

0060



INSTITUTO DE BIOLOGIA

Este exemplar corresponde
à redação final da
tese defendida pelo
candidato José Carlos Copo
e aprovada pela Comissão
Julgadora
Francisco
4/2/91

C659e

13487/BC

CAMPINAS SP



ESTUDO DOS EFEITOS DA PEÇONHA DE *Bothrops insularis* (jararaca ilhêa) SOBRE O MÚSCULO DE CAMUNDONGO E PINTAINHO.

m. J. and
JOSÉ CARLOS COGO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Passo: est
-10/91*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora:

m. d. out.
Dra. Júlia Prado Franceschi
Prof. Adjunto do Depto de Farmacologia - F.C.M.
UNICAMP

Co-Orientadora:

m. d. out.
Dra. Léa Rodrigues Simioni
Prof. Assistente Doutor do Depto de Farmacologia - F.C.M.
UNICAMP

30/9/10304/8

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Campinas-São Paulo-1991

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico este trabalho
aos meus pais

O Universo desorienta-me. Não posso imaginar
que exista um relógio sem relojoeiro.

VOLTAIRE

ÍNDICE

	página
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
-Animais.....	12
-Peçonha.....	12
-Determinação da DL50.....	12
-Preparação nervo frênico-músculo diafragma isolado de camundongo.....	13
-Preparação músculo biventer cervicis de pintainho....	14
-Resposta à Acetilcolina	15
-Registro do potencial de repouso e dos potenciais de placa terminal em miniatura.....	16
-Estudo morfológico das alterações induzidas pela peçonha.....	17
-Dosagem de Creatina Kinase.....	17
RESULTADOS.....	19
-Toxicidade.....	19
-Valor da DL50.....	20
-Preparação nervo frênico-músculo diafragma isolado de camundongo.....	20
-Preparação músculo biventer cervicis de pintainho....	24
-Resposta à Acetilcolina	28
-Registro do potencial de repouso e dos potenciais de placa terminal em miniatura.....	31
-Estudo morfológico das alterações induzidas pela peçonha.....	34
-Liberação de Creatina Kinase.....	46
DISCUSSÃO.....	50
RESUMO E CONCLUSÕES.....	59

ABSTRACT.....61

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....63

AGRADECIMENTOS

O autor deste trabalho agradece às seguintes pessoas:

- Dra Júlia Prado Franceschi e à Dra Léa Rodrigues Simioni pela valiosa orientação e amizade.

- Dr. Marcos Dias Fontana do Departamento de Farmacologia F.C.M. - UNICAMP pela presença constante e aconselhamento eficiente.

- Professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica - IB-UNICAMP que muito contribuíram para a minha formação.

- Dra. Maria Alice Cruz Hofling do Centro de Microscopia Eletrônica do I.B. - UNICAMP pela colaboração em conjunto do estudo morfológico.

- Dr. Áureo Tatsumi Yamada do C.M.E. - I.B. - UNICAMP pela ajuda na parte de documentação deste trabalho.

- Dr. José Roberto Giglio do Depto de Bioquímica da USP-RP pelo fornecimento da peçonha de *Bothrops insularis* que nos possibilitou a realização deste trabalho.

- Dr. Giuseppe Puerto da Sessão de Herpetologia do Instituto Butantan pela gentileza em ceder as fotos (Figuras 1 e 2).

- Biólogo Ronilson Agnaldo Moreno pela amizade e estímulo.

- Biólogo Stephen Hyslop pelo auxílio nas traduções de textos em inglês.

- Biólogas Antonia Maria Ferreira e Adriane Cristina Sarti Sprogis do Centro de Microscopia Eletrônica - I.B. - UNICAMP. pela ajuda nas técnicas morfológicas.

- Biólogo Gildo Bernardo Leite pela incansável e eficiente ajuda na montagem dos experimentos.

-Bióloga Maria Aparecida Selleghin - Departamento de Patologia Clínica - H.C. - UNICAMP.

-Técnica Maria Tereza de Paula do Centro de Microscopia Eletrônica - I.B. - UNICAMP pela ajuda na revelação das fotos.

-Secretárias Gislaine Elias Alipio e Solange Aparecida dos Santos Basso do Depto de Farmacologia F.C.M. - UNICAMP.

-Granja Ito S/A pelo fornecimento dos animais (pintainhos).

-Todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

ESTUDO DOS EFEITOS DA PEÇONHA DE *Bothrops insularis*
(jararaca ilhêa) SOBRE O MÚSCULO DE CAMUNDONGO E PINTAINHO.

INTRODUÇÃO

A *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) é conhecida popularmente como jararaca ilhêa. Foi descrita pela primeira vez por Amaral (1921a, 1921b) que na época realizava um estudo sobre a biologia dos ofídios do Brasil. É uma espécie exclusivamente brasileira que habita a ilha da Queimada Grande a qual se localiza à 40 km da costa e à 40 milhas a Sul-Sudoeste (S.S.O.) do porto de Santos. É uma ilha rochosa, alongada no sentido norte-sul, de difícil acesso pois é cheia de escarpas, não possuindo praias e nem porto para atracar. Seu clima é úmido e quente, embora não tenha nenhuma fonte de água natural. A água potável provém das chuvas que são abundantes. Apesar de ser uma ilha relativamente isolada do continente, houve o desenvolvimento de uma fauna rica que varia desde moluscos, aracnídeos, insetos, batráquios, ofídios até mesmo aves marinhas como mergulhões, gaivotas e outras aves menores que ali procuram abrigo quando há tempestades (Figura 1).

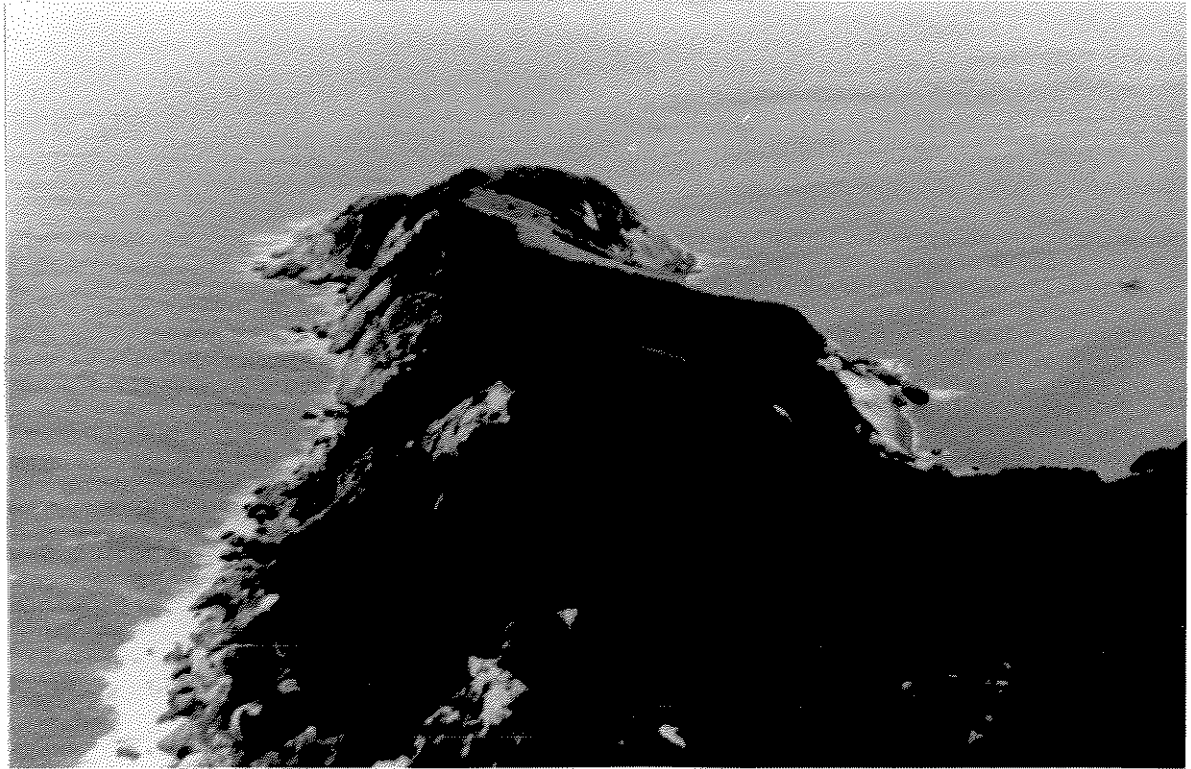


Figura 1: Ilha da Queimada Grande no litoral do Estado de São Paulo a 40 milhas a S.S.O. da barra de Santos. É uma ilha rochosa, de difícil acesso onde a Marinha Brasileira mantém um farol automático. Esta ilha é o *habitat* natural das 2 serpentes: *Bothrops insularis* e *Dipsas albifrons*.
Foto: Giuseppe Puerto

É um paraíso para as duas espécies de serpentes que ali vivem. Uma é a *Dipsas albifrons* Sauvage, a qual é pouco frequente, de hábito noturno e se alimenta de moluscos. A outra espécie é a *Bothrops insularis* a qual é abundante e dá à ilha uma tradição de terror entre os pescadores que por ali se aventuram a pescar. Sua cor é amarela pardacenta com manchas transversais estreitas sobre o dorso, o que a torna quase impossível de ser percebida (Figura 2).

A *Bothrops insularis* difere das outras *Bothrops* do continente em vários aspectos (Amaral, 1918/24; 1918/19), tais como: 1) é menor em comprimento (não ultrapassa 1 metro) e em diâmetro (em média 2,5 cm), 2) vive exclusivamente em árvores, descendo das mesmas apenas para efetuar a digestão e para o acasalamento. Os ofídios brasileiros podem do ponto de vista do habitat, ser distribuídos em: subterrâneos, terrestres, aquáticos ou anfíbios e arborícolas, sendo a *Bothrops bilineatus* e a *Bothrops insularis* as únicas viperídeas que possuem hábito arborícola, 3) possui a cauda semipreênsil pela qual se fixa firmemente em galhos de arbustos ou árvores (essa característica mostra bem as transformações por que ela tem passado com adaptação à vida arborícola), 4) alimenta-se de aves e não de roedores (não existentes na ilha) como o faz a maioria das viperídeas. Amaral nos dá um belo relato



4

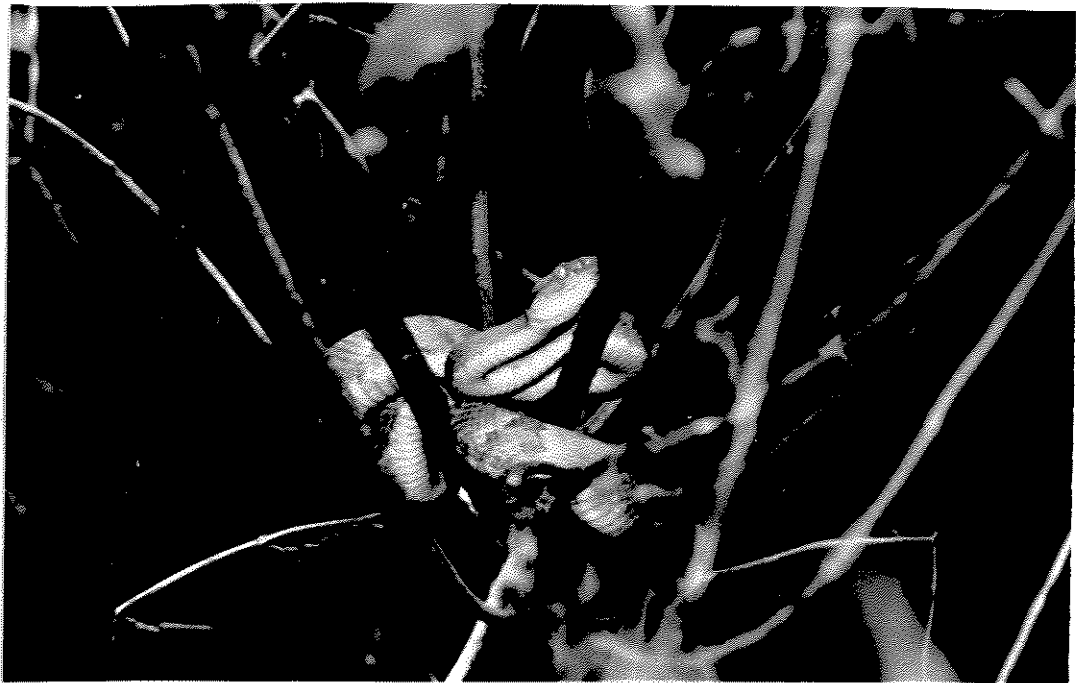


Figura 2: A *Bothrops insularis* é uma serpente que possui hábitos arborícolas. Sua coloração faz com que se confunda com o meio ambiente. Vive exclusivamente na Ilha da Queimada Grande.

Fotos: Giuseppe Puorto

do comportamento alimentar dessa serpente, observado em excursões por ele realizadas à ilha (Amaral, 1921b).
"Quando a necessidade de alimento a aguilhão, serpenteia pelos ramos acima, á procura de um galho donde repontem fructos visitados pelos passarêdo. Ás vezes os fructos não estão ainda bem maduros. Não importa. Ella se enrodilha, se ajeita bem junto aos fructos e, socegradamente, aguarda o amudimento delles. Quando estes começam a lourejar, surgem os pássaros em revoada, pipilando alegremente, num perfeito e suave descuido. Então a Jararaca fica alerta e, quando algum passarinho, mais incauto e esfomeado, se aproxima da manjuba, gargarejando umas notas alacres, ella, rapida e certeira, dá-lhes um bote, geralmente na região cervical ou thoraxica e mata-o intantaneamente, graças ao veneno activissimo que nelle inocula sem demôra. Quando por ventura, o passarinho é apanhado por outra região que não aquellas, a Jararaca, depois de lhe inocular o veneno, lhe váe calmamente deslocando o corpo entre as presas, graças aos vastos movimentos de abduccão e adduccão de que são dotadas as mandibulas dellas, até que lhe attinja a cabeça, por onde sempre começa a deglutil-o. Dentro de um periodo variavel de 5 a 15 minutos, de accôrdo com o tamanho do passaro e com a região apprehendida a degluticção está terminada, a Jararaca desce devagar, voltando pelos ramos e tronco da arvore e vem tranquillamente enrodilhar-se em cima

de gravetos, perto do tronco da árvore, donde digere em paz a sua vítima. Finda a digestão, dentro de 6 a 8 dias, ella naturalmente volta á árvore, á procura de outros passarinhos.", 5) apresenta do ponto de vista reprodutivo, um tipo especial de intersexualidade, com tendência à extinção dos machos, 6) possui peçonha mais tóxica em pombos do que as outras espécies de *Bothrops*. Este fato parece estar relacionado à certa especificidade de sua toxicidade em relação às aves. Fato semelhante foi observado em relação às peçonhas de serpentes marinhas (*Disteiridae*) que são mais tóxicas para peixes. 7) possui hábitos diurnos, embora possua pupila vertical característica de serpentes de hábitos noturnos.

Sendo restrita à ilha da Queimada Grande, a jararaca ilhêa não constitui problema de saúde pública. A literatura médica não registra casos de envenenamento com esta espécie de serpente, embora haja relatos de acidentes em trabalhadores do farol da ilha (hoje substituído por um farol automático) ou em animais domésticos que essas pessoas levaram. No entanto é de grande interesse o estudo da farmacologia desta peçonha considerando-se as particularidades da espécie, abrindo provavelmente novos caminhos para compreensão dos fenômenos evolutivos ocorridos na modificação estrutural de toxinas animais como postulado por Strydom (1979).

O estudo de substâncias tóxicas teve um grande impulso na década de 1840 quando o pesquisador Claude Bernard

estudou a ação do curare, um extrato extraído das plantas do gênero *Strychnos* (Família *Loganiaceae*), usado pelos índios sul-americanos para envenenar suas flechas. Ele verificou que "...em um animal envenenado por curare, a excitação dos nervos motores não provoca reação muscular, enquanto que a estimulação direta dos músculos por uma corrente galvânica produz contrações normais" "O curare isola a propriedade contrátil do músculo da propriedade motriz do nervo" (Claude Bernard, apud Grmek, 1966).

Uma técnica padronizada por Bulbring em 1946, utilizando a preparação nervo frênico músculo diafragma isolado de rato, permitiu o estudo de drogas, peçonhas e toxinas na junção neuromuscular.

Ginsborg e Warriner (1960) e Ginsborg (1960) descreveram uma técnica de estudos em músculos utilizando o biventer cervicis de aves. Os resultados registrados neste tipo de experimento são semelhantes àqueles obtidos com a preparação diafragma de rato, mas devido ao fato desse músculo possuir fibras de inervação focal e multifocal (difusa), sua resposta frente à certas drogas como a Acetilcolina e Carbacol é uma contratura, que mostra semelhança com aquela obtida em músculo desnervado. Estudos mais recentes com esse músculo foram feitos por Chang e Su (1975) e Chang *et al.* (1976).

A utilização de métodos eletrofisiológicos no estudo da junção neuromuscular possibilita avaliar mais adequadamente o efeito de drogas e toxinas sobre a transmissão

neuromuscular na propagação do impulso nervoso e também a ação direta na fibra muscular.

Os primeiros estudos em eletrofisiologia foram realizados por Hodgkin (1937), que demonstrou que um impulso elétrico produz uma alteração na membrana, que se for suficientemente ampla, dá origem à uma resposta propagada chamada de potencial de ação, e que essa propagação é responsável pelo aumento da excitabilidade da fibra nervosa.

Ling e Gerard (1949) utilizando microeletrodos com 1 μ de diâmetro, conseguiram um alto grau de reprodutividade nas medidas do potencial de membrana. Estes autores verificaram que o potencial de membrana era de 78 mV e que esse potencial decrescia a medida em que se elevava a concentração externa de potássio.

Em 1950 Nastuk e Hodgkin usando microeletrodos com 0,5 μ de diâmetro preenchidos com cloreto de potássio (3M) encontraram para o potencial de membrana valor de 88 mV e para o potencial de ação um valor de 119 mV. Suspeitaram também que o potencial de ação estivesse ligado a um aumento específico na permeabilidade da membrana ao sódio.

Fatt e Katz (1952) verificaram que os potenciais de placa terminal em miniatura (p.p.t.m.) estão relacionados com a liberação espontânea de pequena quantidade de acetilcolina denominada *quantum* e representa um potencial unitário ao passo que o potencial de placa terminal (p.p.t.) resulta da liberação de vários *quanta* de

acetilcolina. A confirmação morfológica desse fenômeno foi feita por De Robertis e Bennett em 1955.

Em 1952 vários autores entre os quais Hodgkin e Huxley já admitiam que o impulso nervoso estava associado ao influxo de sódio e que a reversão do sinal estava associado com o efluxo de potássio (Hodgkin e Huxley, 1952a, 1952b e 1952c).

Utilizando-se de técnicas miográficas e eletrofisiológicas, Vital Brazil e Excell em 1971 realizaram estudos sobre a ação da crotoxina (componente da peçonha da cascavel sul-americana *Crotallus terríficus*) observando que a mesma possui uma ação facilitadora pré-juncional, esclarecendo o modo de ação desta toxina.

Mais recentemente, Rodrigues-Simioni *et al.* (1983) realizaram estudos eletrofisiológico com a peçonha de *Bothrops jararacussu*, mostrando os efeitos tanto da peçonha como o Pool IV, principal fração isolada desta peçonha. Verificaram que essa peçonha possui em efeito bloqueador da transmissão neuromuscular.

Tanto as técnicas miográficas quanto as eletrofisiológicas favoreceram e certamente favorecerão a compreensão dos mecanismos pelos quais os muitos tipos de drogas, peçonhas e toxinas agem modificando a transmissão normal do impulso nervoso.

Não existe nenhuma informação na literatura científica a respeito da ação da peçonha de *Bothrops insularis* na junção neuromuscular. As poucas informações

existentes se limitam aos estudos sobre a atividade coagulante e fibrinolítica efetuado por Mebs (1970). Mais recentemente Selistre e Giglio (1987) isolaram uma enzima semelhante à trombina, uma fosfolipase ácida que promove intensa necrose e edema e também uma fração responsável pela atividade hemorrágica. Vários peptídios potenciadores de bradicinina foram também detectados na peçonha por Cintra *et al.* (1984). Estudos *in vitro* de Lobo-Araújo *et al.* (1990) observaram alta atividade caseinolítica, fosfolipásica, esterásica e coagulante sobre o plasma e baixa atividade hemorrágica e hemolítica.

Por outro lado, o estudo filogenético das fosfolipases ofídicas levou Strydom (1979) sugerir que teria ocorrido entre os ofídios um processo evolutivo no qual as fosfolipases presentes na peçonha, deram origem às cardiotoxinas e estas às neurotoxinas pós-sinápticas. Entretanto, o autor ressalva que suas propostas são válidas apenas para as peçonhas de ofídios das Famílias *Elapidae* e *Hydrophiidae*, sendo que na peçonha das serpentes da Família *Viperidae* (Sub-família *Crotalinae*) muito ainda há a esclarecer no tocante às interrelações existentes entre estrutura química e atividade biológica, antes de que uma hipótese filogenética possa ser elaborada.

OBJETIVOS

1- Demonstrar que a flacidez observada em animais injetados com a peçonha de *Bothrops insularis* está relacionada a seus efeitos:

A) sobre a junção neuromuscular, utilizando-se técnicas miográficas e eletrofisiológicas;

B) sobre as fibras musculares através de estudos morfológicos e dosagem bioquímica de Creatina Kinase (CK).

2- Comparar a potência da peçonha de *Bothrops insularis* com a da *Bothrops jararaca* nas preparações utilizadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - ANIMAIS:

Camundongos fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, com peso de 18 a 30 g e pintainhos da linhagem HY LINE W36 fornecidos pela Granja Ito S/A com peso entre 40 a 50 g (4 a 8 dias) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração.

2 - PEÇONHA:

A peçonha de *Bothrops insularis* foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. José Roberto Giglio da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

3 - DETERMINAÇÃO DA DL₅₀:

A DL₅₀ da peçonha de *Bothrops insularis* e *Bothrops jararaca* foi determinada em pintainho e em camundongo. As vias foram intra-muscular (i.m.; 0,5 ml) em músculo peitoral esquerdo de pintainho e intra-peritonal (i.p.; 0,1 ml) em camundongos. Foram utilizados pintainhos pesando 40 a 50 g e camundongos pesando 18 a 22 g, empregando-se 6 animais para cada dose. A peçonha foi dissolvida em solução salina para obtenção da solução estoque a partir da qual foram preparadas quatro soluções de concentrações que guardavam entre si uma razão de 1,5 para a peçonha de *Bothrops*

jararaca e de 3,0 para a peçonha de *Bothrops insularis*. Para o cálculo da DL₅₀ usou-se o método de Weil (1953).

Para verificar a perda da função muscular, foi utilizada a via i.m., injetando-se 80 μ g/0,1 ml no músculo gastrocnêmio direito de pintainho.

4 - PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-MÚSCULO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO:

Camundongos com peso de aproximadamente 30 g foram anestesiados com Hidrato de Cloral a 10% (0,3 ml/100g) e sacrificados. Após retirada, a preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por Bulbring (1946). A técnica consiste em dissecar a pele a nível do tórax e cuidadosamente isolar o diafragma junto com o nervo frênico, tomando-se cuidado para não lesar nem o músculo nem o nervo. Após o isolamento da preparação, que deverá levar o menor tempo possível (10 minutos no máximo), montá-la no suporte que deverá ser colocado dentro da cuba com solução de Tyrode. A composição do Tyrode em mM foi: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42 NaHCO₃ 11,9 e C₆H₁₂O₆ 11,1. A cuba com 10 ml de capacidade foi mantida à temperatura constante de 37° C e arejada com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂; pH 7,4). Foi feito o registro da força de contração muscular em resposta a estímulos supra-maximais (Fisiógrafo KPM-4A), usando-se transdutor

isométrico F-50 (NARKO Bio-Systems Inc.). O músculo submetido à tensão constante de 2 g/cm foi estimulado indiretamente através de seu nervo motor usando-se eletrodo bipolar com pulsos máximos de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. O músculo também foi estimulado diretamente com pulsos máximos de 0,05 Hz de frequência e 2 ms de duração. Neste caso, a preparação foi tratada com d-Tubocurarina (5 μ g/ml) para bloquear as respostas à estimulação indireta. Os pulsos foram gerados por estimulador (GRASS S48). Foram adicionados ao banho 80 μ g/ml da peçonha de *Bothrops insularis* ou de *Bothrops jararaca*. Todas as preparações foram submetidas a um período de estabilização não inferior a 20 minutos.

5 - PREPARAÇÃO MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO:

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). A técnica consiste em anestésiar os animais com éter e dissecar a pele longitudinalmente desde a base do crânio na parte posterior até o início do tórax, expondo os dois músculos biventer cervicis. Após o isolamento, que deverá ser feito com cuidado para não lesar o músculo, amarrar o mesmo nas duas extremidades e fixar na cuba. O músculo foi suspenso em 4 ml de solução de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 24,99 e C₆H₁₂O₆ 11,65, arejado de modo constante com carbogênio a 37° C (mistura 95% O₂ e 5% CO₂, pH 7,5). O

músculo foi submetido a uma tensão constante de 1 g/cm e estimulado através de eletrodos bipolares posicionados na região de transição entre o tendão e o músculo de modo a proceder uma estimulação de campo. Estímulos supra maximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração foram aplicados à preparação (estimulador GRASS S48). Todas as preparações foram submetidas a um período de estabilização não inferior a 20 minutos. Contrações musculares em resposta a estímulos elétricos maximais foram registradas durante 120 minutos (fisiógrafo MPM-4A) ou em registrador de papel (ECR modelo RB 102 de 10 polegadas), usando-se um transdutor isotônico (NARKO Bio-Systems Inc.).

Foram estudados efeitos das doses de 0,5; 1,0; 5,0; 10; 20; 40 e 80 $\mu\text{g/ml}$ da peçonha de *Bothrops insularis* ou 80 $\mu\text{g/ml}$ da peçonha de *Bothrops jararaca*.

6 - RESPOSTA À ACETILCOLINA (ACh):

Verificamos a contratura muscular em resposta a adição ao banho de duas doses de ACh (5 a 10 $\mu\text{g/ml}$) na preparação biventer cervicis de pintainho na ausência de estimulação elétrica, antes e após a adição da peçonha de *Bothrops insularis* (40 e 80 $\mu\text{g/ml}$). Minutos antes da adição e durante a vigência da ação da peçonha, estímulos elétricos foram aplicados continuamente. Foram ainda realizados 4 experimentos com total ausência de estímulos elétricos durante a vigência da ação da peçonha. Os experimentos foram

realizados a 24° C e a 37° C. Foi aplicado o teste t-Student de significância para os valores obtidos.

7 - REGISTRO DO POTENCIAL DE REPOUSO (PR) E DOS POTENCIAIS DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (p.p.t.m.):

A preparação nervo frênico diafragma de camundongo foi distendida em câmara de lucite de 2,5 ml de capacidade à temperatura ambiente. A preparação foi imersa em solução de Tyrode com composição semelhante ao descrito no item 4 e arejada constantemente pelo borbulhamento de carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂; pH 7,4). Microeletrodos preenchidos com KCl 3M (resistência 18 a 25 M Ω) foram introduzidos intracelularmente para a medida tanto do potencial de repouso (PR) das fibras musculares como para a captação dos potenciais da placa terminal em miniatura (p.p.t.m.). Os p.p.t.ms. foram registrados em osciloscópio Tektronix e fotografados (câmara Polaróide) ou em registrador de papel (GOULD RS 3400). O PR foi registrado em osciloscópio Tektronix. A medida do PR foi feita na região das placas terminais e também aleatoriamente em regiões distantes destas. Para estudar o efeito da peçonha, mediu-se o PR e o p.p.t.m. antes e 5, 15, 30 e 60 minutos após a adição da peçonha. No experimento controle, a leitura foi feita nos mesmos tempos sem a adição da peçonha.

8 - ESTUDO MORFOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA PEÇONHA:

Pintainhos de 4 dias, pesando em média 40 g foram injetados no músculo peitoral esquerdo com peçonha de *Bothrops insularis*, em volume igual a 0,1 ml. As doses de 2,0; 4,0; 8,0; 20,0 e 80,0 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ mostraram-se tóxicas. Os animais foram sacrificados após respectivamente 120, 150, 80, 90 e 60 minutos em função dos sinais clínicos acusando morte eminente. Os animais tratados com dose subletal de 0,4 μg , foram sacrificados 24 horas após a injeção. Em seguida ao sacrifício dos animais, procedeu-se à dissecação do músculo e fixação em Bouin durante 24 a 48 horas.

Preparações do músculo biventer cervicis isolado de pintainho incubados com 20 e 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da peçonha de *Bothrops insularis* e 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *Bothrops jararaca* (veja item 4) também foram fixados após o término do experimento, seguindo-se o procedimento de rotina para estudo das alterações morfológicas (desidratação e inclusão em parafina). Secções de 7 μm foram obtidas em micrótomo, montadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.).

9 - DOSAGEM DE CREATINA KINASE (CK):

Devido à ação miotóxica da peçonha de *Bothrops insularis* (Selistre *et al.*, 1990) e sua consequente degeneração da membrana celular, mediu-se os níveis de liberação desta enzima *in vitro*. Durante as experiências

realizadas com músculo biventer cervicis de pintainho para o registro das contrações musculares, alíquotas de 0,2 ml foram retiradas do banho durante o período de repouso (estabilização da preparação) e após a adição da peçonha de *Bothrops insularis* (0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 $\mu\text{g/ml}$), ou de *Bothrops jararaca* (80 $\mu\text{g/ml}$) em períodos correspondente a 40, 80 e 120 minutos de incubação. Para o controle, amostras de 0,2 ml foram retiradas do banho nos tempos acima indicados, sem a adição da peçonha (completando-se no entanto o volume da cuba com a solução de Krebs). Na dosagem de CK foi utilizado Kit MERK-1 test, NAC ativado (teste UV otimizado) onde uma Unidade Internacional (UI) corresponde à transformação catalítica de 1 μmol de substrato por minuto a 25° C. A determinação foi realizada em aparelho GEMINI - The Miniature Centrifugal Analyser do Hospital das Clínicas - UNICAMP. Foi aplicado o teste t-Student de significância para os valores obtidos.

RESULTADOS

1 - TOXICIDADE:

Pintainhos injetados no músculo peitoral esquerdo com peçonha de *Bothrops insularis* foram observados durante o período de sobrevida para a avaliação de seu estado geral. Dez minutos após a administração da peçonha, particularmente nas doses de 8,0; 20,0; 40,0; e 80,0 μg (n= 4 para cada dose), observou-se flacidez dos músculos dos membros que evoluiu para perda do reflexo postural. Seguiram-se uma paralisia flácida dos músculos do pescoço, perda total do tônus muscular, dispnéia, convulsões e morte. Alguns animais exibiram um tipo de vocalização semelhante a soluço além de movimentos pendulares da cabeça. Observou-se também uma acentuada variação individual em resposta às várias doses utilizadas. Os pintainhos injetados (n=4) com a dose de 80 μg no músculo gastrocnêmio direito apresentaram, dois a três minutos após a injeção, uma completa retração do pé direito comprometendo sua postura. Quando estimulados a se movimentar, exibiam dificuldade na marcha, apoiando-se levemente no membro lesado. Sessenta e cinco minutos após a administração da peçonha, houve regeneração parcial da função (marcha) e após vinte e quatro horas, embora edema e hemorragia estivessem ainda presentes no local da injeção,

os animais mostraram uma postura e marcha aparentemente normais (Figura 3).

2 - VALOR DA DL₅₀:

O valor da DL₅₀ e seus limites a nível 95% da peçonha de *Bothrops insularis* determinado em pintainhos (i.m.) e em camundongos (i.p.) podem ser observados na Tabela 1. O valor da DL₅₀ obtido para a peçonha de *Bothrops jararaca* em camundongos por via i.p., foi semelhante ao relatado por Villarroel *et al.* (1978/79), ou seja, 2,22 mg/Kg.

3 - PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-MÚSCULO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO:

A Figura 4 ilustra o efeito da peçonha de *Bothrops insularis* na dose de 80,0 µg/ml sobre as respostas do diafragma à estimulação elétrica direta e indireta. Observou-se na maioria (4 em 6) das experiências onde foram aplicados estímulos indiretos um visível aumento da amplitude das contrações musculares precedendo a instalação de um persistente bloqueio neuromuscular de em média 93% em 110 minutos, que não foi reversível após várias lavagens. Nesses experimentos, 50% de bloqueio foi atingido em média aos 60 minutos (Figura 4A). Nos experimentos onde aplicamos

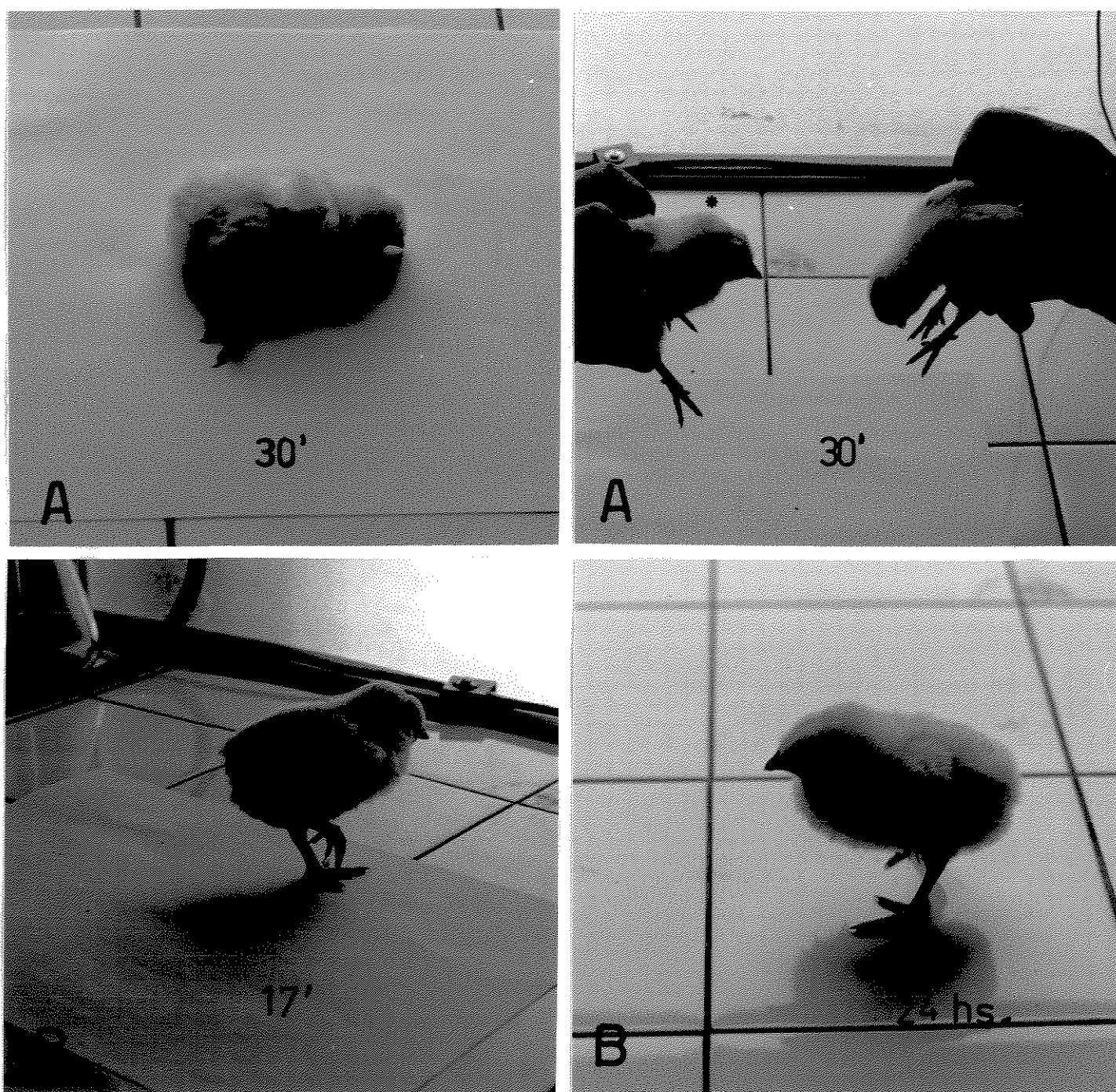


Figura 3: Administração da peçonha de *Bothrops insularis* - 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A - injeção i.m. em músculo peitoral esquerdo. Notar a perda do reflexo postural, nos tempos indicados, quando comparado com o animal não tratado(*) . B - injeção i.m. no músculo gastrocnêmio direito. Notar a retração do pé injetado (17 minutos) bem como a reversão do efeito após 24 horas.

VENENO	ANIMAL	VIA	VALOR DL50 (mg/kg)
<u>B. jararaca</u>	camundongo pintainho	i.p.	2,26 (1,75 - 2,98)
		i.m.	2,77 (1,99 - 3,87)
<u>B. insularis</u>	camundongo pintainho	i.p.	0,88 (0,49 - 1,69)
		i.m.	0,50 (0,32 - 0,77)

Tabela 1: Valores da DL₅₀ e seus limites de confiança de 95% obtidos para a peçonha de *Bothrops insularis* e *Bothrops jararaca* em músculo peitoral esquerdo de pintainho (i.m.) e em camundongos (i.p.). Verificar que tanto o camundongo como o pintainho são mais sensíveis à peçonha de *Bothrops insularis*. Entre as duas espécies de animais utilizados, o pintainho é ainda mais sensível a esta peçonha.

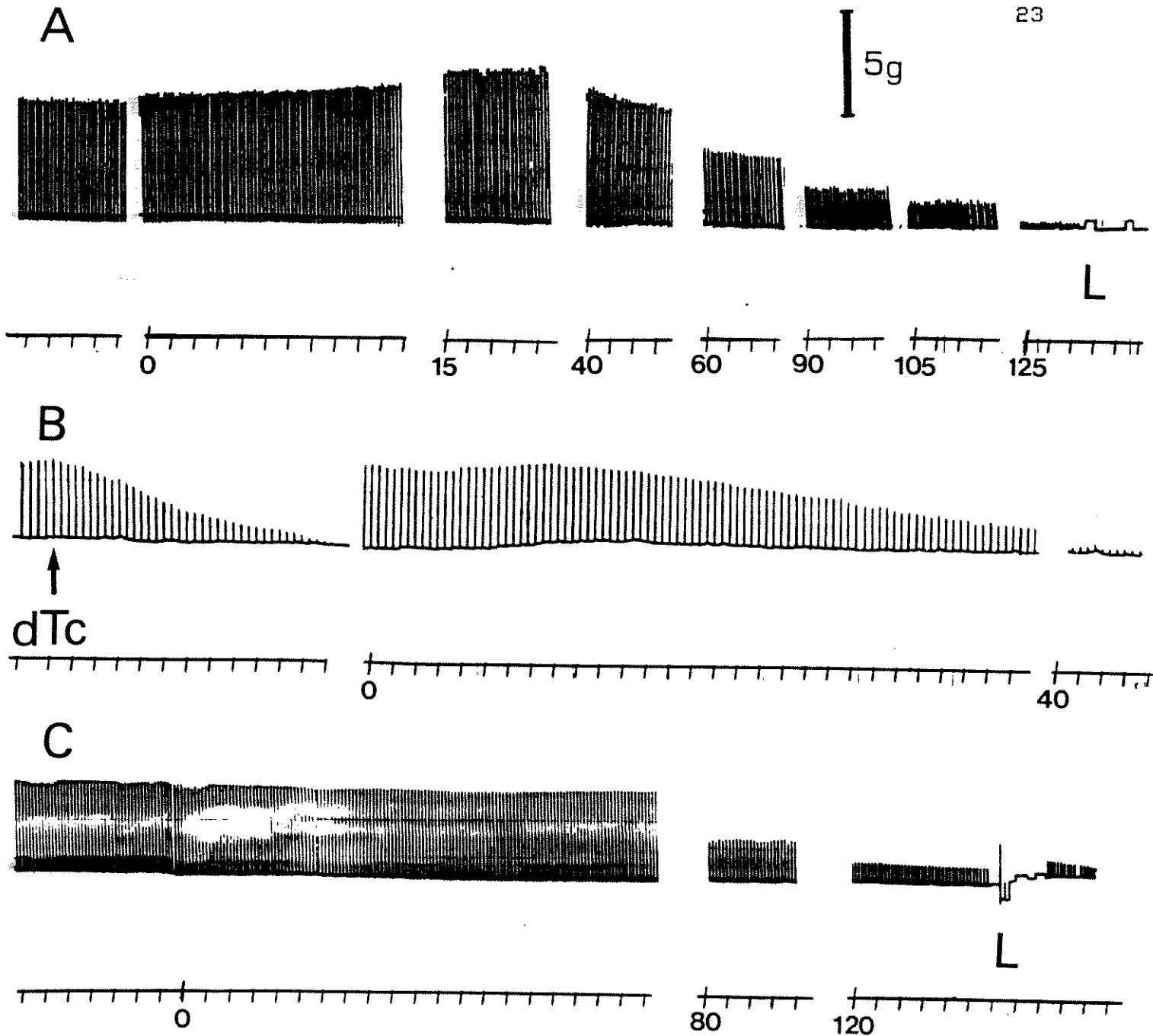


Figura 4: Registro das contrações musculares do nervo frênico-músculo diafragma isolado de camundongo estimulado indiretamente (A) e diretamente (B), previamente tratado com dTc (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -seta). No tempo zero (0), peçonha de *Bothrops insularis* (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foi adicionado ao banho (A e B). Em C registro das contrações musculares estimulada indiretamente. No tempo zero (0), peçonha de *Bothrops jararaca* (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foi adicionado ao banho. Notar em A o aumento das contrações musculares precedendo o bloqueio irreversível. L- Lavagem da preparação. Tempo em minuto.

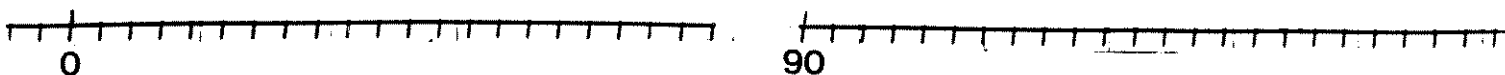
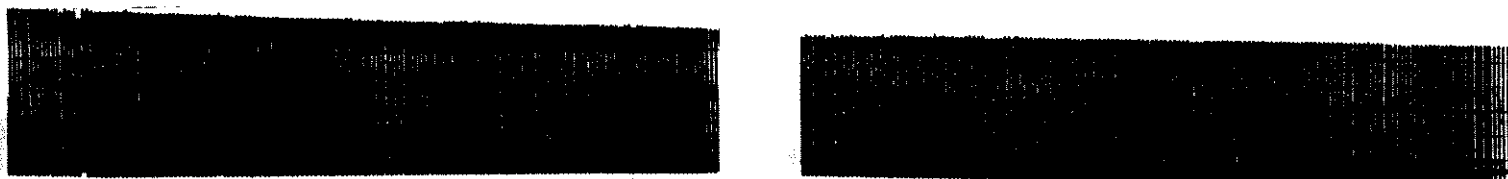
estímulos diretos (n=3), 50% de bloqueio foi atingido aos 21 minutos e cerca de 93% aos 57 minutos (Figura 4B). Uma leve contratura esteve presente em alguns experimentos. Não foi observado reversão após lavagens, tanto nos experimentos onde estimulamos a preparação indiretamente como nos experimentos em que foram usados estímulos diretos. Quando adicionamos a peçonha de *Bothrops jararaca* (80 µg/ml) à preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongo estimulado indiretamente, um bloqueio neuromuscular da ordem de 50% foi observado em média aos 62 minutos, atingindo 84% aos 106 minutos (Figura 4C). Esse bloqueio foi também irreversível, não tendo sido verificado o aumento da amplitude das contrações musculares, nem de intensa contratura como observado com a peçonha de *Bothrops insularis*.

4 - PREPARAÇÃO MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO:

Nesta preparação, o efeito contraturante da peçonha de *Bothrops insularis* foi particularmente evidenciado tendo sido de maior intensidade quando comparado àquele observado na preparação de mamífero. Os efeitos mostraram-se dose-dependente nas doses de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 µg/ml (n= 3, 5, 5, 8, 6, 8 e 13 respectivamente) (Figuras 5, 6 e 7). Observaram-se em alguns experimentos,

5g 25

A



B



C

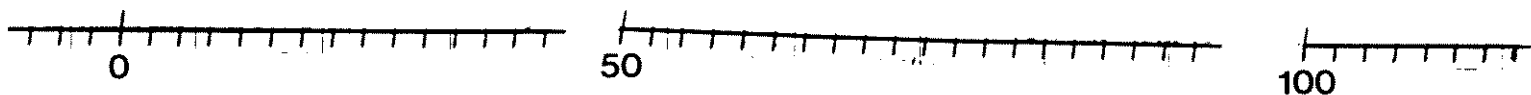
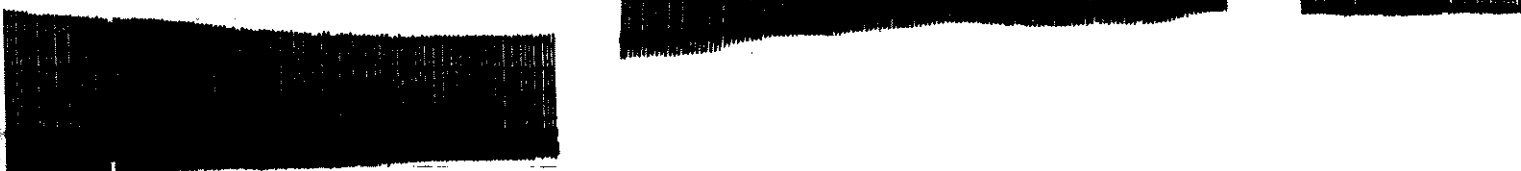


Figura 5: Registro das contrações musculares do músculo biventer cervicis isolado de pintainho com estímulo de campo. No tempo zero (0), peçonha de *Bothrops insularis* foi adicionada ao banho. A- 0,5 µg/ml, B- 1,0 µg/ml, C- 5,0 µg/ml. Verificou-se na dose de 1,0 µg/ml o bloqueio irreversível após lavagem (L) e na dose de 5,0 µg/ml uma contratura e bloqueio também irreversíveis. Tempo em minuto.

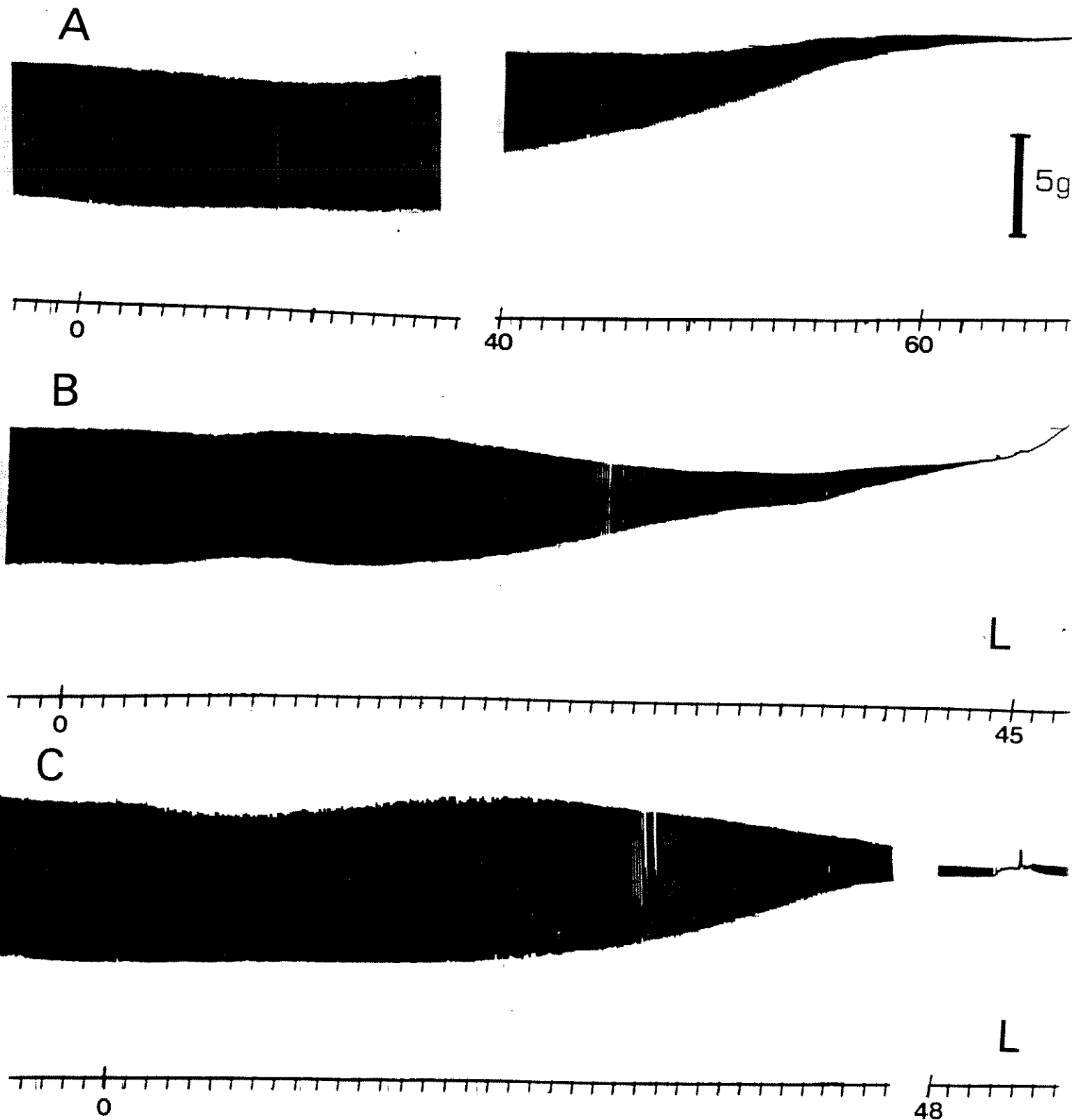


Figura 6: Nas mesmas condições da figura anterior. A- 10,0 µg/ml, B- 20,0 µg/ml e C- 40,0 µg/ml. L- Lavagem da preparação. Tempo em minuto.

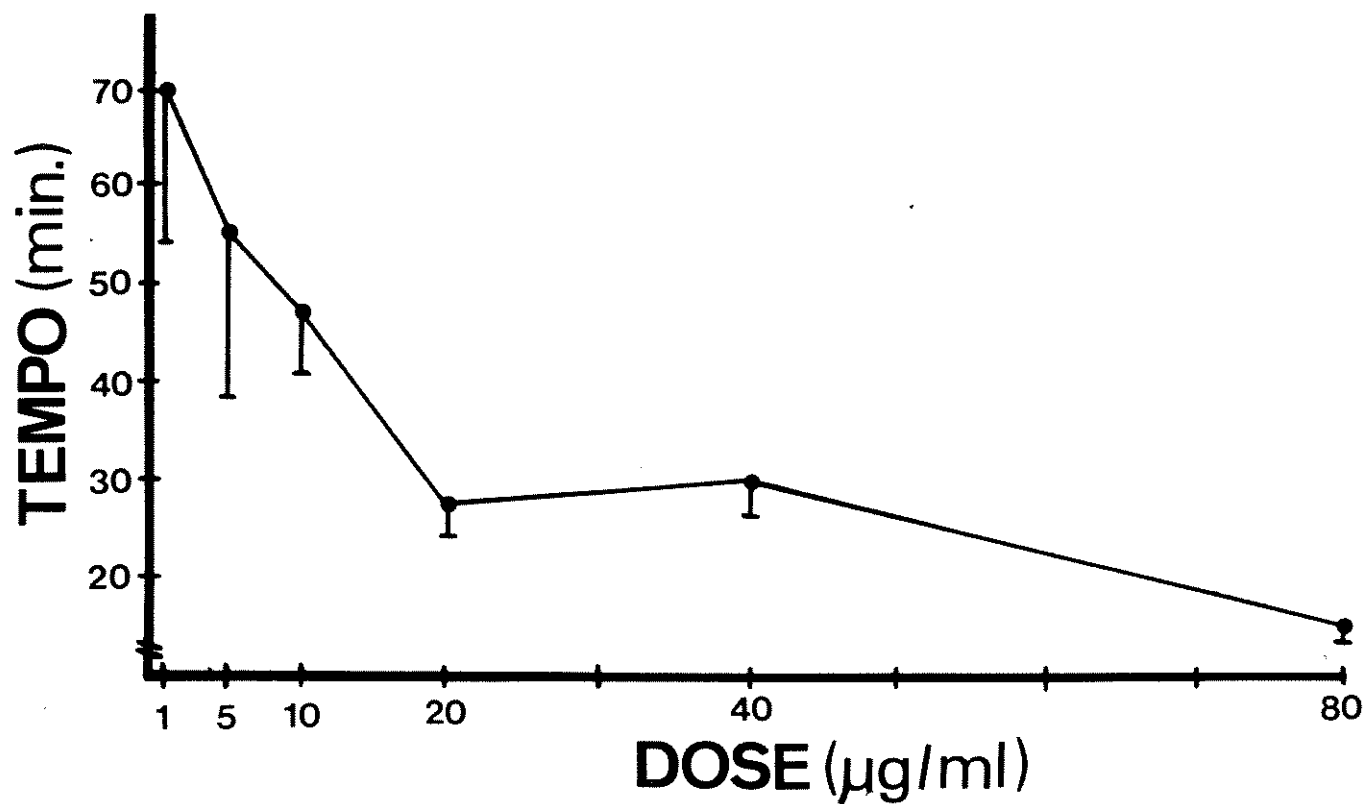


Figura 7: Curva dose-efeito (50% de bloqueio) da peçonha de *Bothrops insularis* no músculo biverter cervicis de pintainho. Cada ponto representa a média de 5 a 13 experimentos \pm erro padrão.

contrações espontâneas (não sincrônicas com a frequência do estímulo) induzidas pela peçonha (40 e 80 $\mu\text{g/ml}$) além de aumento na amplitude das contrações musculares que precedeu a instalação de bloqueio neuromuscular não reversível após várias lavagens. A peçonha de *Bothrops jararaca* mostrou-se menos potente do que a peçonha de *Bothrops insularis insularis* em determinar bloqueio das respostas musculares (Figura 8). Assim, a dose de 80 $\mu\text{g/ml}$ de *Bothrops jararaca* (n=16) determinou um bloqueio de em média 83% num período de 106 minutos. Esta peçonha induziu também uma contratura com características diferentes daquelas exibidas pela peçonha de *Bothrops insularis*.

5 - RESPOSTA À ACETILCOLINA :

Verificamos que a resposta à Ach após a adição da peçonha de *Bothrops insularis* foi inibida em cerca de 60% tanto a 37° C (n=4) como a 24° C (n=8) (Figura 9). Nos experimentos controle, onde não houve a adição da peçonha, verificamos um aumento de 15% na resposta da Ach tanto a 24° C (n=2) quanto a 37° C (n=6). Conquanto este aumento não tenha sido estatisticamente significativo, a diminuição evocada nas preparações tratadas foi altamente significativa ($p < 0,01$). O efeito contraturante da peçonha foi

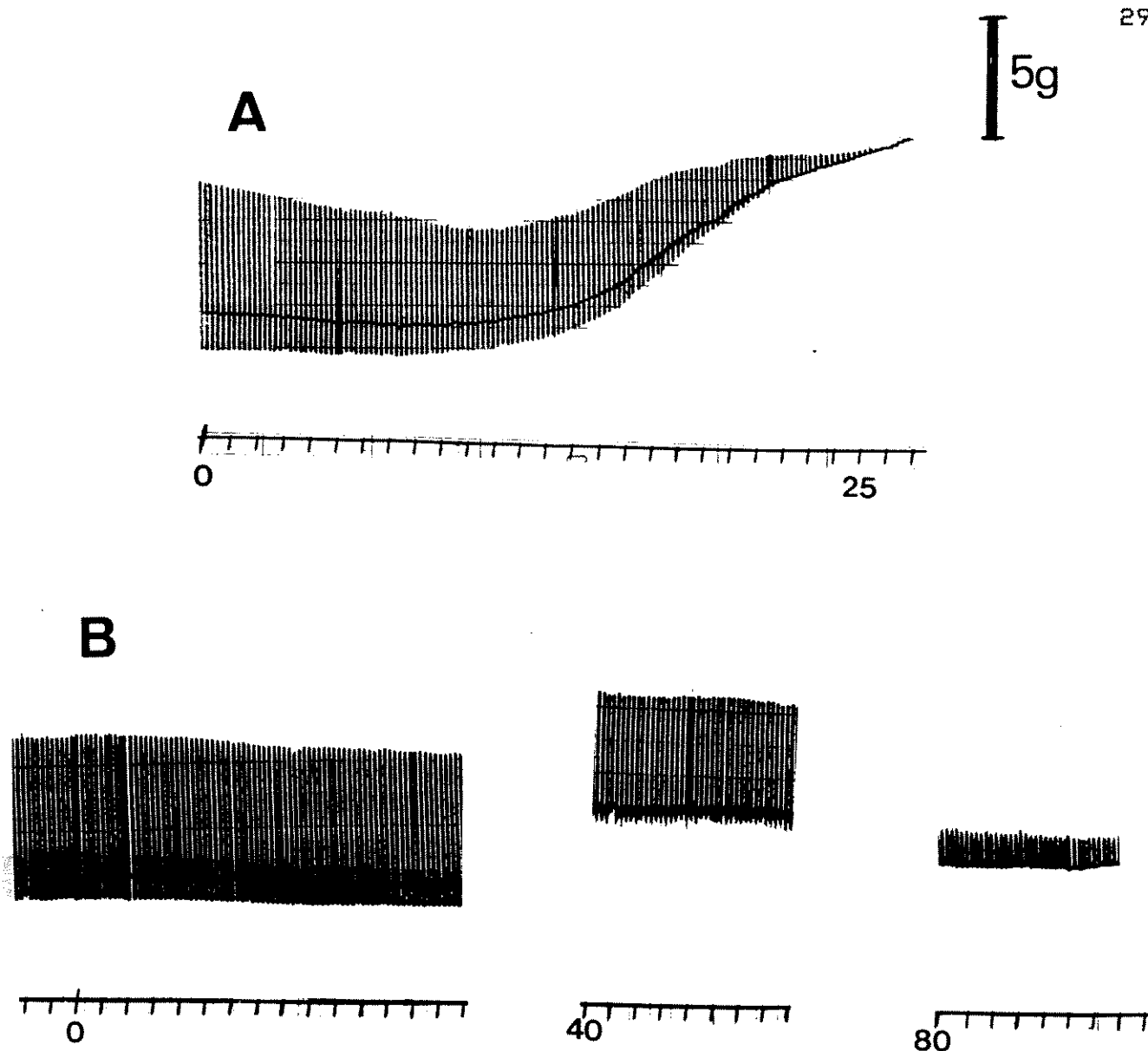


Figura 8: Registro das contrações musculares do músculo biventer cervicis isolado de pintainho com estímulo de campo. No tempo zero (0), peçonha de A- *Bothrops insularis* (80 $\mu\text{g/ml}$) e B- *Bothrops jararaca* (80 $\mu\text{g/ml}$) foram adicionados ao banho. A peçonha de *Bothrops insularis* mostrou-se mais potente do que a peçonha de *Bothrops jararaca*. Tempo em minuto.



Figura 9: Resposta do músculo biventer cervicis à Ach. Verificar a inibição parcial da resposta à Ach ($10\mu\text{g/ml}$) antes e após a adição de $80\mu\text{g/ml}$ (tempo zero) da peçonha de *Bothrops insularis*. Experimento realizado a 37°C . L - Lavagem da preparação. Tempo em minuto.

parcialmente inibido nos experimentos realizados a 24° C. Em 2 dos 4 experimentos realizados com total ausência de estímulos, verificamos o aparecimento de contrações espontâneas após a adição da peçonha.

6 - REGISTRO DO POTENCIAL DE REPOUSO (PR) E DO POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (p.p.t.m.):

O registro dos p.p.t.m. (n=4) mostrou um aumento na sua frequência (p.p.t.m. com frequência incontável) 5 minutos após a adição da peçonha de *Bothrops insularis* (20 e 30 µg/ml) (Figura 10). Em seguida, o tratamento induziu uma gradual diminuição da frequência, evoluindo para bloqueio aos 40 minutos de incubação (não indicado na figura). Não foi verificado aumento na amplitude dos p.p.t.m. A rápida despolarização que se instalou logo após a adição da peçonha de *Bothrops insularis* foi traduzida pela diminuição do PR que chegou em média a -55 mV após 5 minutos, e a -40 mV após 60 minutos. Com a dose de 40 µg/ml (n=3) o PR assumiu valores de -75 mV nos primeiros 5 minutos e -55 mV, 60 minutos após. Portanto o tempo necessário para a despolarização foi também dose-dependente (Figura 11). Observou-se semelhante queda no PR nas regiões distantes das placas terminais. O efeito despolarizante da

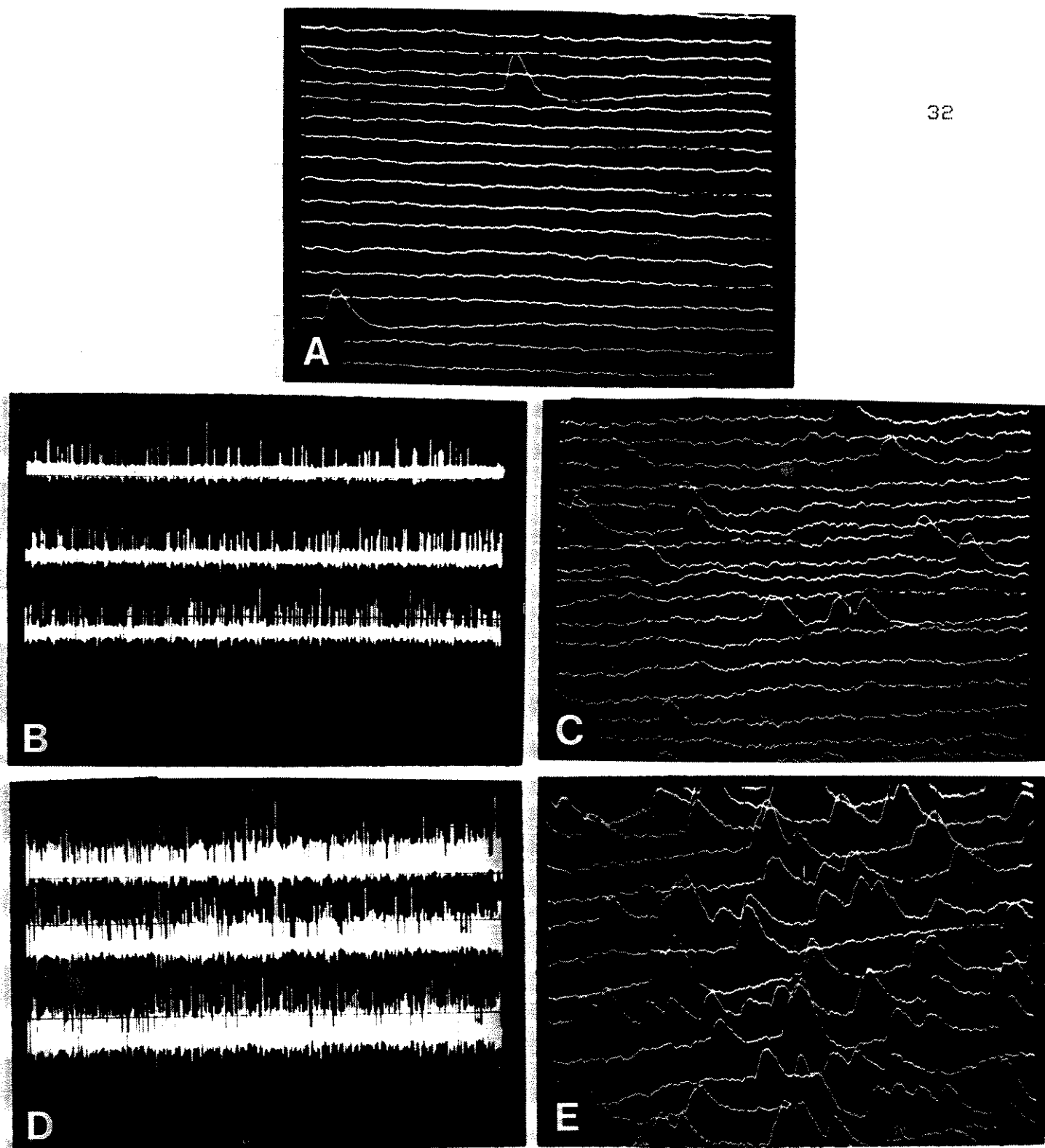


Figura 10: Registro dos p.p.t.m. na preparação nervo-frênico músculo diafragma isolado de camundongo. A - Controle; B e C - 5 minutos após adição de 40 μ g/ml da peçonha de *Bothrops insularis*; D e E - 15 minutos após a adição da peçonha. (B e D - varredura 2 seg/cm; sensibilidade 1 mV/cm); (A, C e E - varredura 10 mseg/cm; sensibilidade 1 mV/cm). Após 40 minutos verificou-se bloqueio total dos p.p.t.m.

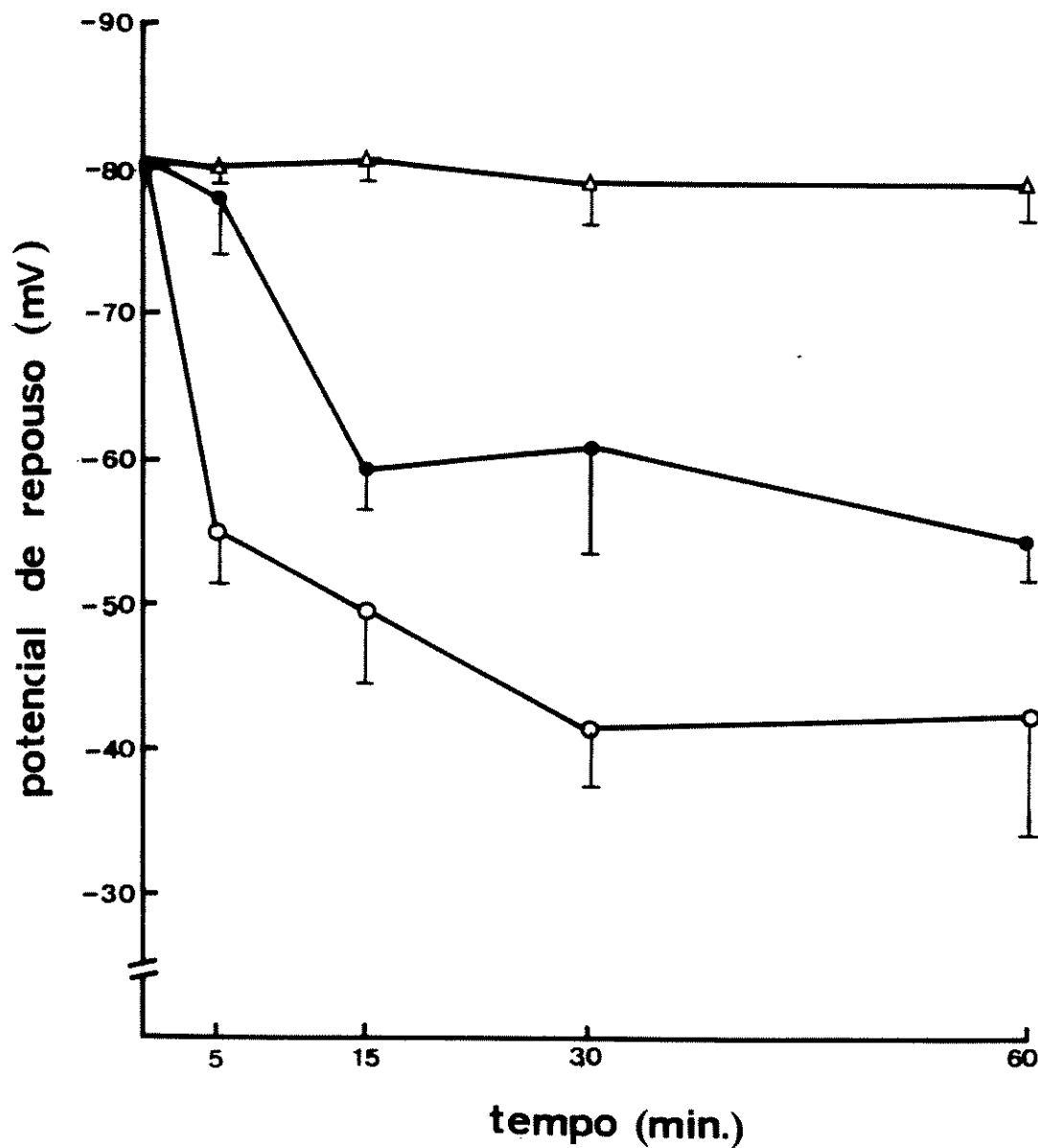


Figura 11: Efeito da peçonha de *Bothrops insularis* no potencial de repouso da fibra muscular. Preparação músculo diafragma isolado de camundongo. (Δ—Δ) controle; (●—●) 40 µg/ml; (○—○) 80 µg/ml. Observar a rapidez com que a despolarização se instala, sua persistência ao longo do tempo e seu caráter dose-dependente. Os pontos representam a média ± erro padrão de 3 a 5 experimentos.

peçonha coincidiu com o aparecimento de intensa fibrilação do músculo. Nos experimentos controles (n=3) não se observou mudança no PR.

7 -ESTUDO MORFOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA PEÇONHA:

1) Músculo peitoral esquerdo:

A) Controle (n=3): O músculo peitoral esquerdo de pintainhos injetados com 0,1 ml de salina estéril e sacrificados 2, 12 e 24 horas, mostrou estrutura histológica normal, ou seja, as fibras musculares apresentavam seus núcleos alinhados periféricamente e organizavam-se em peixes paralelos envolvidos por tecido conjuntivo que forma o endomísio e perimísio. Os vasos sanguíneos, veias e artérias, apresentavam-se normais na aparência, às vezes livres de células sanguíneas, outras vezes com hemáceas em quantidade normal dentro da luz do vaso, a qual mostrava aspecto límpido (Figura 12).

B) Dose 0,4 µg/0,1ml (n=3): O grupo de animais que recebeu dose de 0,4 µg da peçonha teve sobrevivência de 24 horas. Grande parte das fibras musculares apresentavam-se íntegras. Outras porém, com eosinofilia aumentada mostravam picnose nuclear. A estriação transversal tornou-se imperceptível e as fibras

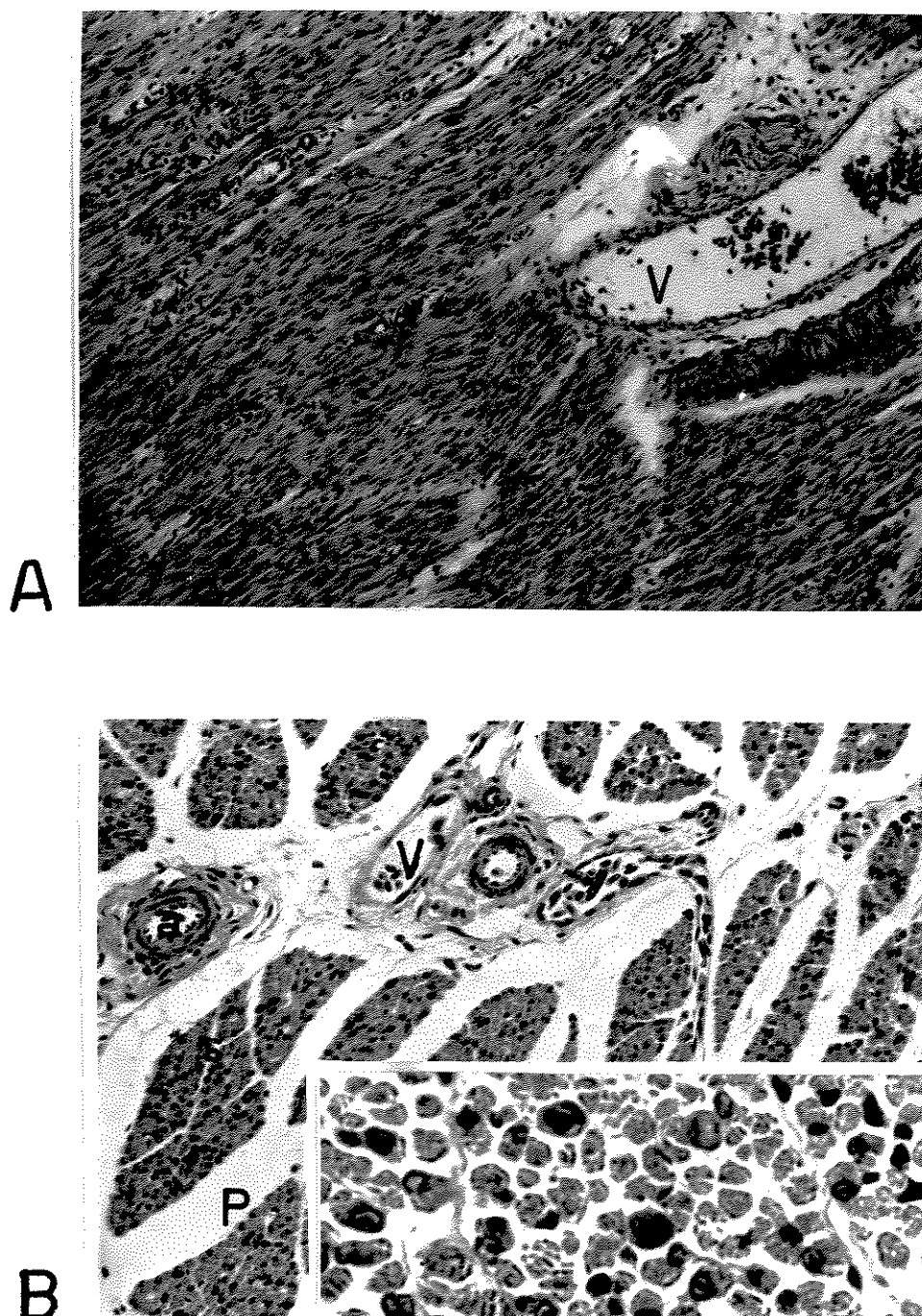


Figura 12: Secções histológicas em parafina do músculo peitoral de pintainho. A- Secção longitudinal mostrando o aspecto normal das fibras musculares esqueléticas. V- veias. B- Secção transversal dos feixes musculares que exibem aparência normal (feixes musculares paralelos envolvidos pelo endomísio (E) e perimísio (P); (a) artéria e (V) veia intactas. No detalhe, núcleos alinhados periféricamente). A e B : H.E. 117X; Detalhe: H.E. 147X.

adquiriram aparência amorfa. Entre alguns grupos de fibras ocorriam infiltrados inflamatórios extensos, com presença de células linfocitárias, plasmocitárias, além de granulócitos. A reação inflamatória era também perivascular, porém em menor escala. Principalmente nas veias encontravam-se trombos oclusivos e fibrina corada; o aspecto límpido da luz destes vasos desapareceu. A parede dos mesmos mostrou-se normal. Com a dose de $0,4 \mu\text{g}$ não foi detectado hemorragia (Figura 13), mesmo após 24 horas.

C) Dose $2 \mu\text{g}/0,1\text{ml}$ (n=3): Esta dose mostrou-se tóxica aos pintainhos, tendo estes que ser sacrificados após 2, 7:30 e 24 horas, dado os sinais clínicos que apresentavam. As alterações morfológicas foram semelhantes àquelas provocadas pela concentração de $0,4 \mu\text{g}$, aparentando ser em alguns cortes até mesmo de menor amplitude. Entretanto, aqueles animais que tiveram uma sobrevida maior, além das anormalidades morfológicas já apontadas, mostravam também hemorragia, a qual podia ser mais ou menos extensa dependendo do local ou do nível da secção histológica. Outra alteração observada com esta dose, independente do tempo de sobrevida, refere-se às hemáceas, que esporadicamente estavam descoradas, dando a impressão de só conterem o núcleo num espaço citoplasmático vazio (hemólise), além de exibirem arredondamento da forma.

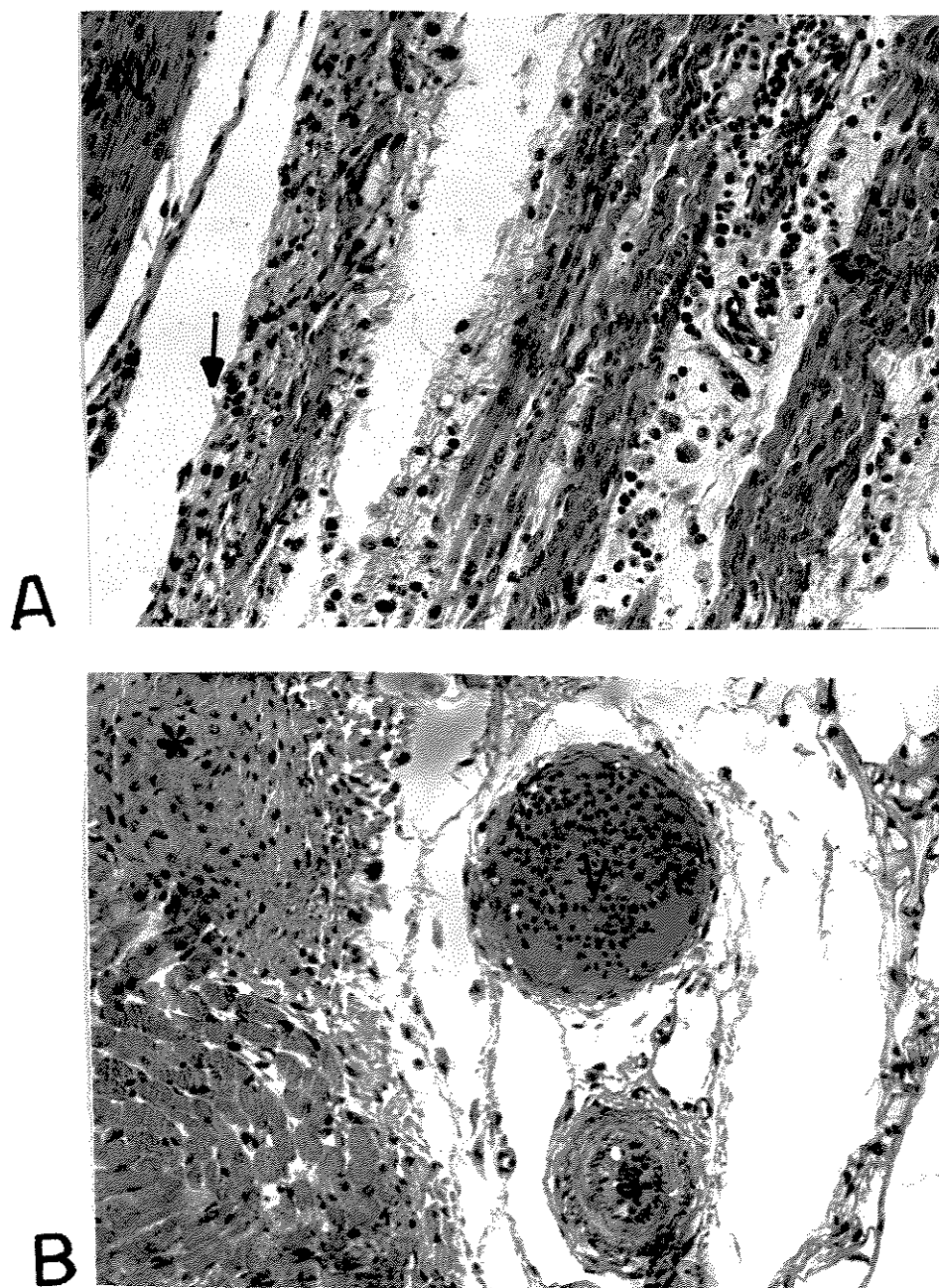


Figura 13: Injeção da peçonha de *Bothrops insularis* na dose de 0,4 μ g. Pintainho sacrificado após 24 horas da injeção. A- As fibras musculares apresentam-se anormalmente eosinófilas, frouxas, vacuolizadas e com a aparência fibrilar normal comprometida. Infiltrados inflamatório (seta) extenso com presença de células linfocitárias, plasmocitárias, histiocitárias além de granulócitos. São observados também feixes musculares com aparência normal (N). B- Aspecto amorfo e desorganizado das fibras musculares (*). Os vasos arteriais (a) e venosos (V) mostram trombos oclusivos e fibrina intensamente corada. Processo inflamatório presente. A e B: H.E. 234X.

D) Dose 4 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ (n=3): Também tóxica, esta dose levou ao sacrifício dos pintainhos 150 minutos após o envenenamento. As alterações morfológicas eram similares às descritas previamente. Adicionalmente algumas fibras musculares mostravam-se vesiculadas, e outras interrompidas por extensa reação inflamatória, com grande contingente de neutrófilos (tecidos de granulação). Muitas destas fibras musculares mostravam-se sem estriação transversal ou longitudinal e bastante eosinófilas.

E) Dose 8 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ (n=3): Nesta concentração da peçonha, os pintainhos foram sacrificados após 1:20 e 2:30 horas. As alterações morfológicas foram idênticas nos 3 animais, e quantitativamente parecem não diferir das observadas com a dose de 4,0 μg , a não ser pela presença de uma região periférica do músculo peitoral com grande número de fibras dispostas longitudinalmente com aspecto frouxo e pontos de interrupção das miofibrilas. Fibras musculares muito contraídas são observadas e também fibras vacuolizadas e em processo de necrose (Figura 14).

F) Dose 20 $\mu\text{g}/0,1$ (n=3): Os músculos peitorais de pintainhos estiveram sob a ação da peçonha nesta concentração "in vivo" por 1:30 e 2:00 horas. As anormalidades morfológicas foram em geral tempo dependentes, mas notou-se graus de alterações diferentes para animais distintos. Aos 120 minutos,

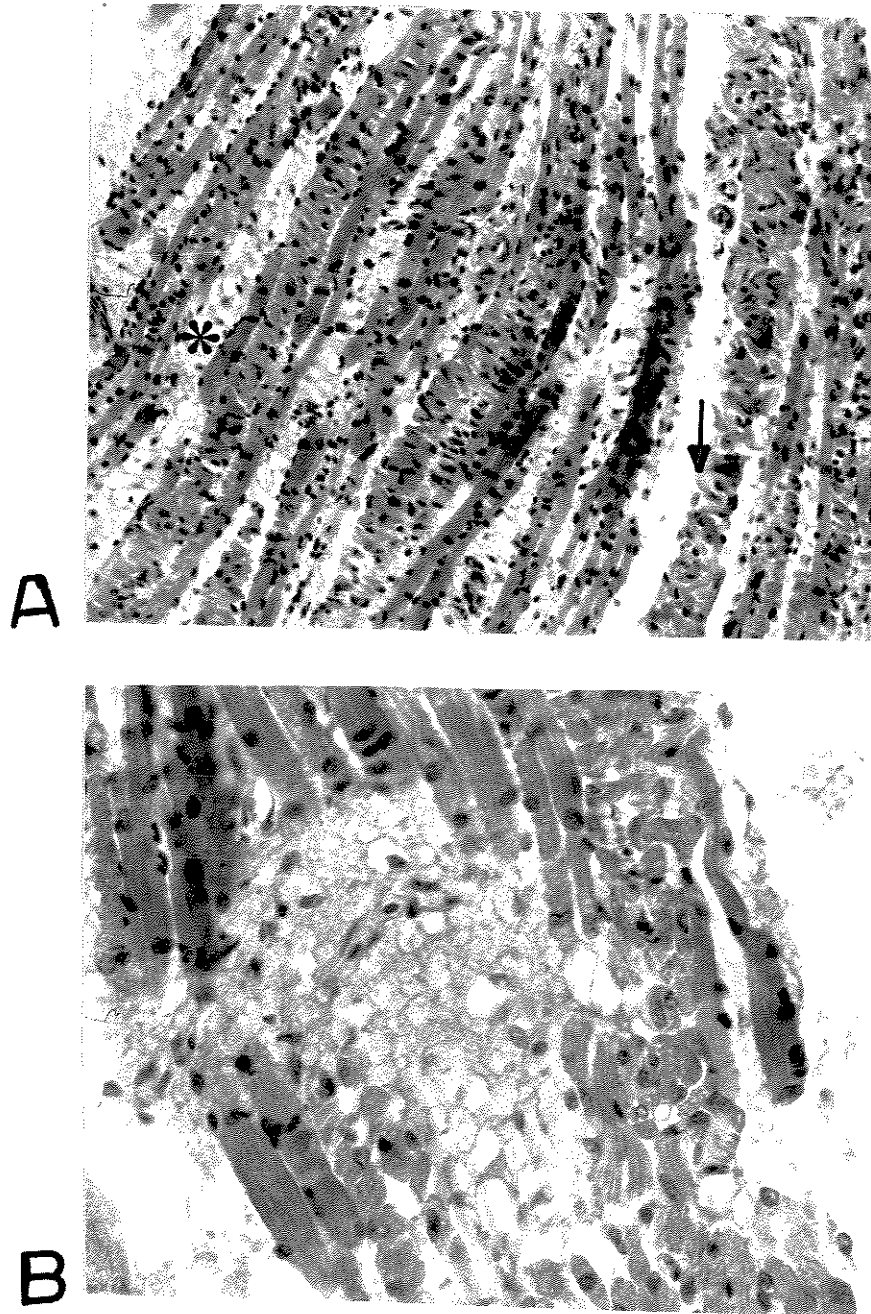


Figura 14: Injeção da peçonha de *Bothrops insularis* na dose de 8 μ g. Pintainho sacrificado após 80 minutos. A- Infiltrado inflamatório generalizado. Condensação do material miofibrilar com conseqüente desaparecimento da estriação (*). Fibras musculares altamente distorcidas pela contração (seta). B- Vacuolização das fibras com mionecrose das mesmas. A: H.E. 234X; B: H.E. 468X.

praticamente a área total do músculo peitoral estava invadida por extensa hemorragia composta por hemácias e derrame de fibrina que obliterava todos os espaços intercelulares do músculo. Em alguns vasos observavam-se trombos oclusivos. Aparentemente havia ausência de reação inflamatória, ou esta era incipiente. Necrose muscular localizada foi observada em alguns pontos do músculo. Por outro lado, hemácias hemolisadas podiam ser encontradas de modo difuso nos vários cortes histológicos examinados (Figura 15).

G) dose $80 \mu\text{g}/0,1\text{ml}$ (n=3): Com esta dose muito tóxica, apenas o tempo de 60 minutos foi alcançado após o envenenamento. As alterações já descritas pareciam ser de menor amplitude, principalmente no que se refere aos efeitos hemorrágicos. Nesta dose, foram encontrados grupos de hemácias hemolisadas e arredondadas descoradas, ao lado de células aparentemente normais nas suas características tintoriais e na sua forma (Figura 16).

2- Músculo biventer cervicis de pintainho

A) Controle (n=3): Os músculos biventer cervicis incubados com solução nutritiva de Krebs (Figura 17A) não mostraram diferenças morfológicas com relação às características apresentadas pelo músculo peitoral esquerdo (Figura 12) de pintainho injetado com solução salina. Eventuais

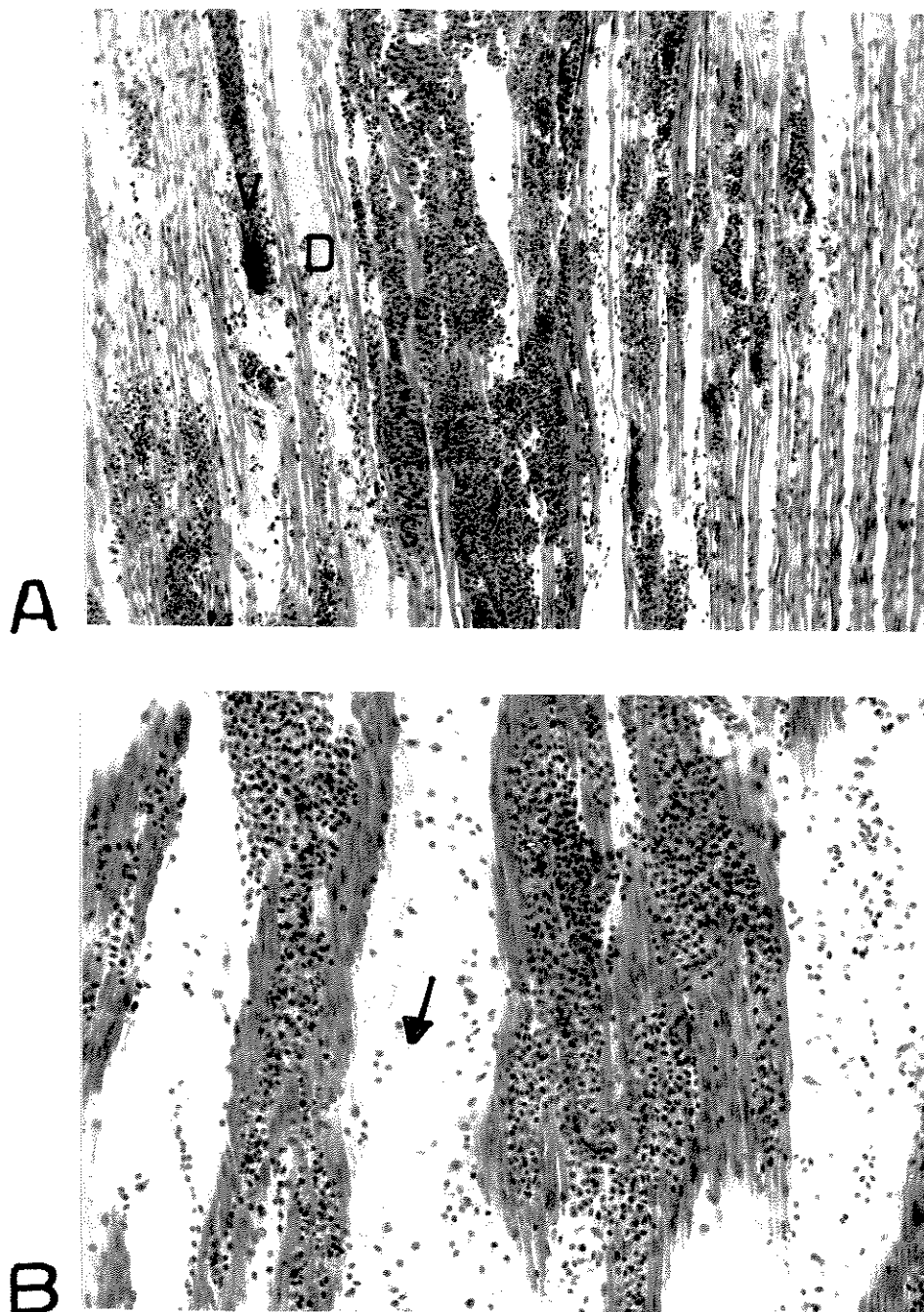


Figura 15: Injeção da peçonha de *Bothrops insularis* na dose de 20 μ g. Pintainho sacrificado após 90 minutos. Vista geral do extenso processo hemorrágico entre as fibras. A- Veia (V) com trombo oclusivo e derrame de fibrina (D). B- As fibras musculares parecem estar sendo dissolvidas como evidenciado por fibrilas esgarçadas presentes nos espaços celulares (seta). A: H.E. 117X: B: H.E. 234X.

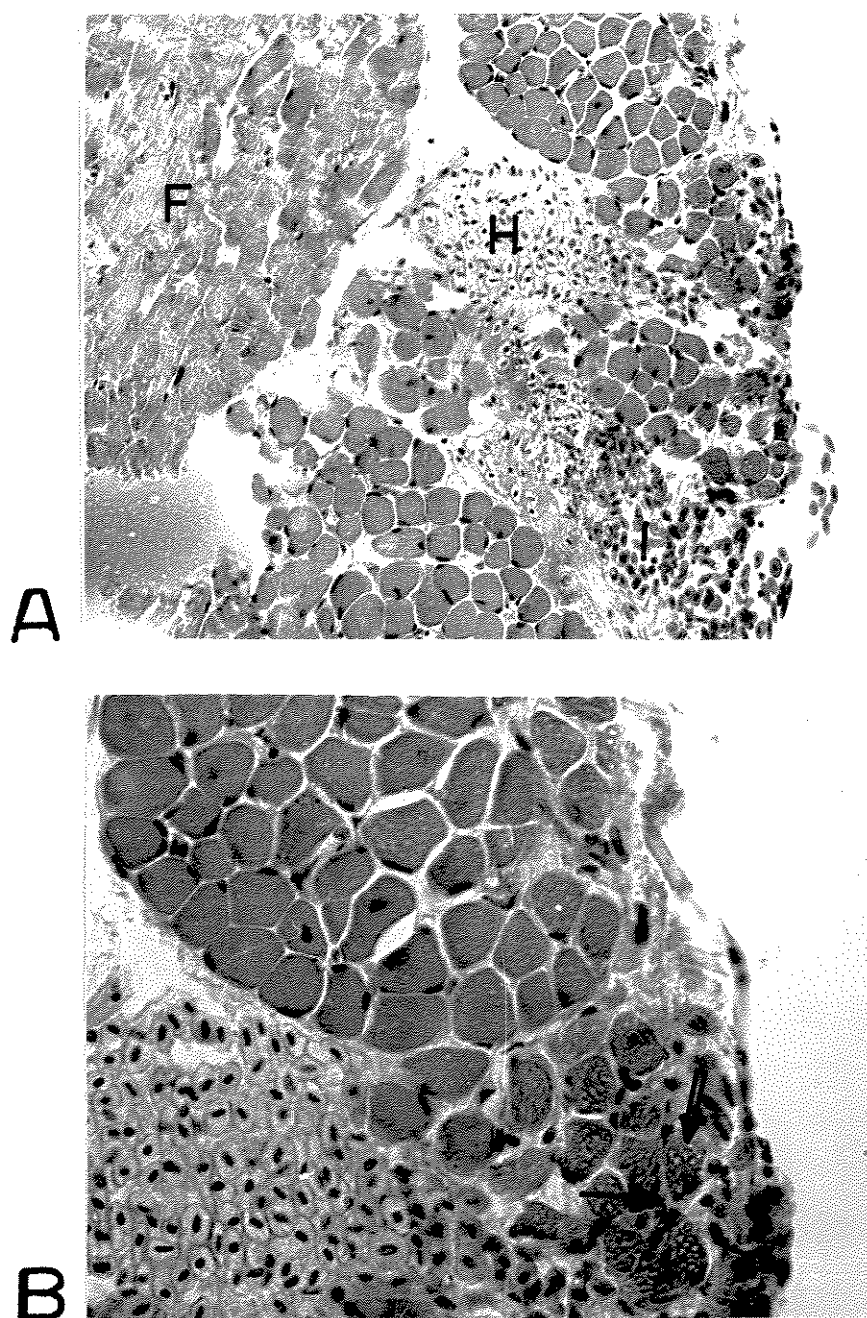


Figura 16: Injeção da peçonha de *Bothrops insularis* na dose de 80 μ g. Pintainho sacrificado após 60 minutos. A- Fibras musculares necróticas e anucleadas (F). Hemorragia mostrando hemácias hemolisadas (H) e intactas (I). B- Detalhe da figura anterior (16A). Necrose aguda das fibras musculares, lise do citoplasma da célula evidenciado pelas vesículas (seta dupla). Algumas células tem indício de picnose nuclear (seta simples) A: H.E. 234X; B: H.E. 468X.

A



B

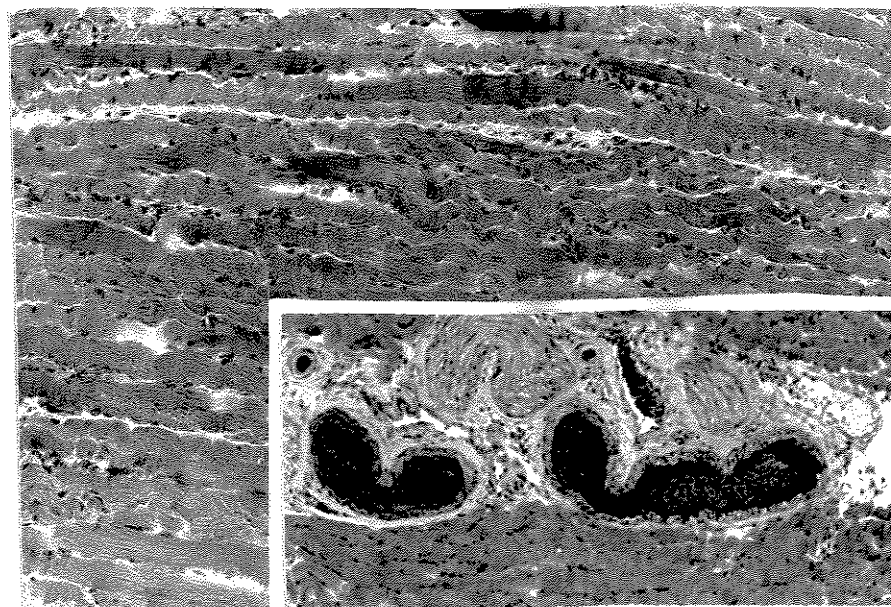


Figura 17: Músculos biverter cervicis de pintainho incubados durante 120 minutos. A- controle: incubação com solução nutritiva de Krebs. Observar as fibras musculares em secção histológica longitudinal mostrando aspecto normal. B- Preparação incubada com a peçonha de *Botrops insularis* (20 $\mu\text{g/ml}$). Notar a contratura das fibras musculares visíveis neste aumento. No detalhe vasos sanguíneos com trombos oclusivos. A e B: H.E. 160X. Detalhe: 147X.

características morfológicas não exatamente idênticas decorrem da influência do fator idade dos animais, a qual varia de 4 a 8 dias. Essas diferenças de idade eram perfeitamente identificáveis pela diferença de tamanho e portanto de peso dos animais que variou de 40 a 50 g.

B) Peçonha de *Bothrops jararaca*. Dose 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=3): As fibras musculares apresentaram aspecto vítreo, com ausência de estriações transversais e acentuada eosinofilia. Infiltrado inflamatório e fibras musculares com hipercontração com zonas de infiltração leucocitária também foram encontrados. Há regiões do músculo com área de lise evidente no citoplasma da célula muscular com interrupção das miofibrilas. Tais características morfológicas evidenciam necrose muscular e picnose nuclear (Figura 18A).

C) Peçonha de *Bothrops insularis*. Dose 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=3): Através da morfologia, as alterações observadas no músculo biventer cervicis de pintainhos incubados com essa peçonha, mostraram alterações que aparentemente são semelhantes àquelas causadas pela peçonha de *Bothrops jararaca* nas mesmas condições (Figuras 17B e 18A respectivamente). Além disso os vasos sanguíneos, principalmente os arteriais

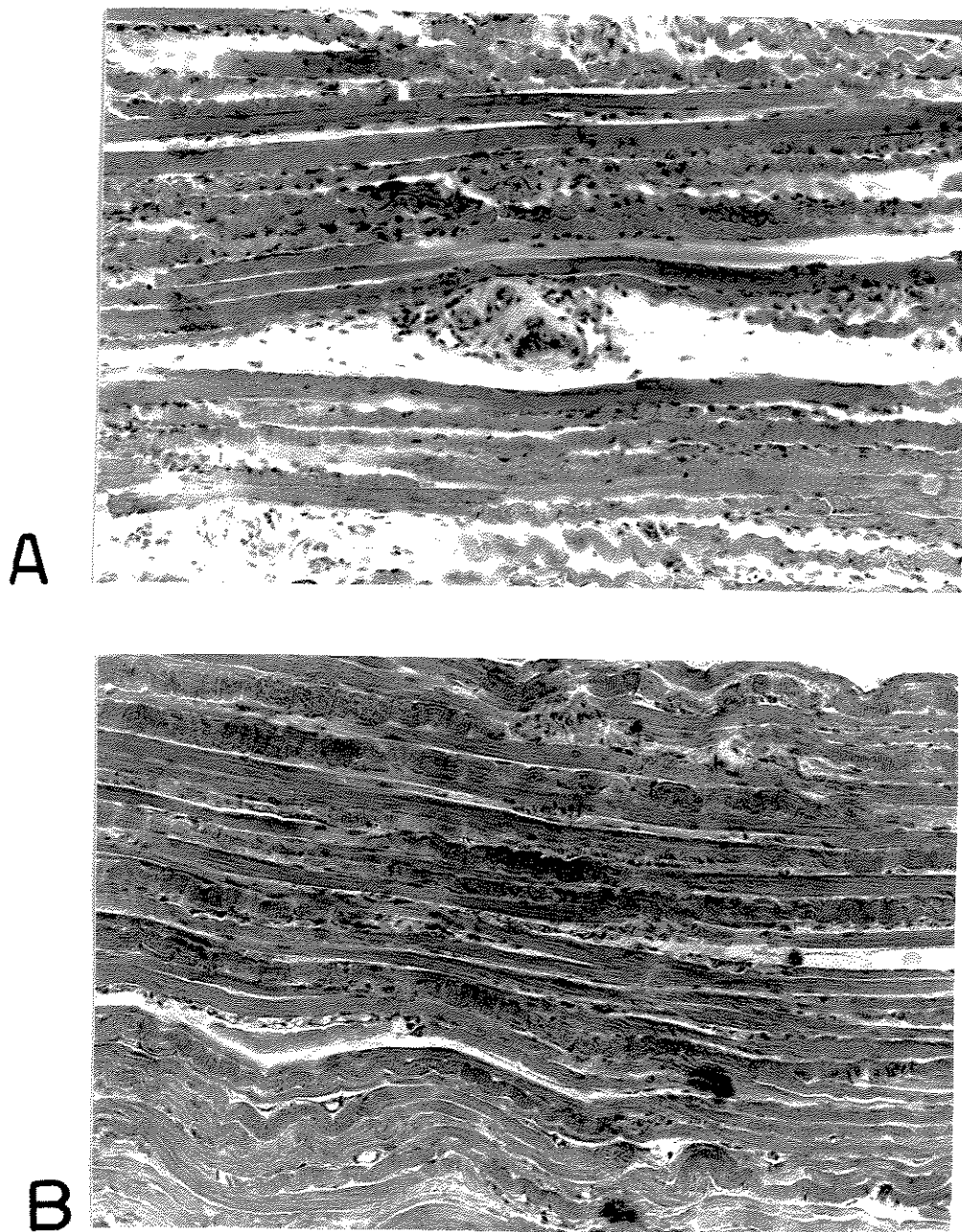


Figura 18: Preparações *in vitro* do músculo biventer cervicis de pintainho incubado por 120 minutos. A- Peçonha de *Bothrops jararaca* (80 $\mu\text{g/ml}$); B- Peçonha de *Bothrops insularis* (80 $\mu\text{g/ml}$). Seções histológicas apresentando aspecto semelhantes (contratura e áreas com lise do citoplasma). Notar infiltração leucocitária no músculo tratado com peçonha de *Bothrops jararaca*. A e B: H.E. 160X.

apresentaram-se ocluídos por hemácias. Entretanto, não se observaram extravasamento de elementos figurados e derramamento de fibrina entre as fibras musculares dos músculos tratados *in vitro*, fato que é observado nos animais que foram injetados *in vivo* com a peçonha de *Bothrops insularis*, os quais mostraram extensa hemorragia intercelular (Figura 14 e 15).

D) Peçonha de *Bothrops insularis*. Dose 80 $\mu\text{g/ml}$ (n=3): As alterações morfológicas observadas com esta dose da peçonha foram semelhantes às observadas com a dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ da peçonha de *Bothrops insularis* e 80 $\mu\text{g/ml}$ da peçonha de *Bothrops jararaca*.

8 - LIBERAÇÃO DE CK DO MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO:

Em baixas concentrações da peçonha de *Bothrops insularis* (0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/ml}$), os níveis de CK ficaram dentro dos valores normais do controle que variou entre 50 e 120 UI/l (n= 2 para cada concentração). A liberação de CK promovida pela dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ (n=4) não foi estatisticamente diferente do controle. Uma liberação significativa de CK ($p < 0,01$) só foi detectada com a dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ (n=3), onde foram atingidos valores de 330 UI/l após 40 minutos e de 400 UI/l após 80 e 120 minutos contados a partir da adição da peçonha ao banho. Os resultados obtidos com a dose de 40 $\mu\text{g/ml}$ (n=5) não foram significativamente diferentes daqueles obtidos com a dose de

20 $\mu\text{g/ml}$. Já com a dose de 80 $\mu\text{g/ml}$ (n=7) a liberação de CK atingiu valores de até 1600 UI/l. Verificamos portanto uma dose-dependência na liberação da enzima CK (Figura 19). Verificamos também liberação de CK quando adicionamos 80 $\mu\text{g/ml}$ (n=3) da peçonha de *Bothrops jararaca* ao banho em níveis semelhantes àqueles obtidos com as doses de 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$ da peçonha de *Bothrops insularis* (Figura 20).

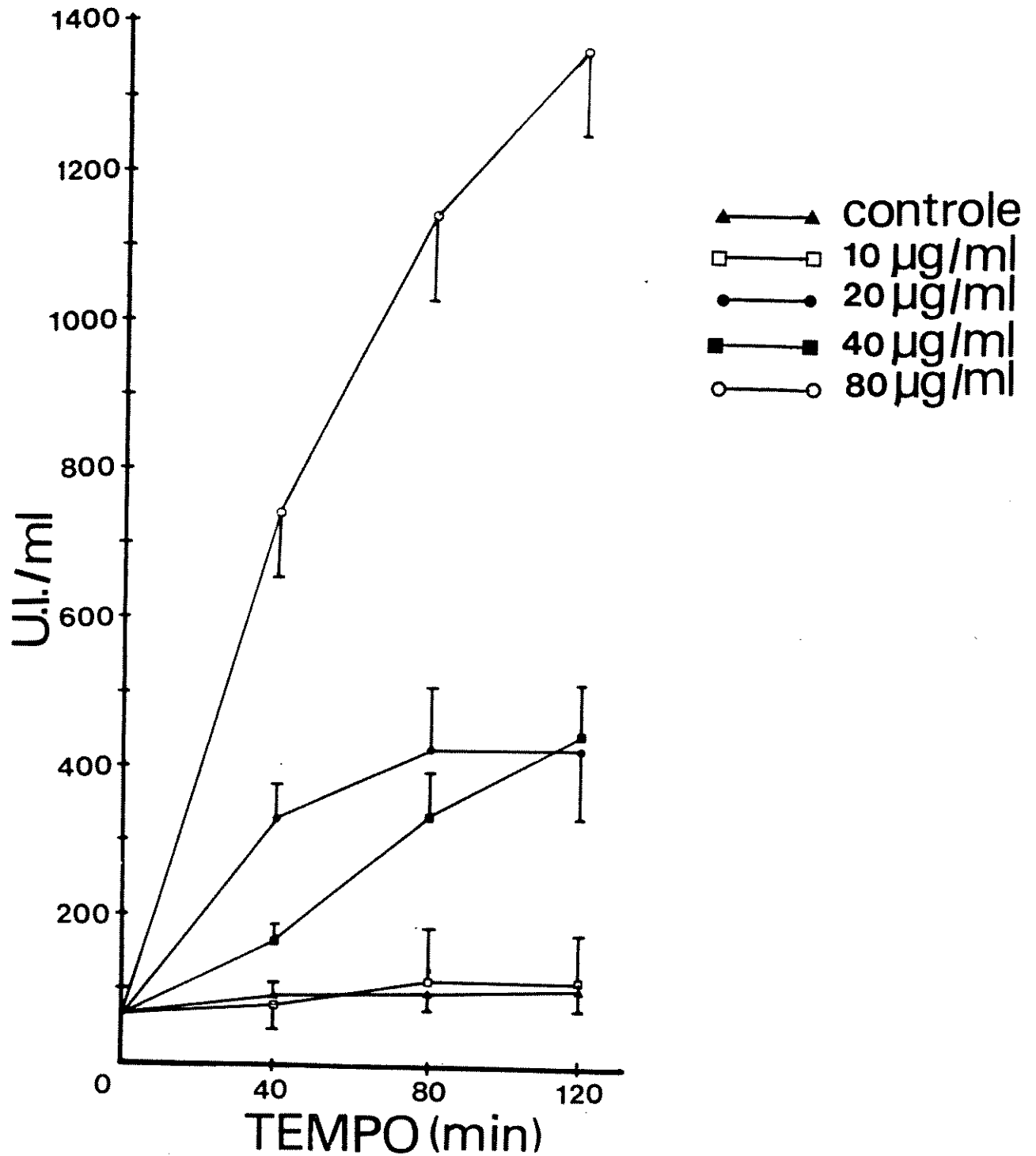


Figura 19: Liberação de CK pela peçonha de *Bathrops insularis*. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 5 experimentos.

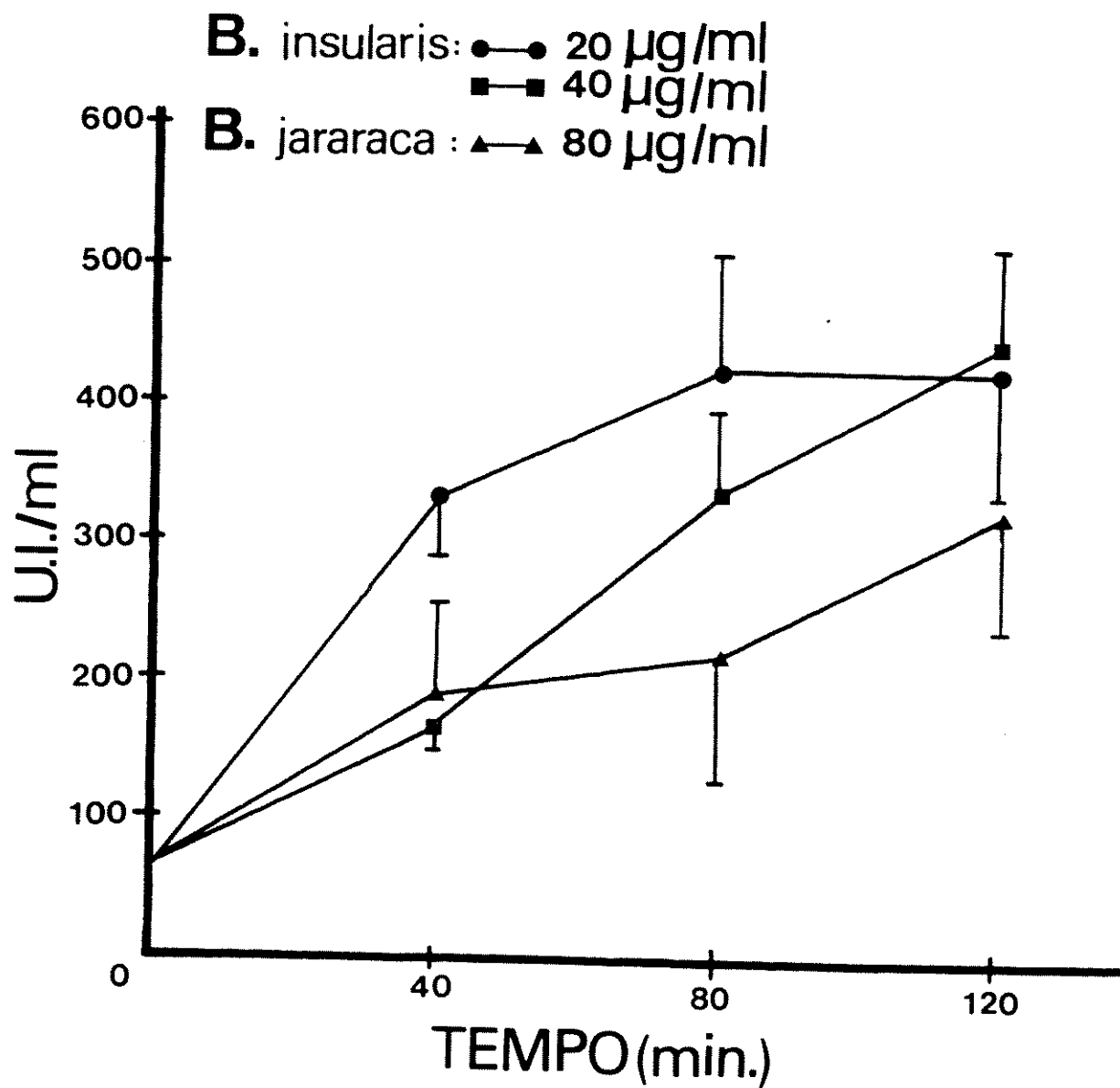


Figura 20: Liberação de CK pelas peçonhas de *Bothrops insularis* e de *Bothrops jararaca*. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 3 experimentos para a *Bothrops jararaca* e de 5 experimentos para *Bothrops insularis*.

DISCUSSÃO

Os estudos das peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* tem sido geralmente direcionados aos efeitos que as mesmas causam no local da picada, efeitos estes caracterizados por hemorragia, edema e mionecrose. desconhecendo-se, com exceção da *Bothrops jararacussu* (Rodrigues-Simioni et al., 1983), uma ação neurotóxica promovida por esse tipo de peçonha.

A peçonha da *Bothrops insularis*, a jararaca ilhêa, é única. Sua toxicidade é superior em média cinco vezes a da *Bothrops jararaca*, quando se utiliza o pintainho como animal de experimentação, podendo imobilizar sua vítima em segundos. Este efeito reproduziu-se em nossos experimentos através de injeções de doses variadas.

De fato, os sintomas apresentados caracterizaram o comprometimento da musculatura em geral. O aparecimento de flacidez muscular (por perda do reflexo e do tônus) que se observa logo após a administração da peçonha de *Bothrops insularis* foi evidente, sendo semelhante a uma curarização.

Como se sabe, o efeito curarizante está relacionado à ocupação dos receptores colinérgicos nicotínicos da placa terminal não havendo entretanto mudança na quantidade de acetilcolina liberada, podendo o bloqueio ser revertido pela

neostigmina. A *Bungarus multicinctus* é um exemplo pois, contém em sua peçonha uma toxina de ação pós-sináptica denominada bungarotoxina, que exhibe essas características assinaladas (Chang, 1979).

A diminuição da resposta à acetilcolina em preparações de aves tratadas pela peçonha de *Bothrops insularis*, sugere que a mesma se fixou de forma irreversível aos receptores pós-juncionais não podendo ser deslocada após a lavagem da preparação. Segundo Chang e Su (1975), a acetilcolina extrínscica quando colocada em preparações biventer cervicis de pintainho, atua de preferência em receptores extra-juncionais, tendo pouca atuação nos receptores juncionais. O fato das contrações musculares evocadas pelo estímulo terem sido completamente bloqueadas e haver ainda resposta parcial à acetilcolina extrínscica, reforça a idéia de que o sítio de ação dessa peçonha é principalmente a nível do receptor juncional da terminação nervosa.

Além do efeito competitivo, a despolarização persistente da região da placa terminal poderia ser responsabilizada pelo bloqueio observado a exemplo do que ocorre com a peçonha de *Bothrops jararacussu* bem como o Pool IV obtido no fracionamento desta peçonha (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983.).

Essa despolarização medida através do PR foi coincidente no tempo com a contratura observada em registro

miográfico em todas as preparações com aves. Portanto, uma ação direta na fibra muscular é também sugerida tanto pela fasciculação como pela diminuição do PR nesta região observada durante os experimentos realizados.

Já a inibição parcial da contratura observada em experimentos realizados a 24°C, revela uma possível ação da fosfolipase A₂ presente nesta peçonha (Selistre *et al.*, 1990), pois é sabido que essas enzimas caracterizam-se por uma ação temperatura-dependente.

Não descartamos a possibilidade de o efeito bloqueador ter também uma origem miotóxica, uma vez que Selistre (1990) determinou edema, hemorragia e mionecrose cinco minutos após a administração da peçonha de *Bothrops insularis* em músculo tibial anterior de camundongo.

As alterações morfológicas revelaram mionecrose e anormalidades vasculares além de hemorragia. Entretanto se compararmos os resultados do tratamento *in vivo* com aqueles do tratamento *in vitro*, as alterações morfológicas não foram exatamente iguais. A mionecrose e os efeitos vasculares foram mais intensos nos animais que receberam a peçonha pela via intramuscular. Por outro lado, a comparação entre os efeitos das doses de 20 e 80 µg/ml no tratamento *in vitro*, não permitiu uma correlação objetiva indicando um efeito mais intenso quando da dose de 80 µg/ml como era de se esperar. Atribuimos essa dificuldade ao fato de não

termos efetuado cortes seriados ou semi-seriados que permitiriam uma avaliação em profundidade da mionecrose. na espessura do músculo, e de estudos morfométricos quantitativos que possibilitariam confirmar esta hipótese de forma objetiva. Assim sendo, uma avaliação subjetiva pode incorrer em erros uma vez que não existe uma manifestação morfológica profundamente diferente nos casos supramencionados.

Em músculos incubados com a peçonha, o processo inflamatório foi menos acentuado, havendo ausência de extravasamento de fibrina e menor intensidade dos efeitos mionecróticos, quando comparados aos observados nas preparações *in vivo*. Com relação ao extravasamento de elementos figurados, supomos que a sua ausência possa decorrer dos processos de lavagem a que o músculo foi submetido. Podemos considerar também o fato de que as substâncias liberadas na microcirculação bem como a coagulopatia de consumo exerçam um sinergismo em relação aos efeitos descritos anteriormente.

A miotoxicidade tem sido observada em muitas peçonhas botrópicas ou não (Gutiérrez *et al.*, 1980; Mebs *et al.*, 1983; Owmy *et al.*, 1983; Queiroz *et al.*, 1985a; Queiroz *et al.*, 1985b; Gutiérrez e Lomonte, 1989 e Gutiérrez *et al.*, 1990), efeito este que é atribuído à presença de fosfolipase A₂ ou à formação de trombos vasculares que determinariam uma hipóxia, podendo a mionecrose ser decorrente de ambas as

alterações supramencionadas (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Queiroz et al., 1983 e Homma e Tu, 1971). Resultados análogos foram obtidos em nossos experimentos, indicando que a fosfolipase A_2 talvez possa estar envolvida no processo mionecrótico que se observou, agindo de maneira semelhante às fosfolipases encontradas em outras peçonhas.

Queiroz et al. (1983) detectaram vacuolização das fibras musculares e fragmentação de miofibrilas dez minutos após a adição ou incubação da peçonha de *Bothrops jararacussu* indicativas de um início de mionecrose. Portanto, o bloqueio muscular por nós observado quinze minutos após a adição da peçonha na preparação de aves, pode ser em parte ocasionado pelas lesões das fibras musculares tal como observadas no músculo peitoral injetado como no próprio músculo biventer cervicis incubado.

Em doses menores, a peçonha em estudo mostrou um paralelismo entre o tempo de bloqueio observado nas preparações musculares de aves e o tempo de aparecimento de mionecrose nas fibras musculares do músculo peitoral. Assim evidencia-se o envolvimento da mionecrose no bloqueio observado. Entretanto, o grau de participação da atividade mionecrótica é por enquanto difícil de ser avaliado.

Muitos autores encontraram uma correlação entre a liberação de CK e mionecrose servindo-se desta medida para avaliar o grau de mionecrose.

As peçonhas botrópicas possuem a capacidade de liberar CK devido aos componentes que rompem a membrana celular. A CK é uma enzima que transfere grupos fosfato da fosfocreatina ao ADP, transformando-o em ATP (Reação de Lohmann), o qual é imediatamente utilizado pela célula como fonte imediata de energia para a contração muscular. Sendo uma enzima essencialmente citoplasmática, seu aparecimento no líquido nutritivo pode indicar alterações na permeabilidade da membrana ou mesmo de lesões celulares (Suarez-Kurtz, 1983).

Vários autores (Gutiérrez et al., 1980; Melo e Suarez Kurtz, 1987; Melo e Suarez Kurtz, 1985; Moreno e Gutiérrez, 1988) admitem a existência de uma correlação entre os níveis de CK liberado e a lesão celular provocada pelas miotoxinas. A importância desta dosagem reflete-se no fato de ser possível estimar a quantidade de peçonha inoculada a partir da concentração plasmática desta enzima, como descrito por Nakada et al. (1980) para a peçonha de *Trimeresurus flavoviridis*. Mebs (1983) adverte entretanto, que a necrose não pode ser avaliada por um único método, como a dosagem de CK, e sim deve ser acompanhada de exames macroscópicos, microscópicos (morfologia) e testes bioquímicos.

Em nossos experimentos (preparações *in vitro*), verificamos alterações drásticas nos níveis de CK devido à atividade miotóxica da peçonha de *Bothrops insularis*,

causando danos no sarcoplasma celular com conseqüente liberação desta enzima. Esta liberação se mostrou dose-dependente e foi proporcional ao grau de lesão observado na morfologia em animais tratados *in vivo*. A peçonha de *Bothrops jararaca* também liberou CK pelo mesmo mecanismo, só que em menor escala.

A falta de correlação entre a curva dose-dependência dos níveis de CK e a constatação da correspondente mionecrose por nós observada quando comparamos as ações das peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops insularis* (80 $\mu\text{g/ml}$) em músculo incubado, pode decorrer tanto da não efetuação de cortes seriados ou semisseriados, quanto de que os efeitos fisiológicos e bioquímicos são mais imediatos do que o aparecimento das alterações morfológicas, tal como foi observado por Cruz-Hofling *et al.* (1983/84).

O que também fica evidente em nossas pesquisas é que a peçonha de *Bothrops insularis* induz uma facilitação da transmissão neuromuscular nas preparações de mamífero antes do aparecimento do bloqueio, o que é incomum nas peçonhas botrópicas. Esse efeito pré-juncional é comum em peçonha de serpentes da Família *Elapidae*, representada no Brasil pela cobra coral ou seja, pela *Micrurus corallinus* (Vital Brazil e Fontana, 1983/84). As mambas africanas como a *Dendroaspis angusticeps* possuem em sua peçonha um polipeptídeo que também exhibe este efeito pré-juncional, aumentando a

amplitude das contrações musculares (Harvey e Karlsson, 1984).

A crotamina, uma toxina isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (Família *Viperidae*), possui um efeito facilitador da transmissão neuromuscular em resposta ao estímulo elétrico (Vital Brazil et al, 1971; Vital Brazil et al, 1979 e Chang e Tseng, 1978). Essa toxina promove um aumento na condutância ao íon sódio alterando o transcurso normal da transmissão. Pellegrini (1978) verificou em preparações tratadas com essa toxina, um aumento da frequência dos p.p.t.m., seguido por uma diminuição da amplitude dos mesmos. Isolada desta mesma peçonha, a crotoxina, que é uma neurotoxina, foi estudada por Vital Brazil e Excell (1971), Vital Brazil (1972) e Hawgood (1979). Estes autores verificaram que esta neurotoxina possui ação pré-juncional.

O fato da miografia ter revelado que a peçonha de *Bothrops insularis* é mais tóxica do que a peçonha de *Bothrops jararaca* tanto em preparações de mamíferos quanto de aves, sugere que a exemplo da *Bothrops jararacussu* (Rodrigues-Simioni et al, 1983), a peçonha da *Bothrops insularis* possua componente(s) com ação neurotóxica.

A presença de componente(s) de ação pré-juncional na peçonha em estudo é fortemente sugerida, não só pelo fato de haver aumento na amplitude das contrações musculares como também pelo aumento da frequência dos p.p.t.m.. Além disso,

o fato de o efeito facilitador traduzido pelo aumento das contrações estar ausente em preparações de mamíferos após o tratamento com d-Tubocurarina, vem reforçar esta hipótese.

Devido à ação em conjunto das toxinas que compõem a peçonha, é difícil responder a várias perguntas que envolvem os mecanismos pelos quais essa peçonha desencadeia seus efeitos. Seu fracionamento poderá assim esclarecer tais mecanismos através do estudo dos componentes isolados nas preparações acima descritas.

Finalmente, o que queremos enfatizar é que há uma semelhança entre a peçonha da *Bothrops insularis* e as peçonhas das serpentes do gênero *Micrurus*, *Crotalus* e *Bothrops*. Em relação à semelhança com a peçonha elapídica, destacamos a facilitação da transmissão e o acoplamento aos receptores pós-juncionais da placa motora. Em relação à peçonha crotálica, notamos que a peçonha de *Bothrops insularis* também possui uma ação neurotóxica devido à sua ação pré-juncional. Já em relação às peçonhas bothrópicas, verificamos a presença de efeitos locais traduzidos por edema, hemorragia e necrose além de distúrbios vasculares. As fosfolipases, as enzimas proteolíticas e as hemorraginas, presentes na peçonha, bem como substâncias por ela liberadas são as responsáveis por tais efeitos.

RESUMO E CONCLUSÕES

A peçonha da *Bothrops insularis* (jararaca-ilhãa) foi estudada em aves *in vivo* (toxicidade e estudo morfológico) e *in vitro* (estudo miográfico, eletrofisiológico e morfológico acompanhado de dosagem de CK), comparando seus efeitos com aqueles da peçonha de *Bothrops jararaca*. Os resultados obtidos levam às seguintes conclusões:

1) A toxicidade da peçonha de *Bothrops insularis* é superior à da peçonha de *Bothrops jararaca* cerca de 5 vezes, mostrando-se as aves muito mais sensíveis à peçonha de *Bothrops insularis* do que os mamíferos.

2) A peçonha da *Bothrops insularis* age na junção neuromuscular possuindo ações tanto pré (ação facilitadora da transmissão neuromuscular) como pós juncionais (contratura e bloqueio da transmissão neuromuscular).

3) A peçonha de *Bothrops insularis* mostrou-se mais potente também nas preparações musculares *in vitro* de aves quando comparada com as preparações musculares *in vitro* de mamíferos, sendo esta atividade dose-dependente. O mesmo pode-se dizer quando comparada com a peçonha de *Bothrops jararaca* nas preparações *in vitro*.

4) Existe também uma ação direta da peçonha na fibra muscular detectada através da degeneração muscular observada tanto nos músculos de pintainhos que foram injetados com a peçonha como nos músculos de pintainhos incubados com a mesma.

5) Devido à degeneração muscular, verifica-se nos músculos tratados *in vitro*, um aumento nos níveis de liberação de CK o qual é dose-dependente. A liberação de CK *in vitro* é também verificada com a peçonha de *Bothrops jararaca* sendo entretanto essa liberação de menor intensidade do que aquela causada pela *Bothrops insularis*.

ABSTRACT

The effects of *Bothrops insularis* (jararaca-ilh a) venom were examined, *in vivo* in birds (toxicity and morphological studies) and *in vitro* (myographical electrophysiological and morphological studies together with the measurement of CK levels). These effects were compared to those of *Bothrops jararaca*. The results obtained allow the following conclusions to be drawn.

1) The toxicity of *Bothrops insularis* venom is about five times greater than that of *Bothrops jararaca*. Birds are much more sensitive to *Bothrops insularis* venom than are mammals.

2) *Bothrops insularis* venom acts on the neuromuscular junction both presynaptically, to facilitate neuromuscular transmission, and postsynaptically, to induce contracture and blockage of neuromuscular transmission.

3) *Bothrops insularis* venom is more potent in *in vitro* muscle preparations of birds than of mammals. This potency is dose-dependent. This venom is also more potent in these preparations than that of *Bothrops jararaca*.

4) The venom of *Bothrops insularis* has a direct action on muscle fibers as demonstrated by the muscle degeneration observed *in vivo* in chicks injected with the venom and *in vitro* in muscle incubated with venom.

5) The muscle degeneration observed *in vitro* resulted in a dose-dependent release of CK. *Bothrops jararaca* venom also caused the release of CK *in vitro*, although this effect was less marked than that observed with *Bothrops insularis* venom.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, A. Excursão à Ilha da Queimada Grande. Coletânea dos Trab. do Inst. Butantan, II:49-55, 1918/19.
- AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ofídeos do Brasil-A-Parte I - Descrição de uma nova espécie. Anexo das Memórias do Inst. Butantan, 1 (1):19-37, 1921a.
- AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ofídios do Brasil - A - Parte II - Biologia da nova espécie *Lachesis insularis*. Anexo das Memórias do Inst. Butantan, 1 (1):40-44, 1921b.
- AMARAL, A. Contribuição à biologia dos ofídios brasileiros (habitat, hábitos e alimentação) - Primeira nota prévia. Coletânea dos Trab. do Inst. Butantan, II:177-181 1918/24.
- BULBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation on the rat. Brit. J. Pharmacol 1:38, 1946.
- CHANG, C. C. The action of snake venoms on nerve and muscle. In: LEE, C. Y.. Snake venoms. Berlin, Springer-Verlag, 1979. p.309-359.
- CHANG, C. C. & SU, M. J. Further evidence that extrinsic acetylcholine acts preferentially on extrajunctional receptors in the chick biventer cervicis muscle. E. J. Pharmacol., 33:337-344, 1975.
- CHANG, C. C.; SU, M. J.; TANG, S. S. An analysis of the mode of action of carbachol on the chick biventer cervicis nerve muscle preparation. E. J. Pharmacol., 36:199-210, 1976.

- CHANG, C. C. & TSENG, K. H. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 63:551-559, 1978.
- CINTRA, A.C.D.; LAURE, O.B.; PRADO FRANCESCHI, J.P.; GIGLIO, J.R. Bradykinin potentiating peptides from the venom of *Bothrops insularis*. Isolation and primary structure. *Arq. Biol. Tecnol.*, 27(2):248, 1984.
- CRUZ-HOFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; VITAL BRAZIL, D. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*, 47/48:95-105, 1983/84.
- DE ROBERTIS, E. & BENNETT, H. S. Some feature of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biochem. Cytol.*, 1: 47-58, 1955.
- FATT, P. & KATZ, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve-ending. *J. Physiol.*, 117:109-128, 1952.
- GINSBORG, B. L. Spontaneous activity in muscle fibers of the chick. *J. Physiol.*, 150:707-717, 1960.
- GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. *Brit. J. Pharmacol.*, 15:410, 1960.
- GRMEK, M.D. Notes inédites de Claude Bernard sur les propriétés physiologiques des poisons de fleches (curare, upas, strychnine et autres). In: *Biologie Médicale*. Paris Vol. LV, 1966.
- GUTIERREZ, J. M.; ARCE, V.; BRENES, F.; CHAVES, F. Changes in miofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by miotoxin isolated from the venom of snake *Bothrops asper*. *Experimental and Molecular Pathology.*, 52:25-36, 1990.
- GUTIERREZ, J. M.; ARROYO, O.; BOLANOS, R. Mionecrosis hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*, 18:603-610, 1980.

- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. Mem. Inst. Butantan, 51(4):221-223, 1989.
- HARVEY, A.L.; KARLSSON, E. Polypeptide neurotoxin from mamba venoms that facilitate transmitter release. TIPS, 71-72, 1984.
- HAWGOOD, B. J. & SANTANA DE SÁ. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component Phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. Neuroscience., 4 (2):293-302, 1979.
- HODGKIN, A.L. Evidence for electrical transmission in nerve-Part I. J. Physiol., 90:183-232, 1937.
- HODGKIN, A. L. & HUXLEY, A. F. The components of membrane conductance in the axon of *Loligo*. J. Physiol., 116:473-496, 1952a
- HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of giant axon of *Loligo*. J. Physiol., 116:449-472, 1952b.
- HODGKIN A. L.; HUXLEY, A. F.; KATZ, B. Measurement of current-voltage relation in the membrane of the giant axon of *Loligo*. J. Physiol., 116:424-448, 1952c.
- HOMMA, M.; TU, A. T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. Br. J. Path., 52:538-542, 1971.
- LING, G. & GERARD, R.W. The normal membrane potentials of frog sartorium fibers. J. Cell. Comp. Physiol., 34:383-396, 1949.

- LOBO ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Comparison of the phospholipase A₂, blood-clotting, caseinolytic, estereolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. In: THIRD PAN-AMERICAN SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS. 3., Daxtepec, 1990. *Toxicon*, 28(6): 601, 1990.
- MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.*, 1:335, 1970.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle relationship to serum Creatine Kinase. *Toxicon*, 21(3):339-404, 1983.
- MELO, P. A. & SUAREZ-KURTZ, G. Effects of polianions on the stimulation of sarcoplasmic enzyme release induced by *Bothrops jararacussu* venom. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 18(5-6):754, 1985.
- MELO, P. A. & SUAREZ-KURTZ, G. Interation of *Bothrops* venoms and antivenin on the release of Creatine Kinase from skeletal muscle. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 20:821-824, 1987.
- MORENO, E. & GUTIERREZ, J. M. Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. *Toxicon*, 26(4): 403-409, 1988.
- NAKADA, F.; UEZU, N.; OHSHIRO, M.; MIYAGI, K. Relation between serum Creatine Phosphokinase activity and the amount of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) snake venom injected in thigh muscle in rabbits. *Toxicon*, 18:351-355, 1980.
- NASTUK, W. L. & HODGKIN, A.L. The electrical activity of single muscle fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 35:39-73, 1950.

- OWNBY, C.L.; ODELL, G.V.; WOODS, W.M.; COLBERG, T.R. Ability of antiserum to miotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myotoxicity and lethal effects of miotoxin a and homologous crude venom. *Toxicon*, 21(1):35-45, 1983.
- PELLEGRINI, A. F.; VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; LAURE, C. J. The action of crotamine on skeletal muscle: an electrophysiological study. *Toxins Animal, Plant and Microbial*, 1978.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; RODRIGUES SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, 22(3):339-346, 1983.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F. R. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 18:337-340, 1985a.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 23:341-345, 1985b.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESSE, N.; CECCARELLI, B. N. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve muscle preparation. *Neuroscience.*, 10(2):475-489, 1983.
- SELISTRE H. S. & GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilh a). *Toxicon.*, 25:1135, 1987.
- SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; SOUZA, G.E.P.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilh a) snake venom. *Toxicon*, 28(3):261-273, 1990.
- STRYDON, J. D. The evolution of toxins found in snake venoms. In: LEE, C.Y. *Snakes Venoms*. Berlin, Springer Verlag, 1979. p.258.

- SUARES-KURTZ, G. Enzyme release from skeletal muscle. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 16: 283-290, 1983.
- VILLARDEL M.S.; ZELANT F.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos bothrópicos em camundongos. *Memo. Inst. But.*, 42/43:311-323, 1978/79.
- VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. *J. Formosan Med. Assoc.*, 71: 394-400, 1972.
- VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B. J. Action of crototoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 212:34-35, 1971.
- VITAL BRAZIL, O. & FONTANA, M.D. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Memo. Inst. But.*, 47/48:13-26, 1983/84.
- VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J. & LAURE, C. J. Crotamina: estudo farmacológico. *Ciência e Cultura*, 23: 382, 1971.
- VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J. & LAURE, C. J. Repetitive muscle responses induced by crotamine. *Toxicon*, 17: 61-67, 1979.
- WEIL, C.S. Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD_{50} or ED_{50}) and instructions for their use. *Biometrics*. 249-263, 1953.

AS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS FORAM ORGANIZADAS DE ACORDO
COM A ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) - NBR
6023, AGOSTO, 1989.