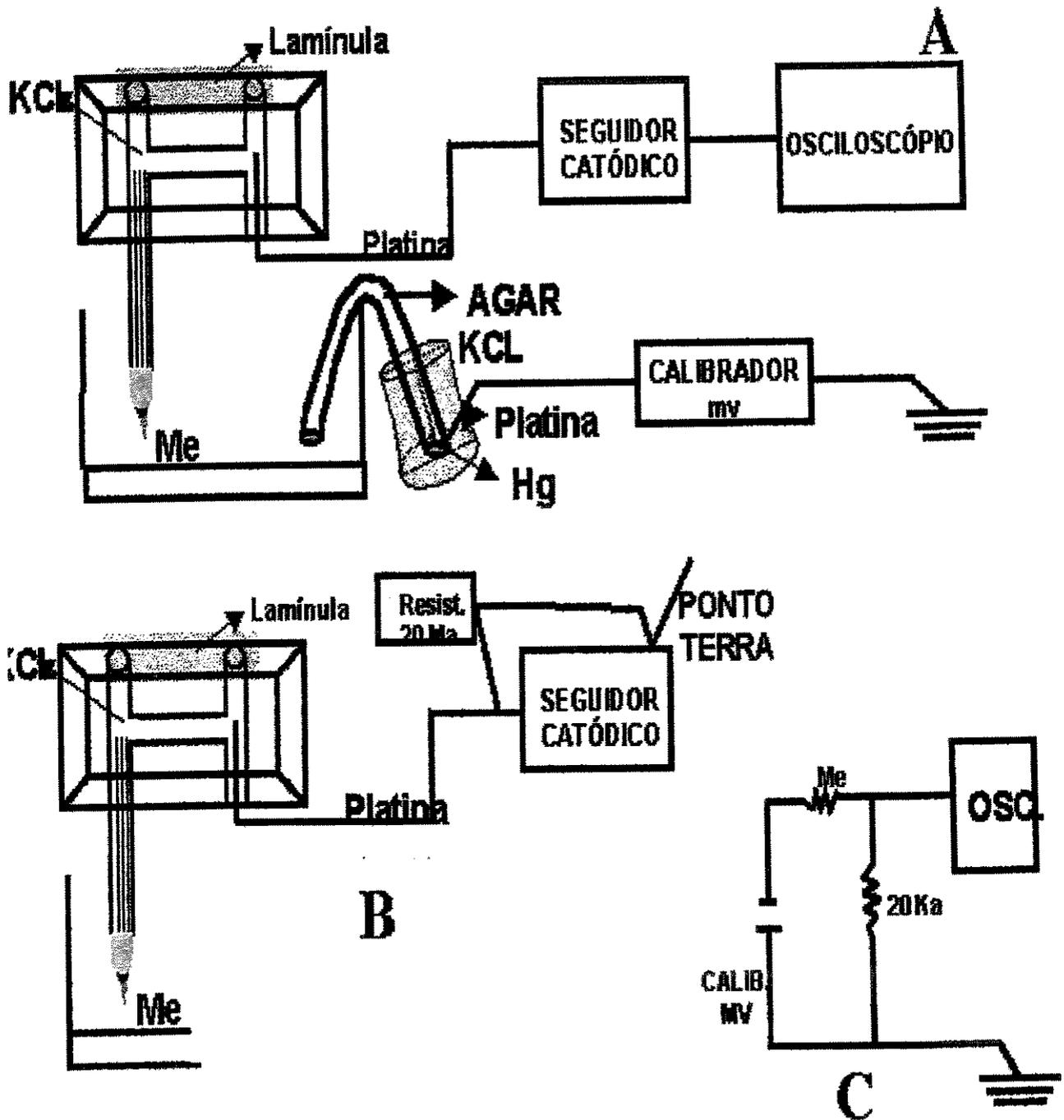


FIGURA 3 – Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de repouso e de placa terminal em miniatura →

A – Circuito simplificado

B – Circuito simplificado para obtenção de resistência do Me

C – Circuito para medida da resistência do Me

3.5.2 MEDIDA DE RESISTÊNCIA DO MICROELETRODO

Após a retirada do seu suporte de estocagem, o Me é encaixado no suporte de acrílico. O conjunto é fixado no braço do micromanipulador, ligando-se o fio condutor ao seguidor catódico.

A medida da resistência do Me ocorre, mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo, em paralelo no circuito, uma resistência de valor conhecido ($20\text{M}\Omega$). São desprezados os Me cuja resistência não está compreendida entre 5 e $20\text{M}\Omega$.

3.5.3 POTENCIAL DE MEMBRANA EM REPOUSO

Para a determinação do potencial de repouso de membrana das fibras musculares, os Me são inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio e mede-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Repete-se o mesmo procedimento em cinco fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média aritmética e o erro padrão das leituras realizadas. Determina-se o potencial de repouso de membrana, multiplicando-se o valor da média por um fator de correção (fc). Este é estabelecido aplicando-se ao circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio ($fc = 100/\text{deflexão correspondente}$).

O efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* sobre o potencial de repouso de membrana foi avaliado utilizando-se a dose de $20\text{ }\mu\text{g/ml}$. Para isso realizou-se primeiramente um controle (antes de adicionar o veneno), e depois as medições após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos da adição do veneno. Para cada intervalo de tempo são feitas cinco medições em cinco

regiões distintas das fibras musculares. Os valores obtidos são comparados com os valores do controle.

3.5.4 POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (pptm)

Para captar o potencial de placa terminal em miniatura, o Me é implantado junto, ou o mais próximo possível, da região da placa terminal motora.

Os pptm's são registrados primeiramente para termos um controle. Depois adiciona-se o veneno de **Bothrops lanceolatus** e observa-se as alterações na frequência e amplitude dos potenciais. Utilizamos Neostigmina (5,8 μ M) e 4-aminopiridina (53 μ M) para tentarmos reverter o bloqueio produzido pelo veneno. Os pptm's são fotografados em filme "Polaroid" por uma câmera osciloscópio (modelo C-5A).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância para as diferenças observadas foi determinada pelo teste *t* – Student, com o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão ($\Sigma \pm e.p.$).

Resultados

4-Resultados

4.1 ESTUDOS MIOGRÁFICOS

4.1.1 PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO

4.1.1.1 Estimulação elétrica indireta

A adição de 20µg/ml do veneno de **Bothrops lanceolatus** produziu inicialmente aumento na amplitude das contrações musculares além de contrações espontâneas (fig.5) e posteriormente provocou diminuição nessas contrações até a obtenção de um bloqueio neuromuscular de 70 % (porcentagem média estipulada para observação dos efeitos do veneno) (fig.4). O tempo para levar a esse bloqueio, foi de $182,6 \pm 15,7$ min.

Na reversão do bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno, a neostigmina (Neo, 5,8µM) antagonizou parcialmente esse bloqueio ($64,4 \pm 9,2$ %) (fig.6), já a 4-aminopiridina (4-AP, 53µM) antagonizou totalmente o bloqueio (fig.7).

→O aumento inicial das contrações musculares e as contrações espontâneas demonstram facilitação da transmissão neuromuscular e discreto aumento na liberação de ach, sugerindo ação pré-sináptica

→A reversão do bloqueio, sugere ação nos receptores nicotínicos pós-sinápticos

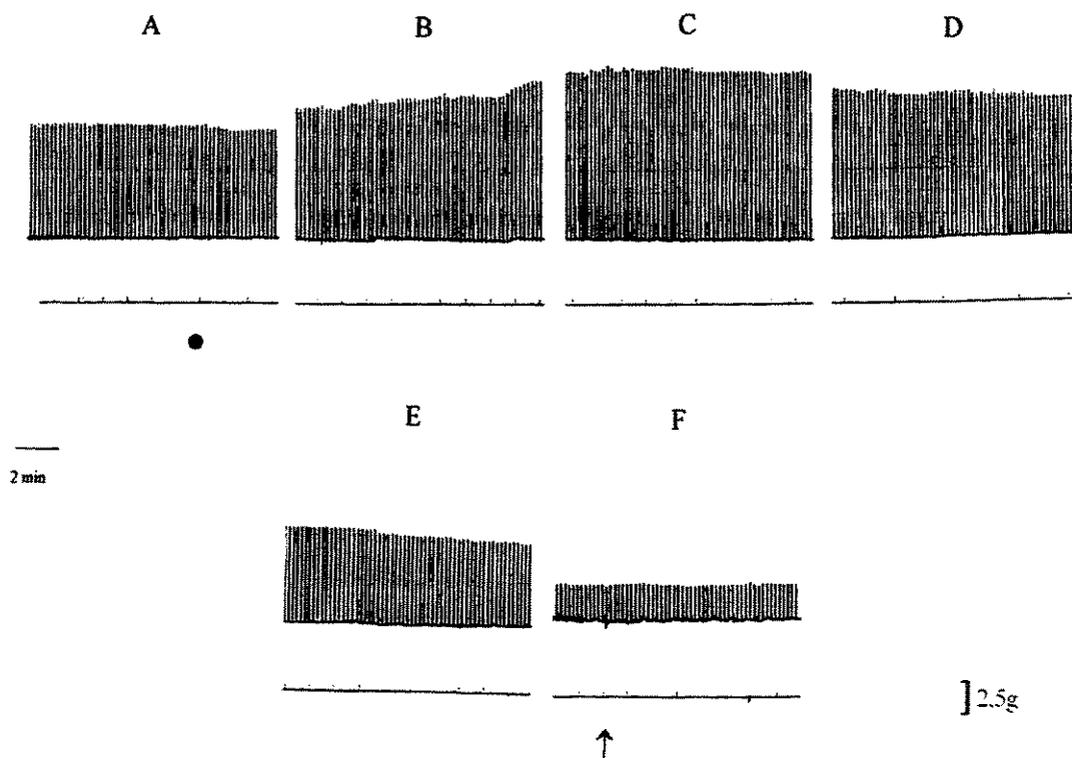


FIGURA 4 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=4).

- A – Controle (7 min) e (●) Adição do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$)
 B – 34 min após adição do veneno
 C – 58 min após adição do veneno
 D – 96 min após adição do veneno
 E – 126 min após adição do veneno
 F – 174 min após adição do veneno e (↑) bloqueio neuromuscular de 70% (182,6 \pm 15,7 min)

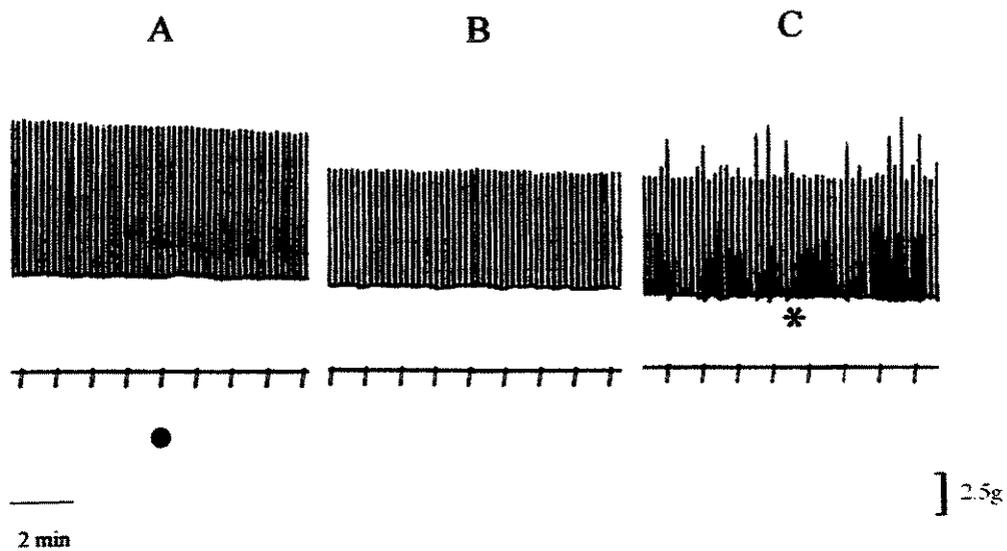


FIGURA 5 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=4).

A – Controle (8 min) e (●) Adição do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$)

B – 50 min após adição do veneno

C – 90 min após adição do veneno e (*) notar as contrações espontâneas produzidas

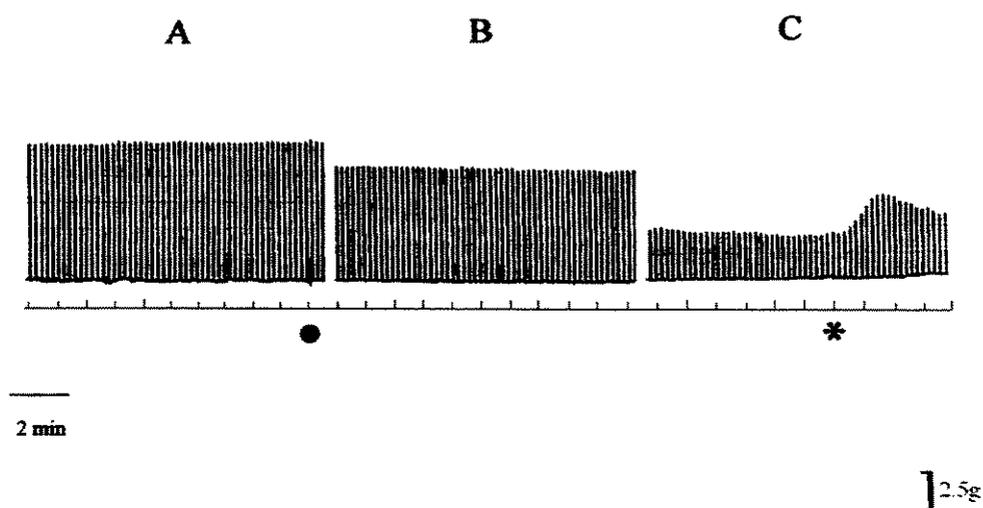


FIGURA 6 – Efeito da neostigmina sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de **Bothrops lanceolatus** (20 $\mu\text{g/ml}$), na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=5).

A – Controle (9 min) e (●) Adição do veneno de **Bothrops lanceolatus** (20 $\mu\text{g/ml}$)

B – 62 min após adição do veneno

C – 135 min após adição do veneno e (*) Adição de neostigmina (5,8 μM) após o bloqueio neuromuscular produzido (158 \pm 26,8min)

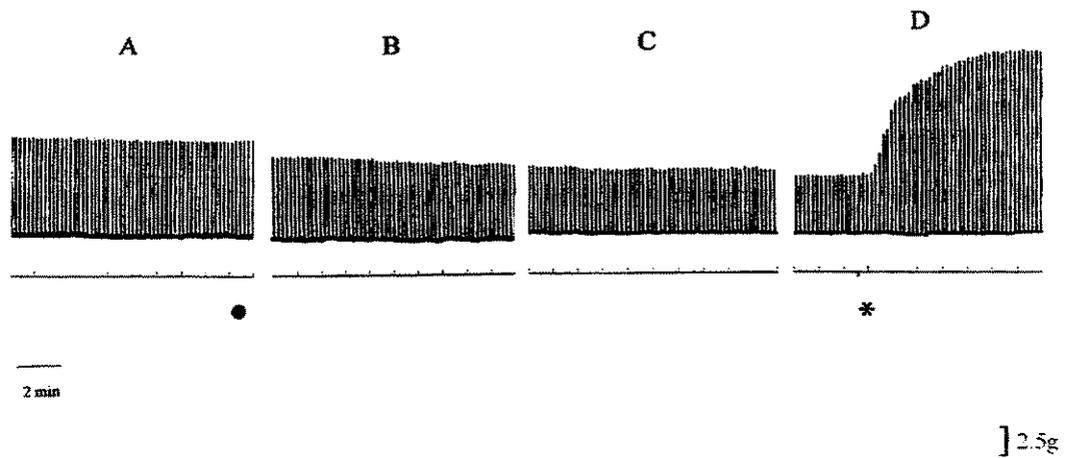


FIGURA 7 – Efeito da 4-aminopiridina sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$) na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta (n=5).

A – Controle (9 min) e (●) Adição do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$)

B – 21 min após adição do veneno

C – 44 min após adição do veneno

D – 127 min após adição do veneno e (*) Adição de 4-AP (53,0 μM) após o bloqueio neuromuscular produzido (123,3 \pm 4,9 min)

4.1.1.2 Estimulação elétrica direta

A preparação foi previamente curarizada com d-tubocurarina 10 $\mu\text{g/ml}$, sob estimulação elétrica indireta até obtenção de um bloqueio neuromuscular completo característico dessa substância.

Realizou-se então estimulação elétrica direta e adição do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$) à preparação. Após 30 min observamos que não houve alteração nenhuma na amplitude das contrações musculares (fig.8).

→Com isso observamos que o veneno, na dose estudada, não provoca nenhum dano nas fibras musculares a ponto de alterar a amplitude das contrações apresentadas antes de sua adição (confirmando que a ação do veneno se dá provavelmente na junção neuromuscular e não nas fibras).

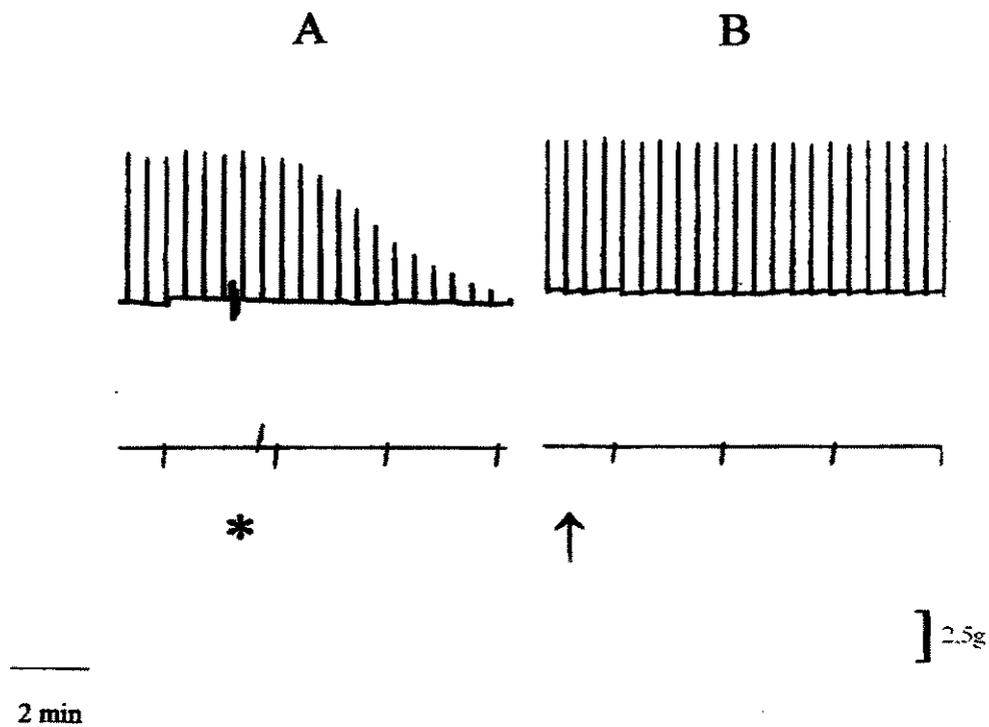


FIGURA 8 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo curarizada (d-tc 10 $\mu\text{g/ml}$) (n=4).

A – Controle (10 min) e (*) Adição de d-tubocurarina

B – (↑) Estimulação elétrica direta, 30 min após adição do veneno

4.1.2 PREPARAÇÃO DIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO DE CAMUNDONGO

Adicionou-se primeiramente a acetilcolina (36 μ M), para obtenção de uma condição controle (no músculo desnervado ocorre a neoformação de receptores nicotínicos ao longo de toda a fibra muscular e a adição de Ach é traduzida por uma contratura). A seguir o veneno de **Bothrops lanceolatus** (20 μ g/ml) foi adicionado e após um período de incubação inicial de 20 min, fez-se novamente estímulo elétrico e adição de Ach. A seguir procedeu-se à lavagem da preparação com Tyrode e após mais 20 min uma nova estimulação elétrica direta e adição de Ach. O veneno foi capaz de bloquear totalmente a resposta contraturante induzida pela acetilcolina após 20 min de incubação, sem que houvesse modificação da amplitude das contrações sob estímulo elétrico direto (fig.9).

→ Isso pode sugerir uma ação do veneno nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos

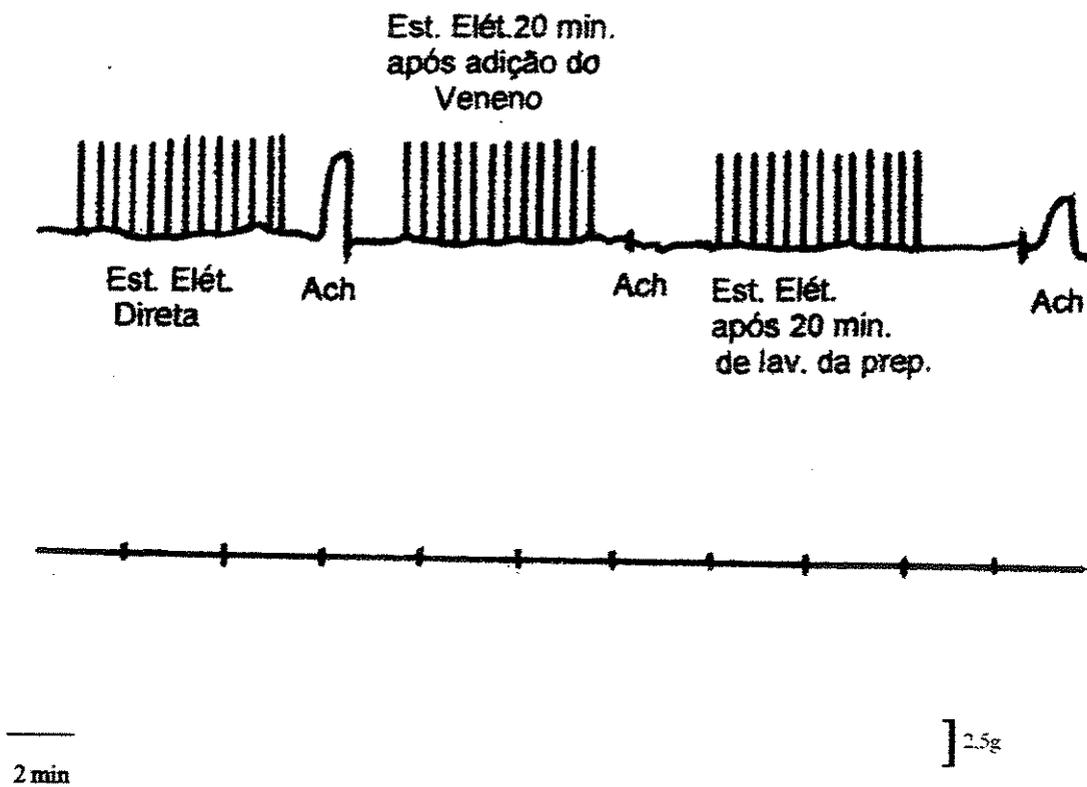


FIGURA 9 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre a preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongo ($n=4$).

— Estimulação elétrica direta e adição de acetilcolina (36 μM) antes da adição do veneno, 20 min após adição do veneno e 20 min após lavagem da preparação.

4.1.3 PREPARAÇÃO MÚSCULO BIVENTER CÉRVICIS DE PINTAINHO

Realizamos a condição controle com a adição e conseqüente contratura de acetilcolina (36 μ M) e então adicionamos o veneno de **Bothrops lanceolatus** (20 μ g/ml). Após período de incubação de 20 min e 60 min o veneno foi capaz de bloquear ou diminuir a resposta contraturante induzida pela acetilcolina em 4 experimentos (n=8). Diante disso concluímos que o veneno na dose de 20 μ g/ml está no limiar de ação na preparação biventer cérvicis de pintainho (fig.10)

→ Sugere que o veneno esteja agindo nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos (confirmando os resultados obtidos com a preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongo)

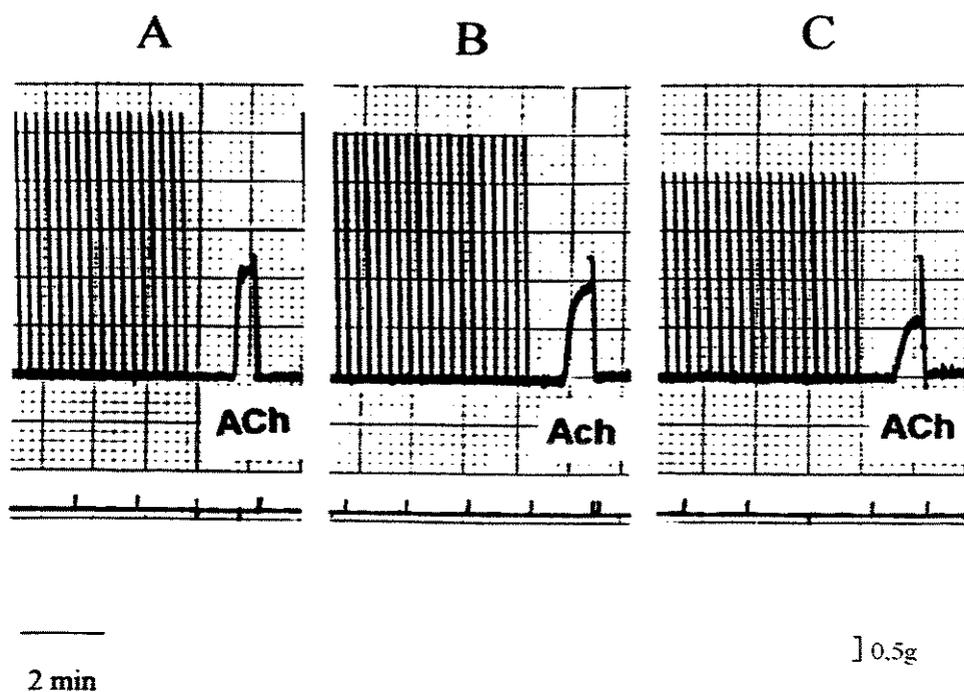


FIGURA 10 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre a preparação músculo biverter cervicis de pintainho (n = 8).

A – Controle (10 min) e Adição de acetilcolina (36 μM)

B – 20 min após adição do veneno e Adição de acetilcolina (36 μM)

C – 60 min após adição do veneno e Adição de acetilcolina (36 μM)

4.2 ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS

4.2.1 Potencial de membrana em repouso

O estudo do potencial de membrana na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo mostrou que o veneno de **Bothrops lanceolatus**, na dose de 20 µg/ml, não produz alterações nas medidas do potencial de membrana das fibras musculares (n=4) (fig.11)

→demonstra portanto que o veneno não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular esquelética de camundongos, e nem ações diretas (lesão), comprovando os resultados obtidos quando se fez estimulação elétrica direta, tanto em diafragmas como no biventer cervices de pintainhos

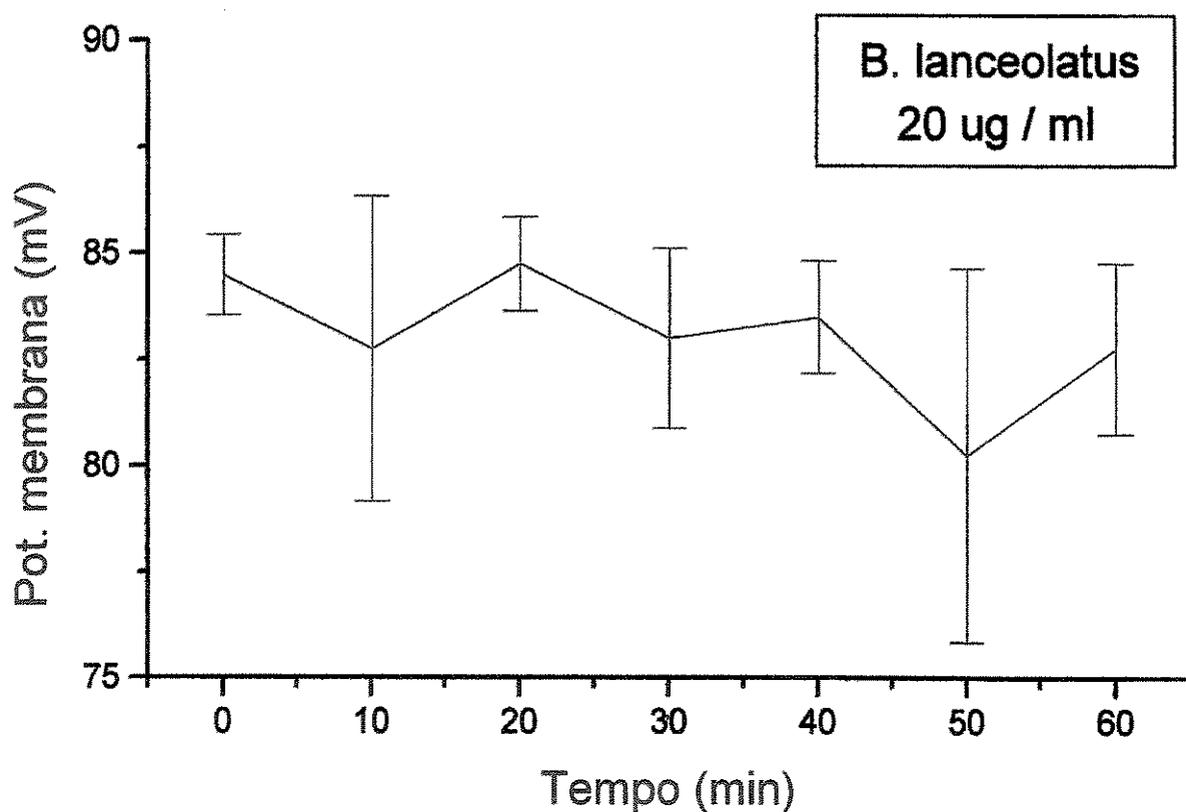


FIGURA 11 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 µg/ml) sobre o potencial de membrana, nas fibras musculares do diafragma de camundongo (n = 4).

— No gráfico o potencial de membrana foi determinado, onde cada ponto representa a média \pm erro padrão de 4 experimentos

4.2.2 Potencial de placa terminal em miniatura (pptom)

O estudo do potencial de placa terminal em miniatura (pptom) na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo demonstrou que o veneno de **Bothrops lanceolatus** (20 µg/ml) provocou um progressivo decréscimo na amplitude e na frequência desses potenciais até seu total desaparecimento. Após esse bloqueio adicionamos a Neostigmina (Neo 5,8 µM) (n=4) que reverteu totalmente a frequência e amplitude dos pptom's em $11,6 \pm 3,6$ min (fig.12). Da mesma forma também utilizamos a 4-aminopiridina (4AP 53 µM) (n=4), que assim como a Neostigmina foi capaz de reverter totalmente o bloqueio produzido pelo veneno em $5,6 \pm 0,6$ min (fig.13).

→Diante disso analisamos que a ação do veneno tem grande probabilidade de ocorrer na região pós-sináptica, nos receptores nicotínicos

E importante salientar que o nosso objetivo é de analisar se há ou não antagonismo destas drogas frente ao bloqueio causado pelo veneno em estudo e não por quanto tempo ocorre esse antagonismo.

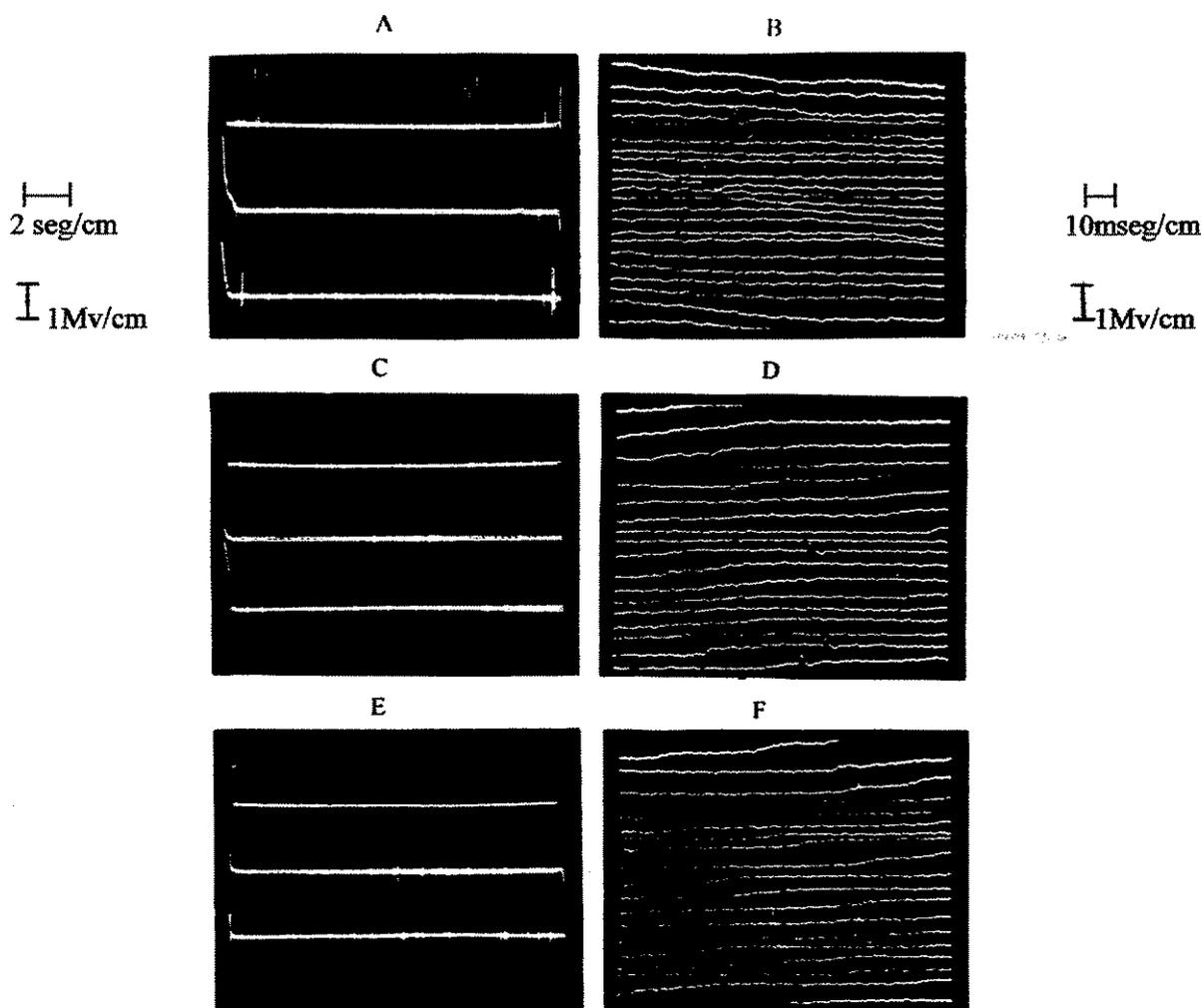


FIGURA 12 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 μg/ml) sobre o potencial de placa terminal em miniatura (pptom) e efeito da neostigmina (5,8 μM) sobre as alterações causadas pelo veneno sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (n = 4).

A – Controle (2 seg/cm)

B – Controle com velocidade de 10 mseg/cm

C – 32 min após adição do veneno (2 seg/cm)

D – 32 min após adição do veneno com velocidade de 10 mseg/cm

E – 8 min após adição de neostigmina (2 seg/cm)

F – 8 min após adição de neostigmina com velocidade de 10 mseg/cm

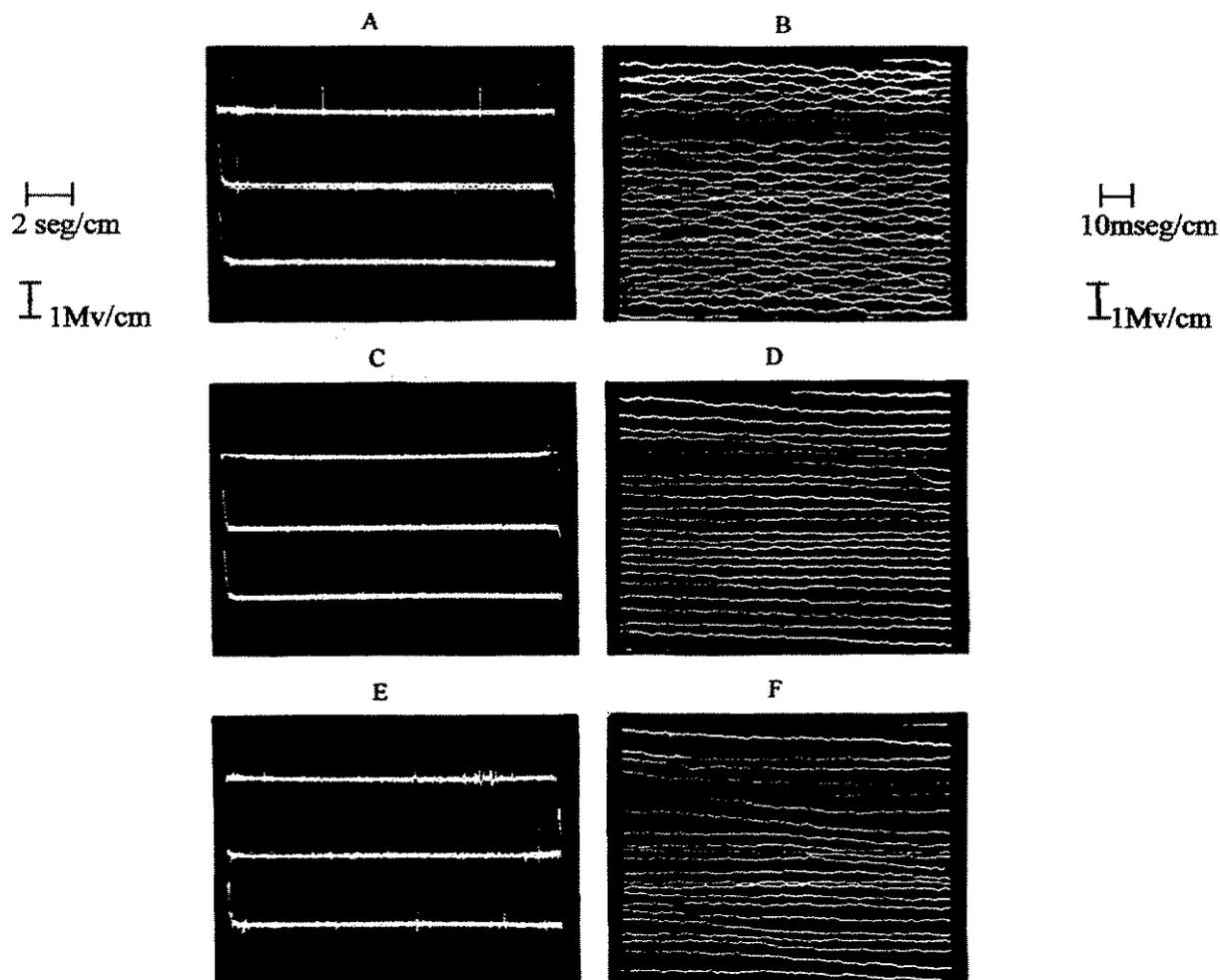


FIGURA 13 – Efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre o potencial de placa terminal em miniatura e efeito da 4-aminopiridina (53,0 μM) sobre as alterações causadas pelo veneno sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (n = 4).

A – Controle (2 seg/cm)

B – Controle com velocidade de 10 msec/cm

C – 5 min após adição do veneno (2 seg/cm)

D – 5 min após adição do veneno com velocidade de 10 msec/cm

E – 7 min após adição da 4-aminopiridina (2 seg/cm)

F – 7 min após adição da 4-aminopiridina com velocidade de 10 msec/cm

Discussão

5-Discussão

O veneno da **Bothrops lanceolatus**, encontrada na ilha da Martinica, no Caribe (América Central), foi até hoje alvo de poucos estudos experimentais, principalmente quanto a sua atividade na junção neuromuscular e no músculo esquelético.

Nesse estudo foi verificado o potencial neurotóxico e miotóxico desse veneno nas preparações nervo frênico-diafragma de camundongo, diafragma cronicamente desnervado de camundongo e biventer cervices de pintainho.

Tanto as técnicas miográficas como as eletrofisiológicas utilizadas favorecem a compreensão dos mecanismos pelos quais o veneno age, modificando a transmissão normal do impulso nervoso.

Foi demonstrado nesse estudo, que o veneno de **Bothrops lanceolatus** na dose de 20 µg/ml, causa alterações tanto miográficas como eletrofisiológicas.

Após estudos realizados com a **Bothrops lanceolatus**, constatou-se que seu veneno apresenta a maioria das atividades biológicas das **Bothrops** brasileiras (LÔBO DE ARAÚJO et al, 1990).

No Brasil as serpentes do gênero **Bothrops** encontradas são principalmente as **Bothrops jararaca**, **jararacussu**, **alternatus** e **neuwedi**. Os venenos **Bothrópicos** além de alterações sistêmicas, algumas vezes letais, induzem intensos efeitos locais, entre eles hemorragia, edema e necrose (OHSAKA, 1979; GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1989). Os venenos **Bothrópicos** são característicos por causar mionecrose (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; COSTA et al 1999). As miotoxinas **Bothrópicas** apresentam uma variada quantidade de atividades das fosfolipases A2 e juntamente com as metaloproteinases hemorrágicas são a

principal causa dos danos locais causados por esses venenos (**GUTIÉRREZ e RUCAVADO 2000**).

Isso difere das características dos venenos das serpentes **Micrurus** (corais) e **Crotalus** (cascavéis) (também presentes no Brasil), pois esses são predominantemente neurotóxicos.

As diversificadas ações dos venenos de serpentes podem ser atribuídas a componentes ou toxinas específicas, embora seja possível que diferentes toxinas possam agir sinergicamente na indução de um efeito, assim como uma mesma toxina pode ter mais de uma ação (**JIMÉNEZ-PORRAS, 1968, 1970; KINI IWANAGA, 1986**).

Entre os gêneros peçonhentos encontrados no Brasil, somente **Crotalus** e **Micrurus** são conhecidos clinicamente por interferir na transmissão neuromuscular, produzindo paralisia da musculatura esquelética. Como os venenos **Bothrópicos** não produzem sinais aparentes de neurotoxicidade nos acidentes com essas serpentes (*in vivo*), a insuficiência respiratória observada em alguns casos é atribuída a um edema pulmonar agudo (**RIBEIRO et al, 1998**).

Apesar disso, vários dos venenos **Bothrópicos**, mesmo não produzindo nenhum sinal clínico de neurotoxicidade após o envenenamento em humanos, podem produzir bloqueio neuromuscular em preparações isoladas (*in vitro*) (**RODRIGUES-SIMIONI et al, 1983; HELUANY et al, 1992; COGO et al, 1993; ZAMUNÉR et al, 1997; COSTA et al, 1999**).

Estudos têm demonstrado que o veneno de várias espécies de **Bothrops**, incluindo **B. alternatus** (**ZAMUNÉR et al., 2004**), **B. erythromelas** (**ZAMUNÉR et al., 2004**), **B. insularis** (**COGO et al., 1993; RODRIGUES-SIMIONI et al., 2004**), **B. jararaca** (**ZAMUNÉR et al., 2004**), **B. jararacussu** (**RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; ZAMUNÉR et al., 2004**), **B. leucurus** (**PRIANTI et al., 2003**), **B.**

moojeni (ZAMUNÉR et al., 2004), *B. neuwiedi* (BORJA-OLIVEIRA et al., 2002, 2003; RODRIGUES-SIMIONI et al., 2004; ZAMUNÉR et al., 2004) e *B. pirajai* (COSTA et al., 1999), podem causar bloqueio neuromuscular em aves e mamíferos *in vitro*. Além disso, podem produzir sinais de neurotoxicidade em pintainhos *in vivo*.

COGO et al, (1993), demonstraram as primeiras evidências sobre a neurotoxicidade do veneno de *Bothrops insularis* em pintainhos, quando após injetá-lo observaram perda do tônus muscular, flacidez no pescoço, apnéia e morte.

Os venenos são compostos por misturas de toxinas e segundo HARVEY et al (1994), as neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes, que causam paralisia neuromuscular, podem agir pré-juncionalmente, interferindo sobre a liberação de acetilcolina ou pós-juncionalmente, bloqueando os receptores para acetilcolina.

Neurotoxinas que agem pós-sinapticamente podem bloquear as respostas à acetilcolina assim como causar inibição das respostas à estimulação elétrica indireta, porém elas não afetam as respostas ao potássio e à estimulação direta no músculo.

A injeção intramuscular do veneno de *Bothrops lanceolatus* em pintainhos provocou perda de equilíbrio, parada respiratória e head drop ou flacidez do pescoço (LÔBO DE ARAÚJO et al, 1990).

Em 1996, ZAMUNÉR et al, relataram que o veneno de *Bothrops neuwiedi* quando injetado em aves, também causou head drop, perda do tônus e insuficiência respiratória.

Isso nos faz concluir que o veneno de *Bothrops lanceolatus*, assim como outros do mesmo gênero, apresenta sinais claros de neurotoxicidade, ainda que observados apenas nas aves.

Já o veneno da **Bothrops jararacussu** é pouco tóxico para aves (quando testado em pintainhos) e, no entanto, é potente quando testado em camundongos (VILLARROEL et al, 1979).

Na preparação neuromuscular isolada nervo frênico-diafragma de camundongo com estimulação elétrica indireta, após adição do veneno de **Bothrops lanceolatus**, ocorre um aumento inicial das contrações musculares e é possível notar também a presença de algumas contrações espontâneas. Após isso ocorre uma diminuição dessas contrações até a obtenção de um bloqueio neuromuscular de 70%, induzido pelo veneno total.

Diante disso, percebemos que esse veneno induz uma facilitação da transmissão neuromuscular nas preparações com camundongos (mamíferos) antes do aparecimento do bloqueio, o que não é muito comum de ocorrer com os venenos **Bothrópicos**, embora uma ação semelhante tenha sido observada com os venenos de **B. insularis** e **B. neuwedi** (RODRIGUES-SIMIONI et al, 2004) e com a miotoxina PLA2 desses venenos (OSHIMA-FRANCO et al, 2004).

Esse efeito sugere ser de origem pré-juncional e é comum de ocorrer com os venenos **Elapídicos**. No Brasil, uma das representantes da família **Elapidae** é a cobra coral (**Micrurus corallinus**) (VITAL BRAZIL e FONTANA, 1983/84).

As manbas africanas como a **Dendroaspis angusticeps** possuem em seu veneno um polipeptídeo que também exhibe este efeito pré-juncional, aumentando a amplitude das contrações musculares (HARVEY e KARLSSON, 1984).

Esse aumento na amplitude das contrações musculares seguido de um bloqueio neuromuscular, demonstra um discreto aumento na liberação da acetilcolina. Isso porque, como não foi observado nenhum aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm's) em

nossos experimentos, essa liberação de acetilcolina não pode ser muito intensa. O fato de ocorrer a liberação espontânea de acetilcolina demonstra não só a presença de uma ação pré-sináptica do veneno, como reforça a nossa conclusão de que o veneno de **Bothrops lanceolatus** realmente deve possuir uma ação neurotóxica. Apesar disso, ao longo do trabalho, percebemos que sua ação pós-sináptica prevalece nos resultados obtidos.

As neurotoxinas pós-sinápticas ocupam os receptores colinérgicos nicotínicos da placa terminal, sem promover despolarização da membrana da fibra muscular e sem alterar a quantidade de acetilcolina liberada. Esse modo de ação é semelhante ao curare (curarização), sendo as toxinas presentes denominadas curaremiméticas. Porém, a combinação das neurotoxinas pós-sinápticas com os receptores é sempre menos reversível e se processa lentamente. Os anticolinesterásicos, como a neostigmina, podem antagonizar esse bloqueio neuromuscular.

A serpente **Bungarus multicinctus** é um exemplo desse modo de ação, pois contém em seu veneno uma toxina de ação pós-sináptica irreversível denominada α -bungarotoxina, que apresenta estas características (CHANG,1979).

O veneno da **Bothrops insularis** também demonstra uma de suas ações como uma curarização, pois após a administração de doses variadas desse veneno em pintainhos, ocorre imobilização em segundos através de uma flacidez muscular por perda do reflexo e do tônus, caracterizando o comprometimento da musculatura em geral (COGO, 1991).

Outro mecanismo de ação pós-sináptico consiste na dessensibilização do receptor nicotínico (bloqueador não competitivo) (CHANGEUX, 1981; HEIDMANN et al, 1983), onde a afinidade do receptor para as neurotoxinas se mostra muito aumentada. Porém, essa interação neurotoxina-receptor não provoca abertura do canal iônico, logo não ocorre influxo de íons sódio e conseqüentemente não ocorre o potencial de ação.

Após o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de **Bothrops lanceolatus** na preparação nervo-frênico diafragma de camundongo, as respostas contráteis à estimulação elétrica direta não se alteraram. Da mesma forma, quando adicionamos a d-tubocurarina na preparação e esperamos obter o bloqueio neuromuscular característico produzido por essa substância, ao realizarmos a estimulação elétrica direta, antes e depois da adição do veneno, não houve alterações na amplitude das contrações musculares apresentadas. Verificamos com isso que o veneno, na dose estudada, não provoca nenhum dano nas fibras musculares a ponto de alterar a amplitude das contrações apresentadas antes da sua adição. Isso confirma uma ação sobre a junção neuromuscular.

Com a adição de neostigmina e 4-aminopiridina ocorre uma reversão do bloqueio produzido, sendo que com a neostigmina a reversão é parcial e com a 4-aminopiridina é total.

O fato de ambas as drogas serem capazes de reverter parcial ou totalmente o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de **Bothrops lanceolatus**, sugere que esse veneno produza um bloqueio dos receptores colinérgicos nicotínicos da placa terminal, agindo também como os curares.

COGO et al, 1993, observou em estudo que o veneno de **Bothrops insularis**, na preparação nervo-frênico diafragma de camundongo, também provoca um aumento inicial das contrações musculares seguido de um bloqueio neuromuscular. Porém esse bloqueio produzido é irreversível, pois os autores não observaram o antagonismo com a neostigmina em seus experimentos e concluíram que o veneno apresenta uma ação pré-sináptica, devido também a um aumento acentuado da freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm's) provocado após sua adição.

Tanto a preparação biventer cervicis de pintainho como a preparação nervo frênico diafragma cronicamente desnervado permite identificar o mecanismo de ação de uma neurotoxina. Isso porque, havendo presença de

contratura à adição de agonistas colinérgicos, após o bloqueio da resposta contrátil evocada, pode indicar atividade em sítios pré-sinápticos. Já a atividade pós-sináptica pode ser identificada pela ausência de resposta aos agonistas colinérgicos, sem afetar as respostas ao aumento da concentração de potássio ou à estímulo direto (BARRET e HARVEY, 1979).

O veneno de **Bothrops lanceolatus**, nas preparações diafragma cronicamente desnervado de camundongo, causou um bloqueio da resposta contraturante induzida pela acetilcolina sem que houvesse modificação da amplitude das contrações sob estímulo elétrico direto.

O fato de o veneno inibir a contratura de acetilcolina pode sugerir a presença de toxinas pós-sinápticas, curaremimética (ação nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos) ou dessensibilizantes do receptor de placa terminal ou até ambas.

Da mesma forma, na preparação biventer cérvicis de pintainho, também houve bloqueio da resposta contraturante induzida pela acetilcolina. Já a contratura induzida pelo potássio (KCl) não foi inibida (LÔBO DE ARAÚJO et al, 2002). Esses resultados confirmam também uma ação pós-sináptica do veneno sobre os receptores colinérgicos nicotínicos e não sobre as fibras musculares.

Nos estudos eletrofisiológicos realizados com o veneno de **Bothrops lanceolatus** na preparação nervo-frênico diafragma de camundongo, observamos que o veneno na dose estudada de 20 µg/ml, não produz alterações nas medidas do potencial de membrana das fibras musculares, demonstrando que esse veneno não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular de camundongos e logo não produz lesões.

FATT e KATZ (1952) verificaram que os potenciais de placa terminal em miniatura (pptom's) estão relacionados com a liberação espontânea de pequena quantidade de acetilcolina, denominada quantum.

No estudo do potencial de placa terminal em miniatura (pptm's), o veneno provocou um progressivo decréscimo na amplitude e na frequência desses potenciais até seu total desaparecimento. Esse bloqueio foi revertido pela neostigmina, que restabeleceu totalmente a frequência e amplitude dos pptm's. Da mesma forma a 4-aminopiridina reverte totalmente o bloqueio produzido. Com isso concluímos mais uma vez que o veneno tem grande probabilidade de agir nos receptores nicotínicos, na região pós-sináptica da placa terminal.

O fato da neostigmina antagonizar o bloqueio dos pptm's, produzido pelo veneno, demonstra que pelo menos parte das toxinas pós-sinápticas é constituída de toxinas de ação reversível. Da mesma forma, o antagonismo exercido pela 4-aminopiridina sobre o bloqueio dos pptm's, pode significar a existência, no veneno, de toxinas dessensibilizantes do receptor.

Isso porque as aminopiridinas são bloqueadoras do canal do potássio voltagem dependente (YEH et al, 1976; ULBRICHT e WAGNER, 1976; SCHAUF et al, 1976) e inibidoras da dessensibilização do receptor nicotínico da placa terminal (VITAL BRAZIL et al, 1983). Na ausência de potenciais de ação, as aminopiridinas não alteram a liberação de acetilcolina. O efeito antagônico da 4-aminopiridina sobre o bloqueio dos pptm's pode ser devido à sua ação inibitória da dessensibilização do receptor.

Diante disso é importante destacarmos que como houve reversão do bloqueio neuromuscular (produzido pelo veneno) pela neostigmina de até 73,6% ($64,4 \pm 9,2\%$), concluímos que pelo menos essa porcentagem do veneno esta agindo nos receptores colinérgicos nicotínicos e é reversível. Logo, se houver a presença de toxinas que ajam por dessensibilização do receptor nesse veneno, essas só podem representar no máximo 26,4% do total de toxinas. Conseqüentemente as 4-aminopiridinas podem estar agindo tanto pelo bloqueio dos canais de potássio como pela inibição da

dessensibilização dos receptores e talvez isso possa explicar porque a reversão do bloqueio pelas 4-aminopiridinas se mostrou mais intenso.

O bloqueio neuromuscular causado pelo veneno pode ser mediado por proteases tais como a protease caseinolítica identificada nesse veneno (LÔBO DE ARAÚJO et al, 2002) ou pelas miotoxinas ainda não identificadas, já que várias miotoxinas PLA2 dos venenos **Bothrópicos** são conhecidas por afetar a transmissão neuromuscular nas preparações com mamíferos (HELUANY et al, 1992; SOARES et al, 2000, 2001, 2002, RODRIGUES et al, 2004).

Devido à ação em conjunto das toxinas que compõem o veneno, é difícil definir os mecanismos exatos pelos quais esse veneno desencadeia seus efeitos. Seu fracionamento poderá esclarecer tais mecanismos, através do estudo dos componentes isolados nas preparações que utilizamos nesse trabalho.

Podemos concluir que o veneno em estudo apresenta tanto efeitos pré-sinápticos como pós-sinápticos e que os experimentos *in vitro*, na dose estudada (20µg/ml), demonstram que os efeitos pós-sinápticos são mais nítidos.

Conclusões

6-Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem levantar conclusões quanto a Ação do veneno de **Bothrops lanceolatus** (Fer de Lance) na junção neuromuscular e no músculo esquelético:

→ O veneno de **Bothrops lanceolatus** induz um aumento inicial das contrações neuromusculares seguido por um bloqueio neuromuscular, que é parcialmente antagonizado pela neostigmina (anticolinesterásico) e totalmente antagonizado pela 4-aminopiridina (bloqueador de canal de K⁺).

→ Sob estimulação elétrica direta o veneno de **Bothrops lanceolatus** não altera a amplitude da resposta contrátil, o que sugere que ele atue na junção neuromuscular e não nas fibras musculares da preparação.

→ Em preparações diafragma cronicamente desnervado de camundongos o veneno de **Bothrops lanceolatus** inibe a contração de acetilcolina, sugerindo uma ação nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos.

→ Em preparações biventer cêrvicis de pintainho, o veneno de **Bothrops lanceolatus** bloqueia a contração de acetilcolina, sugerindo novamente uma ação nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos e não nas fibras musculares da preparação.

→ O veneno de **Bothrops lanceolatus** não produz alterações no potencial de membrana, portanto não demonstra possuir ação despolarizante sobre a fibra muscular do diafragma de camundongos.

→ O potencial de placa terminal em miniatura é bloqueado pelo veneno de **Bothrops lanceolatus** e esse bloqueio é totalmente revertido pela neostigmina e pela 4-aminopiridina, o que sugere a ação do veneno na região pós-sináptica, nos receptores colinérgicos nicotínicos.

Referências Bibliográficas

7-Referências Bibliográficas

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; DA SILVA, O.A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. – Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos **Bothrópico e Crotálico**: análise de 63 casos. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 28: 220-227, 1986.

ARAÚJO, F. A. A.; SATALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. - Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad Jr, V., (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e Terapêutica dos acidentes**, Sarvier, São Paulo, pp. 6-9, 2003.

AURELL, L.; FRIBERGER, P.; KARLASSON, G.; CLAESON, G. – A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for factor Xa. **Thromb. Res.**, 11: 595-609, 1977.

BACHMAN, F.; DUCKERT, F.; KOLLER, F. – The stuart-power factor assay and clinical significance. **Thrombos. Diathes. Haemorrh.**, 2: 24-38, 1959.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. – Acidentes por Serpentes do Gênero **Bothrops**. In: **Venenos animais**, ed EPUC, Rio de Janeiro, pp. 261-280, 1994.

BARRET, J.C. & HARVEY, A. L. – Effects of the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* on skeletal muscle and neuromuscular transmission. **Br. J. Pharmac.** **67**: 199-205, 1979.

BJARNASON, J. B., FOX, J. W. – Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, **62**: 325-372, 1994.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A. – Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. Jour. Trop. Med. Hyg.**, **61**: 689-706, 1999.

BOLÑOS, R. – Las serpientes venenosas de Centroamerica y el problema del ofidismo. Primeira parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. **Rev. Cost. Cienc. Méd.**, **3**: 165-184, 1982.

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

BORJA-OLIVEIRA, C.R., SOARES, A.M., ZAMUNÉR, S.R., HYSLOP, S., GIGLIO, J.R., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L. - Intraspecific variation in the neurotoxic and myotoxic activities of *Bothrops neuwiedi* snake venoms. **J. Venom. Anim. Toxins** **8**, 88-101, 2002.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. – Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, **31**: 1137-1150, 1993.

BRAZIL, V. – La défense contre l'ophidisme. 2^a ed. São Paulo, Pocaie weis, 1911.

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

CALMETE, A. – Contribution à l'étude du venim des serpents. Immunisation dès animaux et traitement de l'envenimation. **Ann Ins Pasteur**, **8**: 275-291, 1894.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. – *In*: the venomous reptiles of Latin America. Cornell University Press, Ithaka, 1989.

CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD Jr, V., (Eds.) - **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e Terapêutica dos acidentes**, Sarvier, São Paulo: 44-60, 2003.

CHANGEUX, J. P. – Acetylcoline receptor: “allosteric “ membrane protein. **Harvey Lectures, Series 75**, 85-254, 1981.

CHANG, C. C. – The action of snake venoms on the nerve and muscle. *In*: LEE, C. Y. ed – **Snake Venoms: Handbook of Experimental Pharmacology**. New York, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 1979. p. 309-376. v. 52.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. – Pharmacological study of edema induced by venom of the snake **Bothrops asper** (terciopelo) in mice. **Toxicon** 33: 31-39, 1995.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. – Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of snake **Bothrops asper** (terciopelo). **Toxicon** 36: 1861-1869, 1998.

CHEYMOL, J.; MILLE, R.; BOURILLET, F.; SUGA, T.; LABOURDETTE, E. – Sur quelques propriétés pharmacodynamiques et biologiques de venins de serpents du genre **Bothrops** (**B. jararaca**, **B. atrox**, **B. lanceolatus** et **B. caribaeus**). **Bull. Soc. Pathol. Exot.** 61: 673-689, 1968.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. – Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, 36: 823-846, 1998.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. – Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29: 1279-1303, 1991.

COGO, J. C. – Estudo dos efeitos da peçonha de **Bothrops insularis** (jararaca ilhêa) sobre o Músculo de camundongo e pintainhos. **Tese de mestrado apresentada ao instituto de biologia da Unicamp**, 1991.

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

CONDREA, E. – Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins. **Experientia**, **30**: 121-129, 1974.

CONDREA, E. – Hemolytic effects of snake venoms. *In* LEE, C. Y. (Ed.) Snake venoms. **Handbook of Experimental Pharmacology**, vol 52, Springer-verlag Berlin Heidelberg, New York, 1979, pp 448.

COSTA, E. P.; CLISSA, P. B.; TEIXEIRA, C. F. P.; MOURA-DASILVA, A. M. – Importance of metalloproteinase and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, **26**: 13-17, 2002.

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

DENSON, K. W. – The specific assay of power-stuart factor and factor VII. *Acta Haemat*, **25**: 105-120, 1961.

DAVIDSON, F. F. & DENNIS, E. A. – Structure , function and mode of action snake venom and other phospholipases A2. *In*: TU, A. T., ed. **Handbook of Natural Toxins, Reptile venoms and toxins**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 107-145. V. 5.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. *In*: BUCHERL, W., BUCKELY, E., DEULOFEU, V. eds – **Venomous animals and their venom**. – 1 ed. New York, Academic Press, 1968. P. 119-165.

FAN, H.W., CARDOSO, J.L.C. - Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier, J., White, J. (Eds.), **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. CRC Press, Boca Raton, pp. 667-688, 1995.

FARIA, L. ; ANTUNES, E.; BOM, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A.
– Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by **Bothrops lanceolatus** (Fer de lance) venom. *Toxicon* **39**: 825-830, 2001.

FATT, P. & KATZ, B. – An analysis of the end-plate potencial recorded with na intra-cellular electrode. *J Phisiol* , **115**: 320-370, 1951.

FATT, P. & KATZ, B. – Spontaneous subthreshold activity at motor nerve-ending. **J. Physiol.**, 117: 109-128, 1952.

FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. – Neutralization of different activities of venoms from nine species of **Bothrops** snakes by **Bothrops jararaca** antivenom. **Toxicon** 30: 1591-1602, 1992.

FERREIRA, S. H.; ROCHA e SILVA, M. – Potention of bradykinin and eleidoisin by BPF (bradykinin potentaiting factor) from **Bothrops jararaca** venom. **Experientia**, 21: 347-349, 1965.

FLETCHER, J. E. & LIZZO, F. H. – Contracture inductionby snake venom cardiotoxim in skeletal muscle from humans and rats. **Toxicon**, 25: 1003-1010, 1987.

FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M. – Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake **Bothrops asper**. **Toxicon**, 38: 63-77, 2000.

FRANÇA, F. O. S. & FAN, H. W. – Acidente **Bothrópico** . In: **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. Schvartsman, s. Ed. Sarvier, 1992.

FRANÇA, F.O.S., MÁLAQUE, C.M.S. - Acidente **Bothrópico**. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad Jr. V. (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. Sarvier, São Paulo, pp. 72-86, 2003.

GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. N. – The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. **Br J Pharmacol**, 15 : 410-415, 1960.

GOLD, B. S. – Neostigmine for the treatment of neurotoxicity following envenomation by the Asiatic cobra. **Annals of emergency medicine**, 28 (1): 87-89, 1995.

GOPALAKRISHNAKONE, P. O. & HAWGOOD, B. – Morphological changes in murine nerve, neuromuscular junction and skeletal muscle by the crotoxin complex. **J Physiol** 291 5-6, 1979.

GUIMARÃES, A. Q.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; ARAÚJO P. M. F.; BOM, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. – Pharmacological and histopathological characterization of **Bothrops lanceolatus** (Fer de lance) venom-induced edema. **Toxicon**: 2002.

GUIMARÃES, A.Q., CRUZ-HÖFLING, M.A., FERREIRA DE ARAÚJO, P.M., BON, C., LÔBO DE ARAÚJO, A. - Pharmacological and histopathological characterization of **Bothrops lanceolatus** (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm. Res.** 53, 284-291, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; ÁVILA, C.; CAMACHO, Z.; LOMONTE, B. – Ontogenic changes in the venom of the snakes **Lachesis muta stenophrys** (bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon** 28: 419-442, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLÁÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA – Neutralización de los efectos locales del veneno de **Bothrops asper** por um antiveneno polivalente. **Toxicon** 19: 439-500, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. – Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon** 23: 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Y. - Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad Jr. V. (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. Sarvier, São Paulo, pp. 310-323, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Y. – Local tissue damage induced by **Bothrops** snake venoms. A review. **Mem Inst Butantan**, 51: 211-223, 1989.

GUTIERREZ, J. M. & LOMONTE, B. Y. – Phospholipase A2 myotoxins from **Bothrops** snake venoms. **Toxicon**, 33: 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; PORTILLA, E.; CERDAS, L.; ROJAS, E. – Local effects induced by coral snakes venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. **Toxicon**, **21**: 777-783, 1983.

GUTIÉRREZ, J. M.; ONNBY, C. L.; ODELL, G. V. – Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake **Bothrops asper**. **Toxicon** **22**: 719-731, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; CERDAS, L. – Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of **Lachesis muta melanocephala**, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. **Toxicon** **25**: 713-720, 1987.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, E.; SILVA, N. J.; NUNES, J. – Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American **Micrurus** (coral snakes). **Toxicon**, **30**: 1299-1302, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M. & RUCAVADO, A. – Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** **82**: 841-45, 2000.

HARRIS, J. B. & CULLEN, M. J. – Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc Rev**, **3**: 153-211, 1990.

HARVEY, A. L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, A.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS, J. B. – Screening of snake venoms for neurotoxic and miotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. **Toxicon** 32: 257-265, 1994.

HARVEY, A. L. & KARLSSON, E. – Polypeptide neurotoxin from **mamba** venoms that facilitate transmitter release. **TIPS**, 71-72, 1984.

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

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

HEIDMANN, T.; OSWALD, R. E. CHANGEUX, J. P. – Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor-rich membrane fragments from **Torpedo marmorata**. **Biochemistry** 22, 3112-3127, 1983.

HELUANY, N. F.; HOMSI BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. – Effects induced by Bothropstoxin, a component from **Bothrops jararacussu** snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon** 30, 1203-1210, 1992.

HOGÉ, A. R. & ROMANO HOGÉ, S. A. R of the world. Part I - Checklist of the pit vipers **Viperoidea, Viperidae, Crotalinae. Mem. Inst. Butantan: 42/43 : 179-310, 1978/1979.**

HUANG, T. F. & CHIANG, H. S. – Effect on human platelet aggregation of phospholipase A2 purified from **Heloderma horridum** venom. **Biochim Biophys Acta 1211: 61-68, 1994.**

IWANAGA, S. & SUSUKI, T. – Enzymes in snake venom. *In*: LEE, C. Y. ed. – **Snake venoms: Handbook of Experimental Pharmacology.** New York, Springer-verlag. Berlin Heidelberg, 1979. p. 41-55. v. 52.

JIMENEZ-PORRAS, J. M. – Biochemistry of snake venoms. **Clin. Toxicol, 3: 389-431, 1970.**

JIMENEZ-PORRAS, J. M. – Pharmacology of reptiles and protein in snake venoms. **Annu. Rev. Pharmacol., 8: 299-318, 1968.**

KINI, R. M. & IWANAGA, S. – Structure – functions relationships of phospholipases 2: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon, 24: 895-905, 1986.**

KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M.; GUIMARÃES S. M. – Fatal extradural haematoma after snake bite (**Bothrops moojeni**). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 552, 1991.**

LANDUCCI, E.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A. C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. – Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon** 32: 217-226, 1994.

LEE, C. Y. & CHANG, C. C. – Modes of action of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. **Mem Inst Butantan**, 33: p. 555-572, 1966.

LEE, C. Y.; CHANG, C. C.; CHIU, T. H.; CHIU, P. J. S.; TSENG, T.C.; LEE, S. Y. – Pharmacological properties of Cardiotoxin isolated from formosan cobra venom. **Naunyn-schmiedebergs Arch Pharmak. u exp Path**, 259: 360-374, 1968.

LEE, C. Y. – Classification of polypeptide toxins from elapid and sea snake venoms according to their pharmacological properties and chemical structures. **J Formosan Med Assoc**, 71: 311-317, 1972.

LIN, S. Y.; HUANG, M. C.; TSENG, W. C.; LEE, C. Y. – Comparative studies on the biological activities of cardiotoxin, melitin and prymnesin. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 287: 349-358, 1975.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; BOM, C. – Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon** 36: 745-758, 1998.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; LEITE, B. G.; PRADO-FRANCESCHI, J. ; FONTANA, M. D.; BOM, C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. – Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. **Toxicon** 40: 1283-1289, 2002.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; PRADO-FRANCESCHI, J. – Comparison of the phospholipase A2, blood-clotting, caseinolytic, esterolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 28: 601-609, 1990.

LÔBO DE ARAÚJO, A – Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus*. **Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, 1990.**

LÔBO DE ARAÚJO, A.; KAMIGUTI, A.; BON, C. – Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom. **Toxicon** 39: 371-375, 2001.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; PRADO-FRANCESCHI, J.; LEITE, B. G.; BOM, C.; SIMIONI-RODRIGUES, L. – The effects of a caseinolytic enzyme isolated from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom on avian and mammalian nerve-muscle preparations. **Toxicon**, 33: 303, 1995.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BOM, C. – Purification of an acidic phospholipase A2 from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon** 32: 1069-1081, 1994.

- LÔBO DE ARAÚJO, A.; SOUZA, A. O.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; FLORES, C. A.; BOM, C.** – *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom induces edema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon** **38**: 209-221, 2000.
- LOMONTE, B.** – Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon** **23**: 173-176, 1985.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MORENO, E.; CERDAS, L.** – Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** **25**: 443-450, 1987.
- MEBS, D. & OWNBY, C. L.** – Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther**, **48**: 223-236, 1990.
- MEIER, J.; STOCKER, K. F.** – Biological and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: Meier j., White j. (Eds) . **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Flórida: CrC Press, 367-412, 1995.
- MELO, P. A. & OWNBY, C. L.** – Different sensitivity of fast-and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. **Toxicon**, **34**: 653-669, 1996.

NISHIDA, S.; FUGIMURA, Y.; MIURA, S.; OSAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. – Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, 33: 1843-1849, 1994.

OHSAKA, A. – Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. *In*: C. Y. LEE (Ed.). *Snake venoms: Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Verlag-Berlin, New York, 1979, pp 480-546.

OSHIMA-FRANCO, Y., LEITE, G.B., DAL BELO, C.A., HYSLOP, S., PRADO-FRANCESCHI, J., CINTRA, A.C.O., GIGLIO, J.R., CRUZ-HÖFLING, M.A., RODRIGUES-SIMIONI, L. - The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95, 175-182, 2004.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; VALÉRIO, A. A.; HYSLOP, S.; ANDRILAO-ESCARSO, S.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. – Rabbit antivenom efficacy against myotoxic and neurotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. *J venom anim toxins*, 8: 226-243, 2002.

PRIANTI Jr., A.C.G., RIBEIRO, W., LOPES-MARTINS, R.A.B., LIRA-DA-SILVA, R.M., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L., CRUZ-HÖFLING, M.A., LEITE, G.B., HYSLOP, S., COGO, J.C. - Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon* **41**, 595-603, 2003.

REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S.; BAMBIRRA, E. A.; LACHAT, J. J.; COIMBRA, T. M. – Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. *Braz. Jour. Méd. Biol. Res.*, **22**: 407-416, 1989.

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES DE CAMPOS, V. A. F.; KATS, G.; TAKAOKAM, N. Y.; LEBRÃO, M. L.; JORGE, M. T. – Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/98. *Ver. Assoc. Med. Bras.*, **44**: 312-318, 1998.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. – Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*, **156**: 261-71, 1949.

RODRIGUES, V.M., MARCUSSI, S., CAMBRAIA, R.S., ARAÚJO, A.L., MALTA-NETO, N.R., HAMAGUSHI, A., FERRO, E.A.V., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R., SOARES, A.M. - Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon* **44**, 305-314, 2004.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESSE, N.; CECARELLI, B. – The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve muscle preperation. *Neuroscience*, 2; 475-489, 1983.

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

ROSENBERG, P. – Phospholipases. *In*: SHIER, W. T.; MEBS, D. ed. – *Handbook of Toxicology*. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 67-277.

ROSENFELD, G.; HAMPLE, O. G.; KELEN, E. M. A. – Coagulation and fibrinolytic activity of animal venoms: determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29: 143-148, 1959.

ROSENFELD, G. – Symptomatology, pathology and treatment of snake bits in South America. *In*: BUCHERL, W. and BUCKLEY E. E. (Ed.) *Venomous Animals and their venom*. Academic press, New York, 1971. pp 345-403.

ROTHSCHILD, A. M. & ROTHSCCHILD, Z. – Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. *In*: LEE, C. Y., ed. – *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Springer-Verlag, 1979. p. 591-628. v. 52.

SAÚDE, M. D. – Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: centro de documentação do Ministério da Saúde, 9-34, Fundação Nacional de Saúde, 1998.

SCHAUF, C. L.; COLTON, C. A.; COLTON, J. S.; DAVIS, F. A. – Aminopyridine and sparteine as inhibitors of membrane potassium conductance. Effects on *Myxicola* giant axons and the lobster neuromuscular junction. **J. Pharmacol. Expert. Ther.** 194: 414-425, 1976.

SHARMA, R. P.; TAYLOR, M. J. – Animal Toxins. In: **Handbook of toxicology.** Haley t. j., Berndt W. O. (eds) Washington: Harder & Row Pubkishers, 439-467, 1987.

SJOSTROM, L.; AL-ABDULLA, I. H.; RAWAT, S.; SMITH, D. C.; LANDON, J. – A comparison of ovine and equine antivenoms. **Toxicon** 32: 427-433, 1994.

SOARES, A.M., ANDRIÃO-ESCARSO, S.H., BORTOLETO, R.K., RODRIGUES-SIMIONI, L., ARNI, R.K., WARD, R.J., GUTIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R. - Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** 387, 188-195, 2001.

SOARES, A.M., GUERRA-SÁ, R., BORJA-OLIVEIRA, C., RODRIGUES, V.M., RODRIGUES-SIMIONI, L., RODRIGUES, V., FONTES, M.R.M., GUTIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R. - Structural and functional characterization of BnSP-7, a myotoxin Lys49 phospholipase A₂ homologue, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** 378, 201-209, 2000.

SOARES, A.M., OSHIMA-FRANCO, Y., VIEIERA, C.A., LEITE, G.B., FLETCHER, J.E., JIANG, M.S., CINTRA, A.C.O., GIGLIO, J.R. - Effects of Mn²⁺ on actions of bothropstoxin-I, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 34, 668-677, 2002.

STROKA, A., DONATO, J.L., BON, C., HYSLOP, S., LÔBO DE ARAÚJO, A. -Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon (in press)**, 2004.

SU, C.; CHANG, C. C.; LEE, C. Y. – *In* : RUSSEL, F. E.; SAUNDERS, P. R. ed. – **Animal toxin**. Pergamon, Oxford and New York, 1967. p. 259-267.

TAMIYA, N & ARAI, H. – Studies on sea-snake venoms. Crystallization of erabutoxins a and b from *Laticauda semifasciata* venom. **Biochem J**, 99: 624-630, 1966.

THOMAS, L. & TYBURN, B. – *Bothrops lanceolatus* bites in Martinique: clinical aspects and treatment. *In*: BOM, C.; GOYFON, M. (Eds.), *Envenomings and their treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon. pp. 255-65, 1996.

THOMAS, L.; TYBURN, B.; KETTERLE, J.; BIAO, T.; MEHDAOUI, H.; MORAVIE, V.; PLUMELE, Y.; BUCHER, B.; CANONGE, D.; MARIE-NELLY, C. A.; LANG, J. – Prognostic significance of clinical grading of patients envenomed by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92: 542-545, 1998.

TREBIEN, H. A. & CALIXTO, J. P. – Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions* 26: 292-300, 1989.

TU, A. T. – Chemistry of Rattlesnake Venoms. *In*: *Rattlesnake Venoms, their Actions and Treatment*. New York, Mercel Dekker, 1982, pp 247.

TU, A.T. – Tissue damaging effects by snake venoms: hemohrrage and myonecrosis. *In*: TU, A. T. ed – *Handbook of natural toxins: Reptile Venoms and Toxins*. New York, Marcel Dekker, 1991. pp. 297-338. v. 5.

ULBRICHT, W. & WAGNER, H. H. - Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on despolarization. *Pflügers Arch.* 367: 77-87, 1976.

VARANDA, E. A. & GIANNINI, M. J. S. – Bioquímica de veneno de serpentes. *In*: BARRAVIERA, B. **Venenos animais uma visão integrada.** 1 ed., Rio de Janeiro, EPUC, 1994 . p. 205-223.

VILLARROEL, M. S.; ZELANT, F.; ROLIN ROSA, R.; FURLANETTO, R. S. – Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos **Bothrópicos** em camundongos. **Memo. Inst. But.** ,42/43: 311-323, 1978/79.

VITAL BRAZIL, O. - Ação neuromuscular da peçonha de **Micrurus**. **O Hospital**, 68: 183-224, 1965.

VITAL BRAZIL, O. – Contribuição ao veneno ophídico **Rev. Med. São Paulo** (1901). *Collectanea dos Trabalhos do Instituto Butantan* (1901-1917) pp 1-30.

VITAL BRAZIL, O. & FONTANA, M. D. – Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral **Micrurus corallinus** na junção neuromuscular. **Memo. Inst. But.** 47/48: 13-26, 1983/84.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; PAVANI, N. J. P. – Effect of 4-aminopyridine on the post-synaptic action of polymyxin B. **Eur. J. Pharmacol.** 159: 47-51, 1983.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; PELLEGRINI, A. F. – Physiopathologie et therapeutique de L'envenomation experimentale causee par le venin de *Micrurus frontalis*. **Mem Inst Butantan (40/41):** 221-240, 1976/77.

VITAL BRAZIL, O. – Peçonhas. *In:* CORBETT, C. E.; ed. **Farmacodinâmica**. 6^a ed . Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p. 1044-1074.

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

WARREL. D. A.; **The global problem of snake bite: its prevention and treatment**. Singapore, National University of Singapore, 1992.

WEIL, C. S. – Tables for the convenient calculation of median-effective dose (LD50 and ED50) and instruction in their use. **Biometrics, 8:** 249-263, 1952.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. – Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. **Toxicon, 35:** 319-340, 1997.

YEH, J. Z.; OXFORD, G. S.; WU, C. H.; NARAHASHI, T. – Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. **Gen. Physiol. 68:** 519-535, 1976.

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

ZAMUNÉR, S. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.- Capacidade neutralizante de antivenenos comerciais sobre as atividades neurotóxicas e miotóxicas de venenos **Bothrópicos**. Campinas, 1997 (dissertação-mestrado, Universidade estadual de Campinas).

ZAMUNÉR, S. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; SIMIONI-RODRIGUES, L. - The screening of **Bothrops** venoms for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparations. **Toxicon** **34**, 314-315, 1996.