MARIELGA REALI

EFEITOS DO VENENO DE NAJA NAJA KAOUTHIA NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO

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 Cirurgiã Dentista Marielga Reali.

Campinas, 08 de janeiro de 2002.

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana
- Orientador -

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MARIELGA REALI

EFEITOS DO VENENO DE NAJA NAJA KAOUTHIA NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO

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*

Co-Orientadora: Profª Drª Maria Alice da Cruz-Höfling

CAMPINAS

2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Reali, Marielga
R229e Efeitos do veneno de *Naja naja kaouthia* na junção neuromuscular e no músculo esquelético de rato / Marielga Reali . Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Marcos Dias Fontana , Maria Alice da Cruz-Höfling
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Junção-neuromuscular. 2. Farmacologia. 3. Venenos. 4. Morfologia. I. Marcos dias fontana. II. Maria Alice da Cruz-Höfling. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE 3E
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R229e
V ... EX
TOMBO BC 54058
PROC 124103
C ... D
PREÇO R$ 11,00
DATA 22/05/03
Nº CPD ...

CM00182836-1

BIB ID 290562

UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Membros:

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Prof. Dr. José Carlos Cogo

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

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

Data: 08/01/02

000317764

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por ter me dado forças para vencer obstáculos, por ter me feito forte, não permitindo que o cansaço me dominasse. Se consegui chegar a este ideal, mais do que todos, devo ao Senhor. Que a luz divina continue a iluminar meu caminho. Conceda-me, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar aquelas que posso, sabedoria para distinguir uma das outras.

Aos meus pais

"A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la

com dignidade, não bastaria um obrigado.

A vocês, que me iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, para que trilhasse sem medo e cheia de esperança, não bastaria um muito obrigado.

A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus, não bastaria um muitíssimo obrigado.

A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Mas é o que acontece agora, quando procuro uma forma verbal de exprimir uma emoção que palavras dificilmente traduziriam."

Ao Thales

Foste à presença, a força, o acalento, a paciência em minhas horas de desespero.

Hoje, eu gostaria que vibrasse comigo.

Não porque eu consegui, mas porque juntos conseguimos vencer mais um desafio em nossas vidas. E que diante dos próximos, Deus permita estarmos juntos, para mais fortes podermos enfrentá-los.

Obrigada pelo interesse sempre notável e atenção constante dispensada em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho e principalmente pela preciosa compreensão.

Ao meu irmão Felipe e minha vó Nena

Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém.

Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto suficiente.

A vocês,

Meu enorme agradecimento pelo companheirismo, carinho, compreensão, apoio, incentivo e constante presença em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Registrar os agradecimentos que contribuíram para este trabalho seria uma árdua tarefa e sem palavras suficientes para expressar tantos reconhecimentos. Os professores se desgastam, movimentam, os amigos se interessam, as pessoas afetivamente mais próximas padecem... Nem por isso se pode deixar que o produto final venha acontecer.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, que não se limitou com todo seu potencial, mostrando-se competente e preocupado para realização deste trabalho. Obrigada por ter me acolhido e orientado seguramente na concretização deste projeto, e, mais que isso, pela compreensão e preciosas sugestões durante todo este percurso. Agradeço pela sua marcante presença em minha vida onde simples gestos ou até mesmo olhares transmitiram-me importantes palavras.

À Prof. Maria Alice da Cruz-Höfling, que quando deveria ser simplesmente professora, foi mestre, que quando deveria ser simplesmente mestre, foi amiga, e sua amizade me incentivou a seguir caminhos. Meu muito obrigado pelo tempo dispensado e conselhos valiosos.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pelo seu concorrido tempo cedido para complementação deste trabalho.

À Profª Drª Angélica e ao Prof. Dr. José Carlos Cogo pelas valiosas sugestões na revisão desta tese, as quais foram muito importantes para o melhoramento da mesma.

Aos amigos Antônio Vilson dos Santos, Gildo B. Leite, José Ilton e Gustavo Henrique da Sliva que, com formas e conhecimentos diversos, colaboraram para realização deste trabalho.

Aos secretários do Departamento de Farmacologia, pela atenção e pelos serviços prestados durante toda esta etapa.

À minha grande amiga Maria Regina Coelho que, com seu exemplo de humildade, deu-me informação incentivando a pesquisa, minha gratidão a você.

Às minhas amigas, Ana Maria T. Grégio e Francine G. Serafim que apesar de distantes neste momento, estiveram presentes durante a execução deste trabalho, me aconselhando, ajudando com dedicação, paciência, conhecimento e muito carinho, obrigada por tudo que fizeram por mim.

À todos amigos do Departamento, Érika, Yoko, Chariston, Vanessa, Alessandra, Patrícia entre outros que compartilharam seus ensinamentos para concretização deste projeto, obrigada pela amizade, apoio e alegre convívio.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pela profunda colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pelos serviços prestados.

Ao Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo convívio e ensinamentos que me prestaram.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica de Biologia da UNICAMP pelo apoio técnico e pelo uso de seus equipamentos.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP)- UNICAMP, pelo suporte financeiro concedido.

Gratidão a todos que, pelo conhecimento, amizade, carinho e respeito, ou pelo simples convívio ao longo deste tempo, se ligou a mim pelo vínculo da experiência comum.

A amizade não se força, não se compra e não se vende,

A amizade acontece, lentamente, em silêncio, devagar.

SUMÁRIO

Pág

RESUMO ..... *xlvii*

1. INTRODUÇÃO 51

2. OBJETIVOS 65

3. MATERIAIS E MÉTODOS 69

3.1. Animais 71

3.2. Veneno 71

3.3. Estudos biológicos 71

3.3.1. Preparação nervo frênico-diafragma de rato 71

3.3.2. Preparação diafragma de rato cronicamente desnervado 72

3.3.3. Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho 73

3.4. Dose letal 50 (DL50) 74

3.5. Estudos eletrofisiológicos 74

3.5.1. Descrição do circuito 75

3.5.2. Medida da resistência do microeletrodo 76

3.5.3. Potencial de membrana (PM) 77

3.5.4. Potencial em miniatura da placa terminal (pptm) 77

3.6. Estudos morfológicos e morfométricos..... 78

3.6.1. Microscopia de luz..... 78

3.6.2. Microscopia eletrônica de transmissão..... 79

3.7. Atividade fosfolipásica..... 79

3.8. Análise Estatística..... 80

4. RESULTADOS..... 81

4.1. Estudos miográficos..... 83

4.1.1. Preparação nervo frênico-diafragma de rato..... 83

4.1.1.1. Estimulação elétrica indireta..... 83

4.1.1.2. Estimulação elétrica direta..... 91

4.2. Preparação diafragma de rato cronicamente desnervado..... 93

4.3. Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho..... 96

4.3.1. Estimulação elétrica indireta..... 96

4.3.2. Estimulação elétrica direta..... 99

4.4. Dose letal 50 (DL50) 101

4.5. Estudos eletrofisiológicos..... 101

4.5.1. Potencial de membrana..... 101

4.5.2. Potencial em miniatura da placa terminal..... 101

4.6. Estudo morfológico..... 104

4.6.1. Microscopia de luz..... 104

4.6.1.1. Diafragmas incubados com 5mg/ml e 10 mg/ml do veneno total de *Naja naja kaouthia*..... 104

4.6.1.2. Diafragmas incubados com 5mg/ml e 10 mg/ml do veneno de *Naja naja kaouthia* com a atividade de PLA2 inibida..... 104

4.6.2. Microscopia eletrônica..... 105

4.6.2.1. Diafragmas incubados com 5 mg/ml do veneno total de *Naja naja kaouthia* e com a atividade fosfolipásica inibida. 106

4.6.2.2. Diafragmas incubados com 10 mg/ml do veneno de *Naja naja kaouthia* com e sem atividade fosfolipásica..... 106

5. DISCUSSÃO..... 133

6. CONCLUSÃO..... 147

7. SUMMARY..... 151

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 155

µg	micrograma
µM	micromol
3,4-AP	3,4-aminopiridina
4-AP	4-aminopiridina
Ach	acetilcolina
CTX	cardiotoxina
DL_{50}	dose letal mediana
d-Tc	*d*-tubocurarina
Fig	figura
Graf	gráfico
Hz	hertz
JNM	junção neuromuscular
KCl	cloreto de potássio
Kg	kilograma
MΩ	mega ohm
Me	microeletrodo
MET	microscopia eletrônica de transmissão
mg	miligrama

ML	microscopia de luz
ms	milissegundos
mV	milivolts
nM	nanomolar
N.n.k	*Naja naja kaouthia*
Neo	neostigmina
NTX	neurotoxina
PLA_2	fosfolipase A_2
PM	potencial de membrana
pptm	potencial de placa terminal em miniatura
V	volts

4- nitro 3 octanoiloxi ácido benzóico	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
4-Aminopiridina	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
4-Bromophenacyl Bromide	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
Acetilcolina	Sigma Chem.Co. (St. Louis, MO, EUA)
Acetona	Sigma Chem.Co. (St. Louis, MO, EUA)
Ácido acético	Merck do Brasil
Ácido clorídrico	Reagen
Äcido hialurônico	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
Ácido pícrico	Sigma Chem.Co. (St. Louis, MO, EUA)
Ácido tricloroacético	Reagen
Acrilamida	Sigma Chem.Co. (St. Louis, MO, EUA)
Älcool etílico	LabSynth-Prod. Para Laboratório Ltda, Brasil
Amônia	Carlo Erba- Itália

Azul de metileno	Carlo Erba - Itália
Azul de toluidina	Carlo Erba - Itália
Bicarbonato de cálcio	Carlo Erba - Itália
Citrato de chumbo	Ladd-Research Industries, Inc., Burlington, USA
Cloreto de cálcio	Merck do Brasil
Cloreto de magnésio	Merck do Brasil
Cloreto de potássio	Merck do Brasil
Cloreto de sódio	Merck do Brasil
d- Tubocurarina	ABBOT - Laboratórios do Brasil, Ltda.
Éter etílico	Chemco Ind. Com. Ltda, Brasil
Formaldeído	Ecibra-Cetus Ind. Com. Prod. Quim. Ltda, S.P.
Fosfato de potássio	Merck do Brasil
Fosfato de sódio	Merck do Brasil
Glicose	Merck do Brasil
Glutaraldeído	Polysciences Inc. (Warringtron, Ohio, USA)

Hidrato de cloral	Pentofarma Ltda, Brasil
Historesin-Embedding Kit	Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Germany
Neostigmine: "Prostigmine"	Laboratórios Roche-Química
Paraformaldeído	Polysciences Inc. (Warrington, Ohio, USA)
Resina Epon	Pelco/ Spi-Chem.
Sulfato de magnésio	Merck do Brasil
Tetrametiletilenodiamina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
Tetróxido de Ósmio	Polysciences Inc. (Warringtron, Ohio, USA)
Tris HCl	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
Triton X 100	Union Carbide - Fundação Sardi

LISTA DE TABELAS

Pág

TABELA 1 : Classificação das cobras Asiáticas..... 54

TABELA 2 : Tempo para instalação do bloqueio e porcentagem de fibras musculares lesadas na preparação nervo frênico diafragma de rato, induzida pelo veneno total e pelo veneno com atividade fosfolipásica inibida nas doses de 5 µg/ml e 10 µg/ml..... 131

Pág

FIGURA 1 : Distribuição Geográfica das Najas..... 56

FIGURA 2 : Foto da cobra *monocellate Naja naja kaouthia* (VIRAVAN *et al.*, 1986)..... 57

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. 76

FIGURA 4 : Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 µg/ml) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta..... 84

FIGURA 5 : Efeito do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 µg/ml com a atividade fosfolipásica inibida) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta..... 85

FIGURA 6 : Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (10 µg/ml) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta..... 86

FIGURA 7 : Efeito do veneno de *Naja naja kaouthia* (10 µg/ml com a atividade fosfolipásica inibida) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta..... 87

FIGURA 8 : Efeito da Neo (5,8 μM) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta. 88

FIGURA 9 : Efeito da 4-AP (53,0 μM) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta. 89

FIGURA 10 : - Efeito das lavagens sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total de *Naja naja kaouthia*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta..... 90

FIGURA 11 : Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) sobre a preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizada (*d*-Tc; 15 μM) 92

FIGURA 12 : Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) sobre a preparação diafragma de rato cronicamente desnervado..... 94

FIGURA 13 : Efeito da ACh (22 μM) e da *d*-Tc (15μM) na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado, antes e após a adição do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml)..... 95

FIGURA 14 : Efeito do veneno total (5 μg/ml) de *Naja naja kaouthia* sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta..... 97

FIGURA 15 : Efeito da ACh (37 e 73μM) e KCl (134 μM) na preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml)..... 98

FIGURA 16 : Efeito do veneno de *Naja naja kaouthia* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho curarizada (*d*-Tc; 44μM)..... 100

FIGURA 17 : Efeitos do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) sobre pptm, no diafragma de rato. Efeito da Neo (5,8 μM) e 4-AP (53,0 μM) sobre as alterações causadas pelo veneno de *Naja naja kaothia* sobre os potenciais de placa terminal em miniatura. 103

FIGURA 18 : Fibras musculares de hemidiafragma de rato-controle..... 109

FIGURA 19 : Fotomicrografias de secções de músculo diafragma de rato incubado com 5 μg/ml (A, B) e 10 μg/ml (C, D) do veneno total de *Naja. naja kaouthia*..... 111

FIGURA 20 : Fotomicrografia de secções de diafragmas incubados com o veneno de *Naja naja kaouthia* com a atividade PLA_2 inibida: 5 μg/ml (A, B), e 10 μg/ml (C, D)..... 113

FIGURA 21 : Fotomicrografia de secções de diafragmas incubados com o veneno de *Naja naja kaouthia* com a atividade PLA_2 inibida: 5 μg/ml (A, B), e 10 μg/ml (C, D)..... 115

FIGURA 22 : Micrografias eletrônicas de diafragma incubado com veneno de *Naja naja kaouthia.* (5 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida)..... 117

FIGURA 23 : Micrografias eletrônicas de diafragma de rato incubado com 5 μg/ml do veneno total de *Naja naja kaouthia*..... 119

FIGURA 24 : Micrografia eletrônica de diafragma de rato incubado com 5 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida e 10μg/ml de veneno total de *Naja naja kaouthia*..... 121

FIGURA 25 : Micrografia eletrônica de diafragma de rato incubado com veneno total de *Naja naja kaouthia* 10 μg/ml..... 123

FIGURA 26 : Micrografia eletrônica de diafragma de rato incubado com veneno de *Naja naja kaouthia*: 10 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida (A) e com o veneno total (B)..... 125

FIGURA 27 : Micrografias eletrônicas de diafragma de rato incubado com veneno de *Naja naja kaouthia*: 10 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida..... 127

FIGURA 28 : Micrografias eletrônicas de junções neuromusculares de diafragma de rato incubado com veneno total (10 μg/ml) de *Naja naja kaouthia*..... 129

Pág

GRÁFICO 1 : Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 µg/ml) sobre o potencial de membrana, nas fibras musculares do diafragma de rato. O potencial de membrana foi determinado como foi descrito no texto. Cada ponto representa a média ± erro padrão de três experimentos..... 102

RESUMO

No planeta existem cerca de três mil espécies de serpentes, sendo aproximadamente 400 espécies consideradas peçonhentas (BARRAVIERA, 1997).

A família *Elapidae* distribui-se pela África, Ásia, Austrália, Nova Guiné e Américas. Já as serpentes do gênero Naja e, especificamente a espécie *Naja naja kaouthia*, aqui estudada, distribui-se no Nordeste da Índia, Burma, Tailândia, Indochina e Norte da Malásia.

A serpente *Naja naja kaouthia,* popularmente denominada na Ásia, por cobra, diferencia-se das outras espécies do gênero por apresentar uma marca atrás do pescoço, em formato de olho, sendo por isto denominada cobra *monocellate.*

Este trabalho relata que o veneno de *Naja naja kaouthia* induz a um bloqueio neuromuscular nas preparações nervo frênico-diafragma de ratos e *biventer cervicis* de pintainho. O veneno foi utilizado nas doses de 5 e 10 μg/ml e produziu 85% de bloqueio neuromuscular em 36,75 ± 2,01 min, n=5, e 18 ± 0,57 min, n=3, $p<0,01$, respectivamente. Com o intuito de avaliar a ação da atividade fosfolipásica do veneno na indução do bloqueio, experimentos foram feitos tratando-se o veneno com bromofenacil para brometo. Os resultados mostraram a ocorrência de 85% de bloqueio em 54 ± 4,62 min, n=3 e 29 ± 0,57 min, n=3, $p<0,01$, respectivamente para 5 e 10 μg/ml de veneno com atividade PLA_2 inibida. A neostigmina (Neo, 5,8 μM) e a 4-aminopiridina (4-AP, 53 μM) antagonizaram, parcialmente, o bloqueio produzido pela dose de 5 μg/ml do veneno total em ambas as preparações, que não foi revertido mesmo após sucessivas lavagens com solução de Tyrode. Estes resultados apontam para uma ação irreversível do veneno sobre os receptores nicotínicos colinérgicos e não sobre as fibras musculares da preparação.

A contratura induzida pela acetilcolina em diafragma de rato desnervado (Ach, 22 μM) e em *biventer cervicis* de pintainho (37 μM) foi inibida pela ação do veneno (5 μg/ml). Já a contratura induzida na preparação *biventer cervicis* pelo KCl (134 μM) não foi alterada pelo veneno na mesma dose.

O estudo dos potenciais bioelétricos das preparações de ratos mostrou que o veneno na dose de 5 μg/ml reduz a amplitude e a freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) até seu total desaparecimento, mas este bloqueio é completamente revertido pela Neo e pela 4-AP.

Estudos à microscopia de luz e eletrônica de transmissão corroboraram os achados de que o veneno induz alterações dose-dependentes em relação as doses utilizadas, 5 e 10 μg/ml de veneno total induzem o aparecimento de 37% e 56% de fibras musculares lesadas, sendo esse número significativo ($p<0.01$). Por outro lado, a investigação do grau de ação do componente fosfolipase do veneno no aparecimento de fibras mionecróticas revelou que com as doses de 5 μg/ml e 10 μg/ml de veneno com atividade PLA_2 inibida, o número de fibras lesadas diminuí, não significativamente, para 27% e 52%. Qualitativamente, porém, essas alterações eram similares com qualquer das doses utilizadas, o mesmo acontecendo com relação às alterações ultra-estruturais envolvendo as células musculares, os fascículos nervosos intramusculares e as junções neuromusculares.

Concluindo, sugere-se que o veneno apresenta componentes neurotóxicos e miotóxicos, que podem estar atuando predominantemente sobre os receptores nicotínicos pós-sinápticos. Dentre esses componentes a PLA_2 sozinha, parece não ter um papel relevante no desenvolvimento das ações miotóxicas, sugere-se que os efeitos podem estar acontecendo devido a um sinergismo entre ela e a cardiotoxina.

1. INTRODUÇÃO

As serpentes representam um grupo de animais cuja constituição é realmente antiga. Surgiram do meio para o fim da era cenozóica, deixando fósseis em terrenos do período cretáceo.

A expressão cobra deve ser deixada com exclusividade para a espécie de Naja que ocorre na Indo-Malaia: originando-se do latim *colubra colobra* - cobra, (na evolução). Cobra foi aplicada na Índia, pelos Portugueses, à espécie de ofídio que ali é conhecida como naga e tida com razão como altamente venenífera (AMARAL, 1977).

As serpentes venenosas são identificadas em cinco famílias: *Elapidae*, *Hydrophiidae*, *Vipiridae*, *Crotalidae* e *Colubridae* (HARRIS, 1985).

A família *Elapidae* possuí representantes na América, Ásia, África e Nova Guiné, representando um total de 43 gêneros. Dentre as serpentes elapídicas da Ásia e África destacam-se as cobras ou najas (*Naja naja* e *Ophiofagus hannah* da Ásia, e *Naja nigricolis*, *Naja nívea* e *Hemachatus haemachatus* da África), as kraits (várias espécies de *Bungarus* da Ásia), as mambas (várias espécies de *Dendroaspis* da África) e as corais (várias espécies de *Micrurus* das Américas). Na Austrália e Nova Guiné, todas as serpentes peçonhentas conhecidas pertencem à família *Elapidae* (HARRIS, 1985).

As Najas são usadas pelos encantadores de serpentes para demonstrações, devido à sua aparência espetacular. São capazes de estender-se ao longo de suas costelas para nivelar com seu pescoço, em forma de capelo, e se fechar quando ameaçadas. Como todas as serpentes, são surdas e respondem a estímulos visuais e mecânicos por trepidação do solo, não se movimentam pela música e sim pelas oscilações do corpo do flautista e da flauta. Apresentam pequenas presas localizadas na região anterior da boca (maxilar superior) e, no ato da picada, músculos são acionados e respondem pela eliminação instantânea do veneno (VITAL BRAZIL, 1982), medem geralmente 1 metro de comprimento. A King cobra, destaca-se por alcançar 5,58 metros (CAMPBELL, 1996).

Sua picada é perigosa para humanos. Chegam a matar 1000 pessoas por ano (WÜSTER & THORPE, 1991) representando um sério problema a Organização Mundial de Saúde no Sudeste da Ásia (NAMIRANIAN & HIDER, 1992), a Ringhal, cobra do pescoço preto e outras espécies de cobras da Ásia, têm a habilidade de espirrar seu veneno a uma distância de 2 metros aproximadamente (CAMPBELL, 1996).

Muitos pesquisadores do século, por vários anos, consideravam que todas as cobras Asiáticas pertenciam a uma única espécie, a *Naja naja*. Recentemente outros pesquisadores reconheceram 10 espécies de cobras Asiáticas (KLEMMER, 1963; LEVITON, 1968; HARDING & WELCH, 1980; GOLAY, 1985), as quais estão representadas na tabela que se segue:

TABELA 1- Classificação das cobras Asiáticas

Espécie	Nome Comum/ População
N. atra (cobra Chinesa)	*Naja naja atra, Naja sputatrix atra* (China, norte do Vietnã-Lingenhöle & Trutnau, 1989)
N. kaouthia (Monocellate cobra)	*Naja kaouthia* (comum) / *Naja naja siamensis* (comum na literatura toxinologica) / *Naja naja sputatrix* (Vietnã, rara) / *Naja naja leucodira* (Reid, 1964) / *Naja kaouthia suphanensis* (cor amarela, proveniente da Tailândia central, rara)
N. naja (cobra Indiana spetacled-"óculos")	*N .n.* naja (comum) / *N. n. oxiana* (espécies típicas do norte da Índia) / *N. n. indusi* (NW Índia, norte do Paquistão, rara) / *N. n. karachiensis* (cor preta, proveniente do Sul do Paquistão) / *N. n. polyocellata* (Sri Lanka, rara) / *N. n. caeca* (espécies típicas do norte da Índia, rara)
N.oxiana (cobra da Ásia Central)	*N. n. oxiana, / N. n.caeca* (rara)
N. philippinensis (cobra Philipina, cobra do Norte da Philipine)	*N. n. philippinensis*
N. sagittifera (Andaman cobra)	*N. (n.) kaouthia, N. n. sagittifera*
N. samarensis (Visayan cobra, cobra do sudeste da Philipinas)	*N. n. samarensis*
N. siamensis (cobra "cuspideira" Indochinesa	*N. n. kaouthia* (tailândia, Cambodia, Vietnã, completa confusão), *N. n. sputatrix* (Tailândia), *N. n. isanensis, N. n. atra* (Tailândia), *N. sputatrix atra* (Tailândia, rara), *N. sputatrix isanensis, N. isanensis*
N. sputatrix (sul da Indonésia, cobra"cuspideira)	*N. n. sputatrix*
N. sumatrama (cobra "cuspideira" Equatorial)	*N. n. sumatrama* (Sumatra), *N. n. sputatrix* (comum, Península da Malásia, Sumatra), *N. n. kaouthia* (cor amarela proveniente do norte da Malásia –Reid, 1964; Tweedie, 1954), *N. sputatrix sputatrix* (Península da Malásia, Java –Lingenhöle & Trutnau, 1989)

WÜSTER, W.. Taxonomic changes and toxinology: systematic revisions of the Asiatic cobras (*Naja naja* species complex). **Toxicon, 34**: 399-406, 1996.

Dificuldades decorrem em relação à sistemática das cobras asiáticas por estas apresentarem grandes variações intra-específicas, especialmente em relação ao padrão de coloração. Assim, uma combinação de análises multivariadas de características morfológicas e análise da seqüência de DNA mitocondrial têm sido usadas para definir a linha de evolução das espécies dentro do complexo grupo a que pertencem as cobras asiáticas. Análises multivariadas de características morfológicas permitem revelar padrões de variações em fenótipos, os quais poderiam permanecer obscuros à primeira vista pela simples observação da variação superficial no padrão de sua cor. Por outro lado, a análise da seqüência de DNA mitocondrial pode ainda revelar espécies, de outra forma ocultas, uma vez que, morfologicamente apresentam-se muito similares como resultado de uma evolução convergente (WÜSTER, 1996).

Uma das formas de identificação das Najas seria a marca em seu dorso. Por exemplo, as espécies provenientes do Paquistão, Índia e Sri Lanka (*Naja naja naja*) apresentam marca em forma de óculos sendo denominadas - *binocellate* (*LINNAEUS, 1758). Já as provenientes do nordeste da Índia, Burma, Tailândia, Indochina e norte da Malásia (*Naja naja kaouthia*), apresentam marca em forma de olho sendo denominadas – *monocellate* (LESSON, 1831) (Fig 2), e as espécies vindas da Ásia Central Soviética, Irã, Afeganistão, norte do Paquistão (*Naja naja oxiana*) não apresentam marca em seu dorso (*EICHWALD, 1831).

Em muitas áreas, especialmente no sul do Paquistão, as cobras passam por uma pronunciada mudança ontogênica de cor, ou seja, espécies jovens são cinzas, com ou sem a marca em forma de óculos. Quando envelhecem, elas escurecem até apresentarem o dorso homogeneamente preto. Estas mudanças de cor esclarecem porque cobras adultas e jovens muitas vezes fazem parte de taxonomias diferentes. SUNDERSINGH (1960) nomeou

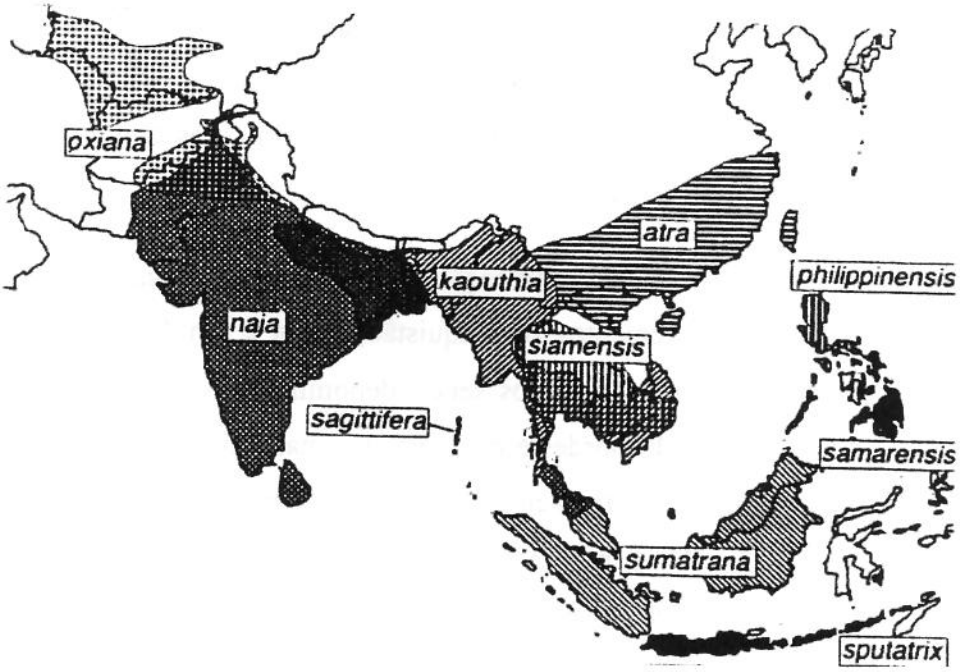
---

* LINNAEUS *apud* – WUSTER, W. & THORPE, R.S. – Asiatic cobras: population systematics of the *Naja naja* species complex serpents: *Elapidae* in India and Central Asia. **Herpetologica, 48**: 69-85, 1992.

* EICHWALD *apud* – WUSTER, W. & THORPE, R.S. – Asiatic cobras: population systematics of the *Naja naja* species complex serpents: *Elapidae* in India and Central Asia. **Herpetologica, 48**: 69-85, 1992.

espécies jovens provenientes de Pilani, Rajasthan de *Naja naja naja*, enquanto duas adultas vindas do mesmo local, as quais eram marrom ou preta, foram nomeadas *Naja naja oxiana*, devido a essas mudanças, além disso, outra característica observada dentro da população das Najas Asiáticas é a presença de uma ou várias pequenas escamas, as quais situam-se entre a extremidade da boca (WÜSTER & THORPE, 1992).

Ditribuição Geográfica



WÜSTER, W., 1996.

FIGURA 1 – Distribuição Geográfica das Najas

Existem diferentes espécies distribuídas em pares ocupando a mesma área, como, *Naja kaouthia* e *N. siamensis* encontradas na Tailândia, Cambodja e Vietnã, *Naja kaouthia* e *N. sumatrana* no norte da Malásia e sul da Tailândia, *Naja kaouthia* e *N. naja* no nordeste da Índia e *Naja naja* e *N. oxiana* no noroeste da Índia e Paquistão, como mostra o mapa (Fig 1) (WÜSTER, 1996).

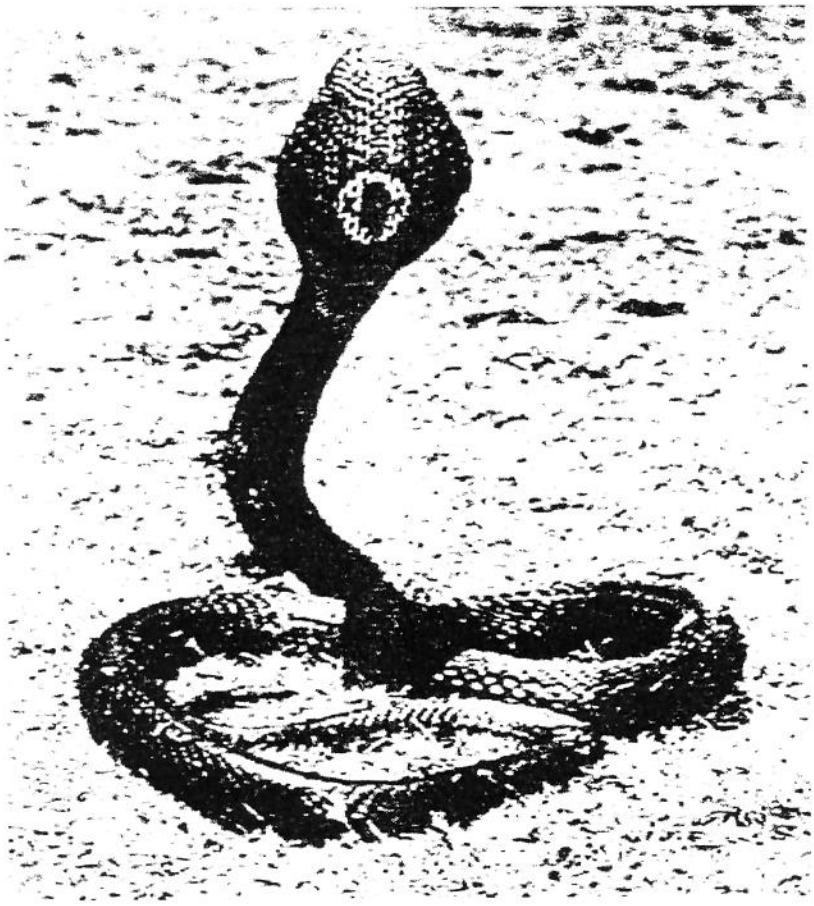


FIGURA 2 – Foto da cobra *monocellate Naja naja kaouthia* (VIRAVAN *et al.*, 1986)

As espécies Najas em geral distribuem-se por habitats e zonas climáticas diversas, desde as regiões semi-áridas do Nordeste até as florestas chuvosas no Sudoeste da Índia e Sri Lanka (WÜSTER & THORPE, 1992).

Elas picam suas vítimas e com movimentos mastigatórios injetam todo seu veneno. A presa morre devido à falência respiratória e circulatória causada por uma variedade de substâncias como: cardiotoxinas (CTX), fatores de coagulação, fosfolipases (PLA_2), entre outras. As enzimas injetadas na presa iniciam a digestão pelos tecidos, afetando os processos vitais, bem como a função dos nervos e músculos (KARLSSON, ARNBERG, EAKER 1971).

O veneno que entra em contato com os olhos de humanos causa imediatamente uma severa irritação na córnea e conjuntiva, que se não tratada pode resultar em cegueira permanente. Envenenamentos causados por esta cobra, levam a uma variedade de sinais e sintomas clínicos. São observadas neurotoxicidade e necroses teciduais locais. A neurotoxicidade envolve ptose, oftalmoplegia com escurecimento na visão ou diplopia, disfagia, disfonia, paralisia flácida, perda dos reflexos do tendão, coma e paralisia respiratória (GOLD, 1995).

A diferente composição dos venenos é que caracteriza as espécies de Naja. Diferenças antigênicas entre os venenos provavelmente indicam que o soro de uma espécie não é efetivo contra o veneno de outra (WÜSTER & THORPE, 1991). Soros produzidos na Índia (fabricados a partir do veneno de *Naja naja*) mostram pobre capacidade neutralizante contra os efeitos dos venenos da *Naja philippinensis* (VOGTMAN, 1950), e soros contra venenos de cobras vindas do Sul da Malásia (*Naja sumatrana*) não são efetivos contra os efeitos do veneno de *Naja kaouthia* (WARREL, 1986). Veneno de *Naja atra,* da China, parece ser pobremente neutralizado pelos muitos soros de Naja comercialmente disponível (MINTON, 1967). Este problema ilustra que precisamos entender a sistemática dos venenos de cobra, para uma correta soroterapia.

Naja sumatrana e *Naja kaouthia*, as quais requerem diferentes soros, ocorrem em partes da Península da Malásia (HUGHES, 1976). *Naja kaouthia* e a cobra cuspideira indochinesa referida por *Naja atra*, são encontradas na Indochina. As diferenças mostradas nas composições dos venenos de *Naja kaouthia* e da população chinesa de *Naja atra* (MINTON, 1967), sugerem que se pode ter dúvidas em relação à eficácia dos soros na Indochina. Problemas podem ser causados por diferenças intra-específicas das propriedades antigênicas dos venenos: diferenças geográficas de populações de mesma espécie podem ter venenos diferentes, resultando em sintomas diferentes (venenos de *Naja kaouthia* da Tailândia parecem ser mais neurotóxicos e menos necróticos que do nordeste da Malásia) e também possível incompatibilidade dos soros (WÜSTER & THORPE, 1991).

Acredita-se que os venenos elapídicos induzem um bloqueio neuromuscular do tipo não despolarizante semelhante ao curare (VITAL BRAZIL, 1965; CHEYMOL, BOURILLET, ROCH-ARVEILLER, 1966). No entanto a ação do bloqueio neuromuscular

das *Elapídeas* difere do curare no desenvolvimento lento, com vagarosa reversibilidade, imperfeito ou passageiro antagonismo pelo anticolinesterásico. Uma queda na produção de acetilcolina pela terminação nervosa tem sido observada (SU, CHANG, LEE, 1967; YANG, CHANG, WEI, 1967). Visto que a resposta contrátil à estimulação indireta do nervo é bloqueada antes da redução à resposta das estimulações diretas no músculo, o sítio de bloqueio primário ocorre certamente na junção neuromuscular (CHANG, 1979).

Os venenos contêm uma variedade de constituintes farmacológicos ativos para que estes bloqueios possam ocorrer, como: proteínas, cardiotoxinas, neurotoxinas e fosfolipases. Segundo definições de LEE (1972), as cardiotoxinas são capazes de causar contraturas. No entanto, as neurotoxinas (NTX) produzem um bloqueio neuromuscular sem causar contraturas. Nas preparações nervo frênico diafragma de rato (BULBRING, 1946), é de grande utilidade à diferenciação entre cardiotoxina e neurotoxina. Após a contratura inicial, a cardiotoxina reduz progressivamente o tamanho das contrações e finalmente cessa a contratura no músculo em resposta a ambas estimulações: direta e indireta ao mesmo tempo (LEE *et al.,* 1968). Em contraste, a neurotoxina pode abolir a resposta contrátil para estimulações indiretas sem nenhuma contratura e a resposta para estimulações diretas, permanece inalterada (TAMIYA & ARAI, 1966; SU *et al.*,1967).

A paralisia motora e respiratória decorre da ação inibitória dos venenos elapídicos sobre a transmissão neuromuscular. A ação bloqueadora neuromuscular em questão e a alta toxicidade desses venenos são devidas a constituintes denominados neurotoxinas. As neurotoxinas elapídicas representam o principal componente do veneno, correspondendo a aproximadamente 20%, dividindo-se em (SELLS *et al.*, 1994):

- Neurotoxinas pós-sinápticas
- Neurotoxinas pré-sinápticas

As neurotoxinas pós-sinápticas combinam-se com receptores colinérgicos da placa terminal, sem promover despolarização da membrana dessa região da fibra muscular. Atuam de modo semelhante ao curare, mas sua combinação com os receptores é sempre menos reversível e se processa de modo lento. Quando um número suficiente de receptores

se acha ocupado pela neurotoxina, a combinação da acetilcolina com aqueles receptores ainda livres, não é mais capaz de provocar uma despolarização de intensidade suficiente para deflagrar o potencial de ação, a transmissão neuromuscular encontra-se neste ponto inibida. Estas neurotoxinas são proteínas básicas (pH acima de 9,0) de pequeno peso molecular (entre 7000 a 8000), desprovidas de atividade enzimática. Constituem-se de uma única cadeia peptídica interligada por pontes dissulfídicas. As drogas anticolinesterásicas (neostigmina, edrofônio) podem antagonizar o bloqueio neuromuscular causado pelas neurotoxinas pós-sinápticas.

As neurotoxinas pré-sinápticas são proteínas de massa molecular variada (entre 12.000 a 56.000 dáltons), básicas ou moderadamente ácidas, têm como característica atuar nas terminações nervosas das placas terminais, inibindo a liberação do mediador (acetilcolina) pelos impulsos nervosos. Quando as quantidades do mediador liberadas não são capazes de produzir uma despolarização para deflagrar o potencial de ação, a transmissão neuromuscular acha-se interrompida (VITAL BRAZIL, FONTANA, PELEGRINI, 1976/77; VITAL BRAZIL, 1980). Todas exercem atividade fosfolipásica A e evoluíram a partir dessa enzima. As neurotoxinas pré-sinápticas são os constituintes mais tóxicos encontrados nos venenos ofídicos. Em preparações isoladas, a ação das neurotoxinas pré-sinápticas é irreversível. As drogas anticolinesterásicas não antagonizam o bloqueio produzido pelas neurotoxinas pré-sinápticas (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77; VITAL BRAZIL, 1980).

Além das neurotoxinas, as peçonhas elapídicas encerram muitos outros constituintes protéicos, alguns atóxicos, outros tóxicos, dos quais são citados: toxinas do grupo da cardiotoxina (cobraminas A e B, fator lítico direto, toxina γ, citotoxina) e as fosfolipases.

A cardiotoxina atua em várias células do organismo, despolarizando suas membranas, acarretando distúrbio em sua função e estrutura. Em concentrações elevadas pode causar destruição (necrose) dos elementos celulares; são encontradas nos venenos das cobras *Naja, Ophiophagus, Hemachatus*, podendo atingir concentrações elevadas de até 50% (VITAL BRAZIL, 1980). As cardiotoxinas também são denominadas de citotoxinas,

fatores líticos diretos e toxinas de membrana, assim denominadas por causarem "*in vitro*" e "*in vivo*", parada cardíaca em sístole (CONDREA, 1974; HARRIS & CULLEN, 1990). São proteínas básicas de pequeno peso molecular (6000 a 7000), desprovidas de atividade enzimática. Assim como as neurotoxinas pós-sinápticas constituem-se de uma única cadeia polipeptídica (60-61 aminoácidos) interligada por quatro pontes dissulfídicas, as cardiotoxinas do veneno de cobra possuem peptídeos de baixo peso molecular que induzem a hemólise dos glóbulos vermelhos (CONDREA, 1974; HARVEY, 1985) e contrações do músculo esquelético (LEE *et al.*, 1968; LIN *et al.*,1985; FLETCHER & LIZZO, 1987). Possuem um elevado número de lisina e alto teor de aminoácidos hidrofóbicos. Estudos feitos com a cardiotoxina da peçonha *Naja naja atra* demonstraram, degeneração hialina e vacuolização das fibras musculares (LAI, WEN, LEE, 1972). Como a peçonha provoca lesões idênticas, mas de modo mais intenso, esses autores sugeriram que a ação da cardiotoxina é potencializada pela fosfolipase do veneno, tais dados se referem a estudos recentes que mostram a ação mionecrosante das fosfolipases ofídicas. Por isso que lesões locais, observadas nos acidentes com Najas, caracterizadas por edemas e necroses, às vezes extensas dos tecidos (REID, 1964), são provocadas não por enzimas proteolíticas, como no caso dos acidentes viperídicos, mas pela cardiotoxina do veneno, provavelmente em ação sinérgica com as fosfolipases. Em preparações neuromusculares isoladas, nervo frênico diafragma de rato, as cardiotoxinas atuam de modo não seletivo na membrana das terminações nervosas e nas fibras musculares, despolarizando-as e provocando contratura do músculo, mesmo se curarizado.

Fosfatidil 2-acilhidrolase, nome trivial da fosfolipase A_2 (PLA_2) cujo peso molecular é de 11000-15000, (IWANAGA & SUZUKI, 1979) apresenta-se como uma enzima, encontrada com freqüência nos venenos de cobras (ROSENBERG, 1990; DAVIDSON & DENNIS, 1991). As PLA_2 têm estrutura variável com cadeia única, como a notexina, da serpente *Notechis scutatus scutatus* (HARRIS, JOHNSON, KARLSSON, 1975), ou consistem de 2 a 4 subunidades como a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* (GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984) e a taipoxina da *Oxyuranus scutellatus* (HARRIS & MALTIN, 1982), respectivamente. "*In vivo*" PLA_2 possuí uma variedade de atividades, incluindo neurotoxicidade pré-sináptica, atividade de agregação plaquetária (HUANG & CHIANG, 1994; LANDUCCI *et al.*, 1994) e nefrotoxicidade (SITPRIJA, SRIBHIADH,

BENYAJATI, 1971). Fosfolipase A_2 tem sido largamente utilizada para investigar a interação lipídeo-proteína (SINGER, 1971). Venenos com fosfolipases A_2 possuem um número relevante de propriedades enzimáticas, incluindo uma absoluta necessidade para o cálcio, marcada estabilidade aquecida, e um alto grau de limitação na estrutura terciária determinado pelas pontes dissulfídicas (IWANAGA & SUZUKI, 1979).

As fosfolipases A_2 ofídicas, com exceção das neurotoxinas pré-sinápticas, são pouco tóxicas, as PLA_2 ácidas e as neutras são menos tóxicas que as básicas. Várias PLA_2 produzem necrose local de fibras musculares quando injetadas por via intramuscular. Estão neste caso a fosfolipase básica e a neutra da peçonha de *Naja nigricollis*, a notexina, a taipoxina e a crotoxina, a qual somente altera, em preparações neuromusculares isoladas, a excitabilidade da membrana das fibras musculares em concentrações bem mais elevadas do que aquelas necessárias para produzir bloqueio neuromuscular (CHANG & DONG LEE, 1977; HAWGOOD & SMITH, 1977; VITAL BRAZIL, PRADO-FRANCESCHI, LAURE, 1979). Injetada via intramuscular em doses subletais, em camundongos, a fosfolipase provoca após 24 horas, completa desorganização da região da placa terminal das fibras musculares e necrose das mesmas, e, após 48 horas, desaparecimento do axoplasma e colapso da bainha de mielina (GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD, 1979). Certas fosfolipases ofídicas, despolarizam tal como as cardiotoxinas, a membrana das fibras musculares em preparações isoladas e provocam contratura do músculo. Há uma participação das fosfolipases ofídicas, em especial dos venenos das najas, na gênese dos efeitos depressores sobre o aparelho cardiovascular.

Com a presença do componente miotoxina no veneno de cobra, espera-se uma redução na resposta à estimulação elétrica direta no músculo esquelético ou exposição para elevação do K^+, embora, possam prognosticar que concentrações baixas do veneno revelem a presença de neurotoxina e somente altas concentrações indicam uma possível presença de componentes miotóxicos.

CAMPBELL (1979) concluiu que os venenos de *Naja naja kaouthia* são primariamente neurotóxicos, mas tem efeitos miotóxicos em altas concentrações. Esses resultados consistem em achados clínicos.

Pesquisas com veneno de *Naja naja kaouthia* demonstraram que ocorre um bloqueio da transmissão neuromuscular com o veneno em baixas concentrações, e em altas concentrações causa efeito direto no músculo resultando em contrações. Demonstrou-se que é conseguido um bloqueio de 50% com concentrações menores que 3,0 μg/ml, completando este bloqueio com concentrações entre 10 e 30μg/ml (HARVEY, *et al.*, 1994).

Outro trabalho foi elaborado usando-se *biventer* de pintainho para comparar a potência dos soros em neutralizações miotóxicas e neurotóxicas das toxinas do veneno de cobras. Concluiu-se que o veneno da *Naja naja kaouthia* produz um bloqueio das contrações dose dependente aos estímulos indiretos, acompanhado pelo bloqueio nas respostas à acetilcolina e carbacol. Na dose de 50μg/ml, o veneno, além de induzir respostas ao KCl , induziu uma pequena e lenta contração (BARFARAZ & HARVEY, 1994).

O tratamento no envenenamento requer altas doses do soro. Quando o soro específico não for imediatamente administrado, ou quando for contra-indicado devido a reações séricas tardias, usa-se anticolinesterásicos para reverter temporariamente os sinais do envenenamento associado à pré-tratamento com sulfato de atropina (6mg/adulto) para bloquear os efeitos muscarínicos da acetlicolina (GOLD, 1995).

Os estudos sobre o veneno de *Naja naja kaouthia* têm como meta investigar sua ação na junção neuromuscular e contribuir para a melhor compreensão da relação farmacológica/morfológica deste tipo de envenenamento.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

Objetivos gerais:

Ampliar os conhecimentos sobre a atividade do veneno de *Naja naja kaouthia* na junção neuromuscular e no músculo esquelético.

Objetivos específicos:

Estudar alterações eletrofisiológicas, miográficas e morfológicas que o veneno produz.

Através de parâmetros farmacológicos pretende-se caracterizar o(s) sítio(s) de ação do veneno.

Verificar se o efeito observado é causado pela fosfolipase presente no veneno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 250-300g; camundongos de ambos os sexos, da linhagem Swiss, com peso entre 18-30 g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas (SP) e pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40-50 g (4 a 8 dias de idade) fornecidos pela Granja ITO S/A, Sumaré (SP). Os animais foram mantidos em gaiolas e tratados com água e ração *ad libitum*.

3.2. VENENO

O veneno de *Naja naja kaouthia* foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

3.3. ESTUDOS BIOLÓGICOS

3.3.1. Preparação nervo frênico-diafragma de rato

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (250 mg/Kg, via intraperitoneal), sacrificados através da sangria por secção dos vasos cervicais, para a retirada e montagem do hemidiafragma esquerdo com porção do nervo frênico correspondente (nas preparações destinadas à estimulação indireta). A preparação foi fixada em cuba contendo 40 ml de solução nutritiva de Tyrode, com a seguinte composição mM: NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 11,9; $MgCl_2$ 0,25; NaH_2PO_4 0,3 e glicose 11. A solução foi constantemente aerada com carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2) e mantida a 37°C. Um eletrodo bipolar era colocado em torno do nervo frênico para a estimulação indireta com um estimulador Grass S48 (0,1 Hz de freqüência, 0,2 ms de duração e voltagem maximal). Nos experimentos em que se procedeu à estimulação direta foram utilizados pulsos supramaximais (0,1 Hz, 2 ms). As contrações musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de um transdutor isométrico Load Cell BG 50 GMS. A preparação foi mantida sob tensão de 2,5 g.

Em preparações nervo frênico diafragma de rato, utilizaram-se doses de 5 e 10 μg/ml do veneno total e 5 e 10 μg/ml do veneno com atividade fosfolipásica inibida para observação do tempo de bloqueio estimado em 85%.

Com o fim de se investigar os mecanismos, envolvendo os efeitos na neurotransmissão, realizaram-se em 5 experimentos, estudos com drogas como a neostigmina (Neo; 5,8 μM), 4-aminopiridina (4-DAP; 53 μM). Procedeu-se também 5 experimentos à lavagem da preparação com solução nutritiva de Tyrode, na vigência do bloqueio neuromuscular, na tentativa de reverter o bloqueio produzido pelo veneno, na dose de 5 μg/ml.

Em todos os experimentos sob estimulação elétrica direta e indireta, antes da adição do veneno ou das outras drogas utilizadas, procedeu-se à estabilização da preparação por 10 minutos.

3.3.2. Preparação diafragma de rato cronicamente desnervado

A desnervação foi realizada segundo a técnica de VITAL BRAZIL (1965). Os animais, depois de anestesiados, eram colocados em decúbito lateral direito, realizando-se uma incisão de aproximadamente 0,5 cm, perpendicular à linha mediana, no terço inferior da região lateral do tórax esquerdo, previamente depilada. A incisão compreende a pele e a camada muscular delgada que recobria esta região. Ao longo do espaço intercostal cortou-se então, com tesoura, os músculos intercostais. Com um bastão de vidro de extremidade recurvada, prendia-se o nervo que, tracionado para as bordas da incisão, era seccionado com tesoura. Em seguida, suturava-se apenas a pele por meio de um ou dois pontos, conforme a extensão da incisão. Decorridos 15-20 dias, montava-se a preparação com o hemidiafragma, segundo a técnica adotada para nervo frênico-diafragma de rato.

O diafragma cronicamente desnervado, era submetido a 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.), que era acoplado a um fisiógrafo Narcotrace 40 (Narco Bio-Systems, Inc.).

A resposta à contração da ACh (36 μM) era realizada em 3 experimentos antes da adição do veneno (condições-controle) e após 60 minutos de incubação. Após cada adição de ACh (36 μM), e observação da resposta na contração do diafragma, procedeu-se à lavagem da preparação com solução de Tyrode (cinco lavagens).

Em alguns experimentos (n=3), as preparações foram pré-tratadas com *d*-tubocurarina (*d*-Tc, 15 μM). A preparação era incubada com *d*-Tc durante 30 minutos e, em seguida, fazia-se a adição de ACh (22 μM). Por meio de sucessivas lavagens com solução de Tyrode (cinco lavagens no período de 15 minutos), obtinha-se total reversão do bloqueio da resposta na contração da ACh (22 μM). Após proceder a este controle, a *d*-Tc (15 μM) era novamente adicionada ao banho por 30 minutos e, em seguida, adicionava-se o veneno (5 μg/ml), o qual era mantido em contato com a preparação por 30 minutos. Posteriormente, a mesma dose de ACh (22 μM) era adicionada. A estimulação direta do músculo (estimulador Grass S 88; pulsos supramaximais de 2 ms de duração e 0,1 Hz de freqüência) era simultaneamente registrada em alguns experimentos.

3.3.3. Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

A preparação foi montada de acordo com o método descrito por GINSBORG & WARRINER (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição mM: NaCl 136; KCl 5; $CaCl_2$ 2,5; $MgSO_4$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; $NaHCO_3$ 11,9; glicose 11,2. A solução foi aerada com borbulhamento de carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida sob tensão de 0,5 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais (estimulador Grass S88) 0,1 Hz de freqüência e 0,2 ms de duração para a estimulação indireta numa voltagem de 5 V e 2 ms de duração para a estimulação direta numa voltagem de 80 V.

Utilizando-se a dose de 5 μg/ml em preparações *biventer cervicis* de pintainho, observou-se o tempo de bloqueio em 85% (n=5).

As contrações musculares, resultantes de estímulos elétricos e as contrações em resposta à adição de ACh (37 μM; 73 μM) ou KCl (134 μM), foram registradas em fisiógrafo Narcotrace 40 (Narco Bio-Systems, Inc.), por meio de um transdutor isométrico (Myograph F-60 - Narco Bio-Bystems, Inc.). O registro das contrações evocadas pela adição de KCl (134 μM) e ACh (37 μM; 73 μM) foram realizados na ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição do veneno) e no final do experimento (após o tempo de bloqueio de 85% com o veneno) (n=4).

A fim de investigar se o veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) possuía ações na fibra muscular, em preparações de ave, algumas preparações *biventer cervicis* foram pré-tratadas com a *d*-Tc (concentração de 44 μM) (n=3) .

3.4. DOSE LETAL 50 (DL_{50})

A dose letal mediana (DL_{50}) e os intervalos fiduciais de 95% do veneno de *Naja naja kaouthia* foram determinados pelo método de WEIL (1952). Foram utilizadas quatro doses de veneno, em progressão geométrica, na razão de 1,50. Grupos de seis camundongos, pesando em média 19 gramas, foram utilizados para cada dose. Administrou-se o veneno por via venosa (veia caudal), num volume de 0,5 ml. Os animais foram observados durante 24 horas.

3.5. ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS

Para o estudo do potencial em miniatura da placa terminal (pptm) e potencial de membrana, foram realizados 5 experimentos utilizando a preparação nervo frênico-diafragma de rato. A preparação foi montada horizontalmente com a superfície torácica voltada para cima e fixada com alfinetes em cuba perspex "Dow Corning-Sylgard" (10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de altura), contendo 10 ml de solução de Tyrode (composição já descrita anteriormente) e aerada com carbogênio. Para a realização das observações eletrofisiológicas, a cuba foi colocada na platina do microscópio, usando-se a

técnica convencional de registros com microeletrodos de vidro (FATT & KATZ, 1951). Os microeletrodos (Me), após serem preparados no próprio laboratório, com o auxílio do "Microelectrode Puller" (modelo 8104, Palmer), e preenchidos com KCl 3M, tendo uma resistência entre 5-20 MΩ eram conservados em geladeira. Para sua confecção, utilizaram-se tubos de vidro apropriados (capilares de vidro Clark com microcapilar interno, para facilitar o preenchimento com KCl).

3.5.1. Descrição do circuito

O Me era fixado, em sua extremidade posterior, a um suporte apropriado de acrílico. A fixação do Me, na parte ântero-inferior do suporte, era 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 o Me e o fio de platina era feita através de um vaso comunicante, preenchido com KCl (3 M). Na extremidade superior do suporte, os orifícios do vaso comunicante eram vedados por uma lamínula, mediante uma delgada camada de vaselina sólida. O suporte era fixado ao braço de um micromanipulador Jena (Alemanha) acoplado a um microscópio esteroscópico Zeiss para aumento de até 40 vezes. Este equipamento permitia realizar pequenos deslocamentos horizontais e verticais, controlando a introdução do Me nas fibras musculares, para as medidas do potencial de repouso e captação dos pptm. O seguidor catódico estava posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectava-se ao canal do osciloscópio (Tektronix 5103N com módulo 5A 22N "Diferential Ampl" e 5B 12N "Dual Time Base"). O eletrodo indiferente constituiu-se de um fio de platina, incluído em tubo de vidro submerso em mercúrio vivo, onde se colocou um tubo curvo (para adaptação a cuba) preenchido com ágar-salina. A preparação e toda a aparelhagem empregada permanecia no interior de uma gaiola de Faraday, montada sobre uma mesa rígida, fixada no solo a fim de evitar vibrações. O circuito descrito apresenta-se (na figura) a seguir:

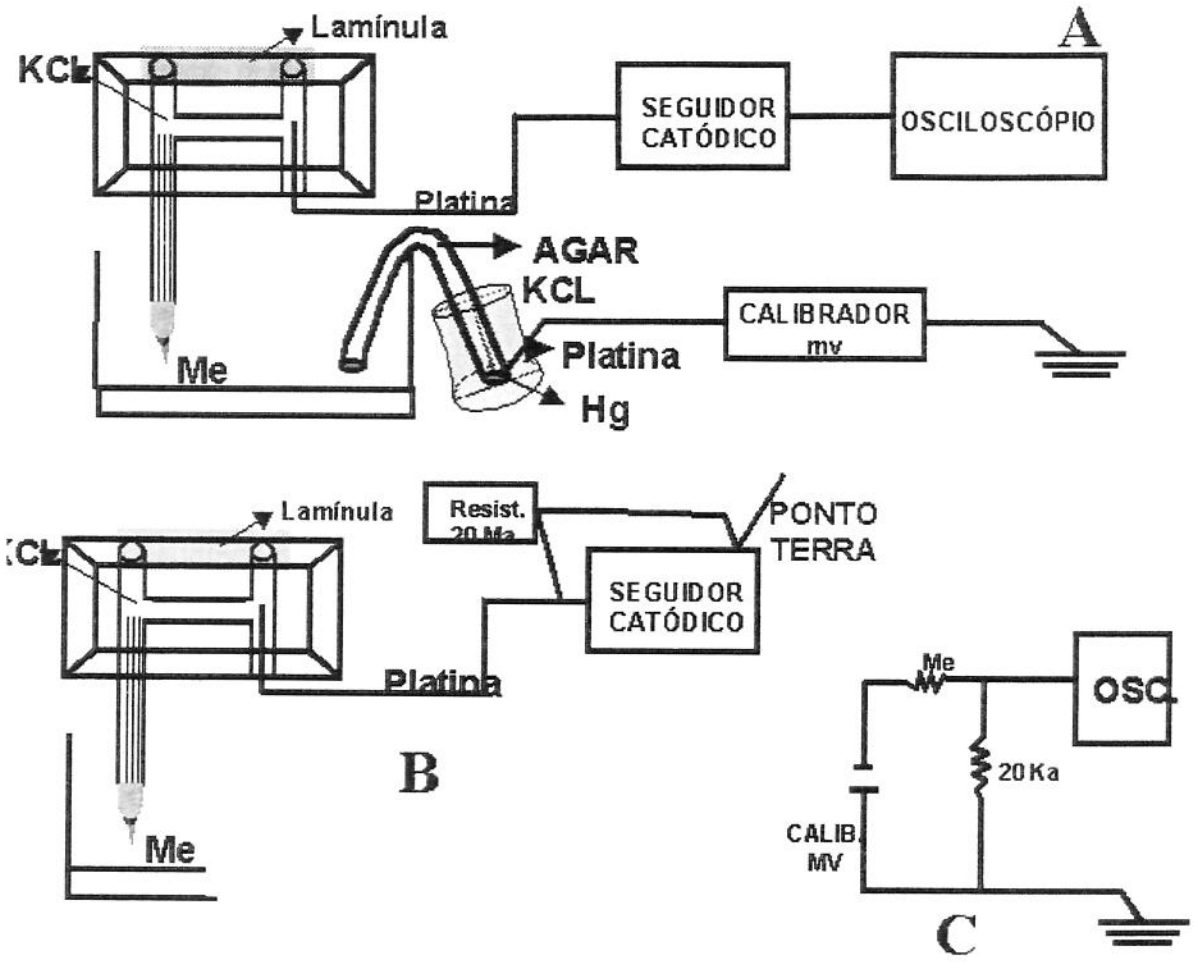


FIGURA 3 - Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de repouso e de placa terminal em miniatura. A - Circuito simplificado; B - Circuito simplificado para obtenção de resistência do Me; C - Circuito para medida da resistência do Me.

3.5.2. Medida da resistência do microeletrodo

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

Procedia-se à medida da resistência do Me, mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo, em paralelo, no circuito, uma resistência de valor conhecido (20 MΩ). Eram desprezados aqueles Me cuja resistência não estava compreendida entre 5 e 20 MΩ.

3.5.3. Potencial de membrana (PM)

Para a determinação do potencial de membrana das fibras musculares (n=3), os Me eram inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Repetia-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. Determinava-se o potencial de membrana, multiplicando-se o valor da média por um fator de correção (fc). Este era estabelecido, aplicando-se ao circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio (fc=100/deflexão correspondente).

Nas experiências realizadas para avaliar o efeito do veneno de *Naja naja kaouthia* sobre o potencial de membrana, utilizou-se a dose de 5 μg/ml.

Os estudos dos efeitos do veneno de *Naja naja kaouthia* sobre o potencial de repouso foram realizados antes (controle), 15, 30, 45, 60 minutos após a adição do veneno, e os valores obtidos foram comparados com aqueles obtidos do controle. A medida do potencial de repouso foi feita em cinco regiões distintas das fibras musculares, nos diferentes momentos da leitura do experimento.

3.5.4. Potencial em miniatura da placa terminal (pptm)

Para captação dos pptm, o Me foi implantado junto, ou o mais próximo possível, da região da placa terminal motora.

Os pptm foram registrados antes (controle), 15 e 30 minutos após a adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml). Na tentativa de reversão do bloqueio produzido pelo veneno, os registros dos pptm foram realizados, incubando-se a preparação com Neo (5,8 μM) ou 4-AP (53,0 μM), após o bloqueio dos mesmos. Os pptm foram fotografados em filme "Polaroid" por meio de uma câmera osciloscope, modelo C-5A.

3.6. ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS

3.6.1. Microscopia de luz

Para estes estudos utilizaram-se as preparações nervo frênico-diafragma de rato (montada segundo a técnica de BÜLBRING, 1946).

Diferentes doses do veneno (5 e 10 µg/ml de veneno na presença, n=5 e 3, respectivamente, e ausência da atividade fosfolipásica, n=3) foram adicionadas a cuba, e deixadas em contato com a preparação durante o período para obtenção do bloqueio de 85%, sob estimulação elétrica indireta e preparações controle (sem veneno e sem estimulação) foram incubadas com solução de Tyrode (30 minutos). Logo após os períodos de incubação, as preparações foram presas com alfinetes, em placa de Petri, preenchida com cera utilidade (uso odontológico) e, rapidamente, submetidas à fixação com solução Bouin e cortadas em pequenos fragmentos (1 mm por 2 mm). As amostras de músculo foram seccionadas na proximidade do curso do nervo frênico a fim de se obterem locais com junções neuromusculares. Os fragmentos permaneciam na solução fixadora Bouin, por 24 horas. O mesmo procedimento foi efetuado para as preparações controle.

Após a fixação, os fragmentos foram lavados três vezes com uma solução de água e amônia, para remoção do ácido pícrico do fixador Bouin, e então, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e três vezes em etanol 100%) por 30 minutos cada série. Após a desidratação, os fragmentos eram embebidos em historesina (Embedding Kit-Leica Instruments, Bromma, Suécia).

Cortes de 2 µm foram obtidos em micrótomo Leica RM 2035 (Leica, Vienna, Austria) e corados com Azul de metileno em bórax 0,5% para análise em microscópio de luz. As fotomicrografias foram obtidas, usando-se um microscópio de luz Nikon Optiphot (Nippon Kogaku K K, Tokio, Japão). O dano morfológico foi quantificado contando o número de fibras com lesões, expressando isto como uma porcentagem do número total de células em três áreas não-sobrepostas e não-adjacentes de cada músculo (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001).

3.6.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Terminados os experimentos com a preparação nervo frênico-diafragma de rato (item 3.6.1.), o músculo foi dividido em fragmentos de aproximadamente 1 mm de largura, que foram imersos rapidamente em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) por aproximadamente 24 horas. Após este período, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, pós-fixados com solução de tetróxido de ósmio 1% por duas horas em temperatura ambiente e novamente lavados três vezes com tampão-fosfato 0,1 M. Após, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, uma vez de 15 minutos cada e três vezes de 10 minutos em acetona 100%), embebidas em uma mistura de acetona-resina Epon na proporção 1:1, durante 24 horas (em rotor) e, finalmente, em resina pura, por 48 horas. A inclusão foi em resina Epon e a polimerização conduzida à 60°C, por 48 horas.

Cortes semifinos (1 μm de espessura) foram obtidos em ultramicrótomo Leica Supernova, em navalhas de vidro e corados em solução bórica de Azul de metileno 0,5% para definição da área de interesse.

Os cortes ultrafinos (60 - 70 nm de espessura) foram obtidos com navalha de diamante, coletados em telas de cobre (200 "mesh") e contrastados com acetato de uranila a 2%, durante 20 minutos, e citrato de chumbo a 0,5%, durante 8 minutos.

As observações e os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de transmissão Leo 906 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP e Departamento de Patologia, FCM da UNICAMP.

3.7. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A atividade fosfolipásica foi determinada de acordo com HOLZER & MACKESSY (1996). A fração cromatográfica apropriada (0,1 ml) foi misturada com 1 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 10 mM $CaCl_2$ e 100 mM NaCl e armazenada em

gelo. Os 100 microlitros do substrato (4 nitro 3 (octanoiloxi) ácido benzóico, 3,0 mM diluído em acetonitrilo) eram então adicionados e misturados com misturador vórtex e incubados à 37°C por 20 minutos.

A reação foi interrompida para que os tubos fossem armazenados em gelo, rapidamente adicionou-se 100 µl de Triton X-100 (2,5% de água destilada), seguido pela mistura no vórtex por 5 segundos. A mistura contida nos tubos foi incubada à temperatura ambiente por 5-10 minutos antes de determinar a absorbância estipulada a 425 nm em um espectofotômetro Uvikon 810, UV/vis (Kontron Instruments). A atividade fosfolipásica foi inibida incubando o veneno com 5 mM de bromofenacil-*p*-brometo, durante 24 h a temperatura de 37°C, para análise da atividade residual como descrito acima. Antes, para testar a atividade biológica do veneno, o inibidor foi removido através de filtração gel em uma coluna PD-10 de Sephadex G-25 (Amersham). Este procedimento resultou em 93% de inibição da atividade PLA_2.

3.8. 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 ± erro padrão ($\sum \pm$e.p.).

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDOS MIOGRÁFICOS

4.1.1. Preparação nervo frênico-diafragma de rato

4.1.1.1. Estimulação elétrica indireta

Em preparações sob estimulação elétrica indireta a adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 e 10 μg/ml do veneno total e com atividade fosfolipásica inibida) provocou diminuição na amplitude das contrações em 85%, porcentagem estipulada para observação dos efeitos do veneno. Os tempos para levar ao bloqueio de 85% foram: 36,75 ± 2,01 min (n=5); 18 ± 0,57 min (n=3), respectivamente para 5 e 10 μg/ml do veneno total, $p<0,01$ (Figs. 4 e 6), e 54 ± 4,62 min (n=3); 29 ± 0,54 min (n=3), respectivamente para 5 e 10 μg/ml do veneno com a atividade fosfolipásica inibida, $p<0,01$ (Figs. 5 e 7).

Tratamentos foram efetuados a fim de reverter o bloqueio da resposta contrátil, induzido pelo veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml). A neostigmina (Neo) (5,8 μM) foi adicionada em cinco experimentos, quando a resposta contrátil encontrava-se reduzida em torno de 85% em relação ao controle (85,05 ±0,05% para 5 μg/ml). Observou-se que a Neo é capaz de reverter, parcialmente, o bloqueio produzido pelo veneno na dose de 5 μg/ml (52,41 ± 4,45%) (Fig. 8) .

A adição de 4-aminopiridina (4-AP) (53,0 μM) em cinco experimentos, em relação ao controle (84,92 ± 0,22%) também foi capaz de reverter parcialmente o bloqueio produzido pelo veneno de *Naja naja kaouthia* na dose de 5 μg/ml (50,14 ± 8,33%) (Fig. 9).

As preparações (n=3), após obtido o bloqueio de 85%, com a dose de 5 μg/ml, sofreram repetidas lavagens (n=5) a cada 15 min com solução de Tyrode por 8 vezes, porém estas foram ineficazes na tentativa de reversão do bloqueio (Fig. 10).

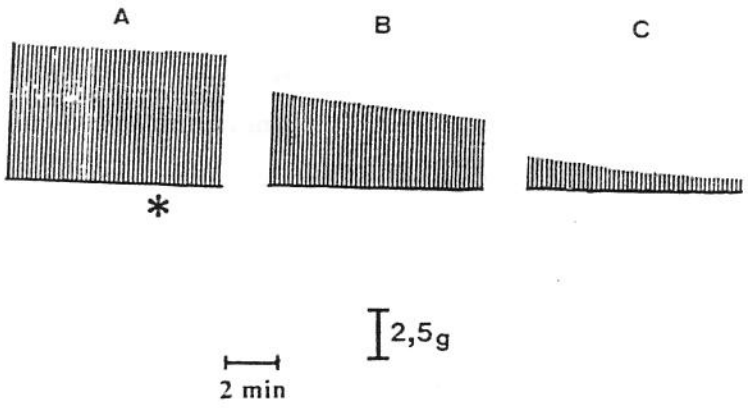


FIGURA 4 - Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 µg/ml) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A - Controle (10 min) e (*) Adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 µg/ml); B - Estimulação elétrica indireta (15 min após adição do veneno); C - Bloqueio neuromuscular de 85% (39 min da adição do veneno).

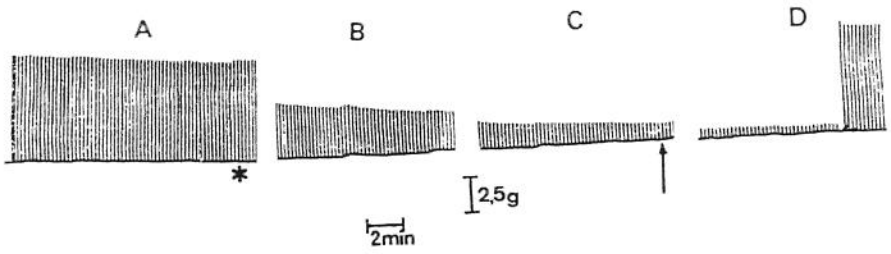


FIGURA 5 - Efeito do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml com a atividade fosfolipásica inibida) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A - Controle (10 min) e (*) Adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml com a atividade fosfolipásica inibida); B – Estimulação elétrica indireta (27 min após adição do veneno); C - (↑) Bloqueio neuromuscular de 85% (47 min da adição do veneno); D – Estimulação elétrica direta.

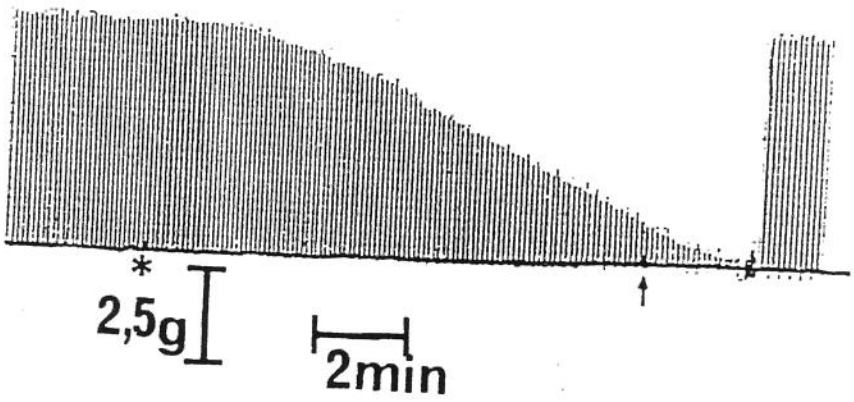


FIGURA 6 - Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (10 μg/ml) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

Controle (10 min); (*) adição do veneno e (↑) bloqueio neuromuscular de 85% (18 min da adição do veneno) e estimulação elétrica direta.

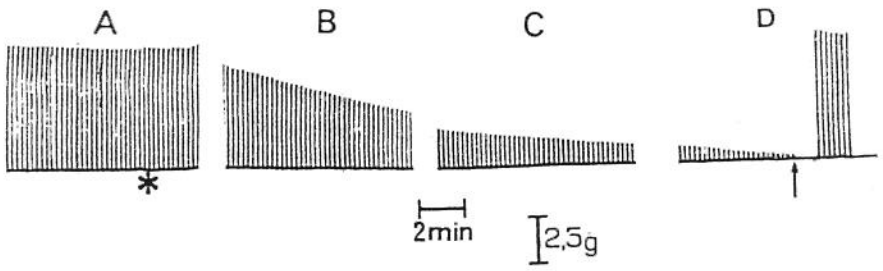


FIGURA 7- Efeito do veneno de *Naja naja kaouthia* (10 μg/ml com a atividade fosfolipásica inibida) sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A - Controle (10 min) e (*) Adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (10 μg/ml); B – Estimulação elétrica indireta (10 min após adição do veneno); C - (↑) Bloqueio neuromuscular de 85% (28 min da adição do veneno); D – Estimulação elétrica direta.

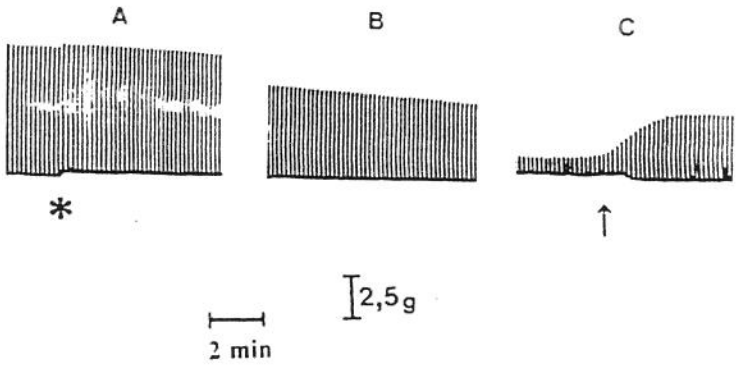


FIGURA 8 - Efeito da Neo (5,8 μM) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A - Controle (10 min) e (*) adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml); B - Estimulação elétrica indireta (23 min da adição do veneno); C - (↑) Adição de Neo (5,8 μM), após bloqueio neuromuscular (85%) com reversão de 40% deste bloqueio.

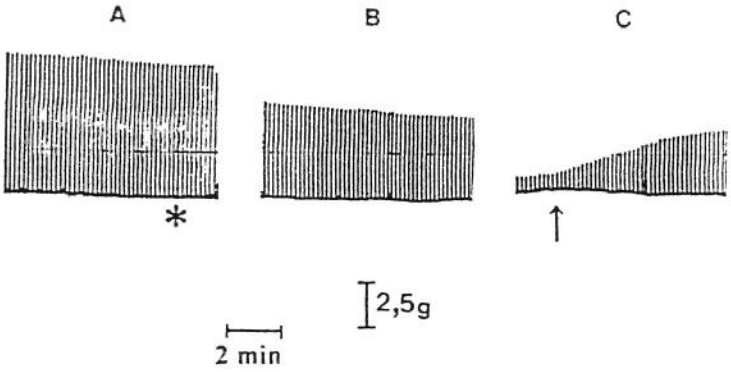


FIGURA 9 - Efeito da 4-AP (53,0 μM) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A - Controle (10 min) e (*) Adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml); B - Estimulação elétrica indireta (37 min após adição do veneno); C - (↑) Adição de 4-AP (53,0 μM), após bloqueio neuromuscular (85%) com reversão de 51% deste bloqueio.

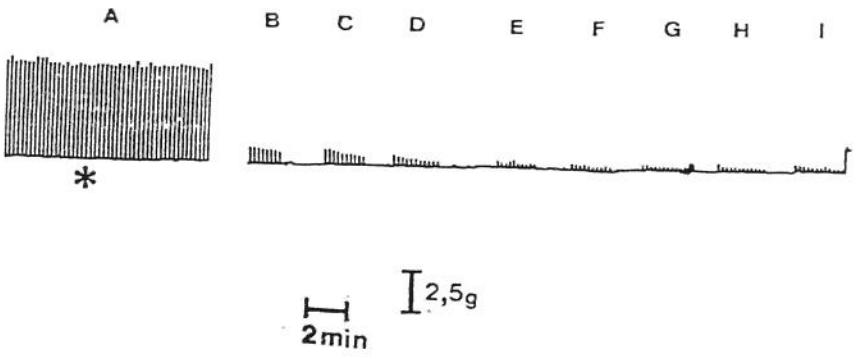


FIGURA 10 - Efeito das lavagens sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno total de *Naja naja kaouthia*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A - Controle (10 min) e (●) Adição do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml); B - Bloqueio neuromuscular após 43 min da adição do veneno; C, D, E, F, G, H, I - Lavagens da preparação com Tyrode, a cada 15 min (cada letra corresponde a 5 lavagens da preparação).

4.1.1.2. Estimulação elétrica direta

Foram também realizados experimentos utilizando-se o pré-tratamento com *d*-Tc (15 μM; n=3). A dose da droga, acima citada, foi suficiente para bloquear as respostas à estimulação elétrica indireta. Após este bloqueio, a preparação era estimulada diretamente (por 10 min) e, a esta preparação, foi adicionado o veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) que permanecia incubado por 30 minutos. O veneno não causou alteração aparente na amplitude da resposta contrátil com estimulação elétrica direta (Fig. 11).

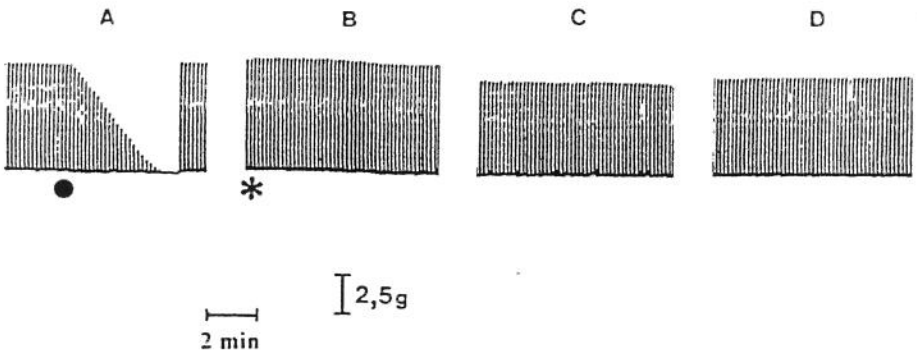


FIGURA 11 - Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) sobre a preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizada (*d*-Tc; 15 μM).

A - Controle (10 min) e (•) adição de *d*-Tc; B - Estimulação elétrica direta (10 min) e (*) adição do veneno (5 μg/ml); C, D – 60 e 90min da adição do veneno, respectivamente.

4.2. PREPARAÇÃO DIAFRAGMA DE RATO CRONICAMENTE DESNERVADO

Nos diafragmas cronicamente desnervados observou-se que, em condições controle, a resposta muscular máxima foi obtida com a concentração de 36 μM de ACh. Houve, no entanto, bloqueio total da resposta contraturante induzida pela ACh, após incubação por 30 min com o veneno *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml; n=5) sem que houvesse modificação da contração sob estímulo direto (Fig. 12). O bloqueio não conseguiu ser revertido após sucessivas lavagens com Tyrode, sugerindo que o veneno possa atuar nos receptores colinérgicos pós-sinápticos.

Nos experimentos em que foram realizados o pré-tratamento com a *d*-Tc (15 μM; n=5), observou-se que, após 30 minutos de incubação com o veneno *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml), as respostas contraturais à ACh foram completamente bloqueadas (Fig. 13). Resultados estes, que demonstram que a *d*-Tc não foi capaz de proteger os receptores colinérgicos pós-sinápticos da ação do veneno.

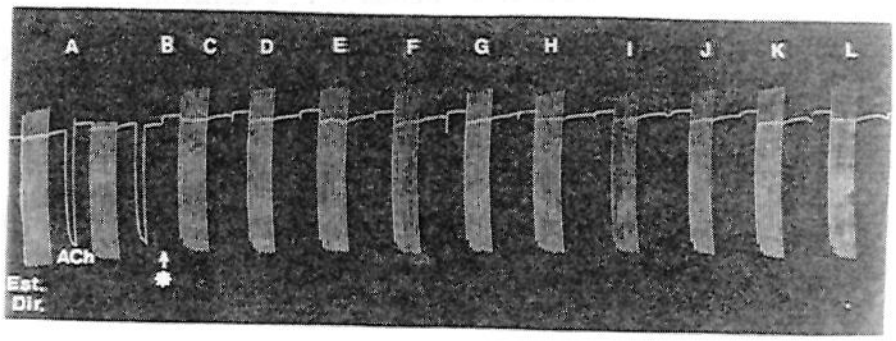


FIGURA 12 - Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) sobre a preparação diafragma de rato cronicamente desnervado.

A – Controle (10 min), estimulação elétrica direta e adição de Ach (36 μM); B – (●) Adição do veneno de *N. n. kaouthia* (5μg/ml); C, D, E, F, G, H, I, K, L Estímulo elétrico direto e adição de ACh após 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60 minutos após lavagens da preparação.

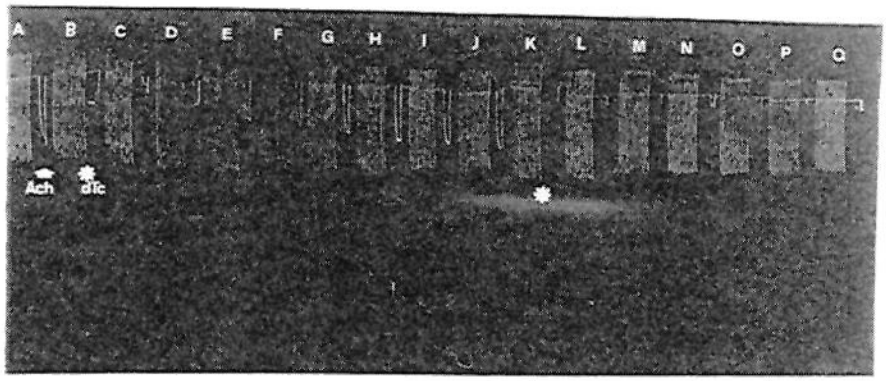


FIGURA 13 - Efeito da ACh (22 μM) e da *d*Tc (15μM) na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado, antes e após a adição do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml).

A – Controle, estimulação elétrica direta e (⏉) adição de Ach (22 μM); B – (*) Adição de *d*Tc (15 μM); C, D, E, F, G, H, I, J – Lavagens da preparação com Tyrode, a cada 15 minutos (cada letra corresponde a 5 lavagens da preparação); K – (✱) Adição de *d*Tc por 30 min e adição do veneno por 30 min; L, M, N, O, P, Q – Adição de Ach (22 μM) mostrando não haver contraturas, e, lavagens da preparação.

4.3. PREPARAÇÃO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO

4.3.1. Estimulação elétrica indireta

O veneno *Naja naja kaouthia*, na dose de 5 μg/ml, causou bloqueio da transmissão neuromuscular na preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho (n=5). Após o bloqueio da resposta contrátil (14 ± 1,84 min), provocada pela estimulação indireta, o veneno induziu bloqueio total da contratura a ACh (37μM e 73 μM, respectivamente). Porém o mesmo não ocorreu com a resposta contraturante provocada pelo KCl (134 μM), em que não houve alteração da resposta muscular (Fig. 14).

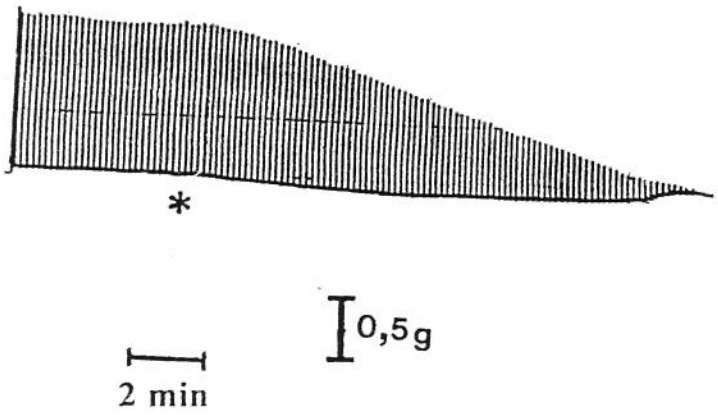


FIGURA 14 - Efeito do veneno total (5 μg/ml) de *Naja naja kaouthia* sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta.

(*) Adição do veneno e bloqueio neuromuscular de 85% (13 min da adição do veneno)

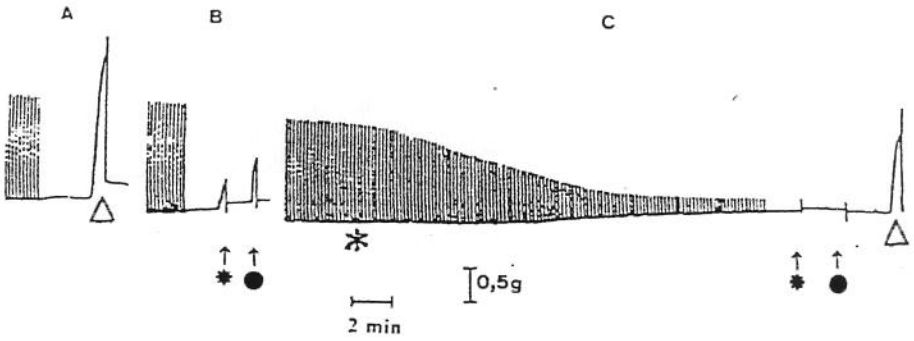


FIGURA 15 - Efeito da ACh (37 e 73μM) e KCl (134 μM) na preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml).

A - Controle - Estimulação elétrica indireta e (⇑) adição de KCl; B - (✱) Adição de Ach (37μM) e (•) Ach (73μM); C - (*) Adição do veneno e adição de ACh e KCl, após o bloqueio neuromuscular em 17 ± 2,51 min, produzido pelo veneno.

4.3.2. Estimulação elétrica direta

Realizaram-se experimentos pré-tratando as preparações com *d*-Tc (44 μM; n=3).

Para este procedimento, a dose da *d*-Tc, foi suficiente para bloquear as respostas contráteis à estimulação elétrica indireta. Após este bloqueio, produzido pela *d*-Tc, as preparações foram estimuladas diretamente e nestas, adicionava-se o veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) que permanecia em contato com a preparação por 30 minutos. O veneno não causou alterações aparentes nas respostas contráteis provocadas pela estimulação elétrica direta.

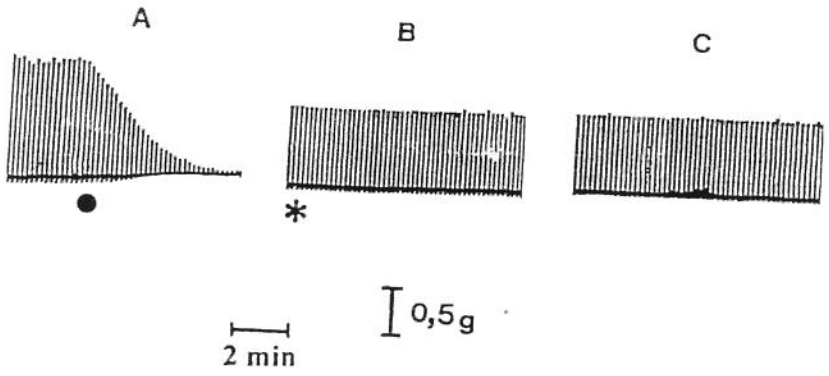


FIGURA 16 - Efeito do veneno de *Naja naja kaouthia* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho curarizada (*d*-Tc; 44μM).

A - Estimulação elétrica indireta, controle (10 min) e (•) adição de *d*-Tc; B - Estimulação elétrica direta (10 min) e (*) adição do veneno (5 μg/ml); C - 30 min após adição do veneno.

4.4. DOSE LETAL 50 (DL_{50})

Na avaliação da dose mediana letal (DL_{50}) em camundongos, o veneno de *Naja naja kaouthia* apresentou os seguintes dados: 273,67 μg/Kg (230,68 μg/Kg a 324,67 μg/Kg). Os cálculos foram realizados através do método de WEIL (1952).

4.5. ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS

4.5.1. Potencial de membrana

O veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) não causou alterações significativas ($p<0,05$ – teste *t-Student*) nas medidas do potencial de membrana das fibras musculares (n=3), sugerindo-se que o veneno não contém componentes que atuem em nível muscular (Grafico 1).

4.5.2. Potencial em miniatura da placa terminal

A ação do veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml; n=6) sobre os potenciais em miniatura da placa terminal (pptm), demonstrou, em geral, uma diminuição progressiva da amplitude e freqüência destes potenciais, até o bloqueio total. Foram realizados três experimentos com a Neo e três experimentos com a 4-AP com o mesmo protocolo. Após 24 (± 1,5) minutos da adição do veneno, observou-se um bloqueio total dos pptm, na vigência do bloqueio adicionou-se em três preparações a Neo (5,8 μM) (Fig. 17 I). Esta droga foi capaz de causar a total reversão da diminuição da freqüência e amplitude dos pptm. Em outros três experimentos, a 4-AP (53,0 μM), foi adicionada após 31 (± 4,3) minutos do bloqueio dos pptm, causando também a total reversão do bloqueio quanto à freqüência e amplitude desses micropotenciais (Fig. 17 II). Após 5 minutos da adição das drogas acima citadas, já foi possível observar esta reversão.

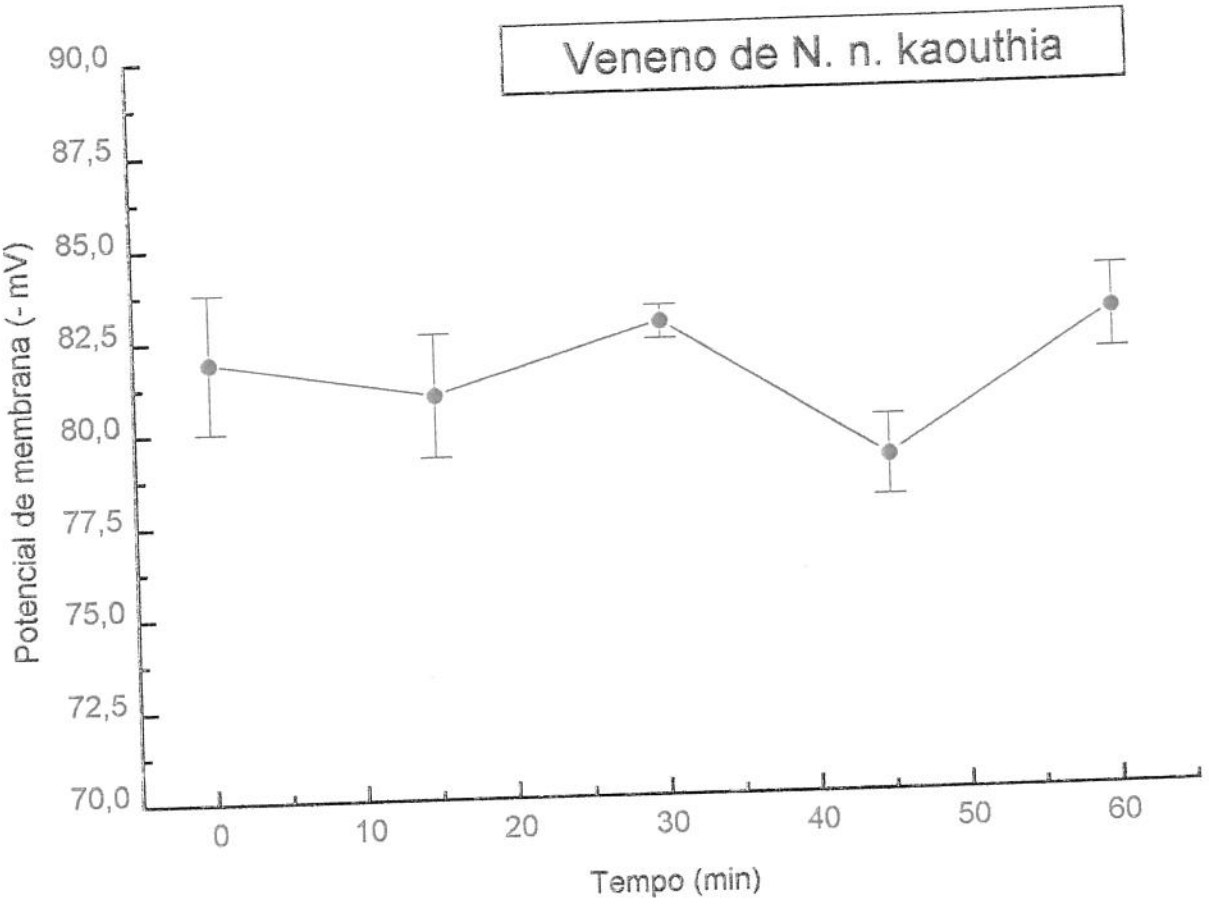


GRÁFICO 1 - Efeito do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) sobre o potencial de membrana, nas fibras musculares do diafragma de rato. O potencial de membrana foi determinado como foi descrito no texto. Cada ponto representa a média ± erro padrão de três experimentos.

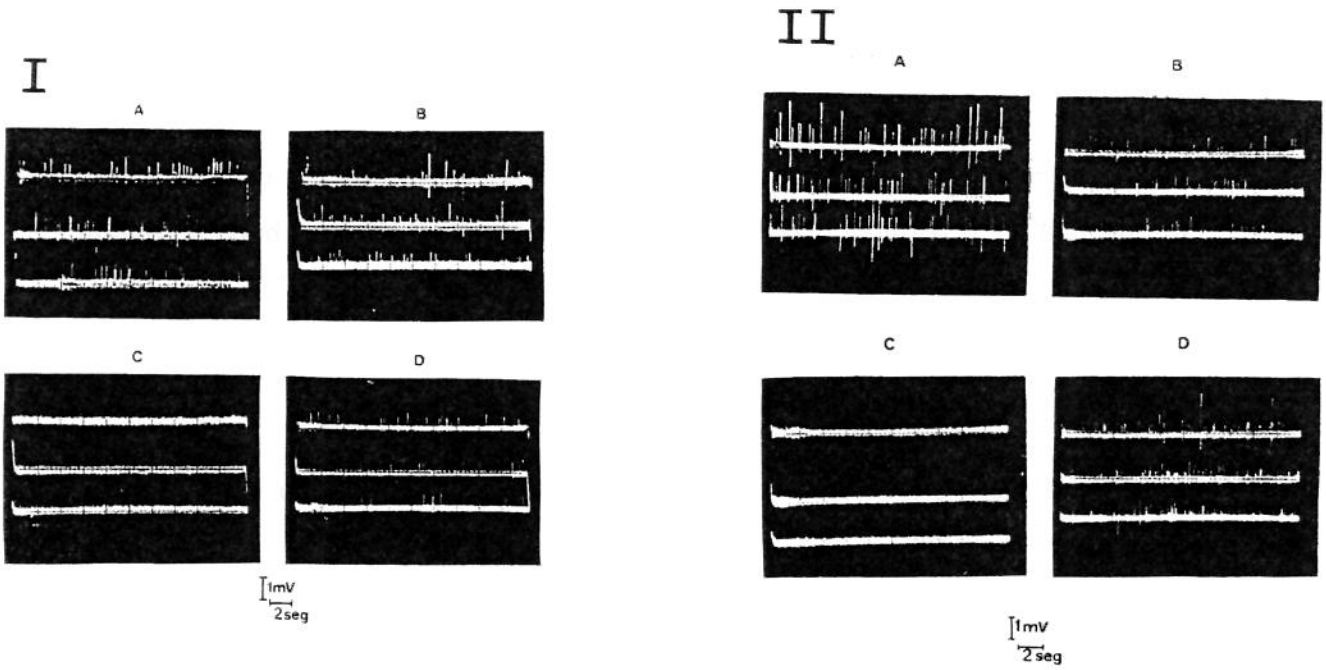


FIGURA 17 - Efeitos do veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml) sobre pptm, no diafragma de rato. Efeito da Neo (5,8 μM) e 4-AP (53,0 μM) sobre as alterações causadas pelo veneno de *Naja naja kaothia* sobre os potenciais de placa terminal em miniatura.

I A - Controle; B – 15 minutos após adição do veneno; C - Bloqueio após 25 min da adição do veneno; D - 5 min após a adição de Neo (5,8 μM).

II A - Controle; B – 15 minutos após adição do veneno; C - Bloqueio após 23 min da adição do veneno; D - 5 min após a adição de 4-DAP (53,0 μM).

4.6. ESTUDO MORFOLÓGICO

4.6.1. Microscopia de luz

Os hemidiafragmas controles incubados com solução de Tyrode por 30 min, sem estimulação elétrica, apresentaram 85% das fibras musculares com estrutura normal. Os fascículos musculares mostravam-se bem organizados e separados por estreitas faixas de tecido conjuntivo, o perimísio (Figs. 18 A, B). Entretanto, 15 % das fibras mostraram alterações discretas que incluíam pouca definição das estrias, e ondulações. Não foram observadas lise de sarcolema ou as alterações comuns após ruptura da membrana da célula.

4.6.1.1. Diafragmas incubados com 5μg/ml e 10 μg/ml do veneno total de *Naja naja kaouthia.*

Nas preparações incubadas com as doses de 5 e 10 μg/ml foram observadas alterações dose-dependentes. As principais alterações referiram-se a 1) desorganização dos fascículos musculares pelo aumento dos espaços intercelulares e interfasciculares (Figs. 19 A, B); 2) distorções nos tamanhos das fibras musculares, particularmente visíveis nos cortes transversais (Fig. 19 A); 3) observação (indireta) de lesão ou de ruptura do sarcolema. A ruptura do sarcolema ficou evidenciada indiretamente pela presença de lesões delta e aglutinação em faixas dos miofilamentos (Figs. 19 B,C, D). Foram encontradas 47.1% (± 11,08%) ($p<0,05\%$) e 62,7% (± 3,6%) ($p<0,01\%$) de fibras lesadas com as doses de 5 μg/ml e 10 μg/ml. Estes dados indicam que, em relação aos controles, o veneno produziu um aumento significativo no número de fibras lesadas de 37% e 56%, respectivamente ($p<0,05\%$ e $p<0,01\%$, respectivamente).

4.6.1.2. Diafragmas incubados com 5μg/ml e 10 μg/ml do veneno de *Naja naja kaouthia* com a atividade de PLA_2 inibida.

Qualitativamente, as alterações induzidas com o veneno de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml e 10 μg/ml), com a atividade de PLA_2 inibida, foram similares às observadas com o veneno total (isto é, sem a inativação da atividade de PLA_2). As alterações observadas

observadas foram diâmetro heterogêneo das fibras, ruptura de sarcolema evidenciada pela presença de lesões delta, miofilamentos densamente agrupados e conseqüentes perda de sarcoplasma, além de desestruturação dos feixes musculares (Figs. 20 A, B,C, D).

Entretanto, quantitativamente ficou evidenciado que a neutralização da atividade fosfolipásica causou diminuição no número de fibras alteradas. Com a dose de 5 μg/ml, o veneno destituído da presença de atividade fosfolipásica causou alterações em 38,4% (± 11,8%) de fibras, enquanto com a dose de 10 μg/ml, 59,5% (± 9,6) das fibras apresentavam-se lesadas após incubação durante o tempo de bloqueio ($p<0.01\%$). Estes resultados indicam que, em relação aos controles, o veneno provocou um aumento significativo de 27% e de 52% no número de fibras lesadas.

A comparação da proporção do número de fibras lesadas nas preparações incubadas com o veneno total (5 μg/ml) com aquelas incubadas com o veneno destituído da atividade fosfolipásica (5 μg/ml) mostrou que a diminuição no número de fibras lesadas quando da ausência da atividade fosfolipásica não é significativa, o mesmo acontecendo com a dose de 10 μg/ml. Por outro lado, o efeito dose dependente do veneno total ou com a atividade fosfolipásica inibida ficou patente ao nível de $p<0,01$.

4.6.2. Microscopia eletrônica

As preparações nervo frênico diafragma de ratos incubadas com solução de Tyrode por 30 min mostraram que a maior parte do tecido muscular apresentava-se íntegro do ponto de vista ultraestrutural. A Fig. 21 ilustra o aspecto da fibra muscular em corte transversal (A), longitudinal (B), secções oblíquas de fibras nervosas mielínicas de um fascículo nervoso intramuscular (C) e de uma junção neuromuscular (D).

4.6.2.1. Diafragmas incubados com 5 μg/ml do veneno total de *Naja naja kaouthia* e com a atividade fosfolipásica inibida.

O veneno total ou o veneno onde a atividade fosfolipásica foi inibida, não induziu alterações diferentes do ponto de vista qualitativo. O estudo quantitativo efetuado nas preparações histológicas mostraram que o aumento do número de fibras lesadas na presença da atividade PLA_2 não era significativo. Assim, a descrição das alterações com os dois tratamentos não será diferenciada, apenas nas legendas das figuras.

À microscopia eletrônica de transmissão procurou-se ilustrar diferentes padrões de alterações exibidos pelas fibras que se apresentavam lesadas. Algumas fibras apresentavam espaços lacunares contendo restos de membranas e situados entre miofibrilas eletrondensas (Fig. 22A). Condensação e aglutinação dos miofilamentos e desorganização das miofibrilas, mitocôndrias e retículo sarcoplasmático (Fig. 22 B, C). Com relação às fibras nervosas intramusculares, o veneno na dose de 5 μg/ml (com ou sem atividade PLA_2) causou enrugamento da bainha de mielina e rompimento do perineuro (Fig. 23 B), porém outros fascículos nervosos apareciam intactos (Fig. 23 A). A ultra-estrutura da maioria das junções neuromusculares foi aparentemente pouco afetada, como ilustra a Fig. 23 C.

4.6.2.2. Diafragmas incubados com 10 μg/ml do veneno de *Naja naja kaouthia* com e sem atividade fosfolipásica.

A incubação das preparações de rato com esta dose de veneno levou ao aparecimento de maior número de células mionecróticas do que com a dose de 5 μg/ml, porém os tipos de alterações eram similares. Similarmente, fibras com aparência intacta foram observadas.

A incubação com o veneno total não induziu alterações mionecróticas substancialmente diferentes das induzidas pelo veneno com a atividade PLA_2 inibida. As células musculares podiam apresentar-se nos estágios iniciais das alterações, onde se podiam identificar as miofibrilas, miofilamentos e as mitocôndrias alongadas intactas (Fig. 24 A) ou em estados mais avançados. Nestes, já não se visualizavam as miofibrilas e os

miofilamentos transformavam-se em massas tortuosas amorfas ou com estrias produzidas pela hipercontração dos sarcômeros. As mitocôndrias redondas e com cristas alteradas apresentavam sinais de desequilíbrio osmótico (Figs. 24 B, C). Outras alterações envolvendo hipertrofia das cisternas do retículo endoplasmático davam à fibra aspecto vacuolado e lacunar (Fig. 25 A). A Fig. 25 B ilustra as alterações mitocondriais de volume e forma, presença de densidades floculentas e cristas densas empacotadas.

O veneno total e com atividade PLA_2 inibida, provocou nas fibras nervosas mielínicas o aparecimento de vacúolos perimielínicos e algumas alterações na bainha (Figs. 26 A, B).

A ultra-estrutura dos componentes das junções neuromusculares não mostrava alterações drásticas. Atribuímos esse quadro ao fato de só conseguirmos visualizar JNMs nas fibras menos afetadas pelo veneno. Nas Figs. 27 e 28 podem-se verificar que o sarcoplasma subjacente às zonas de junção mostram fibras musculares com miofilamentos, miofibrilas e sarcômeros apenas discretamente afetados. As alterações observadas com a dose de 10 μg/ml do veneno total de *N .n. kaouthia* foram terminais nervosos distorcidos e empacotamento das vesículas sinápticas, mitocôndrias intraterminais arrebentadas e dobras juncionais mais desorganizadas (Figs. 28 A, B), quando comparados com os das preparações incubadas com o veneno sem a atividade PLA_2 (Figs.27 A, B).

FIGURA 18 - Fibras musculares de hemidiafragma de rato-controle

Em (A) Secção longitudinal, (B) Secção transversal. As fibras mostram-se normais. A e B = 260 x

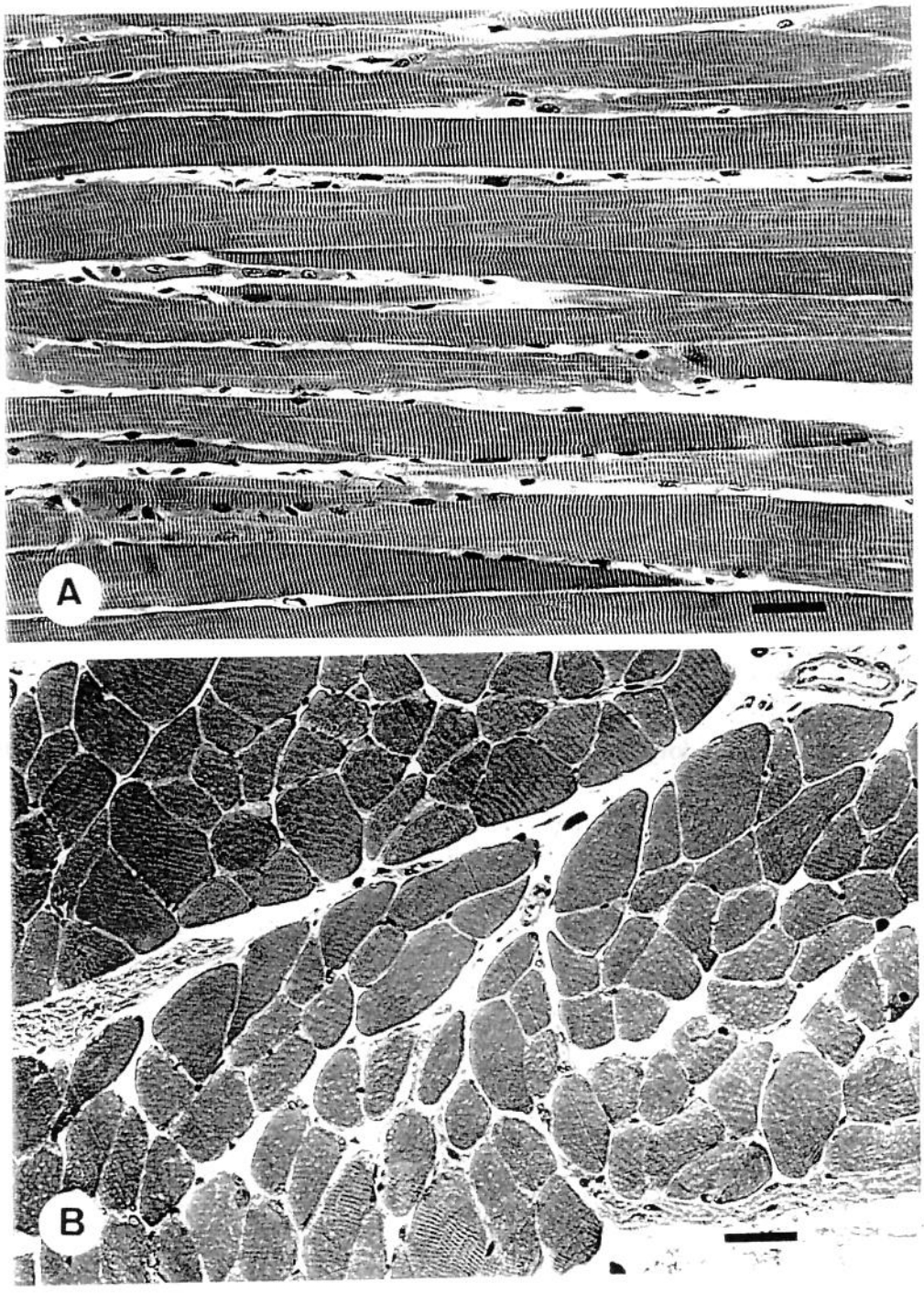

A
B

FIGURA 19 - Fotomicrografias de secções de músculo diafragma de rato incubado com 5 μg/ml (A, B) e 10 μg/ml (C, D) do veneno total de *Naja. naja kaouthia.*

Observe que há fibras musculares normais (n e asterisco) e que o estágio mionecrótico é variável, incluindo lesões delta (d), bandas densas de miofibrilas aglutinadas (b), zonas de hipercontração (h). 195 x.

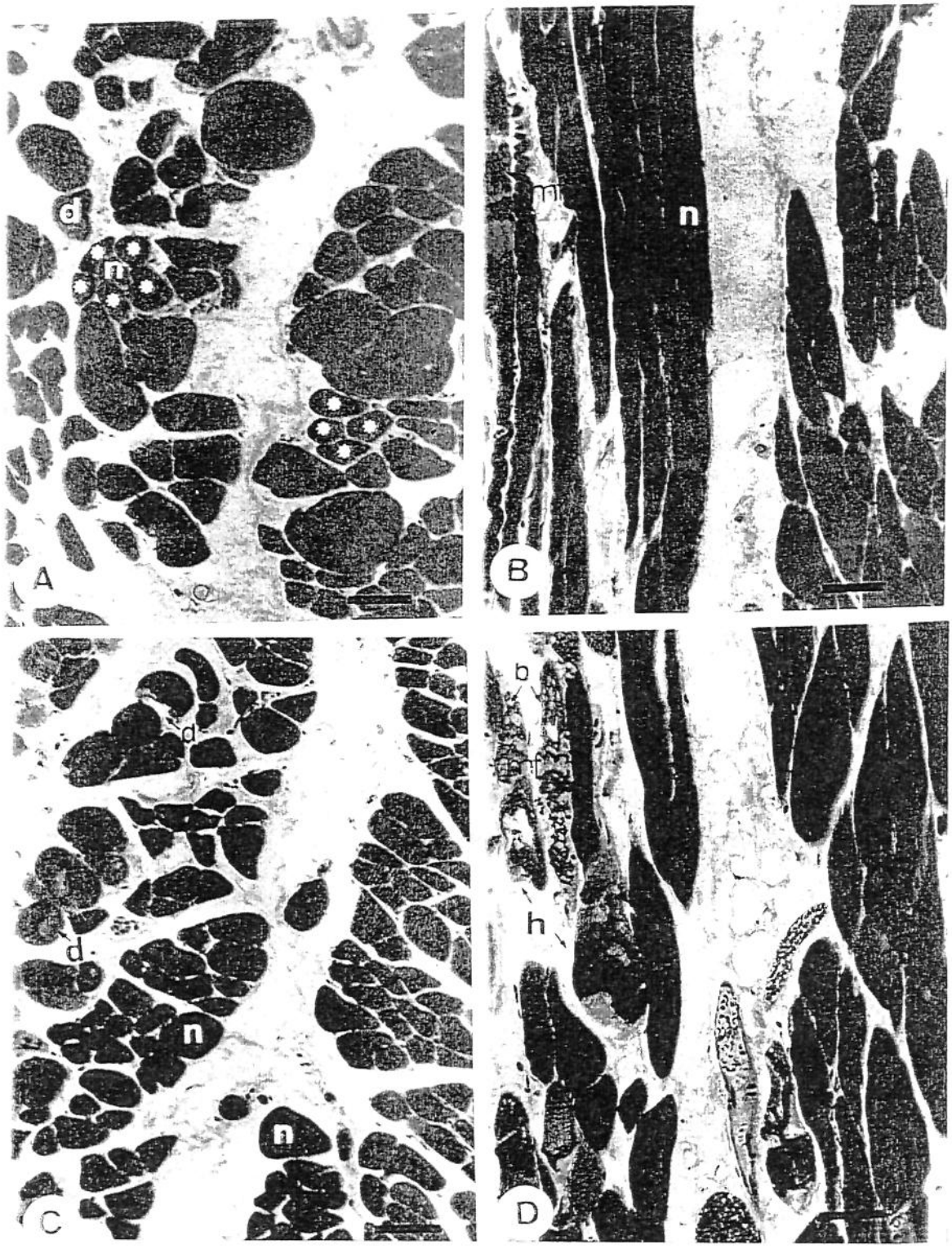

d
n
A
B
n
C
d
d
n
n
D
b
h

FIGURA 20 - Fotomicrografia de secções de diafragmas incubados com o veneno de *Naja naja kaouthia* com a atividade PLA_2 inibida: 5 μg/ml (A, B), e 10 μg/ml (C, D).

Observe que as alterações mionecróticas não acometem igualmente todas as fibras musculares nas duas doses. A ausência da atividade fosfolipásica não impediu o aparecimento de lesões delta (d), zonas de hipercontração (h) e fibras com miofibrilas densamente agrupadas (asterisco). Todas essas alterações são indicativas de que houve lise do sarcolema, n = fibra com aparência normal.195 x.

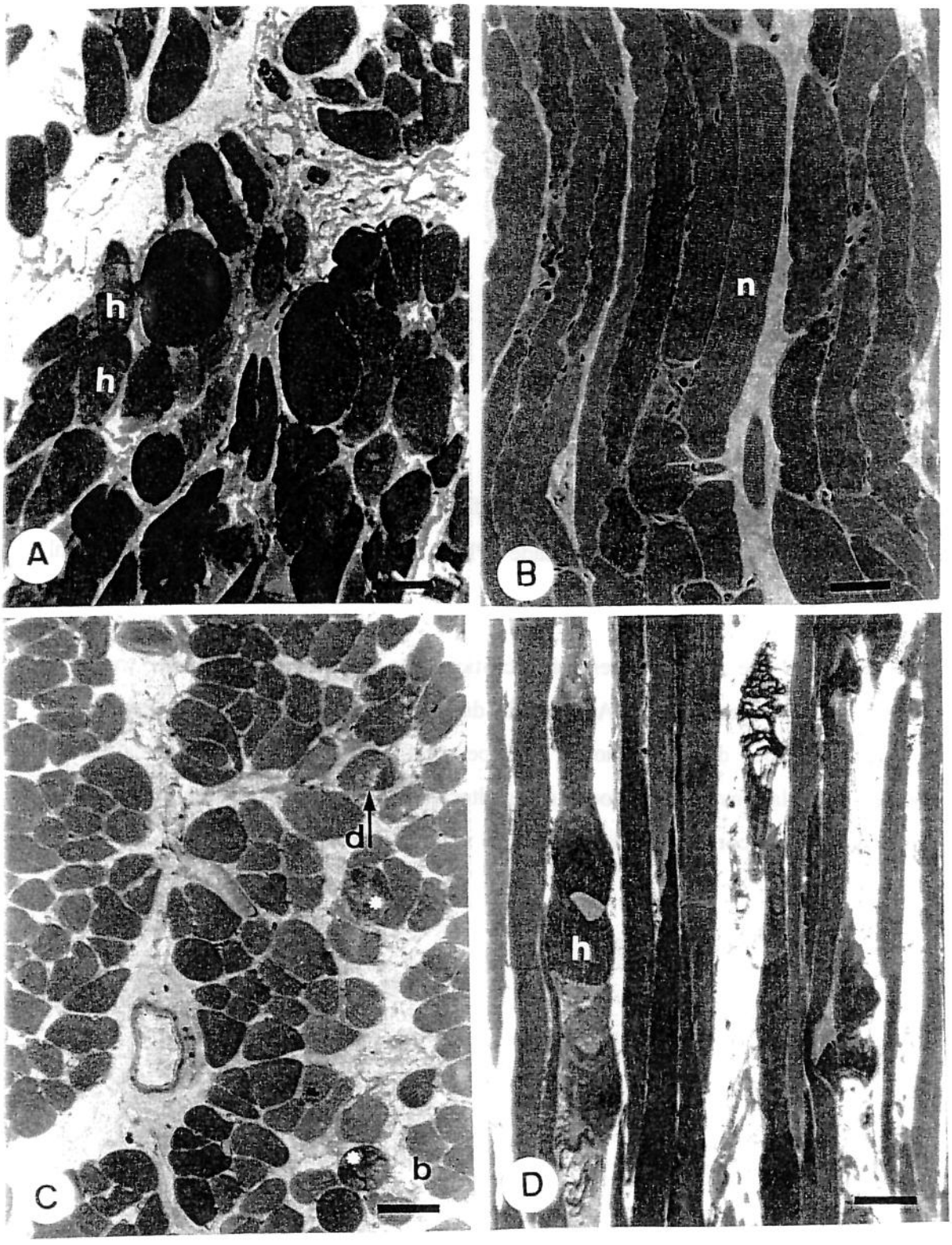

h
h
A
n
B
d
b
C
h
D

FIGURA 21 – Micrografia eletrônica de secções de diafragma de rato, controle (30 min).

Note miofibrilas (mi), mitocôndrias (m) e perfis do retículo sarcoplasmático (setas) normais. Os sarcômeros em B estão bem delineados e sem alterações.

A = 20.925 x, B = 11.150 x.

C – Fascículo nervoso intramuscular íntegro, com axônios envoltos pela bainha de mielina (a) e célula de Schwann (S). 9.000 x

D – Junção neuromuscular com o terminal nervoso (n) com as vesículas sinápticas e mitocôndrias (m) e as dobras juncionais na porção pós-sináptica. Observe um axônio pré-terminal (p). 11.625 x.

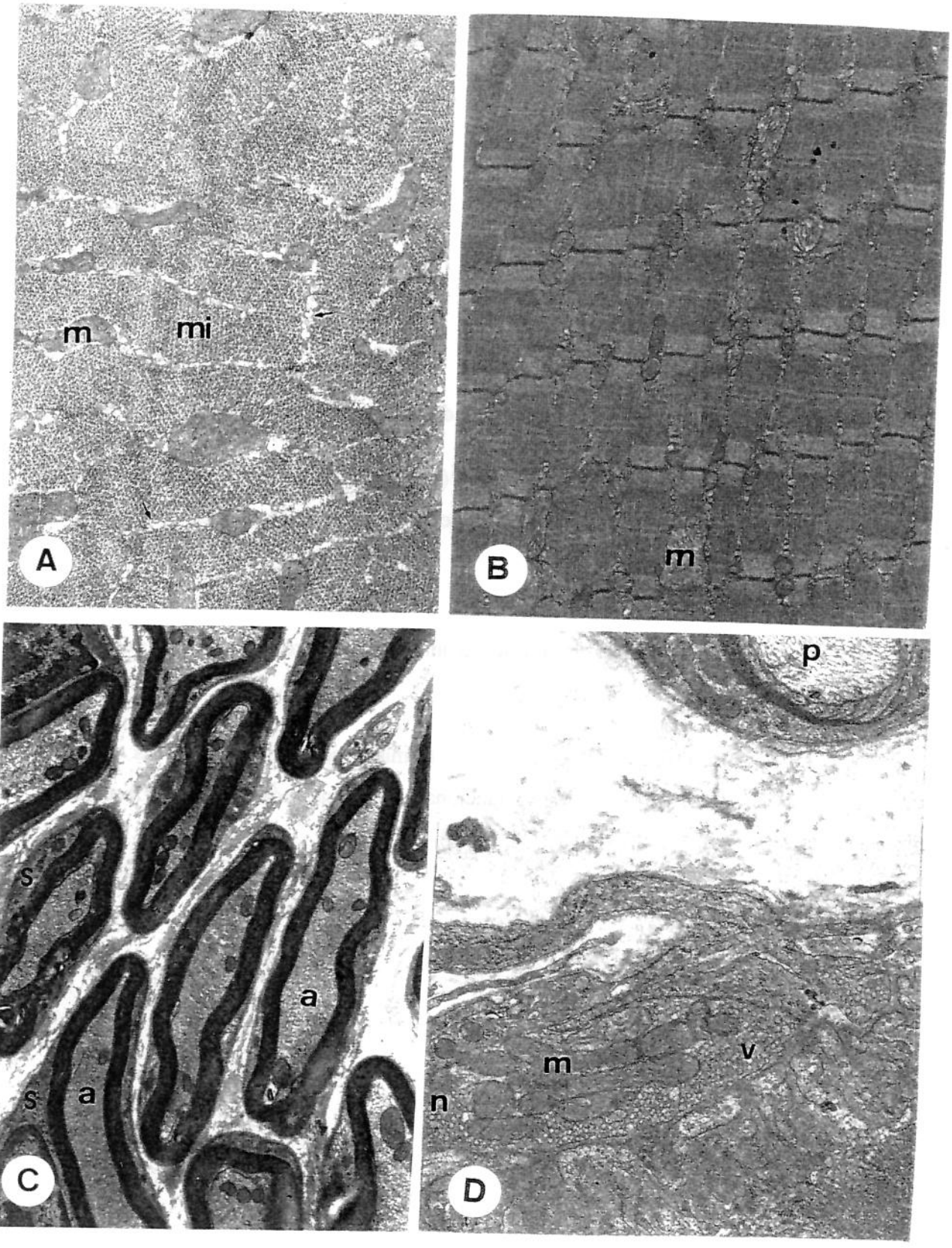

m
mi
A
m
B
s
a
s
a
C
p
m
v
n
D

FIGURA 22 - Micrografias eletrônicas de diafragma incubado com veneno de *Naja naja kaouthia.* (5 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida).

A, B e C – Secções de fibras musculares com diferentes padrões de alterações decorrentes de estágios mais e menos avançados das lesões mionecróticas. Além das miofibrilas (mi) estarem desestruturadas, descaracterizando a estrutura normal da fibra, as mitocôndrias com densidades floculentas e cristas paralelas (m) e o retículo sarcotubular (rs) também estão anormais. A ponta de seta indica um fragmento do sarcolema que foi lisado. A seta indica a membrana basal das células musculares. A = 6.834 x, B = 8.827 x, C = 5.390 x.

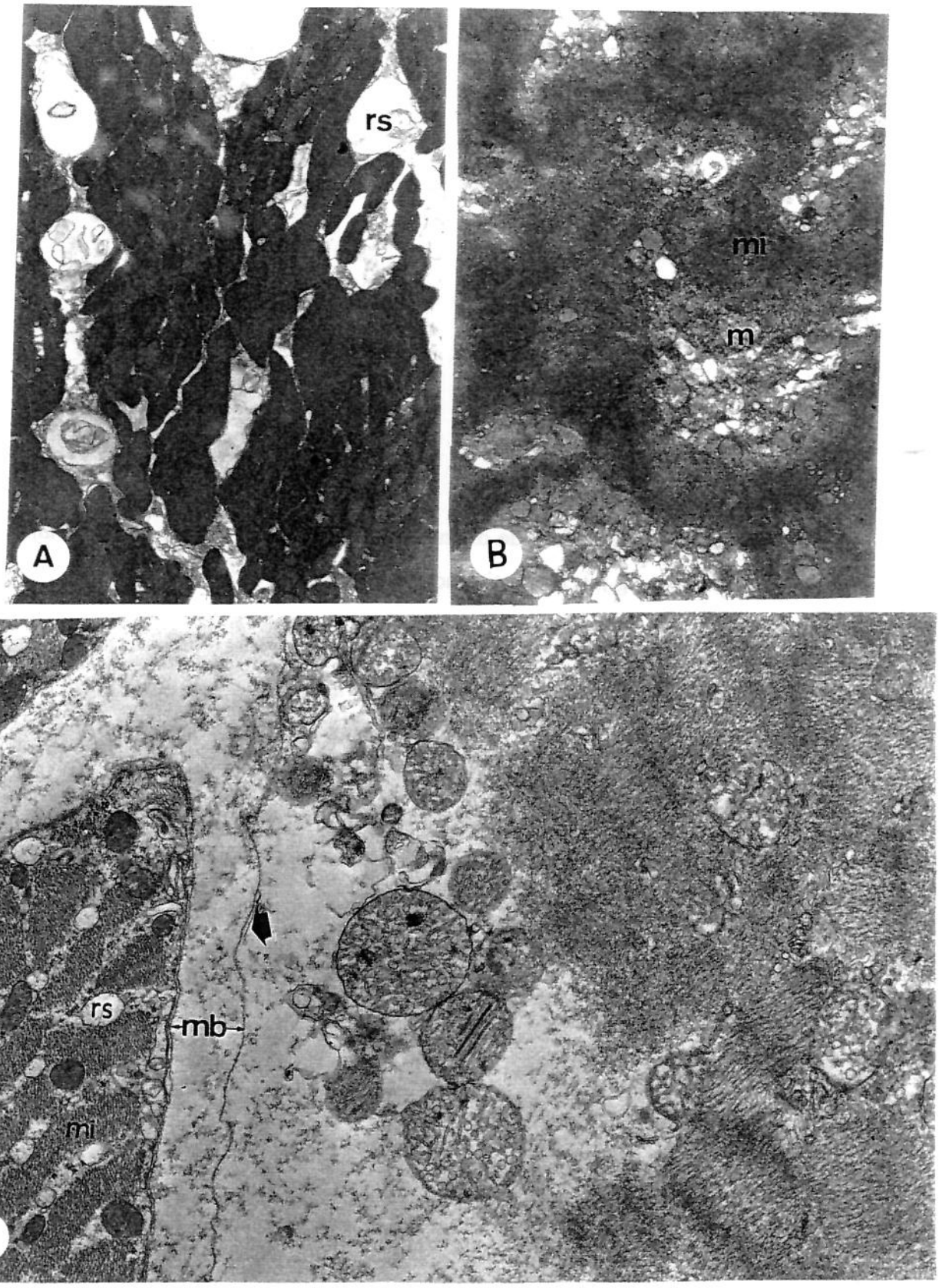

rs
A
mi
m
B
rs
mb
mi
C

FIGURA 23 - Micrografias eletrônicas de diafragma de rato incubado com 5 μg/ml do veneno total de *Naja naja kaouthia*.

A - Fascículo nervoso (5 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida) aparentemente normal com axônios mielínicos (a) e amielínicos (a') envoltos pela célula de Schwann (S); B - Fascículo nervoso (5 μg/ml do veneno total) em estágio inicial de alteração; C - Placa motora com duas secções de terminais nervosos com grande quantidade de vesículas sinápticas e dobras juncionais (j) bem desenvolvidas. Miofibrilas (mi) normais. m = mitocôndrias. A = 11.400 x, B = 4.176 x, C = 25.000 x.

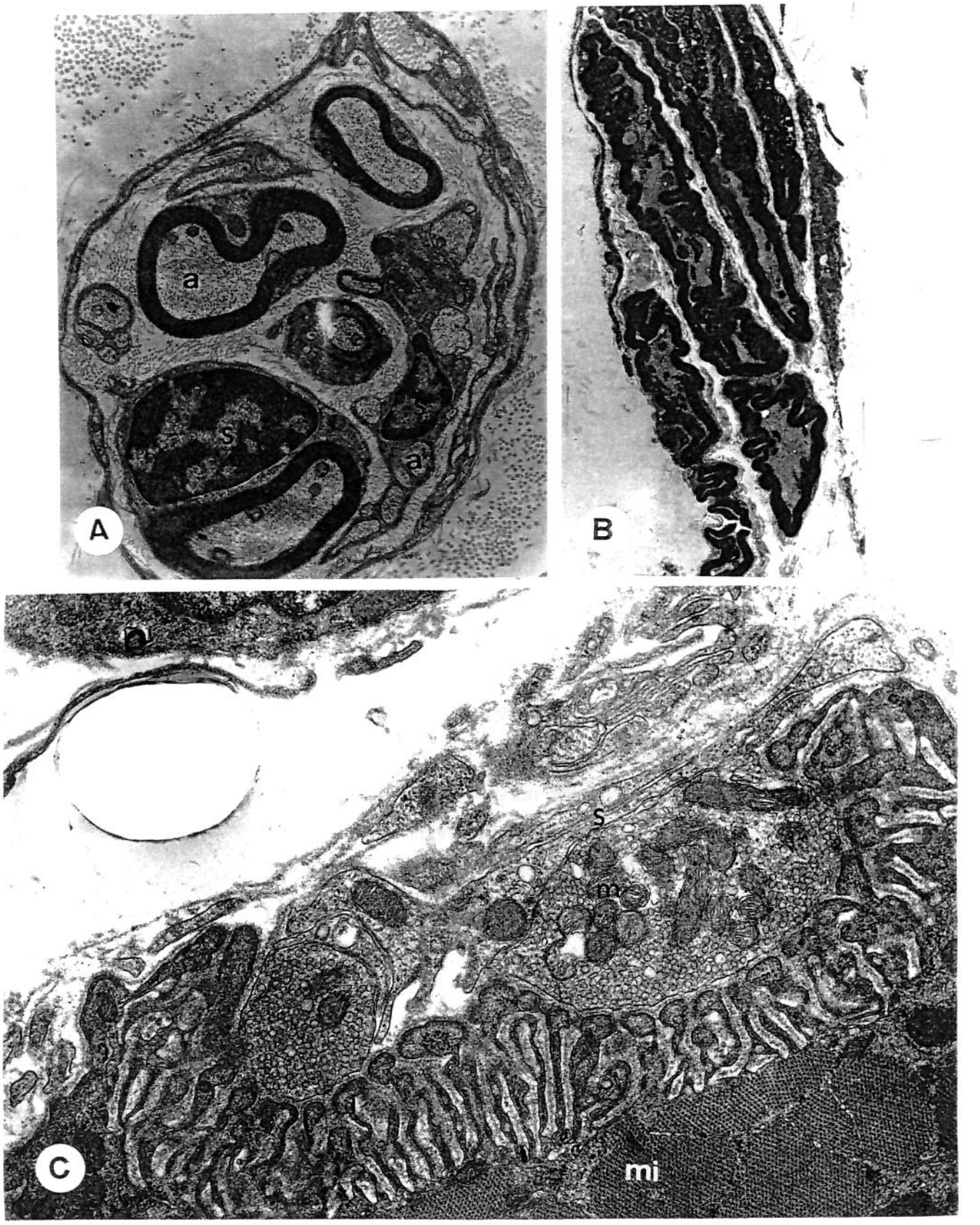

a
s
a
A
B
p
s
m
C
mi

FIGURA 24 – Micrografia eletrônica de diafragma de rato incubado com 5 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida e 10μg/ml de veneno total de *Naja naja kaouthia.*

A, B e C – Alterações das fibras musculares. Em A (5 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida) as miofibrilas mostram rompimentos dos miofilamentos (setas) com perda de porções das bandas A, I e da linha Z e, portanto com desestruturação dos sarcômeros. Em B (5 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida) e C (10 μg/ml) os miofilamentos densamente agrupados formam massas densas amorfas (*) e entre elas as mitocôndrias (m) com degeneração. A = 9.000 x, B = 5.395 x e C = 3.234x.

Em C – Fibra muscular mostrando zonas de filamentos condensados (*), remanescentes das miofibrilas (mi) hipercontraídas e zonas com material floculento (**) resultante da degradação da fibra. N = núcleo degenerado. 3.234 x.

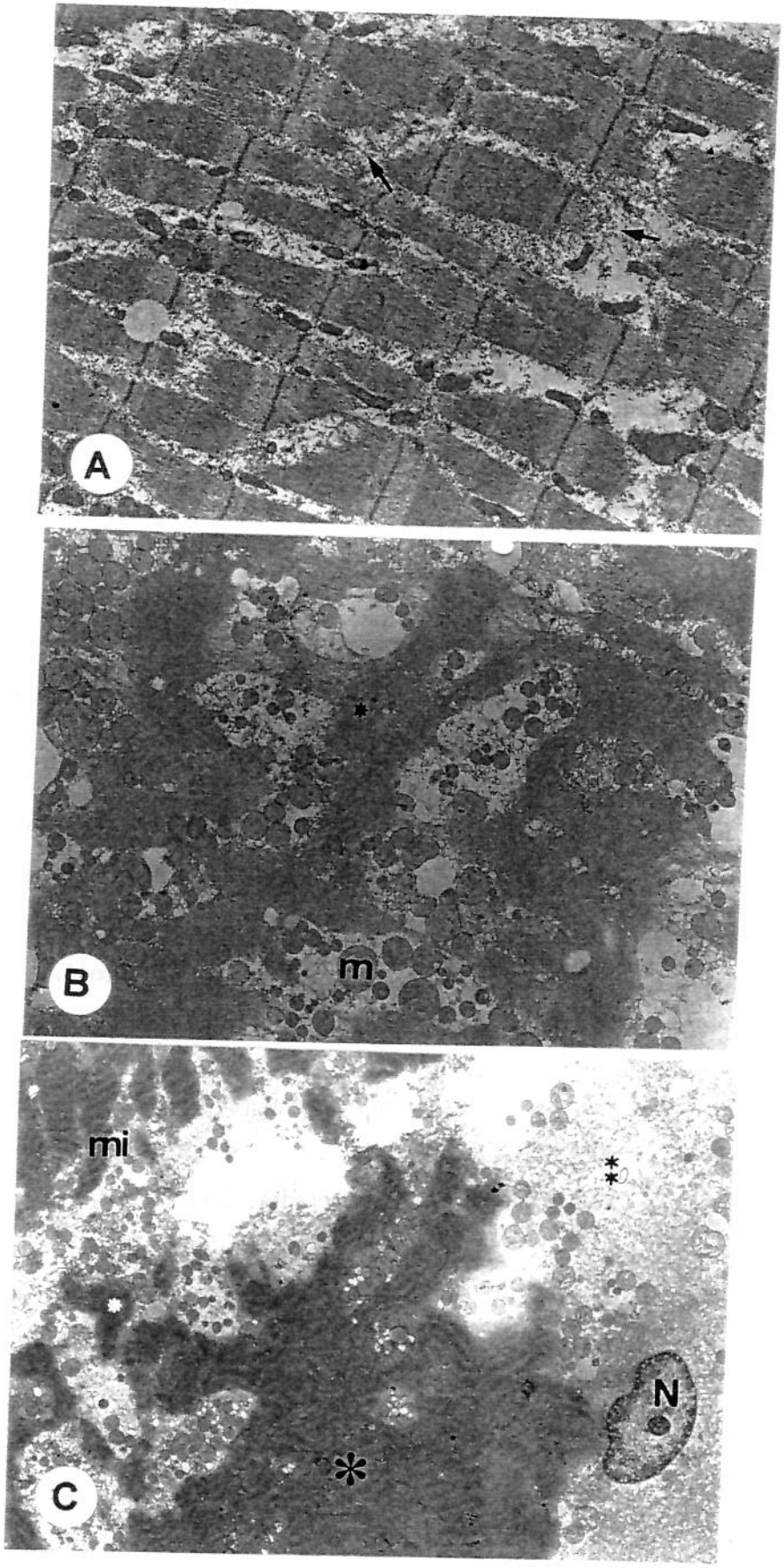
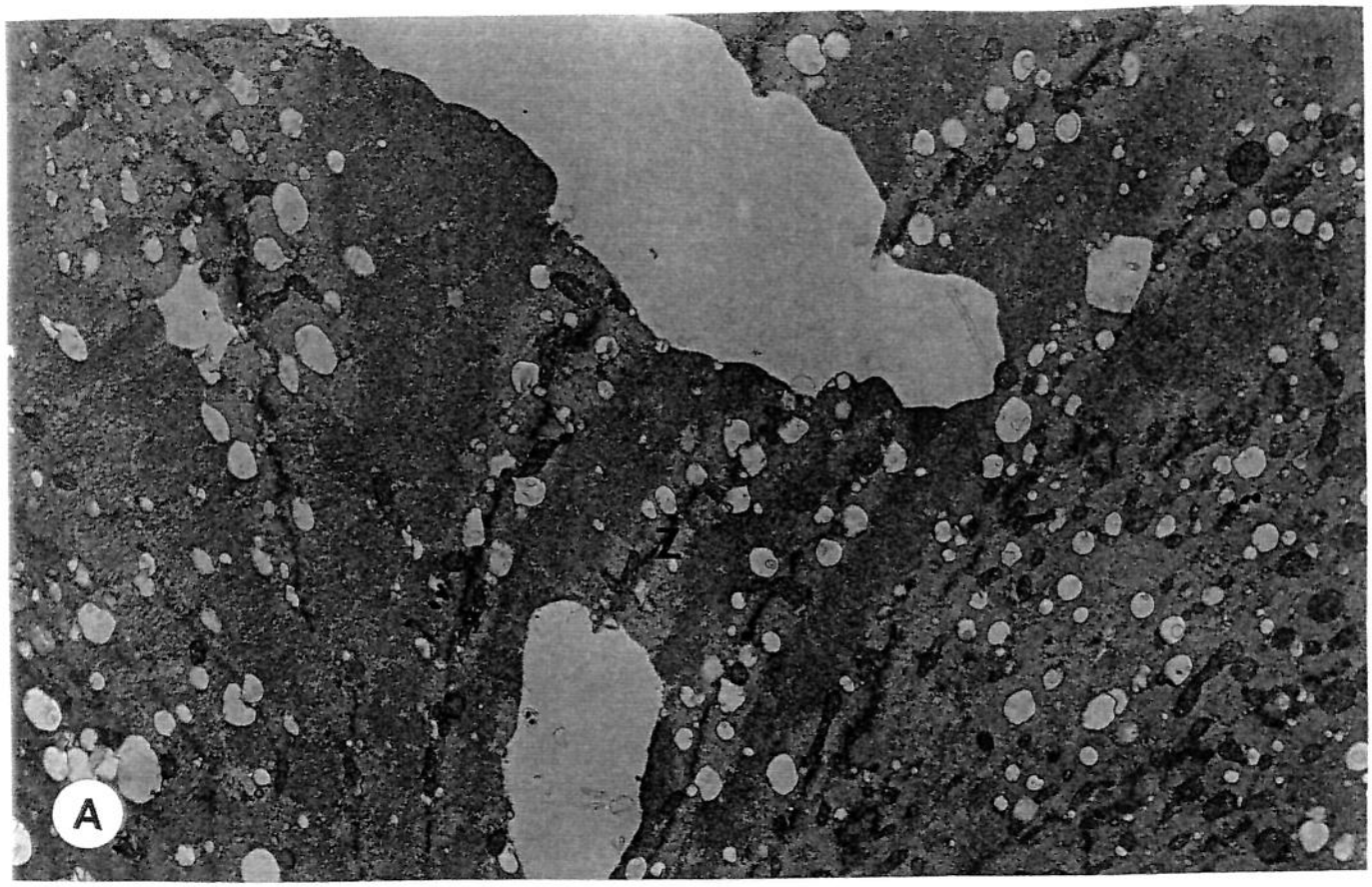

A
B
m
mi
N
C

FIGURA 25 – Micrografia eletrônica de diafragma de rato incubado com veneno total de *Naja naja kaouthia* 10 μg/ml.

Em A: Lacunas e vacúolos, resultantes de anormalidades no retículo sarcoplasmático em meio a sarcômeros desestruturados, onde se percebem as linhas Z. 8.633 x.

Em B: Porção de fibra muscular necrótica com mitocôndrias tumefeitas mostrando empacotamento das cristas (c) e densidades floculentas (setas). 31.032 x.


A

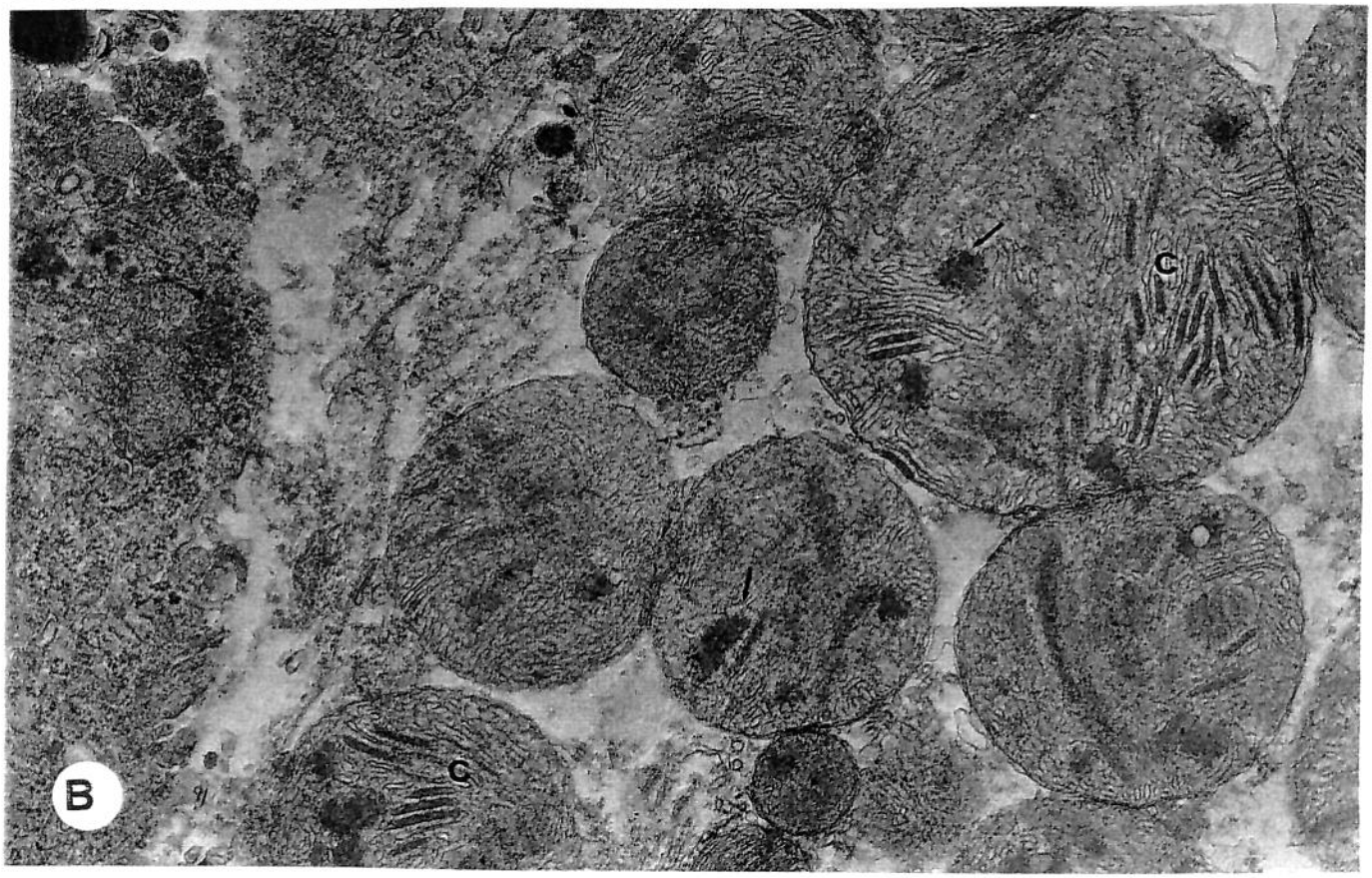
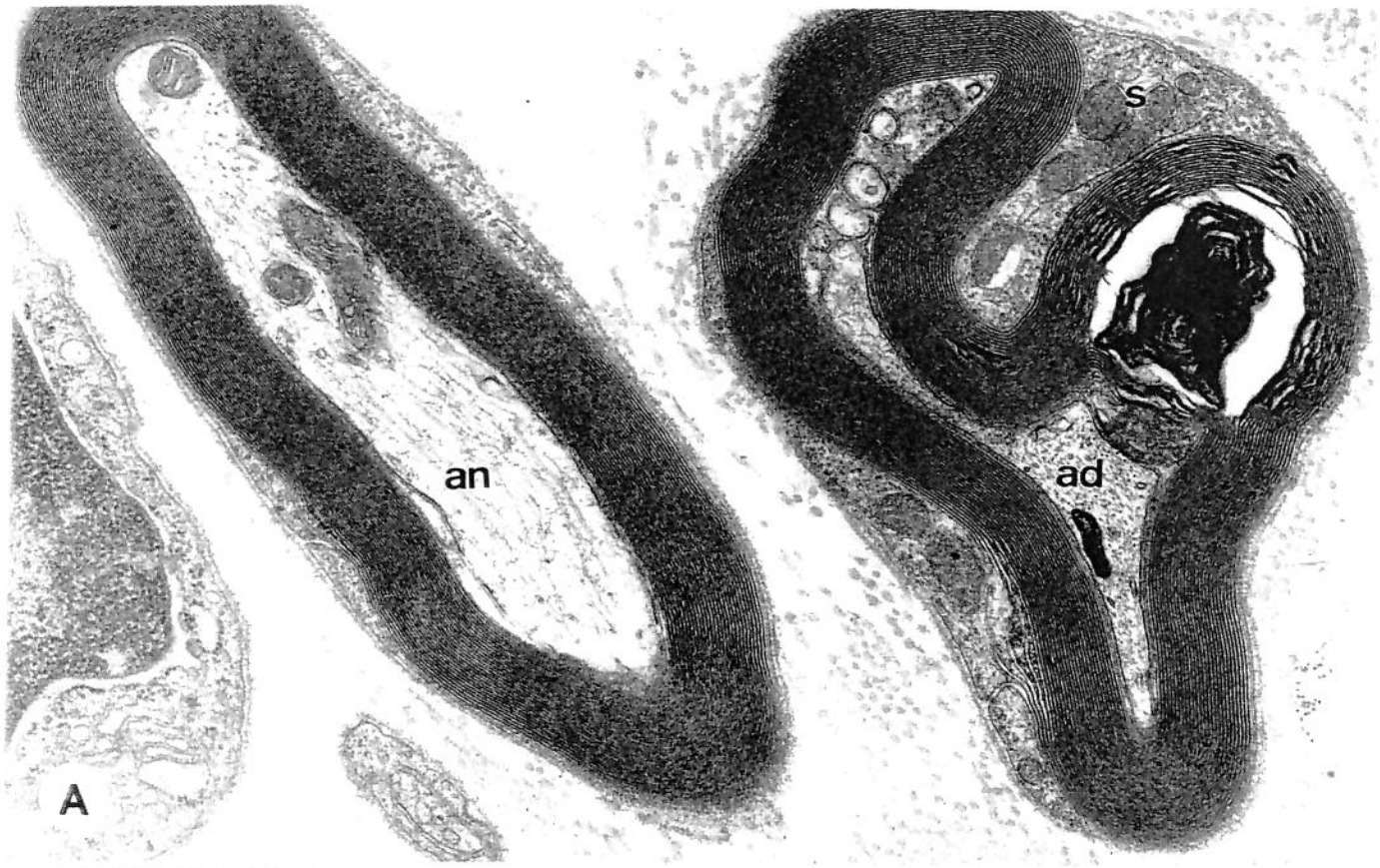

B
C
C

FIGURA 26 - Micrografia eletrônica de diafragma de rato incubado com veneno de *Naja naja kaouthia*: 10 µg/ml com a atividade PLA_2 inibida (A) e com o veneno total (B).

Em A – Axônio normal (an) e axônio com enrolamento da bainha de mielina e axoplasma destacado da bainha (ad), S = célula de Schwann. 32.325 x.

Em B – Axônios com retração do axoplasma e formação de vacúolos perimielínicos (setas) onde se vêem membranas enroladas de lamelas da bainha de mielina. 8.992 x.


an
ad
S
A

B

FIGURA 27 - Micrografias eletrônicas de diafragma de rato incubado com veneno de *Naja naja kaouthia*: 10 μg/ml com a atividade PLA_2 inibida.

Em A – Junção neuromuscular em que o terminal nervoso (T) mostra alteração mitocondrial e dobras juncionais (porção pós-sináptica) eletrondensas, distorcidas e com expansão anormal dos sítios dos receptores (cabeça de seta); j = região de dobras funcionais cortadas, seta = membranas enroladas da região pré-sináptica (terminal nervoso), p = axônio pré-terminal, s = célula de Schwann. 11.615 x.

Em B – Placa motora com três terminais nervosos sem alterações marcantes, embora nem sempre esteja visível o axolema (seta), dobras juncionais (j) desenvolvidas. Porém os miofilamentos mostram rompimento (cabeça de seta) por conta da interrupção da linha Z. 89.925 x.

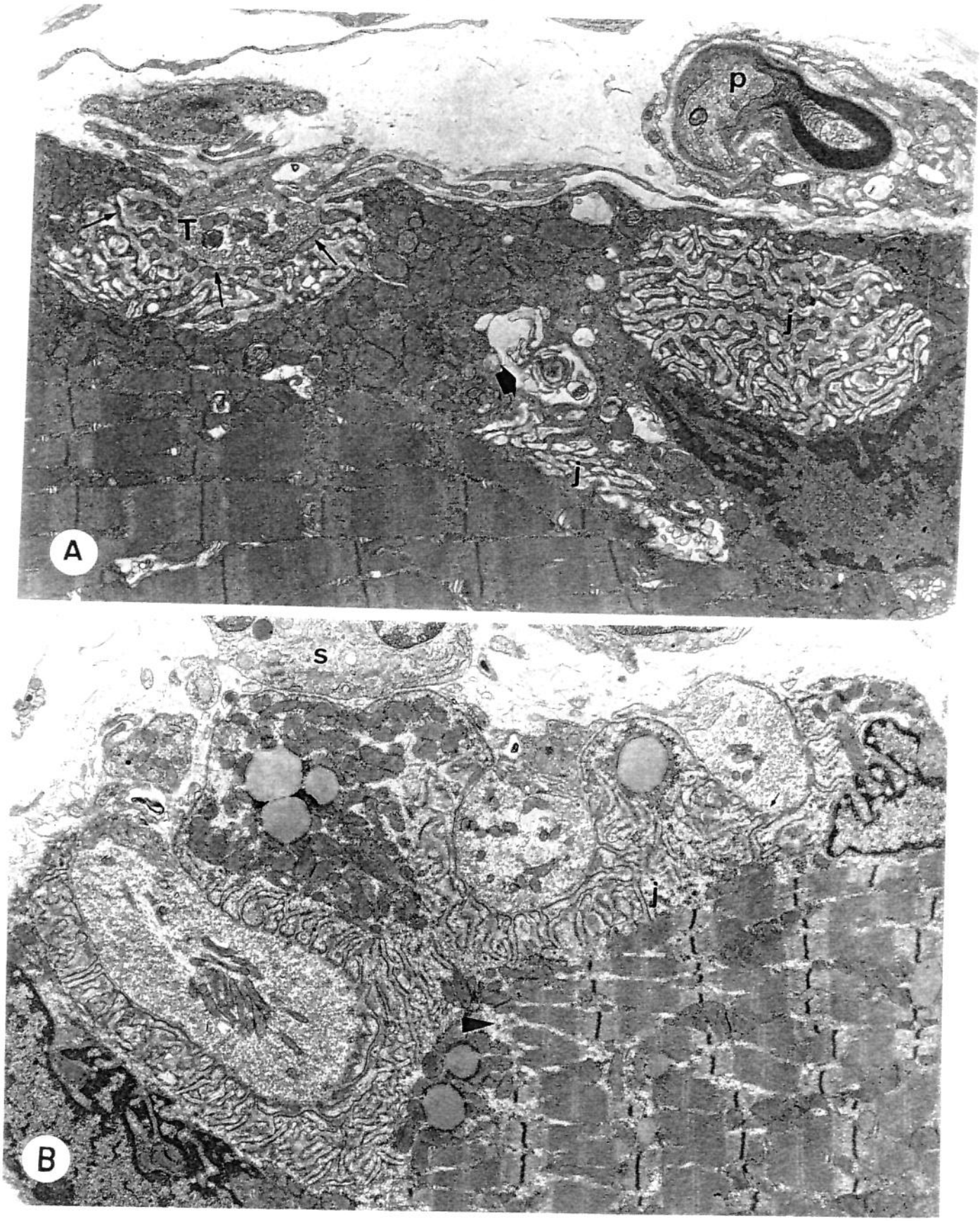

p
T
j
j
A
s
j
B

FIGURA 28 - Micrografias eletrônicas de junções neuromusculares de diafragma de rato incubado com veneno total (10 μg/ml) de *Naja naja kaouthia*.

Em A - Terminal nervoso com população de vesículas sinápticas densamente empacotadas. Em B - mitocôndrias degeneradas (m), deformação das dobras juncionais (*). A = 26.000 x, B = 19.375 x.

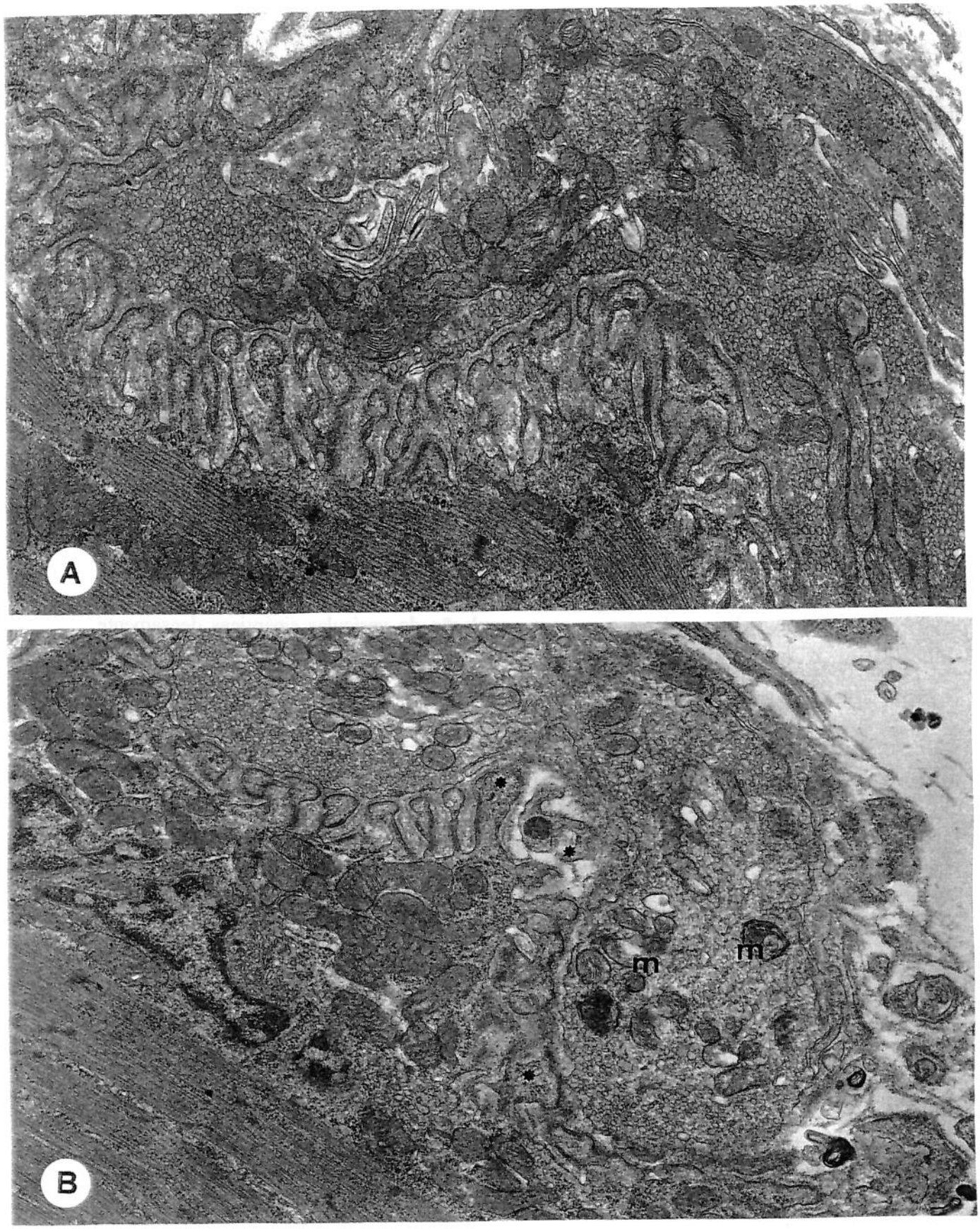

A
B
m
m

TABELA 2 – Tempo para instalação do bloqueio e porcentagem de fibras musculares lesadas na preparação nervo frênico diafragma de rato, induzida pelo veneno total e pelo veneno com atividade fosfolipásica inibida nas doses de 5 μg/ml e 10 μg/ml.

Dose	% bloqueio	Tempo de bloqueio (min) (Farmacologia)	% de fibras lesadas (Morfologia)
Controle	----------	----------	15,4 ± 5,1
5 μg/ml (A_1)	85	36,75 ± 2,01	47,0 ± 11,08
5 μg/ml (B_1)	85	54,0 ± 4,62	38,4 ± 11,75
10 μg/ml (A_2)	85	18,0 ± 0,57	62,7 ± 3,6
10 μg/ml (B_2)	85	29,0 ± 0,57	59,5 ± 9,6

(A) --- veneno total

(B) --- veneno sem atividade fosfolipásica

N.S --- não significativo

A_1 e B_1 --- N.S morfologia e $p < 0.05$ farmacologia

A_2 e B_2 --- N.S morfologia e $p < 0.01$ farmacologia

A_1 e A_2 --- $p<0.01$ morfologia e $p<0.01$ farmacologia

B_1 e B_2 --- $p<0.01$ morfologia e $p<0.01$ farmacologia

5. DISCUSSÃO

As pesquisas sobre o veneno da cobra *Naja naja kaouthia* encontrada na Ásia e África, são diversas (HARVEY *et al.*, 1994; FLETCHER *et al.*, 1992; LEE, 1970; SELLS *et al.*, 1994; WÜSTER, 1996), mas relatos com estudos eletrofisiológicos, reversão de bloqueio com drogas como 4-AP e veneno com atividade fosfolipásica inibida, são de pouca ou nenhuma investigação.

Para determinação da neurotoxicidade e da miotoxicidade do veneno desta cobra, foram usadas preparações nervo frênico diafragma de rato (5 e 10 μg/ml do veneno total e com atividade fosfolipásica inibida), diafragma de rato cronicamente desnervado e *biventer cervicis* de pintainho (5 μg/ml).

Estes resultados demonstraram que não ocorreu o bloqueio das contrações musculares à estimulação elétrica direta quando se utilizou veneno total e veneno com atividade fosfolipásica inibida, nas doses de 5 e 10 μg/ml, em um tempo de 30 minutos após o bloqueio. Por outro lado, BARFARAZ & HARVEY (1994), utilizando a dose de 30 μg/ml do veneno de *N. n. kaouthia*, observaram uma potente e rápida contratura. Neste pico a tensão gerada pela contratura foi entre 13 e 30% da tensão da contração maximal. A resposta do músculo a estímulos diretos foi reduzida para 50 a 60%. Com isto ele comprovou que o veneno de *Naja naja kaouthia* é primariamente neurotóxico, mas em altas concentrações pode apresentar efeitos miotóxicos. Segundo BARFARAZ & HARVEY (1994), estes resultados são consistentes com achados clínicos (CAMPBELL, 1979).

Nestes experimentos, frações de 5 μg/ml do veneno com a atividade fosfolipásica inibida, geraram um bloqueio neuromuscular de 85% em 54,0 min ± 4,62; e com 10 μg/ml do veneno nas mesmas condições, este bloqueio ocorreu em 29 min ± 0,57. Em estudos de FLETCHER, STORELLA, JIANG (1995), a PLA_2 do veneno de *Naja naja kaouthia* (100 nM) apresenta um efeito similar no bloqueio direto estimado a 50% (117 ± 31 min) e no bloqueio indireto (103 ± 28min). Já para o bloqueio estimado a 90%, sob estímulo direto este ocorreu em 170 ± 48 min e em 147 ± 44 min para os indiretos, relatando neste uma diferença de 14%.

A administração de 4-AP e Neo na preparação nervo frênico diafragma de rato, produziu um antagonismo parcial do bloqueio da junção neuromuscular, causado pelo veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 μg/ml). Da mesma forma, o bloqueio causado pelo veneno de outra *Elapidae*, *Micrurus dumerilii carinicauda,* também foi revertido pela Neo e pela 3,4-AP (SERAFIM *et al.* [no prelo]. Semelhante também é o resultado obtido com o veneno de *Micrurus frontalis*, cujo bloqueio é efetivamente antagonizado por drogas anticolinesterásicas (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77).

Em oposição a estes resultados, estudos com o veneno *Micrurus n. nigrocinctus,* demonstraram que o bloqueio não é antagonizado pelas drogas acima citadas (GOULARTE, CRUZ-HÖFLING, RODRIGUES-SIMIONI, 1996).

Pesquisas feitas por VITAL BRAZIL & FONTANA (1983/84) elucidaram que o veneno de *Micrurus corallinus* produz bloqueio neuromuscular irreversível na preparação nervo frênico diafragma de rato. Relataram o não antagonismo pela Neo e não utilizaram a 3,4-DAP nesta pesquisa concluindo que a ação pré-sináptica do veneno era preponderante em relação à pós-sináptica.

Em pesquisas com o veneno de *M. spixii*, VITAL BRAZIL, FONTANA, HELUANY (1995) também observaram bloqueio neuromuscular irreversível nas preparações nervo frênico diafragma de rato e *biventer cervicis* de pintainho.

Com 1 μg/ ml do veneno total de *Naja naja kaouthia,,* HARVEY *et al.* (1994) observaram que a resposta contrátil às estimulações indiretas foram bloqueadas e as respostas à acetilcolina e carbacol exógeno foram abolidas, mas as contraturas induzidas pelo KCl ficaram inalteradas. Em altas concentrações (50 μg/ml), o veneno acelerou o bloqueio às respostas contráteis e, além disso, induziu contraturas. Nesta mesma dose as respostas ao KCl foram reduzidas.

No presente trabalho, nas preparações de diafragma de rato cronicamente desnervado e *biventer cervicis* de pintainho, o veneno total de *Naja naja kaouthia* (5μg/ml), causou bloqueio da contração induzida pela ACh, mas não reverteu as respostas induzidas pelo KCl, demonstrando, mais uma vez que, em baixas doses, o veneno não tem ação farmacológica sobre as fibras musculares, sendo sua ação pós-sináptica sobre os receptores nicotínicos.

microscopia eletrônica, os sarcômeros apresentavam-se menos evidentes, miofibrilas perderam seus padrões de bandas. Em secção longitudinal de uma fibra necrótica ocorreu separação dos miofilamentos e miofibrilas, rompimento e separação do sistema sarcotubular e a perda do estriado das fibrilas. Os miofilamentos separaram do sarcômero e perderam a orientação coalescendo em uma massa amorfa de áreas claras e escuras. Foi marcante a proliferação do sistema sarcotubular.

Esses resultados mostram que o veneno, além de neurotóxico, apresenta ações miotóxicas, descrevendo diferentes estágios de mionecroses.

Na nossa pesquisa o resultado da DL_{50} foi de 273,67μg/kg de peso de camundongo, em injeção i.v, utilizando-se o método de WEIL, 1952. Em relação aos resultados obtidos por SERAFIM *et al.* [no prelo] (764 μg/kg) os nossos resultados foram diferentes, o que mostra ser o veneno de *Naja naja kaouthia* mais ativo do que o veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda,* apesar de ambos pertencerem a mesma família.

Concluindo, sugere-se que o modo de ação do veneno de *Naja naja kaouthia* envolve um efeito na região pós-sináptica da junção neuromuscular. A caracterização dos efeitos do veneno de *Naja naja kaouthia* trouxe relevantes informações quanto ao efeito deste veneno e suas correlações entre alterações miográficas, eletrofisiológicas e morfológicas.

Entretanto, mesmo na dose de 5 µg/ml observou-se que o veneno total induziu o aparecimento de alterações (aqui incluindo estágios iniciais, intermediários e avançados de alterações mionecróticas) em 47% das fibras, o que mostra que, muito embora os registros farmacológicos não indiquem ação direta do veneno sobre o músculo, morfologicamente, elas estão presentes. Isto permite concluir que os efeitos farmacológicos nem sempre se desenvolvem no mesmo passo da resposta morfológica do tecido e que a presença de 47% de fibras lesadas não é suficiente para desencadear os efeitos fisiológicos no músculo sob ação do veneno. Ou seja, os 53% de fibras musculares que permaneceram intactas morfologicamente com a dose de 5 µg/ml de veneno total de *N.n.kaouthia*, são suficientes para manter a integridade da resposta fisiológica do músculo e indicarem a ausência de efeito direto do veneno total sobre o músculo.

O veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 µg/ml), na preparação diafragma cronicamente desnervada, curarizada (15 µg/ml de *d*-Tc), manteve o bloqueio em relação a resposta contratural induzida pela ACh, mesmo após as lavagens, sugerindo que a *d*-Tc, não protegeu os receptores nicotínicos da placa terminal da ação do veneno em estudo, demonstrando com isso que o veneno pode produzir um efeito irreversível. O veneno de *Micrurus frontalis* não se comporta como o veneno de *N.n.kaouthia*, onde a *d*-Tc realmente protegeu os receptores colinérgicos nicotínicos, provando que este veneno age exclusivamente nos receptores colinégicos pós-sináticos (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77).

LEE (1970), observou uma importante participação das neurotoxinas, substância esta contida no veneno das cobras da família *Elapidae* com característica altamente tóxica que produz paralisia flácida e falência respiratória. Estas NTXs dividem-se em dois grupos, de acordo com o mecanismo do bloqueio na transmissão neuromuscular. O primeiro grupo produz um bloqueio antidespolarizante, agindo na membrana pós-juncional do terminal motor, semelhante ao curare, cobra neurotoxina e α bungarotoxina são alguns exemplos deste grupo. O segundo grupo produz bloqueio neuromuscular agindo pré-sinapticamente no terminal do nervo motor; como exemplo a β bungarotoxina. Os estudos eletrofisiológicos indicaram que os efeitos da cobra neurotoxina, assim como a α bungarotoxina, na transmissão neuromuscular, eram semelhantes ao curare. Ambas deprimiam o potencial terminal de placa sem afetar o terminal nervoso, o potencial de

membrana e o potencial de ação do músculo. O potencial de placa terminal em miniatura foi abolido rapidamente antes do bloqueio da transmissão acontecer. Já os estudos eletrofisiológicos relatados com a β bungarotoxina mostraram um completo desaparecimento dos MEPPs, seguindo um período de aumento inicial da freqüência dos MEPPs (LEE, 1970).

Os estudos eletrofisiológicos realizados com o veneno total de *Naja naja kaouthia* (5 µg/ml) mostraram que ele não altera o potencial de membrana das fibras musculares de preparações de diafragma de rato, apesar de possuir efeitos miotóxicos. Este mesmo modo de ação do veneno foi observado para outras *elapídeas* (*Micrurus dumerilli carinicauda,* SERAFIM *et al.* [no prelo], *M frontallis,* VITAL BRAZIL *et al.,* 1976/77, *M. corallinus,* VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84 e *M. spixii,* VITAL BRAZIL *et al,* 1995).

No entanto, este resultado não condiz com a ação do veneno de *M.n. nigrocinctus,* que produz diminuição no potencial de membrana nas regiões das placas motoras e fibra muscular (GOULARTE *et al.*, 1996). LEE & CHANG (1966) também observaram que tanto a cardiotoxina (10 µg/ml) extraída do veneno de *Naja naja atra,* como também o veneno bruto (10 µg/ml), causavam redução progressiva do potencial de membrana.

Estudos realizados no potencial de placa terminal em miniatura constatou que o veneno de *Naja naja kaouthia* causa alterações destes potenciais, com diminuição na amplitude e na freqüência dos mesmos, até seu completo desaparecimento antes do bloqueio ocorrer, assim como relatado por LEE (1970/72). Este resultado corrobora também com o resultado obtido por VITAL BRAZIL, *et al.* (1976/77) no estudo com o veneno de *Micrurus frontalis,* o qual também reduz a amplitude dos pptm.

Ainda, VITAL BRAZIL & FONTANA (1983/84) descreveram um aumento de freqüência dos pptm e redução da amplitude em diafragma de rato com o veneno de *Micrurus corallinus* resultado que contribuí para identificar como principal, uma ação pré-sináptica deste veneno.

Na presente pesquisa, o bloqueio dos potenciais de placa em miniatura foi parcialmente antagonizado por duas drogas: neostigmina e 4-aminopiridina, as quais causaram a reversão do bloqueio, confirmando a ação do veneno em nível pós sináptico. VITAL BRAZIL *et al.*, (1995), também observaram que com o veneno de *M. spixii* a neostigmina induzia o reaparecimento dos pptm bloqueados.

Para estas comparações foi escolhido o veneno de *Micrurus* por serem as únicas *Elapidae* da América do Sul com modo de ação comparável ao veneno de Naja.

Comparando-se o efeito miotóxico do veneno total de *Naja naja kaouthia* com os efeitos induzidos pelo veneno sem atividade fosfolipásica, observou-se que estes resultados mostraram que a remoção do conteúdo de PLA_2 do veneno aumentou significativamente em 46% e 61% o tempo para alcançar 85% de bloqueio neuromuscular nas doses de 5 e 10 μg/ml do veneno, respectivamente ($p < 0.01$). Porém, a atividade fosfolipásica parece ter um papel secundário no aumento do número de fibras mionecróticas. Nem com 5 ou 10 μg/ml do veneno destituído da atividade PLA_2, o número de fibras mionecróticas diminuiu significativamente. Estes resultados sugerem que um mesmo componente do veneno incluindo a PLA_2 pode modular diferentemente as respostas fisiológicas e morfológicas do tecido muscular, e que o grau de dano morfológico induzido pelo veneno não está correlacionado necessariamente a uma deterioração fisiológica igual.

Os achados permitem concluir na incubação da preparação hemidiafragma de rato com o veneno de *N. n. kaouthia*, efeitos neurotóxicos (85% de bloqueio neuromuscular) e efeitos miotóxicos (porcentagem de fibras danificadas).

Viu-se que a ação neurotóxica do veneno age bloqueando não-competitivamente a maioria dos receptores pós-sinápticos. A atividade fosfolipásica parece contribuir significativamente para efeitos neurotóxicos, mas não-significativamente para os miotóxicos nas doses estudadas. Estas suposições estão baseadas nestes achados onde o dobro da dose de veneno dobra o número de fibras afetadas e proporcionalmente reduz à metade o tempo para instalação do bloqueio neuromuscular de 85% quando a preparação estava incubada com o veneno destituído de atividade PLA_2. Porém, quando atividade PLA_2 está presente, o dobro da dose do veneno reduz pela metade o tempo do bloqueio de

85% mas não proporcionalmente dobra o número de fibras afetadas. Os achados sugerem que há um sinergismo entre o efeito da PLA_2 e outros componentes do veneno para elucidar os efeitos neurotóxicos, mas deve-se saber que o conteúdo de PLA_2 não foi avaliado para saber se sua atividade é ou não suficientemente potente para agir sinergicamente com outros agentes miotóxicos presentes no veneno.

FLETCHER & LIZZO (1987), estudando as respostas contraturais induzidas pelas cardiotoxinas do veneno de *Naja naja kaouthia*, observaram um sinergismo entre a cardiotoxina (do veneno de *N. n. kaouthia*) e a PLA_2 (do veneno da abelha *Apis mellifera*), com uma aceleração da cardiotoxina pela PLA_2, demonstrada pelo início menos demorado das contraturas. Entretanto, os autores utilizaram somente a cardiotoxina (2 μg/ml) e não o veneno total para interagir com a PLA_2 (1 μg/ml). HARVEY, HILDER, KAHDER (1983) não observaram este sinergismo entre a cardiotoxina e investigaram a contaminação PLA_2 na indução das contraturas, porém, a concentração de PLA_2 usada naquele estudo era provavelmente muito baixa para observar esta interação. Outros autores (CHANG*et al.*, 1972) informaram uma correlação entre a cardiotoxina e a PLA_2 em despolarizações das preparações de diafragma de rato e concluíram que o sinergismo envolve uma aceleração, mais propriamente, uma potencialização de ação da CTX pela PLA_2.

Em outro trabalho FLETCHER & JIANG (1993) relatam os mecanismos de ação de frações isoladas de CTX do veneno das cobras na indução de contraturas do músculo esquelético e hemólise das células vermelhas do sangue. Recentemente tornou-se mais aparente o número de ações que a CTX possuí, ao menos uma ação primária pode ser estudada por um subgrupo de CTX com atividade hemolítica direta (FLETCHER *et al.*, 1991). Realmente muitas CTX parecem ser não hemolíticas sozinhas e requerem contaminação fosfolipásica para induzir a hemólise (HARVEY, MARSHALL, KARLSSON, 1982; HIDER & HARVEY, 1982; HARVEY, 1985). Nas frações de CTX com a presença da contaminação da atividade fosfolipásica, observou-se que não só a CTX aumenta a ação da PLA_2, como também a PLA_2 aumenta a ação da CTX. No entanto, a potente ação hemolítica da CTX do veneno de *Naja naja kaouthia* é completamente independente da contaminação fosfolipásica da fração da toxina, enquanto a CTX do veneno de *Naja naja atra* é completamente dependente da ação fosfolipásica para atividade

hemolítica (FLETCHER *et al.*, 1991). A possibilidade de diferentes mecanismos de ação em subgrupos de CTXs foi relatada por HARVEY (1985).

Também observando esta interação da CTX com a PLA_2, e já sabendo da ação de diversas miotoxinas em diferentes proteínas, incluindo proteínas envolvidas nas correntes de Ca^{2+} e Na^+, FLETCHER *et al.* (1991), notaram que a CTX do veneno de *N.n. kaouthia* demonstrou inibir a corrente de Na^+ . No entanto, a fração testada apresentava contaminação da PLA_2 no veneno e os ácidos graxos produzidos pela atividade fosfolipásica poderiam ter levado a inibição desta corrente de Na^+, sendo assim, FLETCHER *et al.* (1996) trataram a CTX com bromofenacil - *p* - brometo, com a qual a contaminação fosfolipásica ficou reduzida para 90-95%, tendo como resultado um efeito bifásico tempo dependente (estímulo inicial e subseqüente inibição) na corrente de Na^+. Ou a interação direta da CTX, ou ácidos graxos produzidos pela contaminação PLA_2 causaram inibição das correntes de Na^+.

Apesar dos resultados farmacológicos da presente pesquisa mostrarem que a principal ação do veneno da cobra *Naja naja kaouthia* é neurotóxica, os dados histomorfométricos mostram que o potencial miotóxico do veneno é expressivo, mesmo em doses baixas como as aqui utilizadas.

Estes resultados revelaram que o veneno da cobra *Naja naja kaouthia* produz algumas alterações morfológicas no músculo diafragma de rato, características da ação de fosfolipases miotóxicas (fibras com alterações mionecróticas severas apresentavam ruptura do sarcolema) e de cardiotoxinas (secções longitudinais do músculo diafragma de rato apresentaram microvacúolos e formações de vacúolos grandes, uma hipótese para formação destes seria que um vazamento da membrana plasmática permitisse o influxo de sódio e água, induzindo a dilatação do retículo sarcoplasmático, o qual apareceria com vacúolos a nível de microscopia de luz (OWNBY, CAMERON, TU, 1976; VITAL BRAZIL, 1980; HARRIS & CULLEN, 1990; MEBS & OWNBY, 1990). A amplitude das alterações mionecróticas depende da dose, sendo isso válido para os experimentos com ou sem a atividade PLA_2.

As alterações locais produzidas por venenos ofídicos caracterizam-se em fenômeno altamente complexo, resultante de fatores de ações específicas ou da combinação de fatores secundários, e de reações inespecíficas sobre o músculo afetado (OWNBY *et al.*, 1982; MEBS & OWNBY, 1990). Por esta razão, recomenda-se a combinação de diferentes métodos como miografia, eletrofisiologia e morfologia, para detectação e avaliação da miotoxicidade (MEBS & OWNBY, 1990).

Existem, pelo menos, dois tipos diferentes de toxinas, presentes em venenos elapídicos, causadores de mionecrose, são eles: fosfolipases (HARRIS *et al.*, 1975; GEH & TOH, 1978; HARRIS & MALTIN, 1982) e cardiotoxinas (LAI *et al.*, 1972; DUCHEN *et al.*, 1974).

As cardiotoxinas são proteínas de caráter básico e baixo peso molecular (6000-7000), desprovidas de atividade enzimática (OWNBY, FLETCHER, COLBERG, 1993). São encontradas nos venenos das *Elapidae* – nos gêneros *Naja*, *Ophiophagus* e *Hemachatus* (LEE, HO, EAKER, 1977) e, possivelmente, na *Micrurus fulvius* do hemisfério norte (WEIS & McISAAC, 1971) e *Bungarus fasciatus* da Ásia (LIN, HUANG, LEE, 1972; LIN, *et al.*, 1975). A cardiotoxina I dos venenos das cobras *Naja mossambica mossambica* (DUCHEN *et al.*, 1974; COUTEAUX, MIRA, D'ÁLBIS, 1988) e *Naja naja atra* (OWNBY *et al.*, 1993) demonstrou possuir *in vivo* a habilidade de causar necrose da musculatura esquelética. A cardiotoxina possuí uma variedade de ações em diferentes tipos de células, especialmente hemólise dos eritrócitos, despolarização e contratura das células do músculo esquelético (HARVEY, 1985, 1990).

O sitio atual de interação das cardiotoxinas das células musculares das membranas é desconhecido, mas pode-se incluir: sítios da membrana com carga negativa, sítios de ligações de cálcio e membranas de proteínas (HARVEY, 1990). Os possíveis mecanismos de ação para as cardiotoxinas incluem: (1) interrupção direta da membrana relatada pela despolarização, (2) ou ação indireta através da ativação da fosfolipase C endógena do tecido, ou (3) uma combinação dos dois mecanismos; (4) uma outra possibilidade seria através da inibição da Na^+ K^+-ATPase seguida por aumento da concentração osmótica de Na^+ e edema celular por influxo passivo de água para a célula (OWNBY *et al.*, 1993).

A PLA_2 é uma enzima comum e abundante encontrada nos venenos de cobras (ROSENBERG, 1990; DAVIDSON & DENNIS, 1991). Possuí uma estrutura variável com cadeia única, como a notexina, da serpente *Notechis scutatus scutatus* (HARRIS *et al.*, 1975), ou consistem de 2 a 4 subunidades como a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* (GOPALAKRIHNAKONE *et al.*, 1984) e a taipoxina da *Oxyuranus scutellatus* (HARRIS & MALTIN, 1982), respectivamente. *In vivo,* PLA_2 possuí uma variedade de efeitos, incluindo neurotoxicidade pré-sináptica, atividade de agregação plaquetária (HUANG & CHIANG, 1994; LANDUCCI *et al.*, 1994) e nefrotoxicidade (STIPRIJA *et al.*, 1971).

Sabe-se que algumas fosfolipases ofídicas despolarizam, tal como as cardiotoxinas, a membrana das fibras musculares em preparações isoladas e provocam contratura do músculo. Estão neste caso uma fosfolipase separada da peçonha de *Bothrops jararacussu* (*RODRIGUES-SIMIONI) e a fosfolipase básica da *Naja nigricollis* (LEE & CHEN, 1977).

Sabe-se que as cardiotoxinas induzem despolarização (CHANG, 1979), e que contraturas no músculo esquelético são potencializadas por altas taxas de contaminação da atividade fosfolipásica, mas essas ações no músculo esquelético não são afetadas por níveis considerados baixos, os quais são suficientes para aumentar a hemólise pela cardiotoxina (HARVEY *et al.*, 1982).

Observou-se que mesmo em pequenas amostras (> 0,1% w/w) a PLA_2 pode agir em sinergismo com a CTX para causar hemólise dos eritrócitos ou ruptura das membranas das células (CONDREA, 1974; LOUW & VISSER, 1978). É estabelecido que as PLA_2 de vários venenos de cobras causam mionecrose (MEBS & OWNBY, 1990), no entanto, não é conclusivo estabelecer que a atividade enzimática da PLA_2 é necessária para a atividade miotóxica. Sugere-se que a miotoxicidade (MEBS, 1986) das frações dos venenos de cobras podem ser devido a contaminação fosfolipásica. Em estudos realizados por OWNBY *et al.* (1993) observou-se que a CTX I extraída do veneno de *Naja naja atra* causou *in vivo* mionecrose nas células do músculo esquelético, após injeção da toxina nos

* RODRIGUES-SIMIONI *apud* - LEE, C. Y. & CHEN. - Central neurotoxicity of Cobra neurotoxin, cardiotoxin and fosfolipase A_2. **Toxicon, 15**: 395 – 401, 1977.

camundongos e que nenhuma contaminação da atividade fosfolipásica foi responsável por esta mionecrose. A cardiotoxina causou mionecrose devido à lise da membrana plasmática do músculo esquelético. A cardiotoxina causou lise das células do músculo esquelético *in vitro* após as células serem despolarizadas (HARVEY *et al.*, 1982). O tipo de mionecrose causado pela cardiotoxina consiste no aparecimento de lesões delta seguida de áreas de miofibrilas densamente agrupadas alternando com áreas menos densa contendo vesículas do retículo sarcoplasmático e mitocôndrias danificadas (OWNBY *et al.*, 1993). A lâmina basal dessas células estava intacta, e quando o tecido era examinado dias após o insulto, podia-se observar a regeneração (GUTIÉRREZ, OWNBY, ODELL, 1984).

Neste trabalho, a junção neuromuscular mostrou-se com alterações moderadas, não reveladoras de atividade neurotóxica marcante com as doses empregadas do veneno de *Naja naja kaouthia*. Os axônios dos fascículos nervosos intramusculares foram mais afetados com a dose de 10 μg/ml. Estes resultados sugerem que do ponto de vista neurotóxico, nas doses empregadas, o veneno teve ação moderada, sendo esta principalmente relacionada ao acúmulo de vesículas sinápticas no terminal e desorganização das dobras juncionais. A primeira alteração sugeriria um impedimento na liberação do neurotransmissor por parte do veneno, e, portanto, uma ação pré-sináptica, e a segunda, um efeito pós-sináptico, sobre a região dos receptores nicotínicos. Entretanto, os resultados farmacológicos descartam a ação pré-sináptica. A microscopia eletrônica permitiu corroborar os estudos morfométricos e histológicos observados com a microscopia de luz, bem como caracterizar ultraestruturalmente as alterações dos componentes do tecido. Como já visto e comentado, existiram várias graduações na intensidade das alterações, sendo as severas relacionadas à desorganização das miofibrilas e digestão dos miofilamentos, alteração do retículo sarcoplasmático e mitocôndrias, alterações estas subseqüentes à lise do sarcolema.

Estes resultados vêm de encontro aos resultados *in vivo* apresentados por STRINGER, ROBERT, TU (1971). Utilizando a dose de 15 μg/g do veneno de *Naja naja kaouthia* injetados, na coxa de camundongos Swiss (6 semanas, pesando 20 g), observaram focos de fibras mionecróticas misturadas com fibras de aparência normal sob microscopia de luz, assim como fibras necróticas com grandes áreas de miofibrilas. Já sob aspecto de

myotoxic effects were revealed by histomorphometrical approach. We suggest that the venom neurotoxic and myotoxic components act predominantly on the nicotinic post-synaptic receptors and that its PLA_2-containing fraction has a minor role in promoting myonecrosis and neuromuscular blockade than other cobra venom components.

6. CONCLUSÃO

1 - O veneno de *Naja naja kaouthia* é capaz de causar bloqueio neuromuscular em preparações nervo frênico diafragma de rato e *biventer cervicis* de pintainho.

2 - O bloqueio causado pelo veneno de *Naja naja kaouthia* é parcialmente antagonizado tanto pela neo (anticolinesterásico) como pela 4-AP (bloqueador de canal de K^+).

3 - Em preparações curarizadas, com estimulação elétrica direta, o veneno de *Naja naja kaouthia* não produziu alterações significativas na amplitude das contrações.

4 - Em preparações *biventer cervicis* de pintainho o veneno induziu bloqueio total da contratura a Ach, o mesmo não acontecendo com a resposta contraturante provocada pelo KCl, indicando uma ação a nível de receptores nicotínicos da placa terminal e descartando uma possível ação em nível de fibra muscular do *biventer*.

5 - O veneno não causou alterações significativas no potencial de membrana das fibras musculares, comprovando a observação no item anterior.

6 – A ação do veneno de *Naja naja kaouthia* sobre os potenciais em miniatura de placa terminal, demonstrou uma diminuição da amplitude e freqüência destes potenciais, até o bloqueio total, sugerindo uma atuação deste veneno em nível de receptores nicotínicos pós-sinápticos.

7 – As drogas neostigmina e 4-aminopiridina causaram a reversão total do bloqueio quanto à freqüência e amplitude desses micropotenciais, demonstrando que o veneno não causa nestes, bloqueio irreversível.

8 – Sob o aspecto da microscopia de luz, preparações incubadas com o veneno de *Naja naja kaouthia* nas concentrações de 5 e 10 μg/ml com PLA_2 inibida, não apresentaram alterações qualitativas, mas quantitativamente estas alterações surgiram, só que não foram significativas.

9 – Em relação à microscopia eletrônica, as alterações observadas eram as mesmas qualitativamente e quantitativamente em preparações incubadas com o veneno total e com PLA_2 inibida de *Naja naja kaouthia* nas concentrações de 5 e 10 μg/ml.

10 - Em nossas condições experimentais, verificamos que a PLA_2 não é o único componente do veneno que está induzindo o aumento do tempo de bloqueio. Outros componentes podem estar atuando em sinergismo a ela.

7. SUMMARY

The effects of *Naja naja kaouthia* cobra venom on the rat nerve-diaphragm and chick *biventer cervicis* preparation were examined using myographic, eletrophysiological and histopathological approaches. *N. n. kaouhtia* venom (5, 10 μg/ml with or without PLA_2 activity) induced a dose-dependent neuromuscular blockade of the contractile response to indirect electrical stimulation, but the venom does not depress the twitch response elicited by direct muscle stimulation.

Neostigmine (Neo) and 4- Aminopyridine (4-AP) antagonize partially the effect of the venom on the neuromuscular transmission in the rat nerve-diaphragm. The contractures induced by acetilcholine (ACh) in the denervated rat hemidiaphragm and in the chick *biventer cervicis* are inhibited by the venom. This effect could not be reversed by repeated washing of the preparation. These observations suggest that the venom may also have a post-synaptic action on the nicotinic receptors. Furthermore, bioelectrical potentials to *N. n. kaouthia* venom (5 μg/ml) produced a progressive decrease in the amplitude of the miniature end-plate potential until these were abolished. Neo (5.8 μM) and 4-AP (53 μM) antagonized this blocking effect on neuromuscular transmission, suggesting that the venom produces a postsynaptic action. The venom (5 μg/ml) had no effect on the resting membrane potential.

Histomorphometrical study suggests that the venom (5, 10 μg/ml, with or without PLA_2) possess potential myotoxicity affecting dose-dependently 27%, 52%, 37% and 56% of rat diaphragm fibers, respectively. This suggests that PLA_2 accounts for 7,2% and 27% of the myonecrosis development, respectively.

Muscle damage includes loss of the normal tissue structure, sarcolemma rupture, appearance of multiple zones of closely massed myofibrils, vacuolation, disintegration of myofilaments, sarcomeres destructuration and abnormal mitochondria. Axonal and neuromuscular junction abnormalities were not prominent at these doses.

In conclusion, this work has demonstrated that, *Naja naja kaouhtia* venom has myotoxic and neurotoxic effects on the mammalian and avian neuromuscular junction. Interestingly neurotoxic effects were evidenced by pharmacological approach, while

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. – Esclarecimentos Gerais. **Serpentes do Brasil. Iconografia Colorida. São Paulo, Edição Melhoramentos**, 1977. p. 11-15.

BARFARAZ, A. & HARVEY, A.L. – The use of the chick biventer cervicis preparation on the to asses the protective activity of six international reference antivenoms neuromuscular effects of snake venoms *in vitro*. **Toxicon, 32**: 267-272, 1994.

BARRAVIERA, B. - Acidentes ofídicos. In: Veronesi, R & Foccacia, R. **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro, Atheneu, 1997.

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

CAMPBELL, C.H. – Symptomatology, phatology, and treatment of the bites of elapid snakes. In: LEE, C.Y., ed. - **Snake Venoms: Handbook of Experimental Pharmacology**. New York, Springer-Verlag. Berlim Heidelberg, 1979. p. 898-921. v. 52.

CAMPBELL, J.A. – Cobras. **Grolier Multimidea Encyclopedia, versão 8.01**, 1996.

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

CHANG, C.C.; CHUANG, S.T.; LEE, C.Y.; WEI, J.W. - Role of cardiotoxin and phospholiopase A in the blockade of nerve conduction and depolarization of skeletal muscle induced by cobra venom. **Br J Pharmacol 44**: 752-764, 1972.

CHANG, C.C.; DONG LEE, J.; EAKER, D.; FOHLMAN, J. – Short communications the presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparision with β bungarotoxin and crotoxin. **Toxicon, 15**: 571-576, 1977.

CHEYMOL, J.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M. – Neuromuscular action of venoms of some Crotalidae, Elapidae and Hydrophidae. **Mem Inst Butantan Symp Int, 33**: 541-554, 1966.

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

COUTEAUX, R.; MIRA, J.C.; D'ÁLBIS, A. – Regeneration of muscle after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. **Biol Cell, 62**: 171-182, 1988.

DAVIDSON, F.F. & DENNIS, E.A. - Structure, function and mode of action of snake venom and other phospholipases A_2.In: TU, A.T., ed **Handbook of Natural Toxins, Reptile Venoms and Toxins**. New York: Marcel Dekker, 1991. p: 107-145. v. 5.

DUCHEN, L.W.; EXCELL, B.J.; PATEL, R.; SMITH, B. – Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre necrosis and regeneration. A light and electron microscopic study of the effects of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. **J Neurol Sci, 21**: 391-417, 1974.

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

FLETCHER, J. E. & JIANG, M. S. - Possible mechanismis of action of cobra snake venom cardiotoxin and bee venom melittin. **Toxicon, 31**: 669 – 695, 1993.

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

FLETCHER, J.E.; STORELLA, R.J.; JIANG, M.S. - Bovine serum albumin does not completely block synaptosomal cholinergic activies of presynaptically acting snake venom phospholipase A_2 enzymes. **Toxicon, 33** (8): 1051-1061, 1995.

FLETCHER, J.E.; HUBERT, M.; STEVEN, J.W.; GONG, Q.H.; JIANG, M.S. - Similarities and diferences in mechanismi of cardiotoxins , melittin and other myotoxins. **Toxicon, 34**: 1301-1311, 1996.

FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; GONG, Q.H.; YODKOWSKY, M.L.; WIELAND, S.J. - Effects of a cardiotoxin from *Naja naja kaouthia* venom on skeletal muscle: involvement of calcium release, sodium ion currents and phospholipases A_2 and C. **Toxicon, 29**: 1489-1500, 1991.

GEH, S.L. & TOH, H.T. – Ultrastructural changes in skeletal muscle caused by a phospholipase A_2 fraction isolated from the venom of a sea snake, *Enhydrina schistosa*. **Toxicon, 16**: 633-643, 1978.

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

GOLAY, P. – Checklist and keys to the terrestrial proteroglyphs of the world. **Elapsoidea**. Geneva, 1985.

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.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.M.; HAWGOOD, B.J. & ELDER, H.Y. - Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A_2 complex. **Toxicon, 22***:* 85-98, 1984.

GOULARTE, F.C.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.- Electrophysiological and ultrastructural effects of *Micrurus nigrocinctus* venom on the neuromuscular junction. **Toxicon, 34**: 315, 1996.

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

HARDING, K.A. & WELCH, K.R.G. – Venomous snakes of the world. A checklist. Oxford: Pergamon Press, 1980.

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

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

HARRIS, J.B. & MALTIN, C.A. – Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin of the Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*. **Br J Pharmac, 76**: 61-75, 1982.

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

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

HARVEY, A.L. – Cardiotoxins from cobra venoms. In: TU, A. T. ed. – Reptile Venoms and Toxins. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 85-106.

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

HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; 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.; HILDER, R.J.; KAHDER, F. – Effects of phospholipase A on actions of cobra venom cardiotoxins on erythrocytes and skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta 728**: 215, 1983.

HARVEY, A.L.; MARSHALL, R.J.; KARLSSON, E. - Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (***Naja naja siamensis)*** on isolated skeletal and cardiac muscle preparations. **Toxicon 20**: 379-396, 1982.

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

HIDER, R.C. & HARVEY, A.L. – The structure and actions of cardiotoxins isolated from cobra venoms. **S Afr J Sci, 78**: 350-356, 1982.

HOLZER, M. & MACKESSY S.P. – An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A_2. **Toxicon, 34** (10): 1149-1155, 1996.

HUANG, T.F. & CHIANG, H S. - Effect on human platet aggregation of phospholipase A_2 purified from *Heloderma horridum* venom. **Biochim Biophs Acta 1211**: 61-68, 1994.

HUGHES, B. - Notes on African carpet vipers, *Echis carinatus*, *E. leucogaster* and *E. ocellatus* (*Vipiridae*, serpents). **Revue Suisse Zool, 83**: 359-371, 1976.

IWANAGA, S. & SUZUKI, T. - Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. ed - **Snake Venoms: Handbook of Experimental Pharmacology**. New York, Springer-Verlag. Berlim Heidelberg, 1979. p. 41-55. v. 52.

KARLSSON, E.; ARNBERG, H.; EAKER, D. -Isolation of the principal neurotoxins of two *Naja naja* subspecies. **Eur J Biochem 21**: 1-16, 1971.

KLEMMER, K. – Liste der rezenten Giftischlangen. In: ELWERT, N. G. ed. – **Die Giftschlangen der Erde**. Marburg: Behringwerke, 1963. p. 255-464.

LAI, M.K.; WEN, C.Y.; LEE, C.Y. - Local lesions caused by cardiotoxin isolated from Formosan cobra venom. **J Formosan Med Assoc,** 71: 328-332, 1972.

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 platetets. **Toxicon 32**: 217-226, 1994.

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.

LEE, C.Y. – Elapid neurotoxins and their mode of action. **Clinical Toxicology, 3**: 457-472, 1970.

LEE, C.Y. & CHEN. - Central neurotoxicity of Cobra neurotoxin, cardiotoxin and fosfolipase A_2. **Toxicon, 15**: 395 – 401, 1977.

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.; HO, C.L.; EAKER, D. – Cardiotoxin-like action of a basic phospholipase A isolated from *Naja nigricolis* venom. **Toxicon, 15**: 335-336, 1977.

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

LESSON, R.P. – *Naja kaouthia* Lesson in Férussac. **Bull Sci Nat, 25**: 122, 1831.

LEVITON, A.E. – The venomous terrestrial snakes of the East Ásia, Índia, Malaya and Indonesia. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E.E.; DEULOFEU, V. ed. – **Venemous Animals and Their Venoms**. New York: Academic Press, 1968. p. 529-576.

LIN, S.Y.; HUANG, M.C.; LEE, C.Y. – Isolation of cardiotoxic and neurotoxic principles from the venom of *Bungarus fasciatus*. **J Formosan Med Assoc, 71**: 350-357, 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.

LINGENHÖLE, S. & TRUTNAU, L.-Über die kobras der Gattung *Naja* Laurenti, 1758 in Thailand. **Herpetofauna, 11:** 6-13, 1989.

LOUW, A.I. & VISSER, L. – The synergism of cardiotoxin and phospholipase A_2 in hemolysis. **Biochim Biophs Acta 512**: 163-171, 1978.

MEBS, D. – Myotoxic activity of phospholipases A_2 isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon, 24**: 1001-1008, 1986.

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

MINTON, S.A. - Paraspecific protection by *elapid* and sea snake antivenins. **Toxicon, 5**: 47-55, 1967.

NAMIRANIAN, S.; HIDER, R.C. – Use of HPLC to demonstrate variation of venom toxin composition in the Thailand cobra venoms *Naja naja kaouthia* and *Naja naja siamensis*. **Toxicon, 30:** 47-61, 1992.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; SILVA, G.H.; CARDOSO, D.F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. – Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-i from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon, 39**: 1477-1485, 2001.

OWNBY, C.L.; CAMERON, D.; TU, A. T.- Isolation of myotoxic component form rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Am J Path, 85**: 149-158, 1976.

OWNBY, C.L.; FLETCHER, E.; COLBERG, T.R. – Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle *in vivo*. **Toxicon, 31**: 697-709, 1993.

OWNBY, C.L.; GUTIÉRREZ, J..M.; COLBERG, T.B.; ODELL, G.V. – Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon, 20**: 877-885, 1982.

REID, H.A. - Cobra-bites. **Brit Med J, 2**: 540-545, 1964.

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

SELLS, P.G.; JONES R.G.A.; LAING G.D.; SMITH D.C.; THEAKSTON R.D.G. - Experimental evaluation of ovine antisera to Thai cobra (*Naja kaouthia)* venom and its α-neurotoxin. **Toxicon, 32**: 1657-1665, 1994.

SERAFIM, F.G.; REALI, M.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FONTANA, M.D. – Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. No prelo.

SINGER, S.J.- The molecular organization of biological membranes. In: ROTHFIELD, L. I. Ed. - **Structure and function of biological membranes**. New York-London; Academic Press, 1971. p: 146-222

STIPRIJA, V.; SRIBHIBHADH, R.; BENYAJATI, C. - Haemodialysis in poisoning by sea snake venom. **Br Med J 3**: 218-219, 1971.

STRINGER, J.M.; ROBERT, A.K.; TU, A.T. - Ultrastructural studies of myonecrosis induced by cobra venom in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology, 18**: 442 – 450, 1971.

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.

SUNDERSINGH, P.P.H. - Reptilian Fauna of Pilani with a note on the food contents. Part I, Ophidia. **Proc Rajasthan Acad Sci, 7**: 52-59, 1960.

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.

THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. - Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bull Who, 61**: 949 – 956, 1983.

TWEEDIE, M.W.F. - The snakes of Malaya. Singapore: **Government Printing Office**, 1954.

VIRAVAN, C.; VEERAVAT, U.; WARREL, M..J.; THEAKSTON, R.D.G.; WARREL, D.A. - Elisa confirmation of acute and past envenoming by the monocellate Thai cobra (*Naja kaouthia).* **Am J Trop Med Hyg, 35**: 173-181, 1986.

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

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

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

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

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

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

VITAL BRAZIL, O.; PRADO- FRANCESCHI, J.; LAURE, C.J. - Repetitive muscle responses induced by crotamine. **Toxicon**, **17**: 61-67, 1979.

VOGTMAN, D.B..- **Copeia,** 1950, 225.

WARREL, D.A. - In: HARRIS, J.B. ed. - **Natural Toxins animal, plant and microbial.** Clarendon Press, Oxford, 1986. p. 25.

WEIL, C.S. – Tables for the convenient calculation of median-effective dose (LD_{50} and ED_{50}) and instruction in their use. **Biometrics , 8**: 249-263, 1952.

WEIS, R. & McISAAC, R.J. – Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius.* **Toxicon, 9**: 219-228, 1971.

WÜSTER, W. - Taxonomic changes and toxinology: systematic revisions of the asiatic cobras (*Naja naja* species complex). **Toxicon, 34** (4): 399 – 406, 1996.

WÜSTER, W. & THORPE, R.S. – Asiatic cobras population systematics of the *Naja naja* species complex (serpents *Elapidae*) in India and Central Asia. **Herpetologica, 48**: 69-85, 1992.

WÜSTER, W. & THORPE, R.S. - Asiatic cobras: Systematics and snakebite. **Experientia, 47**: 205 – 209, 1991.

YANG, C.C.; CHANG, C.C.; WEI, H.C. – Studies on fluorescent cobrotoxin. **Biochim Biophys Acta, 147**: 600-602, 1967.

De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas

Referências Bibliográficas: NB 66/78 (BIREME)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE