

"ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DA  
AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO DA ARANHA  
*PHONEUTRIA NIGRIVENTER* SOBRE MÚSCULO  
ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS"

ANA CLÁUDIA MATTIELLO SVERZUT

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Ana Cláudia Mattiello Sverzut</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>Maria Alice da Cruz Höfling</i> 20/10/94
--

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) como parte os requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Fisiologia

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MARIA ALICE DA CRUZ-HÖFLING  
Orientadora

CAMPINAS  
ESTADO DE SÃO PAULO

1994

75.02.534

Aos meus pais, Flávio e Ruth, por terem proporcionado, efetivamente, minha formação pessoal e profissional.

Ao Nando, por incentivar meu aprimoramento profissional e carinhosamente compreender os dias de minha ausência.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Alice da Cruz-Höfling, pela confiança em mim depositada para a execução deste trabalho e pela primorosa orientação.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana do Departamento de Farmacologia - FCM, pela inestimável colaboração na execução dos experimentos eletrofisiológicos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos R. Diniz, do Centro de Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, que gentilmente forneceu as toxinas da aranha *Phoneutria nigriventer*, utilizadas neste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Léa Rodrigues Simioni, do Departamento de Farmacologia - FCM, por ter gentilmente cedido seu laboratório durante a obtenção das amostras morfológicas, e ao biólogo Gildo Bernardo Leite, deste laboratório, pelo auxílio prestado nesta etapa.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica (IB - UNICAMP) - às biólogas Antonia M. Ferreira Lima e Adriane C. Sarti Sprogis, e à técnica Silvia H. Moda pelo inestimável auxílio na preparação das amostras para análise ao microscópio eletrônico de transmissão e na confecção de fotografias; ao biólogo João Roberto M. Bauer pelo apoio prestado na execução de itens burocráticos; à Maria Aurora S. da Silva, pelos diversos serviços executados dentro e fora do laboratório.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Maria Elídia dos Santos e Sônia M. Martins de Oliveira, que colaboraram, no âmbito administrativo, para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao técnico Antônio Vilson dos Santos do laboratório de junção neuromuscular do Departamento de Farmacologia - FCM pelo auxílio prestado na etapa de obtenção dos dados eletrofisiológicos.

Ao Prof. Dr. Luciano de Souza Queiróz por facilitar a utilização do microscópio eletrônico de transmissão do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

À Prof.<sup>a</sup> Maria Silvia de A. Moura, do Departamento de Estatística da Universidade Federal de São Carlos, pelo inestimável auxílio na análise e interpretação dos dados eletrofisiológicos.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)  
pelo suporte financeiro.

E, aos indivíduos não citados nominalmente aqui, mas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO DA LITERATURA	
O músculo.....	06
A junção neuromuscular.....	10
O nervo.....	12
Canais de sódio.....	16
Canais de sódio e o músculo esquelético.....	18
Canais de sódio e o tecido nervoso.....	20
Canais de sódio e neurotoxinas.....	21
Danos musculares.....	26
MATERIAL E MÉTODOS	
Animais.....	29
Toxinas.....	29
Dose.....	30
Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos.....	30
Estudo miográfico.....	30
Estudo eletrofisiológico.....	31
Estudo morfológico.....	32
RESULTADOS	
Análise fisiológica: biopotenciais e força de contração.....	37

Análise morfológica: histopatológica (MO) e biologia celular (MET)	
Grupo controle.....	38
Efeitos da PhTx1.....	40
Efeitos da PhTx2.....	43
Microscopia eletrônica de varredura.....	48
FIGURAS.....	49
DISCUSSÃO	
Aspectos eletrofisiológicos.....	73
Aspectos morfológicos	
PhTx1.....	75
PhTx2.....	81
Correlação entre os achados clínicos e sinais e sintomas clínicos.....	92
CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa	- amino ácido
AaH	- <i>Androctonus australis Hector</i>
ACh	- Acetilcolina
ADP	- Adenosina Di-fosfato
ATP	- Adenosina Tri-fosfato
BTX	- Batracotoxina
CGRP	- Calcitonin Gene-Related Peptide
CK	- Creatinaquinase
DL	- Dose Letal
DP	- Desvio Padrão
EI	- Estimulação Indireta
IP3	- Inositol 1,4,5 Trifosfato
JNM	- Junção Neuromuscular
LM	- Light Microscopy
m	- músculo
mepc	- miniature endplate current
MET	- Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	- Microscópio Eletrônico de Varredura
min	- minuto
MO	- Microscópio Óptico
NR	- Nodo de Ranvier
PA	- Potencial de Ação
PhTx1	- Toxina 1 da Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>
PhTx2	- Toxina 2 da Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>

Pi	- Fosfato inorgânico
pptm	- potencial de placa terminal em miniatura (ou mepp)
PR	- Potencial de Repouso
RS	- Retículo Sarcoplasmático
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNP	- Sistema Nervoso Periférico
STX	- Saxitoxina
TEM	- Transmission Electron Microscopy
Tn-C	- Troponina de controle
Tn-I	- Troponina inibitória
Tn-T	- Troponina de fixação à tropomiosina
Túbulos T	- Túbulos Transverso
TTX	- Tetrodotoxina

## RESUMO

Os tecidos muscular e nervoso têm sido objetos de estudo da ação de toxinas de vários animais venenosos. O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* é um exemplo deste fato. PhTx1 e PhTx2 são toxinas isoladas do veneno total da *Phoneutria nigriventer*. Seus efeitos foram estudados em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos incubados em solução aerada de Tyrode à 37°C, contendo 1 ou 5 µg/ml de PhTx1 ou 1 µg/ml de PhTx2. Estudos fisiológicos e morfológicos foram realizados com a PhTx1 e somente morfológicos com a PhTx2. As alterações foram analisadas 15, 30, 45 e 60 min após incubação com as toxinas. Os estudos miográficos, através de estimulação indireta, mostraram que a PhTx1 não modificou a tensão das fibras musculares esqueléticas. Além disso, os experimentos eletrofisiológicos não mostraram alteração na frequência e amplitude dos ppts, nem no potencial de repouso da membrana após 60 min da adição da toxina. O microscópio óptico (MO) revelou microvacuolização das fibras musculares na presença de PhTx1, assim como mionecrose, incluindo áreas de hipercontração, perda de miofibrilas, as quais foram instaladas logo após 15 min de contacto entre a toxina e o tecido. A toxina PhTx2 causou mionecrose e heterogeneidade no tamanho e cor da célula que progrediu dos 15 aos 60 min. Através de microscópio eletrônico de transmissão (MET) o músculo incubado com PhTx1 demonstrou tumefação do retículo sarcoplasmático, aumento do sarcoplasma celular, desorganização dos sarcômeros, membranas enoveladas e dano mitocondrial. O tecido muscular incubado com PhTx2, mostrou mudanças ultraestruturais similares, mas a mionecrose foi mais extensa e severa aos 60 min. Para ambas as toxinas, os fascículos intra-musculares do nervo frênico mostraram axônios mielinizados com vacúolos dentro da bainha de mielina, assim como, peri- e intra-axoplasmáticos. O citoplasma da célula de Schwann também mostrou vacuolização. Como resultado da vacuolização intramielínica, houve distorção e descompactação da bainha de mielina. As alterações das junções neuromusculares após PhTx1 foram suaves com pouca diminuição de vesículas sinápticas no interior do terminal nervoso o qual tornou-se alongado e fino. A goteira sináptica mostrou-se estreita. Após incubação com a PhTx2, as junções neuromusculares mostraram terminais nervosos depletados de vesículas sinápticas e mitocôndrias tumefeitas e rompidas. O axolema era frequentemente visto invaginando-se ou sequestrando porções do axoplasma, ou estava ausente em certas porções da goteira. As dobras pós-sinápticas eram estreitas e dispersas; algumas membranas enoveladas foram vistas entre estas dobras. As alterações morfológicas induzidas pela PhTx2 no músculo e nervo podem ser compatíveis com a ativação dos canais de sódio presentes nestas membranas excitáveis. O influxo de sódio foi provavelmente acompanhado por influxo e um aumento da concentração intracelular de cálcio. O cálcio intracelular (citosólico) pode ter sido liberado pelo retículo sarcoplasmático e/ou pela mitocôndria. A PhTx1 não teve ação despolarizante ou hiperpolarizante na junção neuromuscular, mas foi contudo tóxica para estruturas musculares e nervosas. O sítio de ação da PhTx1 não foi definido sobre as presentes condições experimentais, mas pode envolver o sarcolema e axolema como sugerido pelas anormalidades morfológicas as quais podem ter sido causadas por distúrbios hidroeletrólíticos.

## "ABSTRACT"

Muscle and nervous tissue have been the focus of studies on the action of numerous animal venoms. The venom of spider *Phoneutria nigriventer* is an example of such studies. PhTx1 and PhTx2 are toxins isolated from crude *Phoneutria nigriventer* venom. Their effects were studied in the mouse isolated phrenic nerve-diaphragm preparation incubated in aerated Tyrode solution at 37°C and containing 1 or 5 µg/ml of PhTx1 or 1 µg/ml of PhTx2. Physiological and morphological studies were performed with PhTx1 while only the morphological effects were examined for PhTx2. The alterations were examined 15, 30, 45 and 60 min after the addition of the toxins. Myographic studies showed that PhTx1 did not elicit any twitch tension of the skeletal muscle fibers under indirect electrical stimulation. In addition, electrophysiological experiments did not show any alteration in the muscle frequency and amplitude, nor was there any change in the resting membrane potential 60 min after addition of the toxin. Light microscopy (LM) revealed microvacuolation of the muscle fibers in the presence of PhTx1 as well as myonecrosis, including areas with hypercontraction, loss of myofibrils, which were installed as early as 15 min after contact between the toxin and the tissue. The toxin PhTx2 caused myonecrosis and heterogeneity both in cell size and colour that advanced from 15 to 60 min. By transmission electron microscopy (TEM) muscle incubated with PhTx1 demonstrated sarcoplasmic reticulum swelling, increase of the cell sarcoplasm, disorganization of the sarcomeres, membranous debris and mitochondrial damage. The muscle tissue incubated with PhTx2, showed similar ultrastructural changes, but myonecrosis were more extensive and severe at 60 min. For both toxins, the intra-muscular fascicles of the phrenic nerve showed myelinated axons with vacuoles inside the myelin sheath as well as peri- and intra-axoplasmic vacuoles. The Schwann cell cytoplasm also showed vacuolization. As a result of the intramyelin vacuolation, there was distortion of the axoplasm structure and discompactation of the myelin sheath. The neuromuscular junction alterations after PhTx1 were mild with little diminution of the synaptic vesicles inside the nerve terminal which became elongated and thin. The synaptic gutter showed shallow. After incubation with PhTx2, the neuromuscular junctions showed nerve terminals depleted of synaptic vesicles and disrupted and swollen mitochondria. The axolemma was frequently seen to be invaginated and sequestered portions of the axoplasm, or were absent at certain portions of the gutter. The post-synaptic junctional folds were shallow and disperse; some membranous whorls were seen among these folds. The morphological alterations induced by PhTx2 in muscle and nerves can be compatible with the activation of the sodium channels present in these excitable membranes. The inward sodium flux was probably accompanied by water influx and an increased intracellular calcium concentration. Intracellular (cytosolic) calcium could be released by the sarcoplasmic reticulum and/or the mitochondria. PhTx1 did not have a depolarizing or hyperpolarizing action at the neuromuscular junction, but it was nevertheless toxic for muscle and nerve structures. The site of action was not defined under the present experimental conditions, but may involve the sarcolemma and axolemma as suggested by the morphological abnormalities which could be caused by hydroelectrolytic disturbances.

## INTRODUÇÃO

Em 1926, BRAZIL e VELLARD caracterizaram a aranha *Ctenus nigriventer* como a segunda espécie de aranha que mais determinava acidentes em São Paulo. Era uma espécie comum encontrada na capital e interior deste estado, e em outros como Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Goiás. BÜCHERL (1964a) afirmou que estas aranhas também encontravam-se no Paraguai, Bolívia e Guianas, e as caracterizou como sul-americanas.

A taxonomia do gênero *Phoneutria* foi abordada por von EICKSTEDT (1978/79). Nesta, fez menção ao emprego, no passado, dos gêneros *Ctenus* e *Phoneutria* como sinônimos e fez uma revisão do fenótipo dos animais, especificando os dados filogenéticos destas aranhas.

Hoje designadas por *Phoneutria nigriventer* (Ctenidae; Labidognatha) e popularmente conhecidas como "armadeiras", as aranhas deste gênero alcançam um comprimento de corpo de até 3 cm, o qual é recoberto por pêlos curtos, aderentes e acinzentados (LUCAS, 1988). Elas não constroem teias. Possuem o hábito noturno da caça, penetrando furtivamente nas residências e se instalando em lugares escuros como calçados (BRAZIL & VELLARD, 1925; 1926; BÜCHERL, 1964b).

Indivíduos acidentados ou animais cujo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* neles foi inoculado, apresentaram sinais e sintomas como dor irradiada

do sítio de introdução, câibras, tremores, convulsões tônicas, paralisia espástica, sialorréia, sudorese, priapismo, taquicardias, arritmias e distúrbios visuais (BRAZIL & VELLARD, 1925; 1926; SCHENBERG & PEREIRA LIMA, 1966; LUCAS, 1988).

Nestes indivíduos ou nos experimentos, não foi observada produção de edema local ou necrose, nem coagulação do sangue ou hemólise (BRAZIL & VELLARD, 1925; 1926). Entretanto, a formação de edema em ratos e coelhos após injeção intradérmica do veneno de *Phoneutria nigriventer* foi observada e quantificada por ANTUNES et al. (1992). Em ambos os animais, a formação do edema foi dose-dependente e potencializada por vasodilatadores como CGRP e Prostaglandina E1. A presença de edema após acidentes com aranhas deste gênero foi também observada clinicamente, constituindo o segundo sinal mais importante identificado dentre 126 pacientes atendidos no CCI-UNICAMP no período de 1984 a 1988 (BUCARETCHI, 1992).

FONTANA & VITAL-BRAZIL (1985) e VITAL-BRAZIL (1987) trabalhando em preparações nervo frênico-diafragma de ratos, observaram uma despolarização da membrana da fibra muscular diafragmática não uniforme, causada pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*, que foi abolida por Tetrodotoxina (TTX - uma guanidina heterocíclica originada de peixes, sapos, polvo e lagartixas, bloqueadora de canais de sódio) ou pela redução da concentração de sódio na solução nutritiva. O veneno também bloqueou a transmissão neuromuscular em determinadas concentrações, bloqueio este não antagonizado por neostigmina (um anticolinesterásico) ou 4-aminopiridina (um potencializador da transmissão neuromuscular, em parte, por bloqueio dos canais de potássio). Foi também encontrado aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptom), suprimidos por TTX quando esta foi adicionada ao banho anteriormente ao veneno. Quando adicionada ao banho após o veneno, diminuiu sua frequência para níveis normais. Ainda, a duração do potencial de ação (PA) não foi alterada pelo veneno. Os resultados supracitado indicaram que o veneno promove ativação dos canais de sódio voltagem-dependentes nas membranas do músculo e nervo.

Especificamente em nervos periféricos de camundongos, CRUZ-HÖFLING et al. (1985), através da injeção do veneno desta aranha no nervo ciático, observaram disparos iterativos das fibras nervosas segundos após a injeção, com fasciculações e potenciais de placa terminal irregulares. Estes autores observaram que a nível morfológico houve tumefação e distensão dos nodos de Ranvier, com aumento de seu volume axoplasmático. Nos internodos, formaram-se vacúolos no espaço periaxonal e intramielínicos, que comprimiam os axônios e distorciam seu calibre.

Quando o veneno foi injetado no músculo *soleus* e extensor longo dos dedos de camundongos suas fibras nervosas apresentaram as mesmas características observadas após injeção intraneural: vacuolização internodal e tumefação axoplasmática nodal. A análise das placas motoras mostrou terminais nervosos distendidos e elétrons-lucentes, depletados de vesículas sinápticas e mitocôndrias esparsas. As fibras musculares como um todo, mostraram-se normais. Após vinte e quatro horas da injeção intraneural as alterações citadas começavam a regredir com consequente restabelecimento gradativo da estrutura normal.

As alterações morfológicas relatadas após introdução do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em nervos periféricos foram idênticas às observadas em experimentos realizados posteriormente com os venenos dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Centruroides sculpturatus* através de injeção intraneural (LOVE et al., 1986). Estas anormalidades morfológicas também foram muito semelhantes às encontradas nos experimentos em nervos periféricos cujo agente utilizado foi a batracotoxina (BTX - um alcalóide esteróide isolado da pele de sapo) (ALBUQUERQUE et al., 1971; MOORE et al., 1986). As alterações morfológicas nos nervos periféricos pareceram ser resultado do prolongado influxo de sódio induzido pelos venenos da aranha, dos escorpiões e da pele do sapo. Nos estudos supracitados, o pré-tratamento com TTX preveniu as alterações morfológicas causadas pelo veneno dos escorpiões e da aranha (LOVE et al., 1986), e preveniu as alterações fisiológicas causadas pelo veneno do sapo (ALBUQUERQUE et al., 1971). Embora os resultados sejam semelhantes, a ação destes venenos sobre os canais de sódio difere em alguns aspectos. Os venenos dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Centruroides sculpturatus* contém várias frações as quais modificam o processo de "gating" (abertura e fechamento) dos canais de sódio, promovendo inativação tardia dos mesmos. Além disso, o veneno do escorpião *Centruroides sculpturatus* também atua como ativador dos canais de sódio (LOVE et al., 1986). Determinadas mudanças provocadas pela BTX em nervos periféricos puderam ser explicadas também devido a um efeito da toxina sobre os canais de sódio (ALBUQUERQUE et al., 1971; MOORE et al., 1986). Quanto ao mecanismo de ação do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* CRUZ-HÖFLING et al. (1985) apontaram que as salvas de pptom e as alterações morfológicas encontradas em seus experimentos poderiam ser consequentes à ativação e/ou retardo na inativação dos canais de sódio. Por outro lado, FONTANA & VITAL-BRAZIL (1985) após experimentos eletrofisiológicos, afirmaram que o veneno desta aranha não atua na inativação dos canais de sódio, baseados no achado de não alteração na duração do PA.

Em 1963, DINIZ demonstrou, por separação eletroforética, que o veneno de *Phoneutria nigriventer* era constituído por um complexo sistema de proteínas, duas destas capazes de produzir contração em preparações de íleo de cobaia. Nestes mesmos estudos conseguiu isolar um componente de notável atividade neurotóxica.

ENTWISTLE et al. (1982) separaram onze frações do veneno de *Phoneutria* por filtração em gel. Um polipeptídeo puro, quase neutro, foi isolado e apresentou peso molecular 5500 a 5900 daltons. Quando perfundido através de preparação de fêmur de inseto gerou potenciais de ação no nervo crural e contrações musculares esqueléticas descontroladas.

Dando continuidade a seus trabalhos prévios, DINIZ e seu grupo (CORDEIRO et al., 1988) identificaram a partir de seis frações isoladas do veneno da mesma aranha, uma com atividade neurotóxica e musculotrópica. Da recromatografia desta última fração, um componente apresentou a mesma atividade neurotóxica e musculotrópica e foi inibido por TTX. Quatro componentes foram originados deste, dos quais dois são: PhTx1 e PhTx2.

REZENDE Jr et al. (1991) isolaram três frações neurotóxicas do veneno de *Phoneutria nigriventer*, letais para camundongos. Essas toxinas apresentaram pesos moleculares entre 6000 e 9000 daltons, com aminoácidos (aa) e sequência amino terminal diferentes. Através de injeção intracérebro-ventricular a PhTx1 (toxina 1) induziu elevação da cauda do camundongo, excitação e paralisia espástica das extremidades posteriores do animal. Após injeção da PhTx2 (toxina 2) por esta via, os animais mostraram sinais de lacrimação, salivação, priapismo, convulsões e paralisia espástica das extremidades anteriores e posteriores. A terceira fração induziu paralisia flácida das pernas do camundongo por vinte e quatro horas ou mais. A DL50 média por injeção intracérebro-ventricular para o veneno bruto, e toxinas 1 e 2 foi respectivamente  $47 \pm 5$  µg/kg,  $45 \pm 4$  µg/kg,  $21,7 \pm 0,7$  µg/kg para camundongos.

A toxina PhTx1, já identificada, foi totalmente sequenciada por DINIZ et al. (1993). Os experimentos para sequenciamento apontaram que esta toxina era inicialmente sintetizada como uma pré-pró-toxina e que, até ser alcançada a sua forma madura, havia similaridade com a síntese e processamento da  $\omega$ -agatoxina IA e IB, toxina derivada do veneno da aranha *Agelenopsis aperta*.

Recentes estudos desenvolvidos por FONTANA & VITAL-BRAZIL (comunicação pessoal) no Departamento de Farmacologia da UNICAMP, com a

toxina PhTx2 atuando sobre contração muscular e potenciais bioelétricos, demonstraram que na despolarização de diafragma de ratos, esta toxina foi dezoito vezes mais ativa que o veneno total e que, em aurícula isolada de cobaia, foi também duas vezes mais ativa que o veneno total. Esta mesma fração, na concentração de 0,25 µg/ml de solução de banho foi capaz de reproduzir os efeitos do veneno total descrito por FONTANA & VITAL-BRAZIL em 1985 (REZENDE Jr et al., 1991). DINIZ et al. (1992) apontaram após separação das frações neurotóxicas dos venenos das aranhas da família *Ctenidae*, que a PhTx2 (derivada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*) em diafragma de ratos e músculo íleo de cobaia ativava canais de sódio, e tinha seu efeito antagonizado por TTX, assim como o veneno total.

Foi objetivo da presente investigação contribuir para a determinação do mecanismo de ação da toxina Phtx1, estudando seus efeitos sobre a contração muscular e potenciais bioelétricos, e estudar as alterações morfológicas induzidas pelas toxinas Phtx1 e Phtx2 sobre músculo esquelético de camundongos, *in vitro*. Com relação a ambas as toxinas, a patogênese das lesões causadas foi estudada em condições agudas do envenenamento. Para tanto, as alterações foram estudadas aos 15, 30, 45 e 60 min de incubação.

## REVISÃO DA LITERATURA

### O músculo

Locomoção e postura são funções principais desenvolvidas pelos músculos estriados esqueléticos. A célula muscular esquelética apresenta uma propriedade específica, quando excitada gera contração. O impulso nervoso que atinge a região de contato entre o axônio e a fibra muscular - placa motora - é fator produtor de excitação e contração desta fibra (ESBÉRARD, 1991a).

Os músculos esqueléticos, como o próprio nome indica, ligam-se a estruturas ósseas ou fáscias, através de tendões, os quais são contínuos com o tecido conjuntivo que envolve todo o músculo, o epimísio. As células musculares esqueléticas ou fibras musculares organizam-se em feixes, chamados fascículos, que estão envoltos por tecido conjuntivo, o perimísio. Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida pelo endomísio.

A especificidade morfo-funcional das células musculares levou à adoção de nomenclatura específica para seus componentes. A membrana celular é comumente denominada sarcolema, o citoplasma é chamado sarcoplasma e o retículo endoplasmático é conhecido como retículo sarcoplasmático.

A fibra muscular esquelética tem comprimento variável e diâmetro entre 10 e 150  $\mu\text{m}$  e é multinucleada, com os núcleos situados na periferia da célula. Cada fibra é constituída de miofibrilas com mesmo comprimento da fibra e diâmetro entre 1 e 2  $\mu\text{m}$  (ESBÉRARD, 1991a).

A fibra muscular esquelética é formada por dois tipos de miofilamentos: o grosso (diâmetro 10 - 12 nm) e o fino (diâmetro 5 - 6 nm). O filamento grosso é formado pela proteína miosina e o filamento fino pela actina. Duas outras proteínas, a tropomiosina e a troponina, estão também presentes no filamento fino e têm papel essencial no mecanismo contrátil. A disposição dessas proteínas, em particular, da miosina e da actina dentro da miofibrila, leva a um padrão de estriação com a formação de bandas e linhas, responsáveis pelo nome dado a esse músculo, de estriado. Ao microscópio óptico de polarização identifica-se na fibra muscular a faixa I (chamada isotrópica por não desviar o plano de luz polarizada) e a faixa A (chamada anisotrópica por desviar o plano de luz polarizada). A faixa I é formada exclusivamente pelos filamentos finos que são cruzados pela linha Z, e a faixa A é formada pelos filamentos finos e grossos, tendo centralmente a banda H, que corresponde à região da miofibrila onde são encontrados somente os filamentos grossos, sem interposição dos filamentos finos. No centro da banda H, encontra-se a linha M, local onde se observam projeções transversais do centro do filamento de miosina, e que parece ser um importante local de enzimas utilizadas no metabolismo energético, como a creatinaquinase (CK) (ESBÉRARD, 1991a; ECKERT & RANDALL, 1988). A creatinaquinase catalisa a transferência de um grupo fosfato da fosfocreatina, uma forma de estocagem de grupos fosfato de alta energia para o ADP, provendo desta forma, o suprimento de ATP necessário à contração muscular. O comprimento relativo das bandas A e I são dependentes do estado de contração ou relaxamento da miofibrila. Enquanto a banda A permanece com seu comprimento quase constante, a banda I é a que mais se altera, isto é, seu comprimento é diminuído quando a miofibrila está contraída e aumentado quando há relaxamento. Em secção transversal das fibras musculares, na região da banda A, os filamentos grossos mostram arranjo hexagonal, com a interposição de seis filamentos finos. Entretanto esse padrão de organização varia em função da região onde a secção transversal aconteceu, se nas bandas A, I, H ou linhas M ou Z. Este perfeito modelo de arranjo dos filamentos, numa razão de 2 filamentos finos para 1 filamento grosso (ou até 3:1), não é frequentemente observável através do MET (GHADIALLY, 1988).

Bioquimicamente a actina e a miosina representam 55% do total de proteína do músculo estriado. A actina está presente sob a forma de polímero longo e

filamentoso, a actina F, formada por dois cordões de monômeros de actina G. A actina G é globular e se polimeriza para formar a actina F, filamentosa, a qual se organiza espacialmente em dupla hélice. A tropomiosina é formada por duas cadeias polipeptídicas torcidas entre si (cada subunidade torcida possui uma alfa-hélice) e fica encaixada entre as duas cadeias de actina F, sem mergulhar na goteira entre elas. A troponina é um complexo de proteínas globulares encontrada nos filamentos finos e presa à tropomiosina em intervalos regulares de 40 nm. É formada por três subunidades Tn-T (faz fixação à tropomiosina), Tn-C (troponina de controle) e Tn-I (troponina inibitória). A subunidade Tn-C fixa quatro moléculas de cálcio iônico e então altera a configuração de toda a molécula, levando a molécula de tropomiosina para o fundo da goteira entre as cadeias de actina, expondo os sítios ativos à miosina. A Tn-I inibe a interação actina-miosina. A miosina é um complexo muito maior. Ela pode ser dissociada em duas cadeias pesadas idênticas e dois pares de cadeias leves. A molécula de miosina, em sua posição caudal, é formada por dois filamentos entrelaçados com cabeças em suas extremidades. A porção caudal é chamada de meromiosina leve e a porção que contém as cabeças de meromiosina pesada. A miosina catalisa a hidrólise do ATP (adenosina trifosfato), formando ADP + Pi (fosfato inorgânico), em reação exergônica (ESBÉRARD, 1991a).

O ATP não é usado diretamente na produção da ponte cruzada (ligação da cabeça da miosina à molécula de actina e conseqüente deslizamento), mas sim para desligar esta união. A miosina apresenta ADP e Pi fixados à cabeça, quando então tem alta afinidade pela actina. Em presença do ATP, actina e miosina unidas, fazem liberar o ADP e Pi, e então o ATP se liga à miosina (reduzindo a afinidade pela actina), processo este desenrolado somente na presença do íon cálcio em concentrações acima de  $10^{-7}$  M. Nestas concentrações a troponina se une com até 4 íons cálcio, modificando a conformação do filamento fino (por mobilização da tropomiosina) e expondo os sítios ativos da actina (ESBÉRARD, 1991a; ECKERT & RANDALL, 1988).

A contração muscular se dá pela liberação de íons cálcio para o sarcoplasma e o relaxamento, indiretamente, pela remoção deste por transporte ativo para o retículo sarcoplasmático. Este sistema também é responsável pela estocagem e liberação deste íon para o meio extracelular. As membranas do retículo sarcoplasmático ocupam de 1 a 5% da célula que contém grande quantidade de cálcio (FLUCHER, 1992; ESBÉRARD, 1991a). FLUCHER (1992) caracterizou, estrutural e bioquimicamente, o retículo sarcoplasmático em compartimentos distintos quanto à regulação de cálcio. A porção longitudinal corresponderia à

fração leve que conteria alta concentração da cálcio-ATPase e faria a captação do cálcio para dentro deste sistema (contra o gradiente de concentração). A cisterna terminal corresponderia à fração pesada do retículo e seria o compartimento de estocagem e liberação deste íon, além de estabelecer contato com os túbulos T (formando o que se chama de tríade). As cisternas contêm calsequestrina (proteína de ligação do cálcio) e canal liberador de cálcio (receptor "ryanodine").

Em continuidade com a membrana sarcoplasmática (ou sarcolema), de composição lipoproteica, têm-se os túbulos T (túbulos transversos), invaginação do sarcolema ao nível dos limites entre as bandas A - I de cada sarcômero. Esta estrutura, considerada como organela funcionalmente e ontogeneticamente distinta, tem dupla função: excitabilidade e transdução de sinais (FLUCHER, 1992).

As tríades são estruturas básicas para a excitação e liberação de cálcio para o músculo. Consistem de duas cisternas terminais de retículo sarcoplasmático fazendo contato com um túbulo T. O espaço entre estes dois compartimentos é de 15 nm. Na fenda foram observadas estruturas periódicas e elétron-densas chamadas de pés-juncionais (FRANZINI-ARMSTRONG, 1970). O pé-juncional era composto de quatro canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS). Pela técnica de "freeze-fracture" foi observado, na membrana juncional dos túbulos T, partículas integrais de membrana que se combinavam com pés alternados na aposição do RS (BLOCK & PUMOLIN, 1988). FLUCHER (1992) concluiu que a aposição entre as cisternas terminais e os túbulos T tinha significado desconhecido mas que devia ser fundamental para a conexão eletromecânica dos sensores de voltagem e canais liberadores de cálcio. Em músculo esquelético de camundongos as tríades encontram-se entre as bandas A e I (LE TREUT et al., 1990).

Para o processo de sinalização dos túbulos T e cisternas terminais do RS, foi proposto que um segundo mensageiro poderia ser responsável por tal fato. Tal mensageiro seria o inositol 1,4,5-trifosfato (ou IP3) produzido pela quebra do fosfatidilinositol ligado à membrana, e que conhecidamente estimula a liberação de cálcio dos estoques intracelulares em alguns tecidos. Considerando-se esta hipótese, a propagação do PA nos túbulos T ativaria nestes uma enzima sensível à voltagem que, direta ou indiretamente produziria IP3 e devido ao estreito contato com as cisternas terminais do RS, se difundiria para a membrana do RS, ligando-se a um receptor que então abriria os canais de cálcio (ECKERT & RANDALL, 1988).

Estruturalmente, cada fibra muscular é rodeada por muitos capilares, ocasionalmente por pequenos feixes de fibras nervosas motoras, que irão formar as

placas motoras. Cada fibra contém vários núcleos alongados, localizados perifericamente (subsarcolemais), que são pequenos, basófilos e alongados (uma fibra normal possui menos que 8 núcleos) (SWASH & SCHWARTZ, 1988). As fibras são envolvidas pela membrana sarcolemal e pela lâmina basal. As fibras musculares, ao MET, apresentam extenso RS e mitocôndrias. Um outro componente do tecido muscular são as células satélites. Estas consistem de núcleos contendo cromatina frouxa, sarcoplasma elétron-lucente com abundância em ribosomos livres, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndrias, mas sem miofilamentos. Situam-se abaixo da lâmina basal e têm função importante nos processos regenerativos (SWASH & SCHWARTZ, 1988; SALPETER, 1987).

Desde 1873, RANVIER (apud CLOSE, 1972) verificou que os músculos esqueléticos apresentavam cores diferentes, sendo uns mais vermelhos que outros quando observados macroscopicamente. Do ponto de vista morfológico, histoquímico e funcional, as fibras que compõem o músculo esquelético são diferentes. Esta heterogeneidade da população de fibras do músculo pode ser evidenciada através de métodos histo-enzimológicos, processos histoquímicos que evidenciam atividade enzimática daquela fibra em particular. As fibras diferem, por exemplo, na atividade enzimática mitocondrial, e esta atividade é na maioria das vezes, inversamente proporcional ao diâmetro da fibra. Nos mamíferos, as fibras pequenas são mais ricas em mitocôndrias e mioglobina, e são prevalentes nos músculos vermelhos, e por isso chamadas fibras vermelhas. As fibras grandes possuem menos mitocôndrias, menos mioglobina e prevalecem nos músculos brancos. Há também as fibras intermediárias, que reúnem características das duas primeiras e são frequentes nos músculos vermelhos (para revisão ver CLOSE, 1972). O método de coloração atualmente mais usado é ATPase miofibrilar que classifica as fibras tipo 1 e tipo 2 (quanto aos aspectos fisiológicos correspondem, respectivamente, às fibras de contração lenta e rápida). A fibra tipo 2 pode ser subclassificada em 2A, 2B e 2C, classificação esta muito útil principalmente no diagnóstico de doenças neurogênicas (SWASH & SCHWARTZ, 1988).

## A junção neuromuscular

Toda fibra muscular é inervada por um neurônio motor. A região da fibra que estabelece "comunicação" com o terminal nervoso é chamada placa motora ou junção neuromuscular (JNM). Em condições fisiológicas um único neurônio motor relaciona-se com várias fibras musculares, o que se chama unidade motora (o número de fibras/unidade motora depende da espécie animal e do tipo de músculo -

exemplo: 3 a 17 no m. extraocular e mais de 1000 no m. gastrocnêmio) (MURPHY, 1990).

A bainha de mielina que envolve o neurônio motor é perdida quando este se aproxima da fibra muscular, então o terminal nervoso desnudo se ramifica e se encaixa sobre a superfície da fibra. Estes terminais ramificados podem estar em associação com a chamada teloglia (por Couteaux na década de 40). Os terminais nervosos (de 30 a 300  $\mu\text{m}$  de comprimento) encaixam-se em "goteiras" na superfície da fibra muscular. A membrana pré-sináptica do terminal nervoso é separada da membrana pós-sináptica, pertencente à fibra muscular, pelo que se chama fenda primária (aproximadamente 500 Å). O sarcolema na região pós-sináptica forma invaginações ou dobras que criam um compartimento extracelular, as fendas secundárias. No compartimento pré-sináptico, do terminal axônico, encontram-se raros ribossomos bem como raros perfis de retículo endoplasmático rugoso e de retículo endoplasmático liso, além de neurofilamentos, mitocôndrias e pequenas vesículas sinápticas (de aproximadamente 500 Å de diâmetro, que representam os pacotes quantais de acetilcolina - ACh), vesículas revestidas ("coated vesicles") possivelmente envolvidas na reciclagem de membranas. Há ainda especializações elétron-densas da membrana neuronal, onde estão alinhadas as vesículas sinápticas contendo o neurotransmissor, chamadas zonas ativas (acredita-se que esta zona não seja exclusiva para a liberação das vesículas de neurotransmissor) (para revisão ver SALPETER, 1987).

Nas fendas sinápticas primária e secundária, é encontrada a lâmina basal que envolve a fibra muscular em toda sua extensão, e acompanha portanto as dobras juncionais, desempenhando as funções de manutenção da organização molecular a nível pré e pós-juncional (para revisão ver SALPETER, 1987). A lâmina basal também pode ser evidenciada na célula de Schwann, um outro componente da junção neuromuscular. As dobras do compartimento pós-juncional são, em sua maioria, próximas e profundas,  $0,73 \pm 0,09 \mu\text{m}$  de profundidade, e largura de  $0,19 \pm 0,05 \mu\text{m}$  (BOUDIER et al., 1992). Elas aumentam a extensão total da porção pós-sináptica da JNM em 3 a 7 vezes, em relação a porção pré-sináptica. A região do topo das dobras pós-juncionais é mais espessa e elétron-densa, e se prolonga para a região das dobras secundárias (25 a 30% para baixo do topo). A porção profunda das dobras secundárias é menos densa e apresenta vesículas revestidas e não-revestidas que frequentemente encontram-se fundidas à membrana sarcolemal. Esta região mais espessada do topo das dobras pós-juncionais contém alta densidade de receptores de ACh. Estudos com alfa-bungarotoxina marcada, uma toxina pré-sináptica do veneno de *Bungarus multicinctus*, ao MET mostraram

concentração de 15.000 a 20.000 sítios ligantes/ $\mu\text{m}^2$  (eram 2 sítios ligantes de ACh/partícula). A base das dobras continham 10 a 100 vezes menos sítios que o topo. O distanciamento de 15  $\mu\text{m}$  do terminal nervoso correspondia a uma densidade de receptores de ACh inferior a 20 sítios/ $\mu\text{m}^2$  e os valores eram ínfimos com distanciamento de mais de 100  $\mu\text{m}$ . O compartimento sarcoplasmático pós-sináptico em proximidade às dobras pós-juncionais continham numerosas mitocôndrias, aparelho de Golgi (localizado principalmente entre os núcleos e as dobras), fragmentos de retículo endoplasmático rugoso e ribosomos, partículas de glicogênio, cisternas do RS e vesículas e um núcleo (para revisão ver SALPETER, 1987).

## O nervo

O tecido nervoso é constituído por dois componentes celulares: os neurônios e as células da glia. Os neurônios apresentam dendritos, corpo celular ou pericário, e axônio. De forma geral, os dendritos são prolongamentos especializados na recepção de estímulos; o corpo celular é o centro trófico da célula; e o axônio faz a condução do impulso nervoso. Em análise ultraestrutural, o corpo celular apresenta núcleo arredondado e nucléolo que contém o material genético da célula, abundante retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi (somente encontrado neste local da célula), mitocôndrias em pequena quantidade (nos dendritos e axônio encontra-se quantidade ainda menor), neurofilamentos e microtúbulos. Os neurofilamentos são filamentos intermediários com diâmetro aproximado de 10 nm, e são abundantes no pericário e prolongamentos. Os microtúbulos têm diâmetro aproximado de 24 nm e assemelham-se aos encontrados em outros tipos celulares. O corpo celular possui uma região com forma piramidal, chamada cone de implantação, onde o axônio tem início. Cada neurônio possui apenas um axônio, e cada axônio pode ter diâmetro e comprimento variados. Seu axoplasma apresenta poucas organelas, dentre elas as mitocôndrias e os microtúbulos, sendo os neurofilamentos estruturas encontradas com maior frequência (para revisão ver JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Os axônios ou fibras nervosas que fazem parte do sistema nervoso periférico, agregam-se sob a forma de fascículos e vêm constituir os nervos periféricos. Os nervos são envolvidos por três tipos de bainhas de tecido conjuntivo: o epineuro, o perineuro e o endoneuro. O epineuro constitui a bainha mais externa de tecido conjuntivo e envolve o nervo como um todo. O perineuro encontra-se abaixo do epineuro e envolve cada fascículo ou grupo de fibras nervosas. O endoneuro envolve cada fibra nervosa individualmente. Estes envoltórios tornam-se mais

delgados a medida que o nervo vai sofrendo ramificações enquanto caminha para a periferia. É aceito que em nervos monofasciculares o epineuro está ausente ou fundido com o perineuro. Nas porções terminais das fibras nervosas a bainha de tecido conjuntivo torna-se atenuada e dispersa, podendo ser distinguida como um tecido conjuntivo geral (PETERS et al.; 1991).

No animal adulto, a bainha de tecido conjuntivo tem função de suporte estrutural e contribui para elasticidade, quando os nervos são estirados durante os movimentos do corpo. O epineuro contém fibras de tecido conjuntivo (principalmente fibras colágenas, seguidas pelas elásticas), fibroblastos, mastócitos, pequenos vasos sanguíneos e linfáticos, e algumas fibras nervosas que inervam estes vasos. O perineuro é composto de células achatadas ou escamosas cujo número depende do tamanho do fascículo nervoso envolvido ou da proximidade do SNC. Em direção à terminação nervosa ele é reduzido a uma simples camada de células e finaliza numa bainha aberta próximo ao final da fibra nervosa. As células perineurais têm uma lâmina basal em ambos os lados. São encontradas fibras colágenas, mais finas que as contidas no epineuro e fibras elásticas em escassa quantidade. Em uma camada de células perineurais, as células adjacentes ajustam-se em "tight-junction", nas chamadas zonas ocludentes. Elas produzem uma barreira à entrada de traçadores nos animais maduros (em animais imaturos ou em situações patológicas esta barreira não é eficiente na difusão de vários traçadores). O endoneuro é constituído de elementos do tecido conjuntivo, principalmente fibras colágenas orientadas longitudinalmente, fibroblastos com núcleo pálido, citoplasma com proeminente retículo endoplasmático rugoso e vesículas pinocitóticas, mastócitos que se localizam nas regiões perivascularares, macrófagos também localizados em proximidade aos vasos sanguíneos e um rico suprimento sanguíneo. Ao acessarem o endoneuro, estes capilares conduzem com eles o perineuro por uma curta extensão, ajudando a manter a integridade da barreira perineural. Desta forma a entrada de substâncias no endoneuro é prevenida pela barreira sangue-nervo, constituída pelo perineuro e capilares sanguíneos contínuos no endoneuro, sendo que em algumas espécies estas barreiras não são completas. Ela protege as fibras de agentes nocivos, limita a penetração de macromoléculas e pode controlar a passagem de íons para o endoneuro (para revisão ver PETERS et al, 1991).

As fibras nervosas, em sua maioria, estão envolvidas estruturalmente por um composto lipídeo-proteico, chamado mielina. Esta estrutura cobre segmentos axônicos, definindo os internodos, que são delimitados lateralmente pelos nodos de Ranvier (superfície do axônio desnuda de mielina). No SNP a mielina, cuja fração sólida contém 70 a 85% de lipídeos e 15 a 30% de proteínas, origina-se de uma

célula mãe, a célula de Schwann, também responsável pela manutenção desta estrutura. Segundo CALEY & BUTLER (1974) a bainha de mielina originada da célula de Schwann é formada dentro da célula mãe e cujas membranas se fundem nas porções externas e formam as linhas intraperiódicas (no SNC as células mãe são os oligodendrócitos, sendo que a bainha é formada a partir da extensão de um prolongamento desta célula). Os principais constituintes da bainha de mielina (colesterol, sulfatídeos, fosfolípídeos e lipoproteínas) têm metabolismo de síntese alto nos primeiros estágios de vida, tornando-se estável na vida adulta e baixa velocidade de "turnover". Alterações estruturais da bainha de mielina ocorrem em condições patológicas como perturbações tóxicas e metabólicas, inflamação e lesão mecânica, e podem resultar na perda segmentar de mielina ou desmielinização (para revisão ver NORTON, 1981; RAINE, 1984).

A célula de Schwann é achatada, com núcleo alongado localizado aproximadamente no centro do internodo, e paralelo ao grande eixo do axônio. O citoplasma contém retículo endoplasmático rugoso e liso, ribossomos livres, microtúbulos, microfilamentos e vesículas pinocitóticas. Também são vistos o aparelho de Golgi e mitocôndrias. Cada internodo é mielinizado por uma célula de Schwann. À medida que um processo citoplasmático desta célula envolve o axônio, este vai tornando-se compactando e perdendo o conteúdo citoplasmático. O processo de mielinização parece advir da penetração do axônio em um sulco existente no citoplasma da célula de Schwann. As bordas deste sulco devem fundir-se e formar o mesaxônio que, por processo desconhecido, deve enrolar-se formando uma espiral. Esta espiralização deve dar origem a dois mesaxônios, o interno e o externo. O mesaxônio interno une o axônio à mielina, o mesaxônio externo une a mielina à superfície da célula de Schwann. Os folhetos internos dos processos da célula de Schwann se fundem e formam as linhas densas principais, enquanto os externos formam as linhas intraperiódicas. A célula de Schwann em toda sua superfície externa é recoberta pela lâmina basal, e nas células de Schwann adjacentes ela torna-se contínua, estendendo-se ao redor da fibra em todo o seu comprimento. O citoplasma da célula de Schwann, em sua camada externa, se expande lateralmente sobre os nodos formando um colar com numerosos expansões digitiformes ou microvilosidades - os processos nodais (que contêm microfilamentos). Abaixo desta camada externa, nas camadas subjacentes da célula de Schwann em suas porções laterais - região paranodal - as lamelas de mielina compactadas se abrem em alças laterais (ou terminais) do citoplasma (NORTON, 1981; BRAUN, 1984; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Em 1925, LILIE (apud ROSENBLUT, 1984) definiu o nodo de Ranvier (NR) como uma mera fenda na bainha de mielina do axônio, explicando fisiologicamente o modelo de condução saltatória. O NR apresenta estrutura similar para o SNC e SNP, sendo que no segundo caso, encontra-se constrição do axônio na região nodal e paranodal. A camada externa da célula de Schwann estende processos digitiformes ao longo e sobre a membrana nodal, que podem ocupar todo o espaço ao redor do nodo, portanto pode ser dito que os nodos "são locais sem mielina cobertos por prolongamentos interdigitantes das células de Schwann". Ainda dentro deste sistema, a lâmina basal que cobre o exterior da bainha de mielina, se estende de uma região internodal a outra, passando pelo NR. Foi sugerido que as alças que compõem a região paranodal seriam áreas de "tight-junction", de forma a isolar o axolema nodal do paranodal, impedindo tanto a corrente de fluir por sob a bainha, assim como a ação de drogas, toxinas, e íons extracelulares. No NR, as organelas parecem estar mais concentradas, o citoplasma encontra-se denso e apresenta neurofilamentos e retículo endoplasmático liso. No SNC os NRs desempenham importante função na transmissão sináptica, para o SNC e o SNP, são mais conhecidos pela rápida condução do PA pela fibra nervosa, chamada condução saltatória.

Os nervos periféricos também são constituídos de fibras nervosas amielínicas, que juntamente com as fibras mielínicas, se arranjam na forma de fascículos. Estas fibras também estão associadas às células de Schwann. Uma única célula de Schwann se associa a um grupo de axônios amielínicos. A proporção, diâmetro e o número de fibras mielínicas e amielínicas, varia de acordo com o nervo. Uma estimativa destes dois tipos de fibra é feita no nervo sural de humanos, um nervo bastante biopsiado. Nele, as fibras amielínicas são quatro vezes mais numerosas que as mielínicas; o diâmetro das fibras amielínicas varia de 0,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  e o das fibras mielínicas de 2.0 a 17.0  $\mu\text{m}$  (SWASH & SCHWARTZ, 1988).

Em linhas gerais, a resposta de contração da fibra muscular é conseqüente à liberação de um neurotransmissor - no caso ACh - na fenda sináptica, liberação esta oriunda de um estímulo propagado na fibra nervosa e originado no neurônio motor do corno anterior da medula espinhal.

Na ausência de qualquer atividade pré-sináptica são registrados pequenos potenciais no elemento pós-sináptico, com amplitude bastante uniforme, cerca de 0,4 mV. Acredita-se que tais potenciais são decorrentes da liberação espontânea do conteúdo de uma vesícula sináptica, e são chamados potenciais de placa terminal

em miniatura (pptm ou mepp - miniature endplate potential). A chegada de um PA na região do terminal nervoso faz abrir canais de cálcio. O influxo consequente deste íon mobiliza as vesículas sinápticas em direção à membrana pré-sináptica, que se fundem e então liberam o seu conteúdo na fenda sináptica (exocitose). Este processo é dependente da concentração de cálcio intracelular (quanto maior a concentração, maior o número de vesículas liberadas). Em condições normais, um PA libera o conteúdo de aproximado de 300 vesículas, sendo que o conteúdo de uma vesícula de ACh, ou quantum, é de cerca de 10.000 moléculas de ACh. O neurotransmissor liberado pode atuar na membrana pós-sináptica através de dois mecanismos: a nível de um receptor nesta membrana que, uma vez ativado produz abertura de um tipo de canal iônico, tornando esta membrana permeável a um ou mais íons ou, a nível de um receptor de membrana que quando ativado promove formação de um segundo mensageiro capaz de induzir a abertura de canais iônicos. O mecanismo utilizado no processo de excitação da fibra muscular, pela ligação receptor nicotínico com a molécula de ACh, é o descrito primeiramente. Estudos de condutância mostraram que para ser produzido um mepc (corrente produzida por um pptm) são abertos 1000 a 2000 canais e que para o receptor se abrir, com alta probabilidade, deveria haver ligação de moléculas de ACh em dois sítios ligantes deste receptor (ESBÉRARD, 1991b; SALPETER, 1987).

Canais iônicos sensíveis à voltagem situados no sarcolema e axolema tornam os tecidos muscular e nervoso eletricamente excitáveis. As propriedades eletrogênicas destas membranas estão relacionadas, em parte, à distribuição e densidade dos canais de sódio voltagem-dependente.

## Canais de sódio

Em condições de repouso, para a célula nervosa por exemplo, existe um excesso de cargas positivas no lado externo da membrana e um excesso de cargas negativas no seu interior cuja diferença pode variar de 40 a 75 mV (dependendo do tipo de célula). O excesso de cargas positivas e negativas em relação à membrana da célula é dado principalmente por quatro íons: sódio, potássio, cloro e ânions orgânicos. Estes íons devem difundir-se através da membrana apenas por poros proteicos hidrofílicos específicos em direção aos seus gradientes de concentração (elétrico e químico) e estabelecem entre si um equilíbrio dinâmico - potencial de repouso. Quando a célula é despolarizada, o estado de repouso da membrana é perdido. Este fato é decorrente da presença de canais iônicos voltagem-dependente (entre outros) que são abertos somente nesta condição. Os canais de sódio voltagem-dependentes são responsáveis pela fase de elevação do PA (quanto

maior o influxo de sódio, mais é alterada a voltagem, e mais canais se abrem, gerando um ciclo despolarizante que tende a alcançar o equilíbrio eletroquímico do sódio). A repolarização da membrana é feita por canais de potássio voltagem-dependente (efluxo deste íon) e inativação dos canais de sódio. Deve ser considerado que, para a propagação do PA o processo de despolarização deve alcançar o potencial limiar da fibra em questão (para revisão ver KOESTER, 1991).

Os primeiros achados científicos que abordaram a geração do PA datam de 1938, por COLE e CURTIS (apud KOESTER, 1991). Eles observaram que a condutância iônica na membrana de axônio gigante de lula estava aumentada durante o PA. Na década de 40, HODGKIN e KATZ (apud KOESTER, 1991) observaram que redução na concentração externa de sódio era acompanhada por redução na amplitude do PA e que, aumento na concentração externa de potássio seguia redução na repolarização do PA. Propuseram então que a despolarização induzida pelo PA causava uma alteração transitória que aumentava a permeabilidade ao íon sódio pela abertura de canais voltagem-dependente, permitindo que este íon pudesse fluir em direção ao seu gradiente de concentração (para revisão ver KOESTER, 1991).

Os canais de sódio são proteínas constituídas estruturalmente por quatro domínios homólogos transmembrana, cada um contendo seis prováveis alfa-hélices rodeadas por um poro central. Os modelos que tentaram descrever a configuração do canal, em sua maioria, propuseram que cerca de 50% da massa proteica desta estrutura encontrava-se na porção citoplasmática, 35% dentro da membrana e 10 a 15% se exporiam ao exterior (TRIMMER & AGNEW, 1989). Possuiriam uma seletividade 12 vezes maior para íons sódio que para outros íons (CATTERALL, 1993). Segundo HILLE (1984 apud BOUDIER et al., 1992), o poro iônico do canal apresentaria um estreitamento, chamado filtro de seletividade, que o faria ter dimensão aproximada à do íon sódio, pois em quase todo o seu percurso o poro iônico seria mais largo que o referido íon. O fluxo iônico através do canal, ou sua interrupção, deveriam ser consequentes aos processos de ativação e inativação do canal, respectivamente. O processo de ativação seria decorrente da despolarização da membrana que exerceria força elétrica sobre sensores de voltagem que conteriam cargas "gating", as quais seriam provavelmente resíduos de aas associados à membrana (KOESTER, 1991; CATTERALL, 1993). NODA et al. (1984) designou o segmento S4 como um provável sensor de voltagem, por possuir resíduos carregados positivamente que estariam separados por resíduos fortemente hidrofóbicos, estrutura esta que se repetiria nos quatro domínios, que seriam as possíveis cargas "gating". A inativação rápida dos canais de sódio pareceu advir de

aas localizados no lábio interno do poro (TRIMMER & AGNEW, 1989; CATTERALL, 1993). Estas condições foram descritas, de maneira simplificada, por HILLE (1984 apud BOUDIER et al., 1992) através de um possível sensor dipolar que detectaria modificações do potencial de membrana e assim induziria mudanças na conformação proteica do canal, entre os estados fechado, aberto e inativo.

TRIMMER & AGNEW (1989), numa revisão sobre canais de sódio, destacaram que os peptídeos destes canais eram mais conservados entre proteínas de animais da mesma espécie e menos conservados naquelas de animais de espécies diferentes.

A permeabilidade ao íon sódio através de seu canal iônico num PA foi descrita como estando aumentada por período de 0,5 a centenas de milisegundos, e que a mesma diminuiria para a linha de base em 2 milisegundos (CATTERALL, 1993). Nesta revisão, o autor também mencionou que o sítio de ação de certas toxinas, drogas e cátions inorgânicos sobre os canais de sódio deveria ser por ligação destas moléculas no interior do poro, passando a competir com a ocupação de íons permanentes, e que TTX e saxitoxina bloqueariam os canais de sódio por ligação de alta afinidade com a porção, ou lábio extracelular do poro. Anestésicos e drogas antiarrítmicas, também abordadas na mesma revisão, ligar-se-iam no lado intracelular do canal, portanto somente quando o poro estivesse aberto.

## Canais de sódio e o músculo esquelético

Empregando a técnica "loose-patch voltage-clamp", CALDWELL et al. (1986) mostraram através de preparações com músculos esqueléticos de cobras (m. oblíquo externo abdominal) e ratos (m. flexor breve dos dedos), que a densidade de corrente referente aos canais de sódio era alta nas membranas da placa terminal e em suas proximidades e baixa nas proximidades dos tendões. A densidade de corrente diminuía com o distanciamento circunferencial e longitudinal da placa motora, parecendo esta diminuição, ser a mesma em ambas as direções. Entre a placa motora e o tendão observaram registros pouco frequentes, com densidade de corrente intermediária entre os dois pontos. Por localização autorradiográfica, utilizando alfa-toxina de escorpião - toxina II do *Androctonus australis Hector* (AaH), a densidade de canais de sódio nas proximidades da goteira sináptica foi estimada ser  $5000/\mu\text{m}^2$  (BOUDIER et al., 1992). Não observaram a presença de canais de sódio nas cristas das dobras pós-juncionais, contrariamente aos achados de FLUCHER & DANIELS (1989), mas que estes localizavam-se nas bases das dobras pós-sinápticas, e cuja densidade também diminuía com a profundidade e

distanciamento da goteira sináptica. Estes mesmos achados, que consideraram profundidade e distanciamento dos canais em relação a goteira sináptica, foram obtidos por LE TREUT et al. (1990) através experimentos de "binding" com as toxinas alfa e beta de escorpião em músculo esquelético de camundongos e por FLUCHER & DANIELS (1989), com estudos citoquímicos ultraestruturais com imuno-ouro em diafragma de ratos. Estes últimos autores, através destes mesmos estudos, também estabeleceram colocação de uma possível proteína de ancoramento para os canais de sódio (ankyrina) e das proteínas do próprio canal na profundidade das dobras e região perijuncional, apesar de ter obtido baixa densidade de ligação.

Em 1978, CAILLÉ et al. através de preparações que utilizaram m. semi-tendinoso de *Rana esculenta* sugeriram que a corrente de influxo que promovia a contração muscular - corrente de sódio - poderia ser separada em duas fases: uma precoce, gerada na superfície da membrana, e uma tardia, gerada na membrana do túbulo T, a qual seria responsável por parte da contração muscular. Os autores fizeram referência ao fato de que a corrente de sódio "tubular" teria cinética mais lenta que a da superfície. Experimentos realizados com frações de TTX também em m. semi-tendinoso de *Rana esculenta* mostraram diferentes sensibilidades dos canais de sódio das membranas da superfície e das membranas do sistema T (JAIMOVICH et al., 1983). Foi postulado que a densidade de canais de sódio na superfície da fibra era quatro vezes maior que nos túbulos T. Desta forma, as propriedades elétricas das referidas membranas têm relação à distribuição e densidade dos canais de sódio voltagem-dependentes.

A corrente de sódio nas fibras musculares de contração rápida e de contração lenta tem sido estudada por RUFF & WHITTLESEY, em 1993. Estes autores, utilizando a técnica de "loose-patch voltage-clamp" de fibras musculares de contração rápida e de contração lenta observaram que o tipo de fibra influencia as propriedades do canal dependente de voltagem e a distribuição desta proteína sobre o sarcolema. Os dados mostraram que a corrente de sódio na região da placa era 541% mais intensa para fibras de contração rápida e 327% para fibras de contração lenta quando comparado com a corrente de sódio extrajuncional, e que a corrente de sódio para fibras de contração rápida no repouso era 154% mais intensa na placa e 56% mais intensa na membrana extrajuncional quando comparado com as fibras de contração lenta. Também foi evidenciado que para uma determinada fibra, os canais de sódio próximos à placa são similares aos canais que se encontram distantes à ela.

## Canais de sódio e o tecido nervoso

Quanto ao tecido nervoso periférico e a presença de canais de sódio, BOUDIER et al. (1992) evidenciaram baixa densidade ou ausência destes canais na membrana axonal. Nas células de Schwann estimaram densidade de 1000 canais/ $\mu\text{m}^2$ , e na região extrajuncional de 400 a 700/ $\mu\text{m}^2$ . GRAY & RITCHIE (1985) através de experimentos de "binding" e experimentos eletrofisiológicos também observaram a presença de canais de sódio nas células de Schwann de coelhos e nas células de Schwann de ratos colocadas em cultura. CHIU (1987) estabeleceu relação entre a presença de corrente de sódio sensível à voltagem (e corrente de potássio) nas células de Schwann não mielinizantes e o processo de mielinização da fibra nervosa. MASSACRIER et al. (1990) contrariaram os resultados observados por CHIU (1987), utilizando em seus experimentos toxina beta marcada de escorpião (toxina IV de escorpião *Centruroides suffusus suffusus*) em nervos ciático de coelhos. Os autores observaram ausência de sítios ligantes na membrana plasmática das células de Schwann de fibras mielínicas ou amielínicas.

Experimentos realizados por GRISSMER (1986) desmielinizando agudamente os internodos de nervo periférico de sapo e realizando "voltage-clamp", demonstraram influxo de corrente transitória sensível à TTX e que esta produziria alongamento da corrente de potássio. Este autor também relacionou a densidade de canais de sódio e potássio no nodo de Ranvier e internodo, e estabeleceu que para o íon potássio a densidade de canais era 20 vezes menor no internodo que no nodo, e para o íon sódio, esta mesma relação, era 500 vezes menor no internodo. Em 1988, BOUDIER et al. utilizando toxina II de AaH mostraram a existência de canais de sódio na membrana de axônios neurosecretórios, através de marcação na hipófise de rato. Também mostraram marcação sobre as células gliais que recobrem as JNMs. Além disso, propriedades do nodo de Ranvier para ligação catiônica vêm sendo investigada desde o século passado. LANDON & LANGLEY (1969 apud ZAGOREN, 1984) observaram que os NR possuíam em suas estruturas substâncias ligantes de cátions. A ligação de cátions foi observada no axoplasma nodal de fibras maduras e mielinizadas, e foi proposto que estes sítios relacionariam-se a canais de sódio. Pela técnica de "freeze-fracture", na membrana nodal do SNC e SNP, foi demonstrada a presença de partículas intramembranas na face-E e na face-P. A face-P apresentou igual número de partículas quando analisada a região nodal e internodal, e a face-E apresentou maior concentração na região nodal, e nesta, a densidade de partículas esteve próxima a estimada para canais de sódio (cerca de 1200 a 1300/ $\mu\text{m}^2$ ) (para revisão ver ZAGOREN, 1984).

## Canais de sódio e neurotoxinas

A literatura revela que as neurotoxinas tornaram-se um objeto de estudo essencial em neurobiologia, sendo os canais de sódio um alvo privilegiado para suas ações neurotóxicas.

A TTX, assim como outras (algumas abaixo relacionadas), são toxinas específicas para este canal. As toxinas bloqueadoras dos canais de sódio seriam TTX e saxitoxina (STX) (RITCHIE & ROGART, 1977). A TTX é uma guanidina heterocíclica encontrada originalmente no ovário e fígado dos peixes da sub-ordem *Gymnodontes*, e mais recentemente também foi encontrada em lagartixa, sapo e polvo (para revisão ver CATTERALL, 1980). Esta toxina deve atuar sobre os sistemas cardiovascular, respiratório e neuromuscular, inibindo a geração do PA. A inibição se dá via bloqueio reversível da permeabilidade ao sódio na fase de despolarização da célula excitável. A interação da toxina com o canal de sódio deve ocorrer no lado extracelular do canal. A STX também é uma guanidina heterocíclica produzida por dinoflagelados do gênero *Gonyaulax* e encontrada em larga concentração nos moluscos, mexilhões e outros animais deste tipo. Os estudos realizados com esta toxina ocorreram após aos da TTX, e mostraram que esta toxina também bloqueia o PA sem causar despolarização, de modo reversível, como para a TTX. A TTX e a STX devem ligar-se aos canais de sódio quando estes estão em repouso, ativados ou inativados, e parece que o sítio receptor para estas toxinas não se relaciona ao componente sensível à voltagem do canal. Há fortes evidências de que o grupo carboxila pertencente ao filtro de seletividade do canal seria essencial para o transporte iônico e necessário para a ligação das toxinas. As conotoxinas, como a derivada do *Conus geographus*, pertencem a este grupo pois inibem a fixação de STX no canal de sódio do músculo por interação com o sítio de ação desta toxina (para revisão ver CATTERALL, 1980)

A veratridina, a batracotoxina, a aconitina e a grayanotoxina promovem despolarização das células excitáveis por manterem os canais permanentemente abertos (RITCHIE & ROGART, 1977). A veratridina é um alcalóide esteróide, e o mais potente, produzido pelas plantas da sub-ordem *Melanthaceae*, da família *Lilaceae*. A veratridina é causadora de contratura muscular, disparos nervosos iterativos e alteração da ritmicidade cardíaca. Estas alterações devem ser decorrentes da despolarização das células excitáveis causadas por bloqueio da inativação do canal de sódio e mudança da ativação para potenciais mais negativos (em decorrência da ação desta toxina, no potencial de membrana de repouso tem-

se canais iônicos ainda ativados). A permeabilidade ao íon sódio causada por esta toxina é bloqueada por TTX, indicando que a veratridina realmente modifica uma fração do canal de sódio envolvida na geração do PA. A batracotoxina (BTX) é um alcalóide esteróide isolado da pele do sapo colombiano *Phyllobates aurotaenia* e espécies relacionadas. Os efeitos desta toxina foram despolarização muscular e nervosa por aumento da permeabilidade ao sódio (ativação persistente no potencial de repouso da membrana) nas membranas excitáveis, despolarização esta bloqueada por TTX (ALBUQUERQUE et al., 1971). A TTX é um inibidor não-competitivo da ação desta toxina o que indica que a BTX atua em sítio receptor diferente ao da TTX e STX no canal de sódio. Estudos realizados em nodo de Ranvier demonstraram que tal toxina promove bloqueio completo da inativação e mudança, na dependência da voltagem, na ativação para potenciais de membrana mais negativos. A aconitina é um alcalóide produzido pela planta *Aconitium napellus* e é responsável por repetitivos pós-potenciais e oscilações seguindo estimulação nervosa. Estes efeitos são produzidos devido a despolarização prolongada seguindo ao PA, que então previne a repolarização. A TTX também bloqueia esta despolarização, sugerindo que tal despolarização seja resultante da ativação dos canais de sódio voltagem-dependente e bloqueio da inativação. As grayanotoxinas (I, II e III) estão contidas nas plantas da família *Ericaceae* e despolarizam as células excitáveis por aumentarem a permeabilidade ao íon sódio. A TTX inibe de forma não-competitiva a corrente de sódio induzida por esta toxina, o que indica que elas atuam em sítios diferentes no canal de sódio. De forma geral pode ser inferido que estas toxinas, solúveis em lipídeos, atuam sobre o mesmo canal iônico devido ao fato de, a TTX causar específico bloqueio às suas respectivas ações, e ainda que elas se ligam com alta afinidade para um estado ativo dos canais de sódio e mudam o equilíbrio preexistente dependente da voltagem entre o estado aberto e inativo (para revisão ver CATTERALL, 1980).

As toxinas polipeptídicas que atuam em canais de sódio são as do veneno de cretas espécies de escorpião e as de anêmona do mar. Estas toxinas foram extensamente usadas na investigação e interpretação da estrutura, função e diferenciação dos canais de sódio ao nível molecular (JAIMOVICH et al., 1982). A fidedignidade quanto à densidade de canais de sódio, inferida através de experimentos de "binding" ou eletrofisiológicos usando toxinas, foi contestada por LE TREUT et al. (1990). Venenos e toxinas de escorpião causaram alterações nas propriedades de voltagem dos canais de sódio, induzindo liberação de neurotransmissores, arritmias cardíacas, despolarização e disparos repetitivos no nervo (CATTERALL, 1980). O veneno do escorpião fricano *Leiurus quinquestriatus*,

do escorpião *Androctonus australis Hector*, e do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* prolongaram a inativação dos canais de sódio (BARHANIN et al., 1982) e o primeiro alterou a dependência da voltagem da ativação e inativação para potenciais de membrana mais negativos (para revisão ver CATTERALL, 1980). O veneno do escorpião *Centruroides sculpturatus* causou repetitivos potenciais de placa terminal no nervo motor, manutenção da corrente de sódio após fluxo transitório deste íon - o potencial de ação foi prolongado - e não teve efeito sobre a sua inativação, mas alterou a dependência da voltagem da ativação para potenciais de membrana mais negativos (KATZ & EDWARDS, 1972; MEVES et al., 1982). A presença de TTX e STX não afetou a ligação destes venenos no sítio receptor do canal de sódio, o que indicou distinção do local de ação para os venenos e da TTX e STX. As toxinas originadas dos venenos dos escorpiões foram classificadas em alfa e beta toxinas. As alfa toxinas, como a toxina II originada do AaH, induziram de forma geral prolongada inativação do canal de sódio, e sua afinidade estava relacionada ao potencial de membrana da célula. As beta toxinas, como a toxina IV originada do veneno de *Centruroides suffusus suffusus*, mudaram a ativação dos canais de sódio independente do potencial de membrana. As toxinas alfa e beta devem ligar-se especificamente aos sítios 3 e 4, respectivamente, dos canais de sódio - ver tabela a seguir (LE TREUT et al., 1990; MASSACRIER et al., 1990). A toxina de anêmonas do mar foi inicialmente isolada e purificada do veneno de *Anemonia sulcata*, com polipeptídeos de peso molecular variando entre 2500 e 5000 daltons. A partir desta foram sequenciadas três toxinas, e de outra anêmona, a *Anthopleura xanthogrammica*, mais uma toxina. Os polipeptídeos de cadeia mais longa eram mais potentes que os de cadeia mais curta, e produziam inibição da inativação e ligação dependente da voltagem (para revisão ver CATTERALL, 1980).

A tabela abaixo enumera as toxinas referidas anteriormente e as correlaciona com seus diferentes sítios de ação farmacológicos.

Sítio receptor	Neurotoxinas	Efeitos farmacológicos
1	TTX saxitoxina	inibição do transporte iônico
2	veratridina batracotoxina aconitina grayanotoxina	ativação persistente do canal e sinergia às toxinas que se fixam no sítio 3

Sítio receptor	Neurotoxinas	Efeitos farmacológicos (continuação)
3	toxinas de escorpião tipo alfa toxinas de anêmona mar	inibição da inativação e sinergia com as toxinas que se fixam no sítio 2
4	toxinas de escorpião tipo beta	modificam a ativação

Inseticidas naturais como as piretrinas e seus derivados sintéticos como os piretróides devem atuar no sistema neuromuscular de insetos e crustáceos por aumento da permeabilidade ao sódio, induzindo hiperexcitabilidade, convulsões e paralisias eventuais. Seu principal efeito foi diminuição na velocidade de inativação do canal com consequente aumento transitório da permeabilidade deste íon durante o PA (JACQUES et al., 1980). Estas neurotoxinas, em altas concentrações, devem deprimir a permeabilidade ao sódio e ao potássio, com consequente bloqueio da excitabilidade nervosa. Este bloqueio, no entanto, foi revertido na presença de alcalóides (como a veratridina e BTX) e outras neurotoxinas peptídicas (JACQUES et al., 1980).

Alguns venenos e toxinas não têm ação direta sobre os canais de sódio. No entanto, atuando em outros locais que não estes canais, induzem grandes alterações estruturais no tecido muscular esquelético ou sinais clínicos neurológicos semelhantes aos causados pelo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*.

O veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* interferiu na liberação do neurotransmissor do terminal nervoso motor, mas não promoveu alterações na porção pós-sináptica (GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD, 1984). Através de injeção endovenosa e injeção intramuscular em diafragmas de camundongos, observaram no tecido nervoso lesões leves associadas à tumefação mitocondrial (com desorganização de suas cristas e vacuolização com inclusões vesiculares) e diminuição no número e variação na forma das vesículas sinápticas. Com relação as fibras musculares, estas apresentaram dissolução em 24 horas, com desorganização e necrose. Entre 24 e 48 horas havia perda de axoplasma e, colabamento e esfarelamento de mielina com formação de glóbulos. Os autores associaram estas alterações a possível aumento do íon cálcio no citosol. Outras neurotoxinas como a taipoxina e notexina dos venenos das cobras *Elapidae*, *Oxyuranus scutellatus* e *Notechis scutatus scutatus*, respectivamente, também

causaram alterações na porção pré-sináptica (CULL-CANDY et al., 1976). Estas alterações incluíram bloqueio da transmissão neuromuscular e depleção de vesículas sinápticas do terminal nervoso, mas não interferiram na região pós-sináptica.

STRINGER et al. (1972) estudou o efeito do veneno da cobra *Crotalus viridis* em músculo bíceps femoral de camundongo. Observou áreas focais de mionecrose com retículo sarcoplasmático dilatado e desorientado, componentes filamentosos condensados e, mitocôndrias alargadas e arredondadas, além de hemorragia no tecido conjuntivo endomisial muitas vezes associada a rompimento da membrana sarcoplasmática.

Achados clínicos como lacrimação, salivação, sudorese, taquicardia e fasciculação muscular compuseram um quadro, dentre outros sinais, causado pelo veneno da aranha australiana *Atrax robustus* (ou "Sydney funnel-web spider") (DUNCAN et al., 1980; DUCHEN & GOMEZ, 1984). Estes sinais foram observados a nível clínico em macacos e foram decorrentes da liberação de ACh na placa motora e sistema nervoso autônomo, seguido por depressão desta liberação num segundo momento. Estudos *in vitro* mostraram que os efeitos foram reversíveis e não pareceram causar danos ultraestruturais (DUNCAN et al., 1980).

Os venenos da aranha do gênero *Lactrodectus*, popularmente chamadas viúva negra, marrom e vermelha, têm ação neurotóxica e afetam o terminal nervoso sensorial e motor, principalmente de humanos, primatas e roedores. O indivíduo acometido sofre dor irradiada da área da mordida, torna-se inquieto e experimenta dificuldade respiratória. A síndrome conta ainda com suor profuso lacrimação, náusea, vômito, oligúria, retenção urinária e priapismo. O veneno parece atuar a nível pré-sináptico (axônio pré-terminal e células de Schwann), mas não afeta as fibras musculares. Estudos *in vitro* utilizando o veneno da viúva negra em diafragmas de camundongos revelaram terminais nervosos tumefeitos, depleção de vesículas sinápticas e rompimento mitocondrial. As alterações agudas observadas nas JNMs utilizando este mesmo veneno, restringiram-se ao terminal pré-sináptico e foram caracterizadas por tumefação, elétron-lucência, depleção das vesículas sinápticas, mitocôndrias tumefeitas e arredondadas, membranas enroladas em proximidade ao axolema e desnervação após poucas horas (QUEIROZ, 1982). Os ramos nervosos intramusculares e células de Schwann encontravam-se em condições normais (para revisão ver DUCHEN & GOMEZ, 1984).

## Danos musculares

Os venenos e toxinas podem ter seus sítios de ação específicos na célula, no entanto, os mecanismos que desencadeiam no final do ciclo, as alterações estruturais, são bastante semelhantes.

Em 1978, PUBLICOVER & DUNCAN utilizando um ionóforo de cálcio que atua no retículo sarcoplasmático, observaram que o aumento do íon cálcio intracelularmente, causou um sequestro deste, num primeiro momento, pelas mitocôndrias que então se tornaram tumefeitas. Em seguida elas liberaram o cálcio acumulado e sofreram mudanças estruturais. Segundo estes autores, o aumento de cálcio intracelular estimularia uma protease neutra responsável pela degradação dos miofilamentos. Na década seguinte DUNCAN & JACKSON (1987) utilizando agentes que reduziram a degradação proteica induzida pelo cálcio, não observaram redução dos danos ultraestruturais. Ainda neste ano, DUNCAN (1987) estabeleceu que o íon cálcio em concentrações superiores a  $10^{-7}$  M poderia disparar rápido e consistente dano muscular. Baseados nos dados supracitados concluiu que os mecanismos de dano celular rápido não estavam relacionados, de forma prioritária, a alteração no pH, depleção de ATP, proteases neutras ativadas por cálcio e enzimas lisosomais, embora tenha argumentado que *in vivo* cada um destes itens podia ter sua função. RODERMANN et al. (1982), estudando este mesmo problema, utilizaram ionóforo de cálcio e inibidores da protease ativada por este íon e observaram, assim como DUNCAN & JACKSON (1987), que a lise proteica não era reduzida. No entanto, utilizando um inibidor de proteases lisosomais encontraram inibição da lise tecidual, e concluíram que a lise proteica do músculo era causada por efeito da função lisosomal mediada por prostaglandina.

Em 1988, estudando a ação da fosfolipase A2 (PLA2 - considerada como provável candidata causadora de danos musculares em consequência da sua ativação pelo cálcio), DUNCAN observou que a inibição desta e de outros metabólitos desta via, não prevenia o dano celular induzido pelo aumento de cálcio intracelular. O autor então não descartou a possível atividade desta fosfolipase no dano muscular, mas sugeriu a atuação de um outro sistema.

Em continuidade aos estudos dos fatores que ativariam o mecanismo de dano muscular via aumento de cálcio intracelular, DUNCAN (1989) estudou a função dos radicais oxigênio. A ativação deste mecanismo seria via fluxo de cálcio através de uma proteína de transporte ligada a desidrogenase transmembrana, onde a desidrogenase NADPH que relaciona-se ao fluxo de elétrons

transmembrana e ciclo redutor, causaria oxidação "thiol" (alteração da miosina) e produção de  $O_2^-$ . Desta forma, o sistema disparado por cálcio seria ativado por perturbações na membrana, anóxia, agentes mitocondriais e ciclo redutor (oxidação "thiol").

Diversas musculopatias apresentam, sob análise ultraestrutural, extensas áreas de dano muscular. Em pacientes com paralisia hipercalêmica, cujo principal sintoma referido é fraqueza muscular, a análise ultraestrutural do tecido muscular mostrou desorganização miofilamentar, perda do paralelismo dos sarcômeros, rompimento miofibrilar, tumefação mitocondrial e rompimento de suas cristas, ondulamento ("streaming") das linhas Z, retículo sarcoplasmático dilatado e formando vacúolos, áreas de rarefação de material miofibrilar e, corpos ovais encontrados abaixo da membrana sarcolemal (MACDONALD et al., 1968). Na poliomiosite crônica, que também se manifesta por fraqueza e cansaço, a análise do tecido muscular ao MET demonstrou alterações marcantes no núcleo da fibra e que com o rompimento do envelope nuclear eram identificadas figuras mielínicas e desarranjo das linhas Z, daquela proximidade (SATO et al., 1971).

Significativas alterações da fibra muscular são encontradas na distrofia muscular de Duchenne. Os níveis de CPK (creatinafosfoquinase) estavam usualmente elevados, assim como os do íon cálcio (MILHORAT et al., 1966; ANAND, 1983), as miofibrilas extensamente espaçadas, as mitocôndrias em degeneração, retículo sarcoplasmático desorganizado, distendido e vesiculado, havia rompimento da membrana plasmática porém a fibra muscular permanecia envolvida pela lâmina basal, linhas Z borradas, miofibrilas fragmentadas, aumento de sarcoplasma e figuras mielínicas (MILHORAT et al., 1966).

A condição: exercício excêntrico tem mostrado ser marcante na produção de danos fibrilares. Indivíduos submetidos a este tipo de exercício, como no processo de desaceleração, mostraram dor muscular tardia, rompimento de fibras musculares mas ausência de necrose isquêmica das mesmas (FRIDÉN et al., 1981). O sarcômero perdeu sua estrutura, de forma não usual (EDWARDS et al., 1984), as linhas Z tornaram-se alargadas, borradas e rompidas e o material miofilamentoso adjacente encontrou-se supercontraído ou desorganizado (FRIDÉN et al., 1981). O consumo de oxigênio, e portanto ATP, foi menor que o utilizado na contração concêntrica (ABOTT et al., 1952; MATTIELLO et al., 1989). A força voluntária máxima diminuiu com o progresso do número de contrações (NEWHAM et al., 1983). Tem sido mostrado que contrações excêntricas causam elevação dos níveis

de enzimas musculares circulantes, principalmente creatinaquinase plasmática (CK) (ARMSTRONG et al., 1983; NEWHAM et al., 1983; MATTIELLO et al, 1989).

A febre também é uma condição que desencadeia lise proteica do tecido muscular. BARACOS et al. (1983) demonstraram que, por exemplo, nos processos infecciosos (e consequente febre), os pirógenos leucocíticos induziram liberação de prostaglandina E2 pelo tecido muscular e esta, por sua vez, levou à quebra de proteínas deste tecido.

As fibras musculares esqueléticas sofreram danos ultraestruturais quando foram colocadas em condição de hipóxia (McCALL & DUNCAN, 1989). Sob preparação *in vitro* o músculo *soleus* foi submetido a hipóxia e a estimulação de campo, seguindo um período de hipóxia. Nestas circunstâncias a análise morfológica identificou dois tipos de danos: sarcômeros relaxados com dissolução dos miofilamentos e deslizamento ou dissolução de secções das linhas Z; além de sarcômeros contraídos ou hipercontraídos com miofilamentos aparentemente pouco danificados. Ainda sob estas condições, após 30 minutos de hipóxia, havia dano ultraestrutural nas fibras musculares, sem contudo haver alteração detectável nos níveis de CK. Segundo estes autores a liberação de CK ocorreria somente após incubação do músculo por 90-120 minutos. Os eventos de dano celular pareceram ser propiciados por mudanças no fluxo de cálcio mitocondrial, já que a função desta organela é suprimida quando exposta a curtos períodos de hipóxia. Os autores concluíram que a combinação hipóxia e atividade contráctil desencadeariam mal funcionamento das mitocôndrias e RS.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS

Os animais utilizados para experimentação foram camundongos *Mus musculus* variedade *Albinus* da raça Swiss, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP pesando entre 18 e 22 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com água e ração *ad libitum*, no Departamento de Farmacologia desta Universidade.

### 2. TOXINAS

As toxinas PhTx1 e PhTx2 (toxinas 1 e 2 respectivamente) da aranha *Phoneutria nigriventer* foram isoladas e, gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Carlos R. Diniz do Centro de Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG.

As toxinas enviadas ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP foram solubilizadas, conforme indicação, em solução fisiológica (ou salina). A concentração final apresentada pelas toxinas 1 e 2, em relação à solução diluidora, foi de 1:1 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

### 3. DOSE

Nos estudos eletrofisiológico e morfológico, as doses de toxina 1 e 2 estabelecidas para a experimentação foram, em ambos os casos, de 1 µg/ml - toxinas já solubilizadas em salina. Esta dose foi definida tomando-se por referência os estudos eletrofisiológicos desenvolvidos por FONTANA & VITAL-BRAZIL (1985), que utilizaram o veneno total desta aranha, e obtiveram respostas do terminal nervoso e das fibras musculares esqueléticas a partir de 1 µg/ml da solução do veneno nos experimentos *in vitro*. Também foram considerados os estudos eletrofisiológicos, desenvolvidos por este mesmo grupo, utilizando a toxina PhTx2 (comunicação pessoal). Nestes estudos observaram responsividade das fibras musculares esqueléticas e do terminal nervoso, do músculo diafragma de ratos, a partir da dose de 0,38 µg/ml.

O estudo eletrofisiológico contou ainda com a utilização de uma dose superior, de 5 µg/ml, em determinados experimentos, com o objetivo de comprovar os resultados encontrados.

### 4. PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS

Os animais foram sacrificados por deslocamento na porção cervical da coluna vertebral nos experimentos fisiológicos, e anestesiados com éter etílico nos experimentos morfológicos e em seguida, foram sangrados por secção dos vasos do pescoço. A preparação nervo frênico - diafragma foi isolada e montada no menor tempo possível, estando sob aeração com carbogênio (mistura 95% oxigênio e 5% gás carbônico, pH 7,4) e em solução Tyrode, segundo técnica modificada descrita por Bülbiring, 1946) - para ratos. A composição da solução Tyrode em mM foi: NaCl 136,8; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; MgCl<sub>2</sub> 0,25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3; glucose 11,0.

### 5. ESTUDO MIOGRÁFICO

#### **Registro da força de contração frente à estimulação indireta**

Para estudos do efeito da PhTx1 sobre a contração muscular, o músculo diafragma, com o nervo íntegro, foi suspenso em cuba de vidro de 5 ml com solução de Tyrode (composição já descrita), aerado com carbogênio e em temperatura de 37°C, durante 60 minutos. O registro foi realizado em fisiógrafo MPM - 4A através de transdutor isométrico F - 50 NARKO Bio-Systems Inc. O músculo foi

estimulado por eletrodo bipolar, através de seu nervo motor (indiretamente), cujos pulsos foram gerados por estimulador GRASS S48. A duração e a frequência destes pulsos foram 0,2 ms e 0,1 Hz respectivamente, e voltagem maximal. Durante todo este processo o músculo esteve submetido à tensão constante de 2 g/cm através de fio atado à sua porção tendinosa e ligado ao transdutor miográfico acima citado. A toxina foi adicionada somente após estabilização da preparação (n=2).

## 6. ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

### **Registro dos potenciais de repouso (PR) e dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm)**

Para estudos do efeito da toxina 1 sobre potenciais bioelétricos, o diafragma foi montado horizontalmente numa cuba de perspex de capacidade de 4 ml. O fluído do banho, temperatura e mistura do gás para oxigenação também foram solução de Tyrode pH 7,4, 37°C e 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, respectivamente.

O registro destes potenciais foi conduzido de maneira convencional, utilizando microeletrodos de vidro preenchidos com KCl 3 M (resistência 5 a 20 MOhms), que foram introduzidos intracelularmente na região das placas terminais. Os PRs (n=4) e pptm (n=2) foram registrados em osciloscópio TEKTRONIX e somente os pptm foram fotografados em câmara POLARÓIDE.

Ambos os potenciais bioelétricos foram avaliados em diferentes tempos após a adição da PhTx1. São eles 0 (ou controle), 15, 30, 45 e 60 minutos.

As medidas de PR que foram consideradas em cada tempo representaram o valor médio obtido à partir do registro de cinco fibras musculares distintas.

A análise de significância estatística das medidas tomadas para potencial de repouso (PR) foi determinada pelo teste Student t, com um nível de significância 0,01.

## 7. ESTUDO MORFOLÓGICO

### 7.1 Incubação

Para análise morfológica, metade dos músculos diafragmas (hemidiafragmas) de camundongos, isolados segundo técnica descrita anteriormente, foram montados com a face torácica voltada para cima (na posição supina), em cubetas de 3,5 cm de diâmetro, preenchidas com 4 ml de solução nutritiva Tyrode à 37°C e sob aeração feita com carbogênio. As bases das cubetas eram preenchidas com parafina para proporcionar fixação do hemidiafragma, através de alfinetes de metal, instituindo tensão mínima nas fibras musculares.

A seguir o hemidiafragma, sob aeração, permaneceu incubado sob temperatura constante de 37°C. Nestas condições adicionava-se a toxina (1 ou 2) na dose de 1 µg/ml (já descrita) e iniciava-se a contagem do tempo. O grupo controle 0 (zero) foi obtido simplesmente através do isolamento do diafragma seguindo a técnica descrita e, fixado subsequentemente. O grupo controle 60 min foi obtido através do isolamento e incubação do diafragma em solução nutritiva Tyrode, na ausência de toxina, com as demais condições experimentais mantidas. Os tempos considerados neste estudo foram: controle: 0 (zero) e 60 minutos, sem toxina, e para cada toxina, 1 e 2: 15, 30, 45 e 60 minutos. O número de diafragmas considerado em cada tempo e que compôs o estudo morfológico foi de 2 (n=2).

### 7.2 Fixação

Completada a incubação do músculo com a toxina, iniciava-se o processo de fixação do material em experimentação, para análise ao MET.

#### 7.2.1 Fixação pelo método Karnovsky

Nesta etapa a solução incubadora foi desprezada e, rapidamente foi derramado por sobre o músculo solução fixadora Karnovsky - 2,5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,2 M (acrescido de 0,002 g de cloreto de cálcio para cada 100 ml de tampão cacodilato nesta concentração), pH 7,2 - 7,4 e, à temperatura de 4°C. Nesta solução o músculo foi fragmentado em pedaços de aproximadamente 2 x 1 mm e aí foram mantidos por tempo mínimo de 2 horas, à 4°C.

Após 1 hora de imersão em solução fixadora Karnovsky, parte do material foi colocado em outra solução, descrita abaixo, para proceder à marcação das JNMs

(STRUM & HALL-CRAGGS, 1982). O restante do material foi mantido na mesma solução dando prosseguimento ao processamento habitual de tecidos biológicos.

### **7.2.2 Marcação das placas motoras**

O material selecionado para marcação das placas motoras foi transferido para solução de marcação preparada imediatamente antes à sua utilização, segundo técnica descrita por STRUM & HALL-CRAGGS (1982). A técnica basicamente compreende a localização citoquímica da atividade da acetilcolinesterase das placas motoras. Através deste método são revelados sítios "esterase positivos" pela incubação com indoxil acetato e pararosanilina, possibilitando a observação das junções neuromusculares ao MO e MET. O meio de incubação citoquímico consistiu de:

- 1,0 ml de uma solução de indoxil acetato e,
- 0,2 ml de solução de pararosanilina em
- 8,8 ml de tampão citrato (pH 6,0) resfriado.

Após permanecer uma hora neste meio de incubação, à 4°C, o material tornou-se disponível para prosseguir conjuntamente o processamento do material para a MET com a outra porção de músculo que encontrava-se em solução fixadora Karnovsky.

O material como um todo (marcado e não marcado) passou em seguida por solução a 1% de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ).

### **7.2.3 Pós-fixação e contrastação**

Colocado em solução de  $\text{OsO}_4$  1% (diluição feita em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 - 7,4) o material permaneceu à 4°C, por 2 horas.

Anteriormente à fase de desidratação, o material foi retirado da solução de  $\text{OsO}_4$  e transferido para a solução de acetato de uranila 0,5%, aquosa. Nesta solução foi deixado durante a noite.

### **7.3 Desidratação**

O material foi desidratado em etanol (30, 50, 70, 90, 95 e 100%). Em cada estágio os fragmentos permaneceram por períodos de 15 min, sendo que em 100% foram realizadas três trocas.

Anteriormente à embebição, os fragmentos passaram por óxido de propileno diluído em etanol na proporção 1:1, e a seguir em óxido de propileno puro, por períodos de tempo de 15 min cada.

## **7.4 Embebição e inclusão**

A resina utilizada nesta etapa de experimentação foi Araldite 502 (Polysciences Inc.) misturada com DDSA, DMP-30 e Dibutilftalato nas devidas proporções, como indicado pelo fabricante.

A embebição dos fragmentos foi feita com a resina anteriormente referida diluída em óxido de propileno. Foram estabelecidas três etapas, de uma hora cada, utilizando três proporções distintas de resina:óxido de propileno - 1:2, 1:1, e 2:1, realizadas em rotor. Em seguida os fragmentos foram transferidos para resina pura e colocados em estufa à 37°C por uma hora. A seguir foram transferidos para os moldes de silicone, previamente preenchidos com resina pura e foram orientados, onde permaneceram em estufa à 60°C por, no mínimo, três dias para polimerização.

## **7.5 Cortes semifinos**

Obtida a polimerização em resina dos fragmentos do material em estudo, foram efetuados o seccionamento e a análise dos mesmos.

### **7.5.1 Seccionamento**

Os fragmentos de músculo esquelético foram cortados em Ultramicrótomo Super Nova (Reichert-Jung) utilizando, navalhas de vidro. Cortes com espessura variando entre 0,5 a 1 µm foram separados e aderidos à lâminas histológicas através de flambamento. O processo de coloração destes cortes foi feito com azul de toluidina 5% em carbonato de sódio 0,5%.

### **7.5.2 Análise Histopatológica**

O processo de análise histopatológica destas lâminas foi feito em MO Zeiss. Os cortes semifinos foram fotografados em Fotomicroscópio Zeiss, utilizando filme Kodak Plus X Pan 125 ASA, branco e preto.

A partir desta análise será estabelecida a seleção do material que seria submetido ao seccionamento ultrafino.

## **7.6 Cortes ultrafinos**

### **7.6.1 Seccionamento**

Os cortes ultrafinos foram obtidos utilizando ultramicrótomo referido anteriormente, com navalha de diamante. A espessura dos cortes variou entre 60 e

70 nm. Este material foi contrastado com solução de citrato de chumbo ( $\text{CO}_2$  sensível) a 0,2% em hidróxido de sódio 0,1 N (VENABLE & COGGESHALL, 1965), por 7 min à temperatura ambiente.

### **7.6.2 Análise Ultraestrutural**

O processo de análise ultraestrutural deste material foi feito em MET Zeiss modelo EM9S-2 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, operado sob tensão de 60 KV. O filme utilizado para fotografar este material foi Fuji Electron Microscopic Film - orthochromatic.

## **7.7 Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O material utilizado para análise na MEV esteve incubado com as toxinas 1 e 2, assim como o material utilizado para o MET, já referido anteriormente (item 7.1). Após incubação, os diafragmas, sob os mesmos tempos considerados para análise ao MET, foram fixados em Karnovsky conforme descrito no item 7.2.1. Tendo permanecido por tempo mínimo de 2 horas nesta solução, à 4°C, e já fragmentado, o material foi transferido para solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M (com cloreto de cálcio), pH 7,4 e lavado com esta solução por 15 min. O processamento utilizado segue técnica descrita por USHIKI & IDE (1988) para observação de nervos periféricos, a qual segue abaixo.

### **7.7.1 Digestão enzimática**

Encerrado o processo de lavagem, os fragmentos foram transferidos para solução de hidróxido de potássio 5N por 10 min à 60°C, dando início ao processo de exposição das fibras musculares por liberação do tecido conjuntivo que envolve este tecido (epimísio, perimísio e endomísio).

O material foi novamente lavado em tampão fosfato 0,1 M, agora em pH 6,8 e, a seguir foi colocado em solução de collagenase Tipo II (Sigma) por 3 horas, finalizando o processo de digestão enzimática do tecido conjuntivo.

### **7.7.2 Pós-fixação**

Nesta etapa os fragmentos apresentavam, a nível macroscópico, nítidas fibras musculares parcial ou totalmente livres. A imersão destas em ácido tânico 2% (diluído em tampão fosfato 0,1 M - pH 7,4) constituiu a etapa seguinte à digestão enzimática. Nesta solução os fragmentos permaneceram por 2 horas à temperatura ambiente, e em seguida foram lavados em água destilada por 1 hora. O processo de pós-fixação foi completado com solução de tetróxido de ósmio 2% (diluído em

tampão fosfato 0,1 M - pH 7,4) onde os fragmentos estiveram imersos durante a noite.

### **7.7.3 Desidratação**

Após terem sido novamente lavados em água destilada, os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol: 30, 50, 70, 90 e 100%, permanecendo por 15 min em cada estágio, com exceção do último estágio, onde permaneceu por 45 min (referente a 3 trocas).

Finalizada a desidratação, o material foi transferido para acetato de isoamila diluído em etanol, na proporção 1:1 por 15 min. Em seguida esteve em acetato de isoamila puro por mais 15 min.

### **7.7.4 Ponto crítico**

O ponto crítico-seco foi alcançado usando CO<sub>2</sub> líquido estando o material em acetato de isoamila. Para tanto foi utilizado aparelho de ponto crítico BALZERS CPD 030 - Critical Point Dryer. Os fragmentos foram então montados em suportes de alumínio e metalizados com carbono grafite e ouro, em evaporador HITACHI, modelo HUS - 4GB Evaporator.

### **7.7.5 Análise**

O processo de análise de superfície das fibras do músculo diafragma foi realizado em MEV JSM-JEOL T300 do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP. O filme utilizado para fotografar este material foi FUJI Neopan SS - 120.

## RESULTADOS

### ANÁLISE FISIOLÓGICA: BIOPOTENCIAIS E FORÇA DE CONTRAÇÃO

Os resultados fisiológicos obtidos utilizando a PhTx1 foram divididos quanto às respostas observadas na preparação nervo frênico-diafragma de camundongos frente à estimulação indireta e quanto aos registros do potencial de repouso e do potencial de placa terminal em miniatura.

#### 1. REGISTRO DO POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (pptm)

O registro destes potenciais para cada tempo de atuação da toxina (15, 30, 45 e 60 minutos), com dose de 1 µg/ml, não demonstrou qualquer alteração na frequência ou amplitude, quando comparado com o registro realizado nas condições de repouso (figura 1 I, II, III, IV, V).

Estes resultados não foram modificados quando foi utilizada uma dose cinco vezes maior (5 µg/ml) da PhTx1 sobre a preparação.

#### 2. REGISTRO DOS POTENCIAIS DE REPOUSO (PR)

O registro dos PR após os mesmos tempos à adição de 1 µg/ml da toxina 1, não mostrou alteração significativa ( $P > 0,01$ ) nos sentidos de despolarização ou hiperpolarização das fibras musculares esqueléticas de camundongos.

O registro dos valores de PR também não sofreu alteração quando foi utilizada uma dose cinco vezes maior (5 µg/ml) da toxina 1 da aranha sobre a preparação (tabela 1; figura 2).

### 3. REGISTRO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR À ESTIMULAÇÃO INDIRETA (EI)

Na preparação nervo frênico - diafragma de camundongos sob estimulação indireta, foi observado que a toxina PhTx1 da aranha *Phoneutria nigriventer*, na dose 1 µg/ml, não desencadeou alteração na amplitude das contrações das fibras musculares esqueléticas no decorrer de 60 minutos à adição da mesma (figura 3).

## ANÁLISE MORFOLÓGICA: HISTOPATOLÓGICA (MO) E BIOLOGIA CELULAR (MET)

Os achados do estudo morfológico compreendendo o grupo controle e os grupos que envolviam os estudos com as toxinas PhTx1 e PhTx2 serão descritos a partir das análises efetuadas ao nível da MO e MET.

OBS. A técnica utilizada para marcação das JNMs pela pararosanilina não se mostrou eficiente particularmente para MET. Entretanto os fragmentos que encontravam-se macroscopicamente marcados (pontos ocres no tecido muscular) foram selecionados, e a partir dos blocos destes foi possível alcançar as JNMs com maior facilidade, quando comparado com os demais blocos (não marcados).

### 1. GRUPO CONTROLE

#### 1.1 Microscopia Óptica

As fibras musculares analisadas, referentes aos grupos controle (0 e 60 min) mostraram em cortes longitudinais para ambos os tempos, estriações transversais, núcleos ovalados e periféricos distribuídos uniformemente ao longo do comprimento das fibras, bem como os contornos celulares bem delimitados. Quando em cortes transversais observavam-se contornos arredondados ou poligonais, e núcleos também periféricos (figuras 4 a, b).

Os axônios evidenciados nestes mesmos tempos, isolados ou pertencendo a grandes feixes nervosos, apresentavam contornos regulares, mielina bem evidente e axoplasma uniformemente distribuído (figura 5).

## 1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise ultraestrutural das fibras musculares dos animais pertencentes aos grupos controle mostrou em ambos os tempos, quando em secção longitudinal, a unidade básica de contração - o sarcômero - com estruturas constitucionais bem definidas (figura 6). Pode ser verificado o alinhamento das linhas Z, os filamentos de actina e miosina, as tríades instaladas abaixo da linha que faz a união das bandas A e I, para o músculo esquelético de camundongos, e as mitocôndrias bem preservadas com suas cristas bem orientadas e matriz com elétron-densidade normal. Em cortes transversais verificou-se a delimitação das fibras musculares pelo sarcolema, a presença de sarcoplasma por entre os filamentos e, retículo sarcoplasmático e mitocôndrias por entre as miofibrilas (figura 7).

A placa motora nestes animais era caracterizada por terminal nervoso com vesículas sinápticas esféricas elétron-lucentes bem distribuídas e mais concentradas nas chamadas zonas ativas. As mitocôndrias pertencentes ao terminal nervoso apresentavam-se estruturalmente bem preservadas. A porção da fibra muscular que encontrava-se imediatamente abaixo do terminal axonal apresentava-se com uma depressão, a fenda sináptica primária. O sarcolema nesta região apresentava invaginações que caracterizam as fendas sinápticas secundárias. A lâmina basal, que acompanha o sarcolema em toda a sua extensão, na placa motora seguiu a fenda sináptica secundária. A região sub-sináptica da fibra muscular que constitui a placa motora possuía um sarcolema rico em mitocôndrias (figura 8).

Sob corte transversal, os feixes nervosos mostravam-se envolvidos, em toda a extensão, pelo perineuro. Seus axônios apresentavam-se envoltos por lamelas de mielina, que lhes conferia uma conformação irregular, podendo ocasionalmente serem identificados núcleos das células de Schwann. O axoplasma estava uniformemente distribuído. O espaço entre as fibras nervosas era preenchido por delicada camada de tecido conjuntivo, endoneuro, com fibras colágenas distribuídas ao acaso e orientadas transversalmente e longitudinalmente (figuras 9 a, b). Em situações muito restritas observou-se pequena descompactação das lamelas de mielina e discreta tumefação mitocondrial, nos referidos tempos

## 2. EFEITOS DA PhTx1

### 2.1 Microscopia Óptica

As alterações histopatológicas observadas, através da MO, causadas pela PhTx1 foram encontradas nos tecidos muscular e nervoso após 15 min de atuação desta toxina e não diferiram, em extensão, quanto àquelas encontradas após 60 min de atuação da mesma toxina.

Quando analisadas em cortes transversais ou longitudinais, as fibras musculares apresentaram-se íntegras em sua maioria, durante todas as etapas estudadas (figuras 10 a, b). No entanto, algumas fibras musculares apresentaram vacúolos após 15 min de incubação, vacuolização esta que acometeu de maneira similar outras fibras analisadas após incubação por 30, 45 e 60 min. Outras fibras poderiam apresentar-se escuras. Ambas as alterações podem indicar mionecrose (figura 11).

Os axônios mielínicos analisados neste estágio do estudo mostraram graus diferentes de retração do axoplasma. Aqueles axônios que mostravam, em corte, o axoplasma preenchendo todo o lúmen axonal podem representar fibras nervosas totalmente íntegras, ou simplesmente mostrarem integridade apenas naquele nível da secção (figura 12).

### 2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

#### 2.2.1 Análise ultraestrutural das fibras musculares

As fibras musculares que se mostravam alteradas ao MO, quando analisadas no MET traziam várias alterações ultraestruturais. Um achado bastante comum foi tumefação mitocondrial, observada logo após 15 min de incubação. Esta organela apresentou diversos estágios degenerativos. O aumento de volume, caracterizado por arredondamento do contorno externo da organela, era acompanhado por elétrons-lucência de sua matriz. As cristas mitocondriais apresentavam perda de sua arquitetura intrínseca, e membranas ou barras elétrons-densas também foram observadas no interior desta organela, com 30 min de experimentação (figura 13). Ocasionalmente havia lise de suas membranas externas (figura 14).

Foi observada vacuolização no interior das fibras musculares que, provavelmente correspondia aos microvacúolos identificados pelo MO, e aumento do volume sarcoplasmático (aumento da elétrons-lucência) em todos os tempos

estudados. A vacuolização pareceu ser decorrente da tumefação do sistema reticular sarcoplasmático, caracterizando-se por formação de estruturas esféricas, e por vezes, com acúmulo interno de membranas enroladas concentricamente. Os túbulos T com seu aspecto e dimensões normais podiam ser vistos justapostos às cisternas terminais do retículo sarcoplasmático dilatadas (figuras 15 a, b). O aumento de volume de sarcoplasma era mais evidente nas proximidades do sarcolema, mas também pode ser notado após 15 min de incubação no interior da fibra muscular esquelética, por entre as miofibrilas. Estas regiões possuíam, na maioria das vezes, além de mitocôndrias dispersas (e por vezes em degeneração), restos de material celular. Ocasionalmente foi observado rompimento ou rarefação do sarcolema após incubação do músculo esquelético com a PhTx1 (figura 16).

As fibras musculares analisadas sob corte longitudinal mostraram, algumas vezes, integridade de sua organização morfológica, com sarcômeros bem definidos. Outras vezes podiam ser notadas regiões nas fibras em que estas estruturas encontravam-se encurtadas (figura 13), o que denota que as alterações mionecróticas nesta fase precoce têm características focais. As regiões de encurtamento do sarcômero associavam-se efetivamente às áreas de degeneração mitocondrial. No entanto, em áreas que havia mitocôndrias em degeneração, podiam ser vistos sarcômeros que estavam em condição de repouso (figura 17).

### **2.2.2 Análise ultraestrutural dos nervos**

Nos quatro tempos analisados, os axônios com axoplasma uniformemente distribuído, com microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias estruturalmente bem definidos, e linhas intraperiódicas contínuas coexistiam com axônios que apresentavam alterações caracterizadas por descompactação das lamelas de mielina e, formação de vacúolos intramielínicos e intraxonais. Paralelamente a célula de Schwann mostrava sinais degenerativos, que incluíam edema, perda de organelas e vacuolização (figuras 18 e 19).

Adicionalmente, algumas fibras nervosas apresentavam as lamelas de mielina descompactadas, as quais voltavam-se para o axoplasma formando as chamadas figuras mielínicas, e acabavam por comprimir as estruturas pertencentes à porção interna do axônio. Muitas vezes, além da compressão do axoplasma desencadeada pelas figuras mielínicas, somava-se a vacuolização intramielínica (figura 20).

Os vacúolos encontrados no citoplasma da célula de Schwann, assim como os vacúolos intramielínicos não se apresentavam em grandes proporções e eram

de pequeno tamanho. O perineuro encontrava-se íntegro em sua extensão, assim como o endoneuro, e núcleo da célula de Schwann.

Com o tempo, os vacúolos intramielínicos avolumavam-se de forma a restringir o conteúdo axoplasmático a pequeno espaço dentro do axônio. Vacuolização intraxonal constituiu um achado ocasional nos axônios do nervo frênico incubados com PhTx1 (figura 21).

As fibras nervosas amielínicas não mostraram alterações aparentes nos quatro tempos analisados. Morfologicamente assemelhavam-se às observadas nas condições controle.

### **2.2.3 Análise ultraestrutural das junções neuromusculares**

As placas motoras analisadas no decorrer do intervalo dos 15 aos 60 min de incubação com a PhTx1 mostraram terminais nervosos com mitocôndrias que apresentavam cristas bem definidas e vesículas sinápticas com forma, tamanho e quantidade semelhante às encontradas sob as condições controle. Exceção ocorreu aos 30 min de atuação da toxina, onde alguns terminais nervosos mostraram-se depletados parcialmente de vesículas sinápticas.

A porção pós-sináptica apresentou dobras pós-juncionais alongadas e esparsamente distribuídas, acompanhando em extensão os terminais nervosos. O distanciamento aparente das membranas pré e pós-sinápticas - fenda sináptica - condizia com as condições controle. Também pode ser observado agrupamento de mitocôndrias próximo às dobras pós-juncionais, com arranjo de suas cristas e elétrôn-lucência quase que exclusivamente normais. O sarcoplasma sub-sináptico mostrou-se homoganeamente distribuído próximo e por entre as miofibrilas (figura 22).

Um achado bastante interessante, e discretamente evidenciado desde os 15 min de incubação, foi a presença de goteiras sinápticas rasas (figura 23). Várias placas motoras foram encontradas nestas condições após 60 min de incubação. Nelas, o terminal pré sináptico estava alongado, acompanhando grande extensão da fibra muscular, e estreitado por todo o seu percurso. Ainda neste tempo, os terminais nervosos haviam perdido a elétrôn-lucência, apresentando-se como uma massa opaca quando observados no MET e, as vesículas sinápticas encontravam-se densamente comprimidas (figura 24). As demais estruturas, do próprio terminal assim como da porção pós-sináptica e da fenda sináptica, encontravam-se estruturalmente bem preservadas.

### 3. EFEITOS DA PhTx2

#### 3.1 Microscopia Óptica

O tecido muscular e os axônios analisados sob MO, após serem incubados por período de até 60 min com a toxina 2 da aranha *Phoneutria nigriventer*, sofreram alterações estruturais que progrediram dos 15 min aos 60 min. A extensão da lesão foi diretamente proporcional ao tempo de incubação do tecido com a toxina.

Após 15 min de incubação, sob corte transversal, apareceram lesões focais de fibras musculares em associação a fibras com aparência normal. As lesões caracterizavam-se por microvacúolos, regiões das fibras que apresentavam áreas pálidas e irregulares, fibras com lesões em delta, células escuras, células com aparência amorfa e outras com miofibrilas agrupadas ao acaso (figura 25). Sob corte longitudinal puderam ser caracterizadas regiões de hipercontração e aumento de diâmetro nas fibras musculares, seguidas por regiões de estiramento dos miofilamentos e diminuição do diâmetro (figura 26). Estas alterações podiam ser acompanhadas pela presença de microvacúolos.

Aos 30 min, as fibras no seu todo mostravam-se atingidas mais extensamente, apresentando graus variados de lesão celular. Vacuolização foi o aspecto mais marcante em termos de extensão da lesão além de grande heterogeneidade na coloração das fibras, sendo que as mais escuras tinham aspecto amorfo-hialino (figura 27). Neste estágio, sob corte longitudinal também eram vistas fibras com coloração não uniforme ao longo do seu comprimento, inclusive com perda de material miofilamentar, e áreas de contração nas fibras.

Aos 45 min, as fibras musculares que se apresentavam sob corte transversal ainda eram predominantemente marcadas por vacúolos de diversas dimensões. Neste estágio, as fibras coradas mais fortemente apresentavam forma poligonal, as coradas mais levemente mostravam-se mais arredondadas, com aspecto tumefeito. Concomitantemente, eram identificadas lesões focais que atingiam a periferia da fibra tornando-as pálidas e havia até mesmo perda de parte da célula (figura 28). Em cortes longitudinais, eram vistos: vacuolização, células com aparência amorfa, regiões com áreas pálidas irregulares, áreas de hipercontração e de estiramento e, descontinuidade longitudinal dos miofilamentos (figura 29). Após 60 min de incubação, em cortes transversais era visível a tumefação sofrida pelas células

danificadas quando comparadas com as vizinhas, que apresentavam contornos poligonais assimétricos (figura 30). Observado o material em secções seriadas pode ser notado que os vacúolos sofriam aumento e diminuição nos seus tamanhos, de corte para corte.

Os axônios analisados sob corte transversal apresentaram marcada vacuolização após 45 e 60 min de experimentação (figura 31).

## **3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

### **3.2.1 Análise ultraestrutural do tecido muscular**

A análise ultraestrutural das fibras musculares mostrou alterações logo aos 15 min de incubação com a toxina 2. A princípio, pode ser constatada a coexistência de células bastante danificadas em proximidade a outras completamente intactas, as quais pareciam estar em maior proporção. As células afetadas apresentavam descontinuidade longitudinal, em espessura, dos sarcômeros, ou seja, perda do valor de referência em espessura das miofibrilas, no decorrer do comprimento da fibra. Além desta alteração em espessura, foi verificado rompimento dos miofilamentos em determinados pontos. A banda I do sarcômero em determinadas regiões estava com seu comprimento alterado, assim como, por conseguinte, a banda A. Estas porções contraídas, eram seguidas por zonas de repouso ou estiramento dos miofilamentos, promoviam desalinhamento das linhas Z da fibra (figura 32). As linhas Z em algumas ocasiões apresentaram-se borradas ou onduladas ("streaming"). O espaço entre os miofilamentos estava muito aumentado provavelmente por aumento do sarcoplasma (caracterizado por aumento da elétrion-lucência), o qual era mais avolumado nas proximidades da membrana sarcoplasmática. O sarcoplasma que envolvia os miofilamentos continha restos de material celular distribuídos homogeneamente. Havia ainda tumefação do retículo sarcoplasmático e as tríades eram marcadas por discreta tumefação da sua porção reticular (figura 33). Havia tumefação mitocondrial e desorganização de seu sistema de cristas. Algumas fibras continham internamente estruturas membranosas enoveladas, também chamado "whorls". Estas estruturas membranosas enoveladas foram vistas, a partir deste mesmo tempo, em proximidade ao sarcolema.

Aos 30 min de incubação o material apresentava áreas com alterações morfológicas musculares drásticas e com tumefação evidente das cisternas terminais do retículo sarcoplasmático (figura 34). Havia regiões nas miofibrilas de algumas fibras musculares onde não era possível identificar a banda I, e algumas

linhas Z também pareciam borradas. Os cortes transversais mostravam desorganização dos miofilamentos, aumento de sarcoplasma e restos de material celular no líquido sarcoplasmático. Também havia alterações mitocondriais.

As etapas posteriores mostraram aumento em extensão dos danos acima descritos, podendo, ocasionalmente, ser visto rompimento da membrana sarcoplasmática (figura 35). Algumas fibras apresentavam grandes e pequenos vacúolos por entre os miofilamentos dissolvidos no sarcoplasma. Os vacúolos de tamanho grande encontravam-se em quantidade restrita, formando estruturas enoveladas ou simplesmente possuíam o interior elétron-lucente no todo. Os vacúolos de tamanho pequeno eram fartos em número e, ocupavam extensa área sarcoplasmática. Após 60 min existiam fibras morfologicamente desestruturadas, com áreas que apresentavam alta densidade de miofibrilas associadas a outras de completa ausência. Até mesmo o sentido do corte, transversal ou longitudinal, era difícil de ser identificado pois havia completa perda da organização estrutural das fibras (figura 36). As mitocôndrias representaram, dentro do contexto: alterações ultraestruturais desencadeadas pela PhTx2 no músculo diafragma de camundongos, um aspecto indicativo do fator progressão da lesão. Pode ser notado uma evolução temporal, em extensão, do acometimento desta organela nas diferentes etapas deste estudo. Algumas fibras musculares apresentaram mitocôndrias estruturalmente íntegras em proximidade a outras fibras cujas mitocôndrias podiam encontrar-se tumefeitas, com seu sistema de cristas destruído e fragmentado, elétron-opacas, com restos de material no seu interior, barras elétron-densas, e até mesmo rompimento da membrana externa. As alterações supracitadas não puderam ser agrupadas de forma a estabelecer uma evolução cronológica do acometimento muscular e mitocondrial, ou seja, não pode ser estabelecido um paralelo entre o tempo de incubação do músculo com a toxina e os diversos estados das mitocôndrias. Nem todas estas alterações foram encontradas numa única fibra e, algumas destas alterações não foram vistas em todas as etapas de incubação do músculo com o veneno.

De forma geral, a toxina PhTx2 causou franca mionecrose cuja intensidade foi máxima no último tempo de análise, 60 min, para este trabalho.

### **3.2.2 Análise ultraestrutural dos nervos**

Também as lesões induzidas pela PhTx2 sobre os axônios do nervo frênico foram evidenciadas logo após 15 min de experimentação. Axônios em degeneração eram vistos em proximidade a axônios estruturalmente íntegros. Os axônios danificados apresentavam descompactação das lamelas de mielina e formação de

vacúolos de diferentes tamanhos identificados nas imediações do axoplasma, e foram classificados como intramielínicos. Também foram encontrados vacúolos no citoplasma das células de Schwann. As mitocôndrias do axoplasma mostraram-se, na maior parte das vezes, tumefeitas e com seu sistema de cristas em degeneração. O perineuro e o endoneuro apresentaram-se estruturalmente íntegros. Os NRs ocasionalmente observados neste tempo, apresentaram-se distendidos e bastante irregulares quanto nos seus diâmetros, com retração e separação das alças terminais de mielina das regiões paranodais proximais e distais (figura 37).

Dos 30 aos 60 min de incubação, os axônios do nervo frênico mostraram intensificação progressiva dos sinais anteriormente referidos. No decorrer do tempo foram identificados vacúolos de maior tamanho, a mielina tornou-se mais descompactada e as estruturas do axoplasma (microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias) cada vez mais comprimidas. Em algumas ocasiões o axoplasma reduziu-se quase à metade das dimensões originais ou até mais. A ruptura do perineuro também foi observada, mas em raríssimas ocasiões (figura 38). Durante este período de envenenamento pela PhTx2, alguns axônios apresentaram em seu interior as estruturas axoplasmáticas agrupadas ao acaso ou em estado de rarefação, o que foi classificado como edema intraxonial (figura 39).

Após 60 min de incubação apareciam vacúolos no citoplasma das células de Schwann tanto das fibras nervosas mielínicas como amielínicas. Entretanto as fibras amielínicas, diferentemente das mielínicas, não apresentavam necrose axonal visível (figura 40).

### **3.2.3 Análise ultraestrutural das junções neuromusculares**

As alterações desencadeadas pela PhTx2 sobre as JNMs puderam também ser evidenciadas logo aos 15 min de incubação. Neste tempo, as alterações observadas na região de sinapse neuromuscular referiam-se particularmente à região pré-sináptica. Os terminais nervosos apresentavam mitocôndrias edematosas com desestruturação e/ou perda das cristas, associada à elétronicência da matriz. Além disso, a maioria dos terminais mostravam-se depletados total ou parcialmente de vesículas sinápticas. Era comum a presença de porções do axoplasma segregadas do restante do terminal por membrana envolvente, provavelmente resultante da invaginação do axolema. Estas porções segregadas do axoplasma do terminal podiam ou não conter vesículas sinápticas sequestradas. Nos terminais não depletados de vesículas, estas podiam agrupar-se de forma irregular junto ao axolema pré-sináptico (figura 41). Com relação ao axolema em

certas regiões da superfície do terminal, apresentava-se mal definido como membrana unitária. A região pós-juncional sub-sináptica apresentava a fenda sináptica secundária, caracterizada pelas dobras pós-juncionais, modificada. As dobras apresentavam-se alargadas, principalmente próximo à fenda sináptica primária, escassas em número e rasas. Outras alterações dessa região incluíam a presença de mitocôndrias anormais, estruturas vacuolares membranosas e núcleo ("sole plate nucleus") com superfície altamente corrugada na face voltada para as dobras juncionais (figura 41). A porção pós-sináptica apresentava, às vezes, dobras pós-juncionais rasas ou até mesmo, ausência das mesmas (figura 42). As mitocôndrias podiam ou não apresentar-se desestruturadas.

Seguindo o avanço temporal, após 30 e 45 min, a toxina em estudo dava sinais de estar induzindo desnervação do terminal nervoso. Esta afirmação pode ser comprovada pela figura 43, onde observa-se espaçamento das porções laterais entre terminal nervoso e fibra muscular com deslocamento do terminal nervoso em relação à sua goteira, na fibra muscular e projeções da célula de Schwann para o interior da goteira sináptica. Além disso, houve diminuição drástica das vesículas de neurotransmissor e indefinição da membrana unitária, o axolema. As mitocôndrias não guardavam a posição característica que lhe cabe dentro do terminal. Também pode ser evidenciado alargamento das dobras pós-juncionais, diminuição na profundidade das mesmas, e escassez na sua periodicidade como já citado anteriormente. Além do aspecto desnervação, o terminal pré-sináptico mostrou-se por vezes deformado. O aspecto de pequeno botão ovalado envolvido parcialmente pela fenda sináptica primária tornou-se modificado, como pode ser visto na figura 44, apresentando-se agora como enorme estrutura mergulhada na fibra muscular. O aspecto "lavado" do terminal, vacúolos, restos membranosos, são outros aspectos anormais presentes nesses terminais.

Dando continuidade à evolução temporal, e conseqüentemente às modificações estruturais, aos 60 min pode ser comprovado que grande parte das JNMs analisadas apresentavam diversos graus de desorganização estrutural. Muitas delas apresentavam uma fenda sináptica alargada ou apresentavam restos de material celular no axoplasma, assim como depleção de vesículas sinápticas (parcial ou total), vacúolos intraxonais de diversos tamanhos, e tumefação e lise mitocondrial, caracterizando desnervação das fibras musculares esqueléticas observadas (figura 45). A porção pós-sináptica em adição aos itens já relacionados, apresentou ocasionalmente pequenas vesículas distribuídos ao acaso nas proximidades da goteira sináptica.

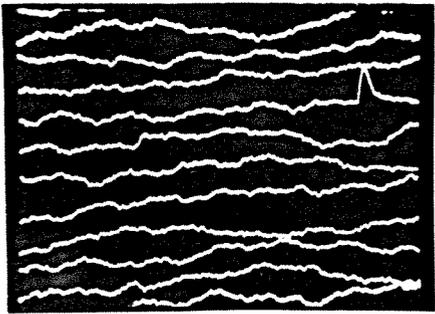
Resumindo, a PhTx2, derivada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* causou alterações agudas em todos os componentes neuromusculares considerados, alterações estas que progrediram com o tempo de exposição do músculo diafragma à toxina.

#### 4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

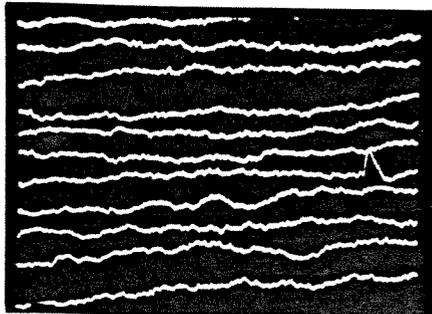
A análise de superfície das fibras musculares esqueléticas através do MEV mostraram, para as condições controle (zero e 60 min), a presença evidente de estriações transversais e um aspecto plano, a nível longitudinal (figuras 46 e 47, respectivamente). A análise das fibras incubadas com a PhTx2 mostrou corrugações, em pequeno e grande aumento, em determinadas porções que podem ser confrontadas com os achados macro e microscópicos (figuras 48 e 49). Macroscopicamente, durante o período de incubação com a PhTx2, podem ser notadas contrações espontâneas sofridas por algumas regiões do músculo diafragma. Microscopicamente, este fato pode ser confirmado pelas figuras 26 e 29, onde claramente são observadas áreas de contração e de estiramento.

Resultados mais significativos que pudessem estabelecer ou auxiliar na elucidação do mecanismo de ação das toxinas neste tecido, não foram obtidos através da análise imediata com utilização desta técnica. Portanto, torna-se somente parte ilustrativa do trabalho, os poucos achados obtidos pela análise do tecido muscular no MEV.

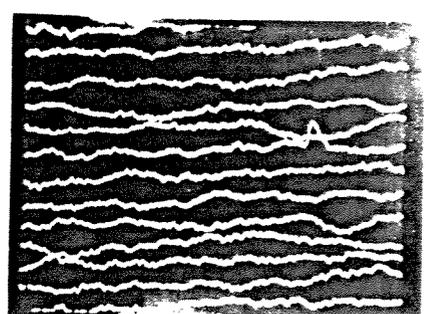
Figura 1 (I, II, III, IV e V). Efeito da toxina PhTx1 da aranha *Phoneutria nigriventer* sobre os potenciais de placa terminal em miniatura em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (n=2). I, controle; II, III, IV e V correspondem a 15, 30, 45 e 60 min após adição de 1 µg/ml da toxina ao banho. Note que o número de pptm não é modificado com o tempo de incubação do músculo com a toxina.



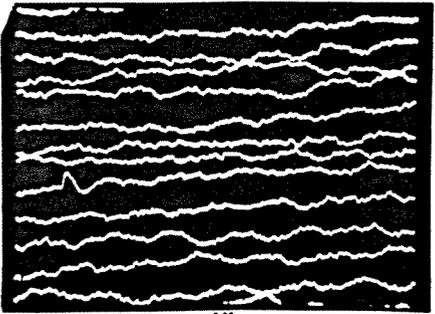
I



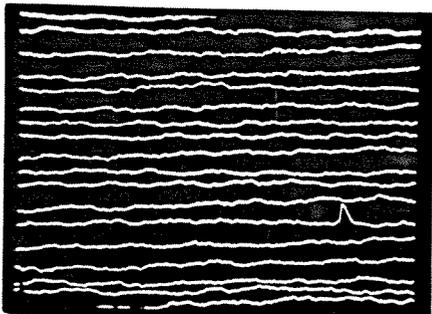
II



III



IV



V

Tabela 1: Efeito da toxina PhTx1 da aranha *Phoneutria nigriventer* sobre potencial de membrana a partir da análise de 5 fibras, para cada tempo. Quatro experimentos distintos foram realizados com dose 1 µg/ml da toxina no banho e um único experimento foi realizado com dose 5 µg/ml da toxina no banho. Os dados registram média ± DP.

Figura 2: Distribuição dos valores médios dos potenciais de membrana referentes as médias encontradas a partir da análise de 5 fibras, para cada tempo, nos diferentes experimentos.

- ◆, diafragma de camundongo incubado com PhTx1, dose 1  $\mu\text{g/ml}$  (n=4);
- , diafragma de camundongo incubado com PhTx1, dose 5  $\mu\text{g/ml}$  (n=1).

TOXINA PhTx1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	TEMPO (min)	POTENCIAL DE MEMBRANA (mV)
1 (n=4)	0	83,1 $\pm$ 3,40
	15	81,9 $\pm$ 1,58
	30	82,3 $\pm$ 1,54
	45	82,1 $\pm$ 1,44
	60	81,6 $\pm$ 2,26
5 (n=1)	0	81,6
	15	80,4
	30	80,4
	45	81,6
	60	82,0

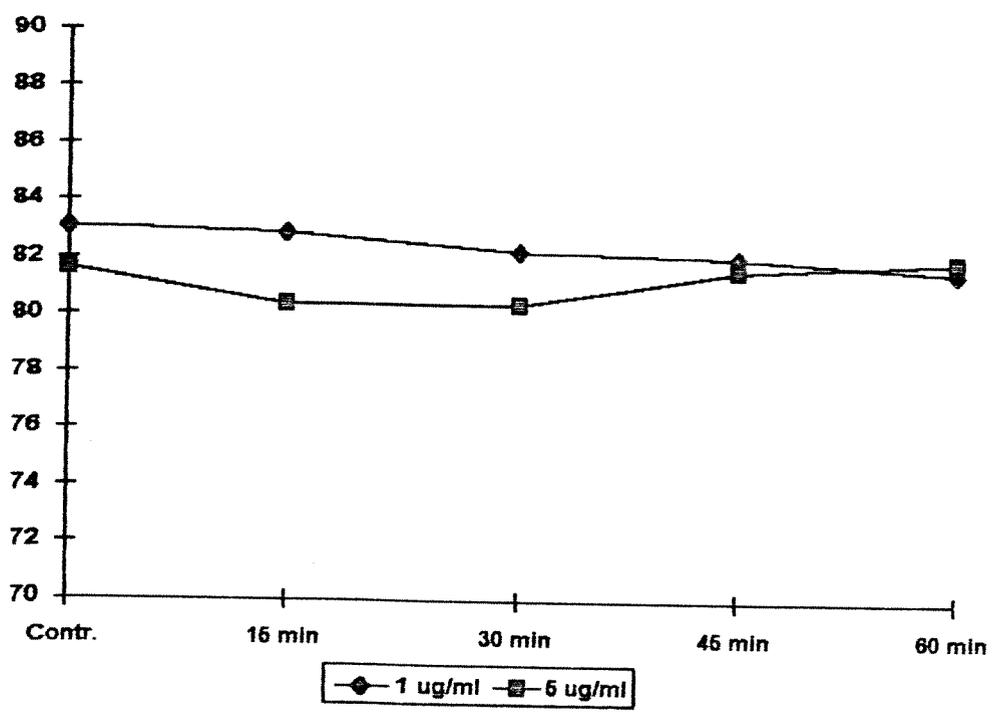


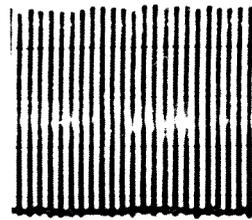
Figura 3: Efeito da toxina 1 da aranha *Phoneutria nigriventer* sobre diafragma de camundongos frente à estimulação indireta, com choques maximais de 0.1 Hz e 0,2 ms.



**A**



**B**



**C**

2 g [   
 1 min

Figura 4: Diafragma controle. a: controle 0 em corte transversal. As fibras musculares apresentam formas poligonais ou arredondadas com núcleos periféricos (→). b: controle 60 min em corte longitudinal. Observe as fibras musculares que apresentam discretas estriações transversais e a presença de um pequeno feixe nervoso. Azul de toluidina 520x e 1344x.

Figura 5: Diafragma controle. Observe nervo no tempo zero, por entre as fibras musculares, com suas bainhas de mielina e axoplasma homogeneamente distribuído. Azul de toluidina 640x.

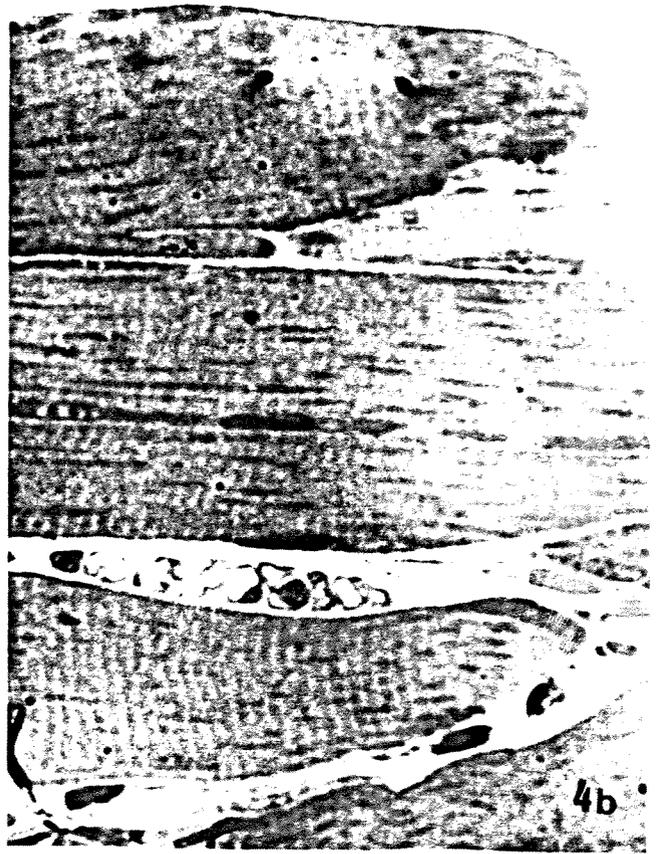


Figura 6: Ultraestrutura da fibra muscular normal em corte longitudinal. Observe as bandas A (A) e I (I), linhas Z (Z) e mitocôndrias (M). Controle 0. 16848x.

Figura 7: Fibra muscular normal em corte transversal. Note as miofibrilas delimitadas pelo sistema reticular sarcoplasmático ( → ) e pelas mitocôndrias. Controle 60 min. 18576x.

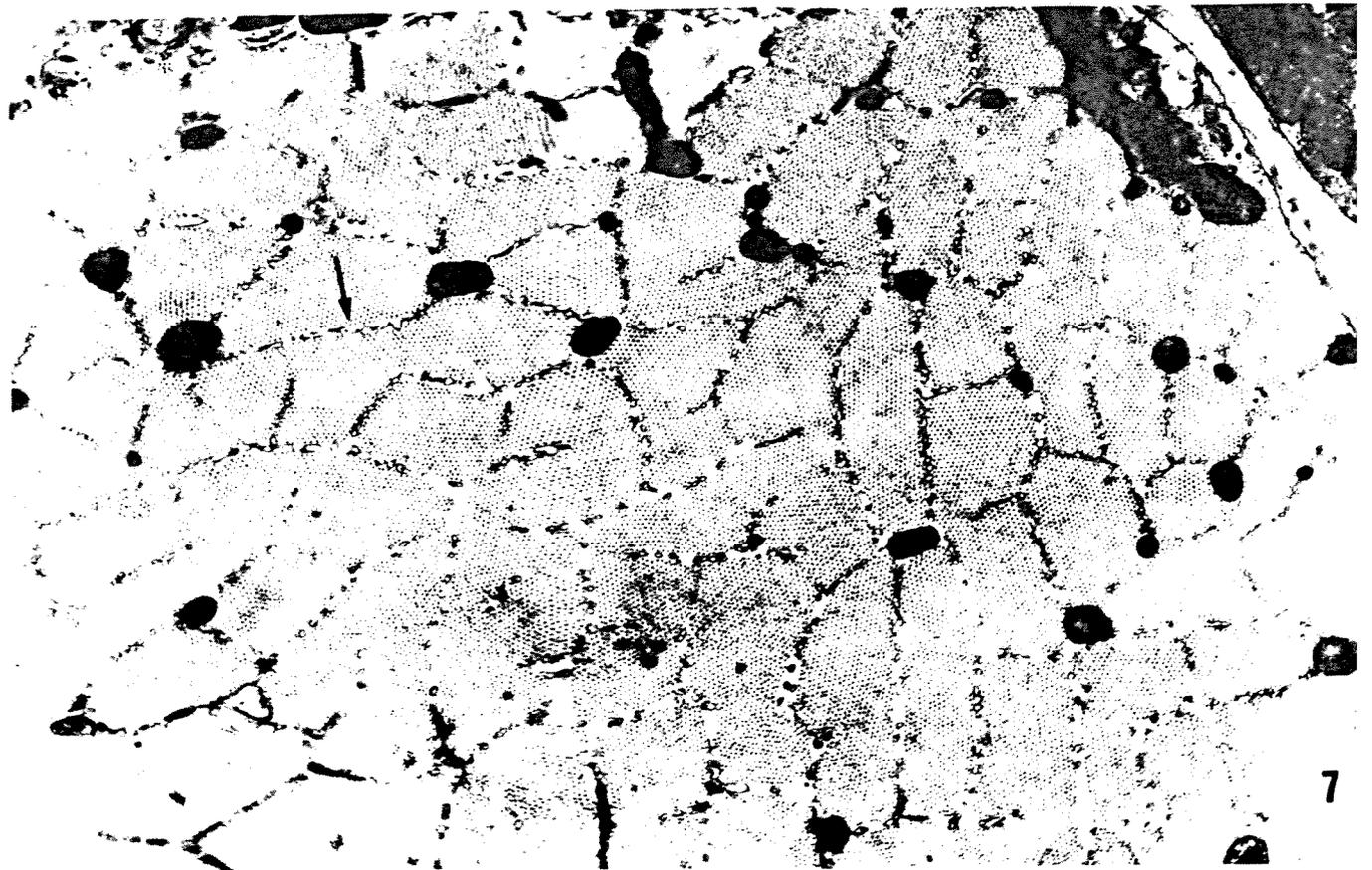
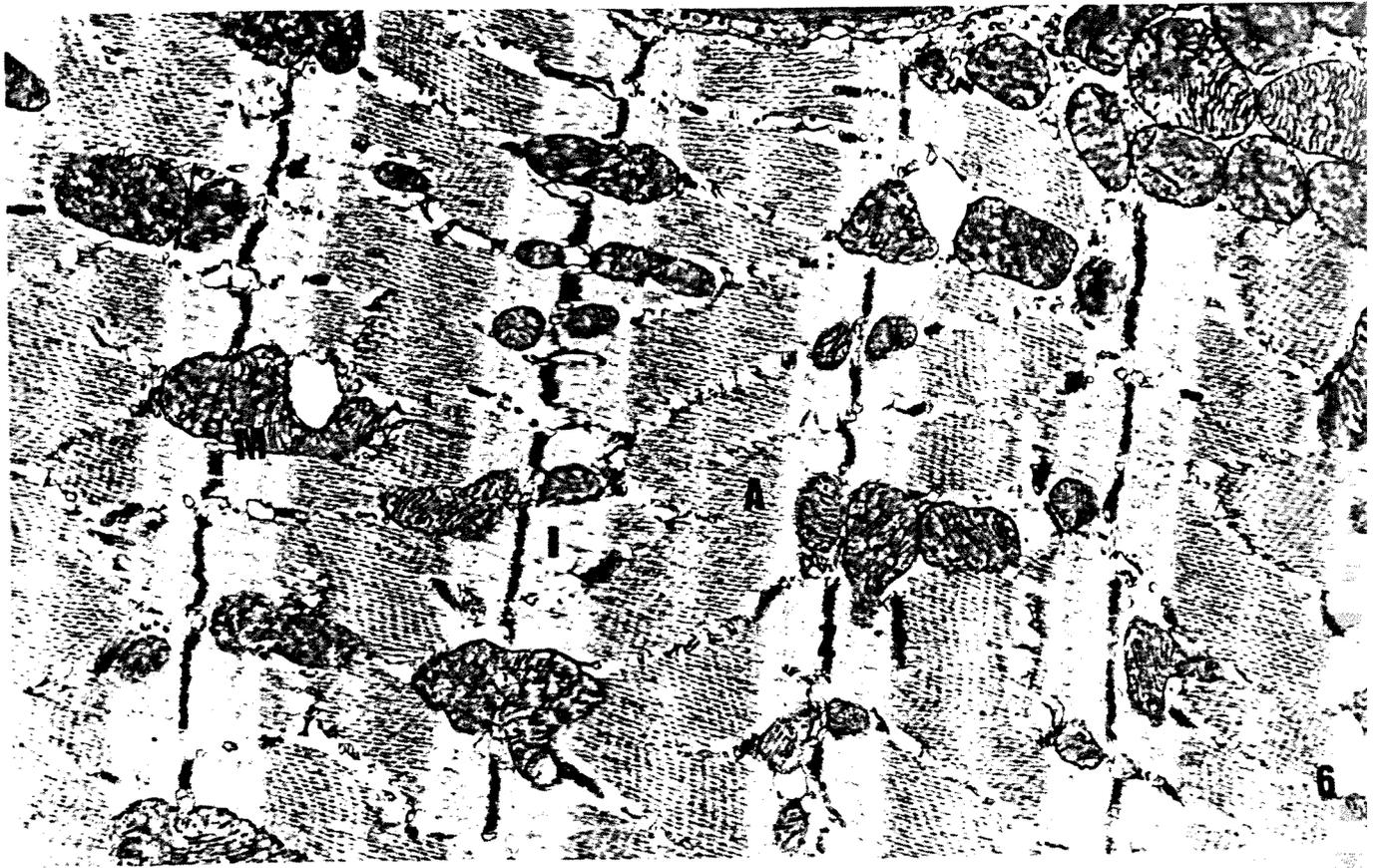


Figura 8: Placa motora normal. Controle 60. Observar terminal pré-juncional com vesículas sinápticas mais concentradas nas zonas ativas e axoplasma uniformemente distribuído. A nível pós-sináptico podem ser vistas as dobras pós-juncionais bem distribuídas e mitocôndrias dispostas nesta porção da fibra muscular. Observe núcleo da célula de Schwann. 19740x.

Figura 9: Axônios normais de um feixe nervoso. a: Controle 0; b: Controle 60 min. Observar em ambas as micrografias axônios com mielina compactada e axoplasma bem distribuído com mitocôndrias. Observe, em b, a presença do perineuro envolvendo todo o feixe nervoso (►) e do endoneuro, que preenche todo o espaço entre os axônios, com suas fibras colágenas. 8400x e 8000x.

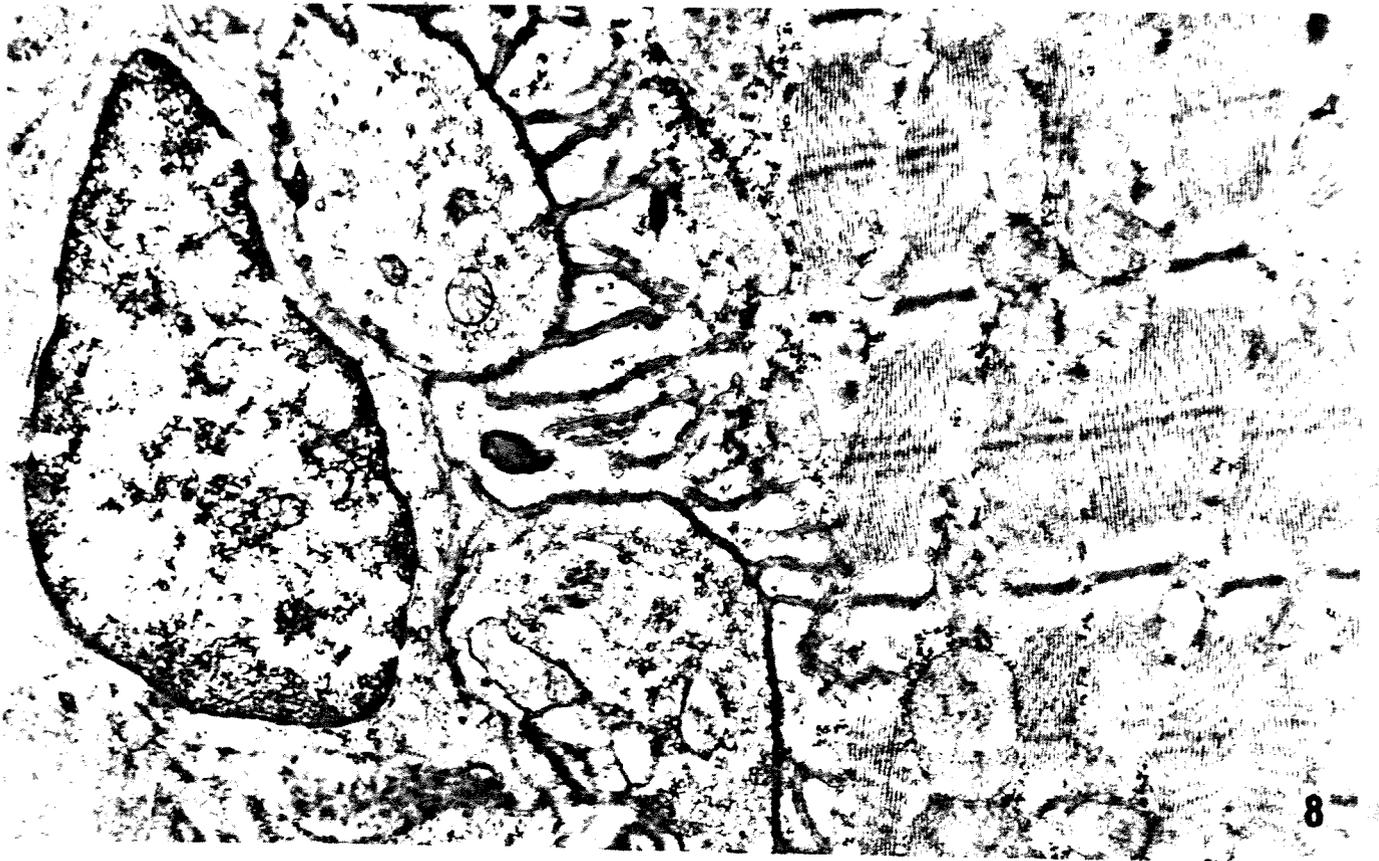


Figura 10: PhTx1. a: após 15 min de incubação e b: após 45 min. Vista geral mostrando a integridade das fibras musculares aos 15 min de incubação (a) e mesmo após 45 min (b). Os pontos e faixas em negro referem-se a pontos de localização de acúmulo de mitocôndrias. Em ambas há pequenos fascículos de axônios. Azul de toluidina 752x e 504x.

Figura 11: Observe no corte longitudinal, após incubação com a PhTx1 por 60 min, que as fibras com microvacúolos esparsos mantêm a estriação, enquanto aquelas com alta densidade dos mesmos, mostram aspectos de mionecrose. Observe as zonas A e I, e as linhas Z nas fibras normais e sua desorganização nas células vacuolizadas e escuras. Azul de toluidina 992x.

Figura 12: Nesta figura pode ser visto corte transversal de ramos do nervo frênico após incubação com a PhTx1 por 45 min. Alguns axônios apresentam vacúolos de diferentes tamanhos no axoplasma e na bainha de mielina, outros parecem encontrar-se íntegros. Azul de toluidina 1184x.

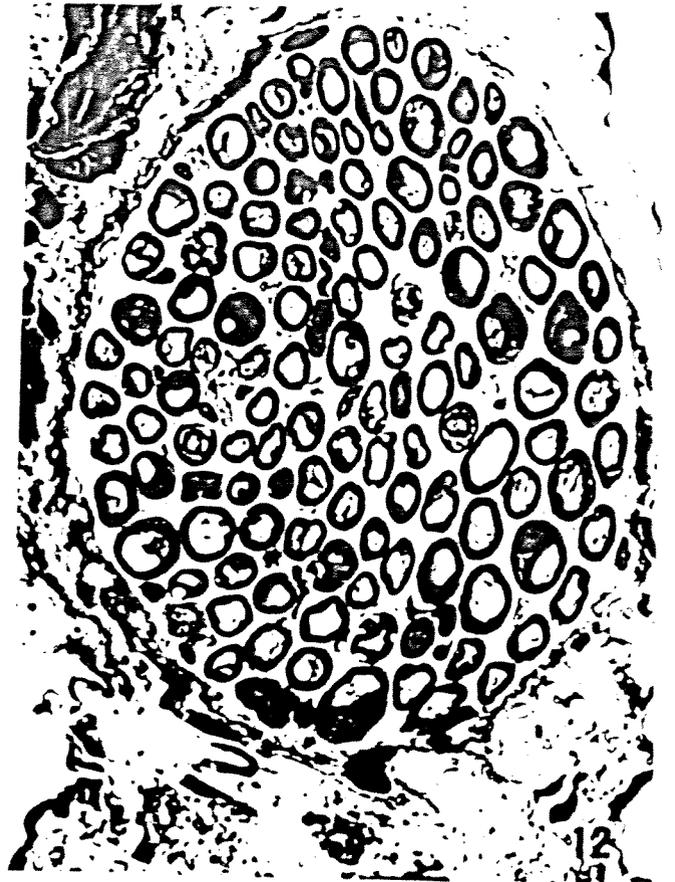
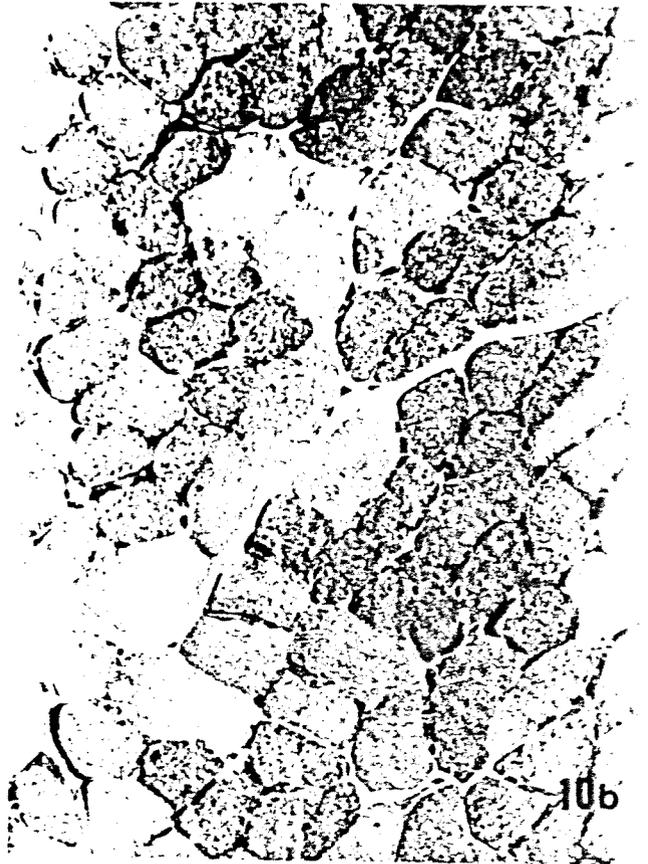


Figura 13: Fibra muscular esquelética após 15 min de incubação com a toxina PhTx1 da aranha *Phoneutria nigriventer*, sob corte longitudinal. Observe necrose desta porção celular caracterizada por mitocôndrias tumefeitas, com perda da arquitetura de suas cristas e barras elétron-densas ( → ). Note que o tecido muscular encontra-se em estado de encurtamento, não sendo definidas as bandas A e I e somente um sombreamento das linhas Z. 12800x.

Figura 14: Fibra muscular esquelética necrótica após 30 min de incubação com a toxina PhTx1. Observar tumefação mitocondrial, perda da arquitetura de suas cristas e matriz com aspecto "lavado". Notar barras elétron-densas ( → ) e rompimento de uma membrana externa ( ► ). 18144x

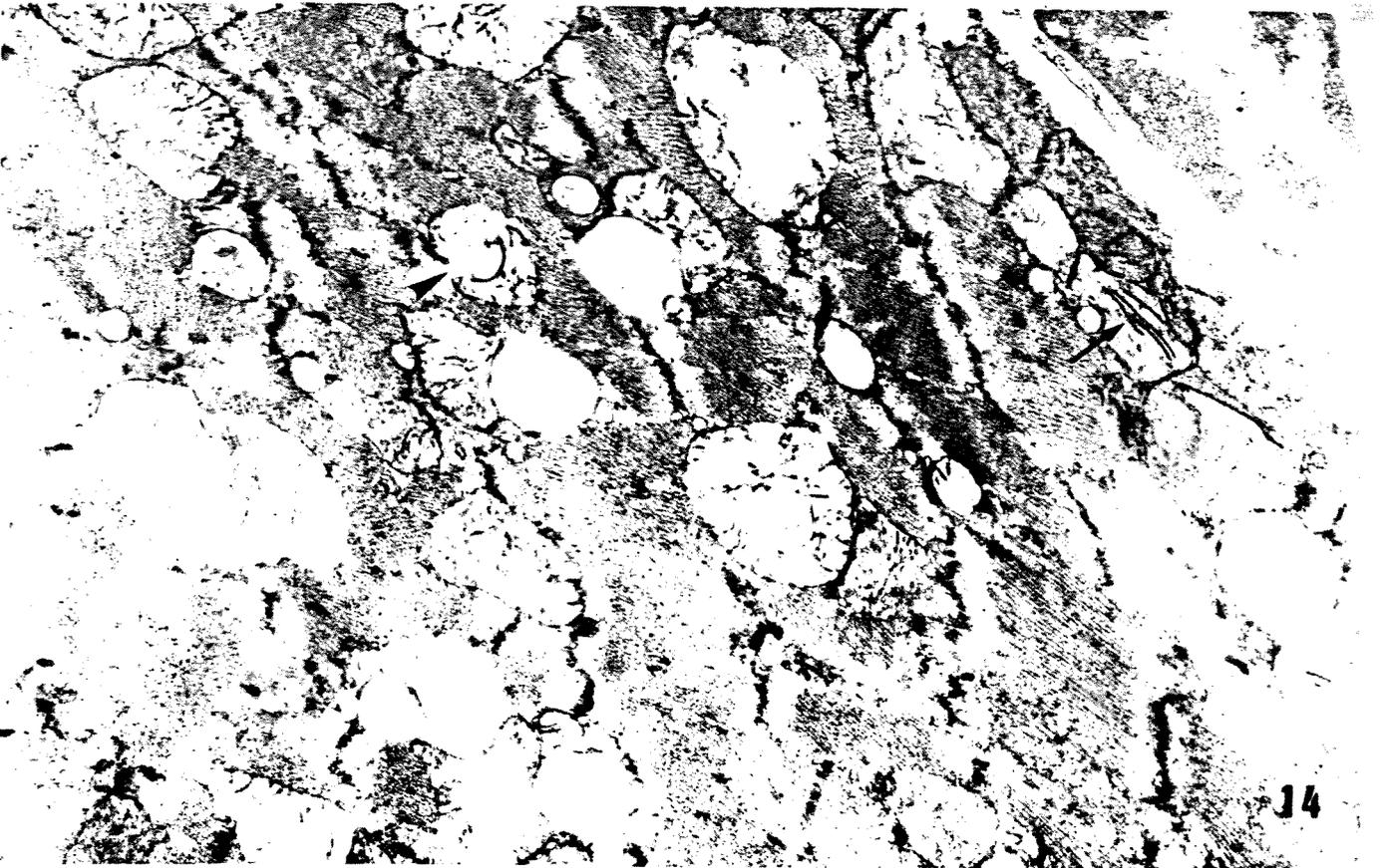
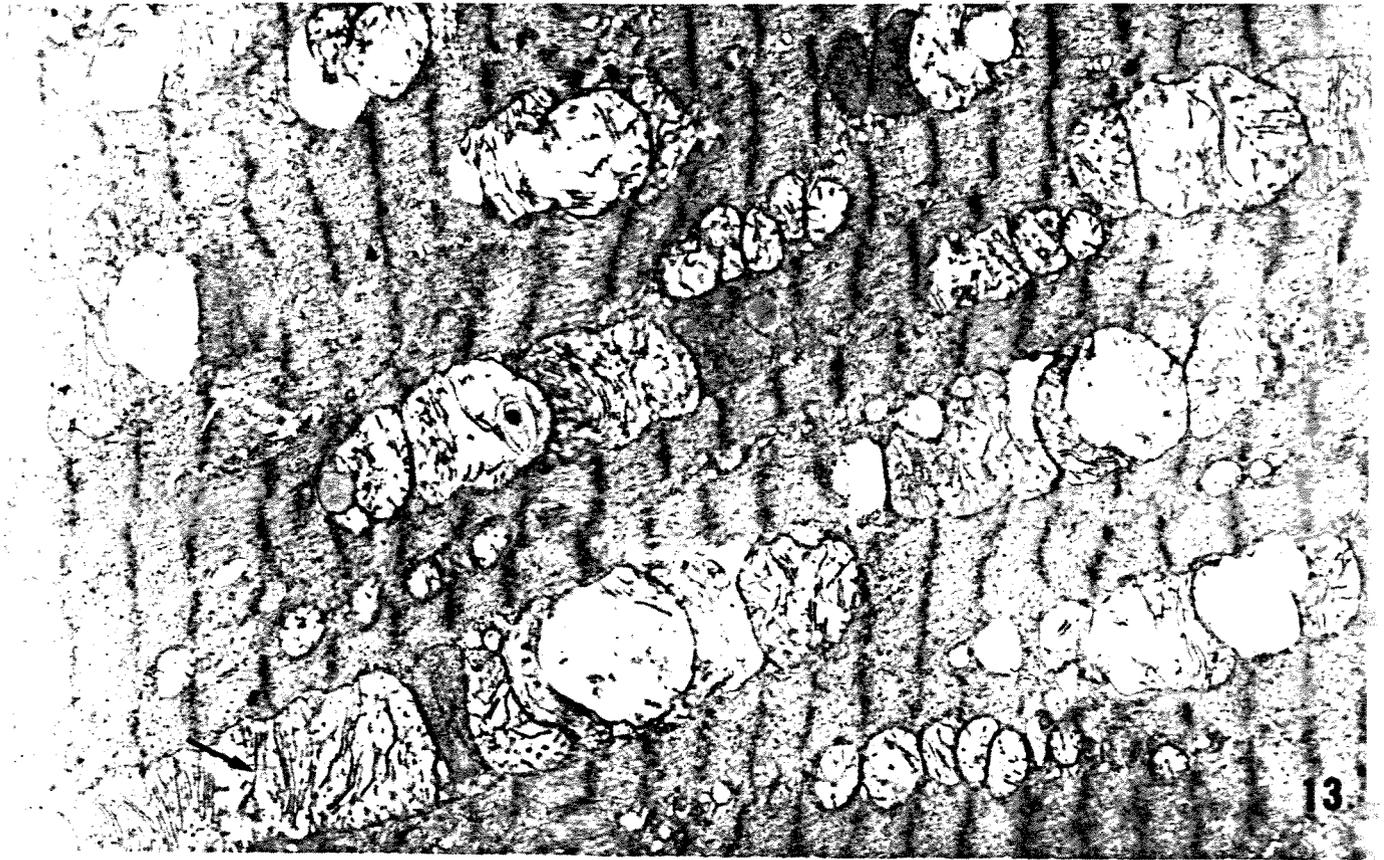


Figura 15: Em a, diafragma de camundongo em corte longitudinal após 30 min de incubação com a toxina PhTx1. Observe a integridade estrutural dos sarcômeros associados a presença de estruturas enoveladas (▶), vacuolização de algumas cisternas terminais do retículo sarcoplasmático ( → ) e integridade dos túbulos T (▶). Em b, diafragma de camundongo em corte transversal após 45 min à adição da toxina no banho de incubação. Observe a presença de vacúolos sob a forma de estruturas esféricas no interior da fibra muscular. Note também mitocôndrias tumefeitas com cristas desintegradas, sugerindo necrose celular, e inclusive, pequenas estruturas membranosas no interior destas organelas, em destaque uma delas ( →▶). 22464x e 36800x.

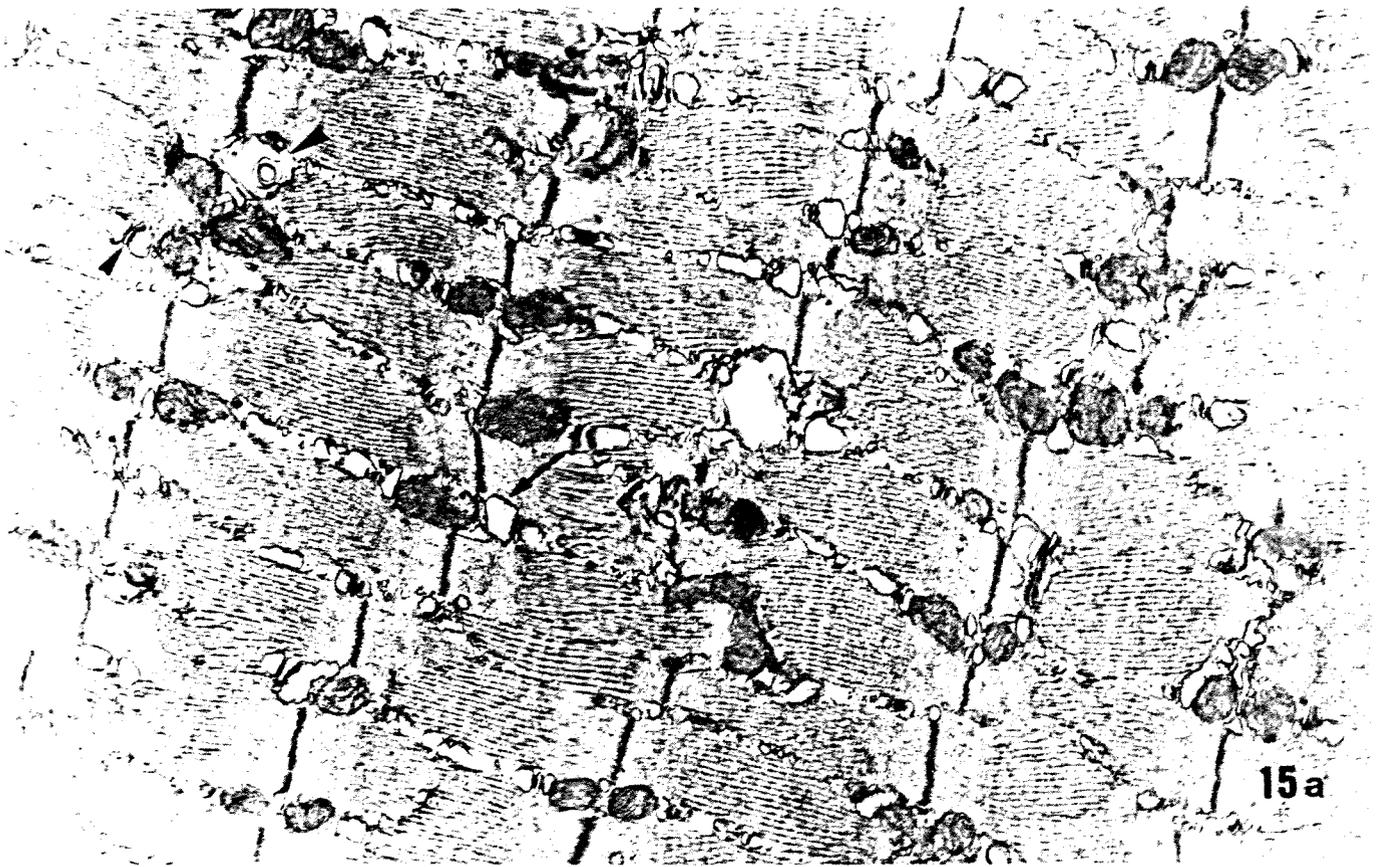


Figura 16: Fibra muscular esquelética após 30 min de incubação com a toxina PhTx1. Corte longitudinal. Pode ser observado aumento de volume sarcoplasmático próximo ao sarcolema, com restos de material celular, e interrupção dos miofilamentos na extremidade da fibra ( \* ). No interior da fibra observa-se vacuolização das cisternas terminais do retículo sarcoplasmático de algumas tríades (►). Outras apresentam-se normais. 14688x.

Figura 17: Diafragma de camundongo após 45 min de incubação com a PhTx1, em corte longitudinal. Observe a integridade dos sarcômeros em proximidade a mitocôndrias tumefeitas e com a arquitetura de suas cristas desorganizada. 32164x.

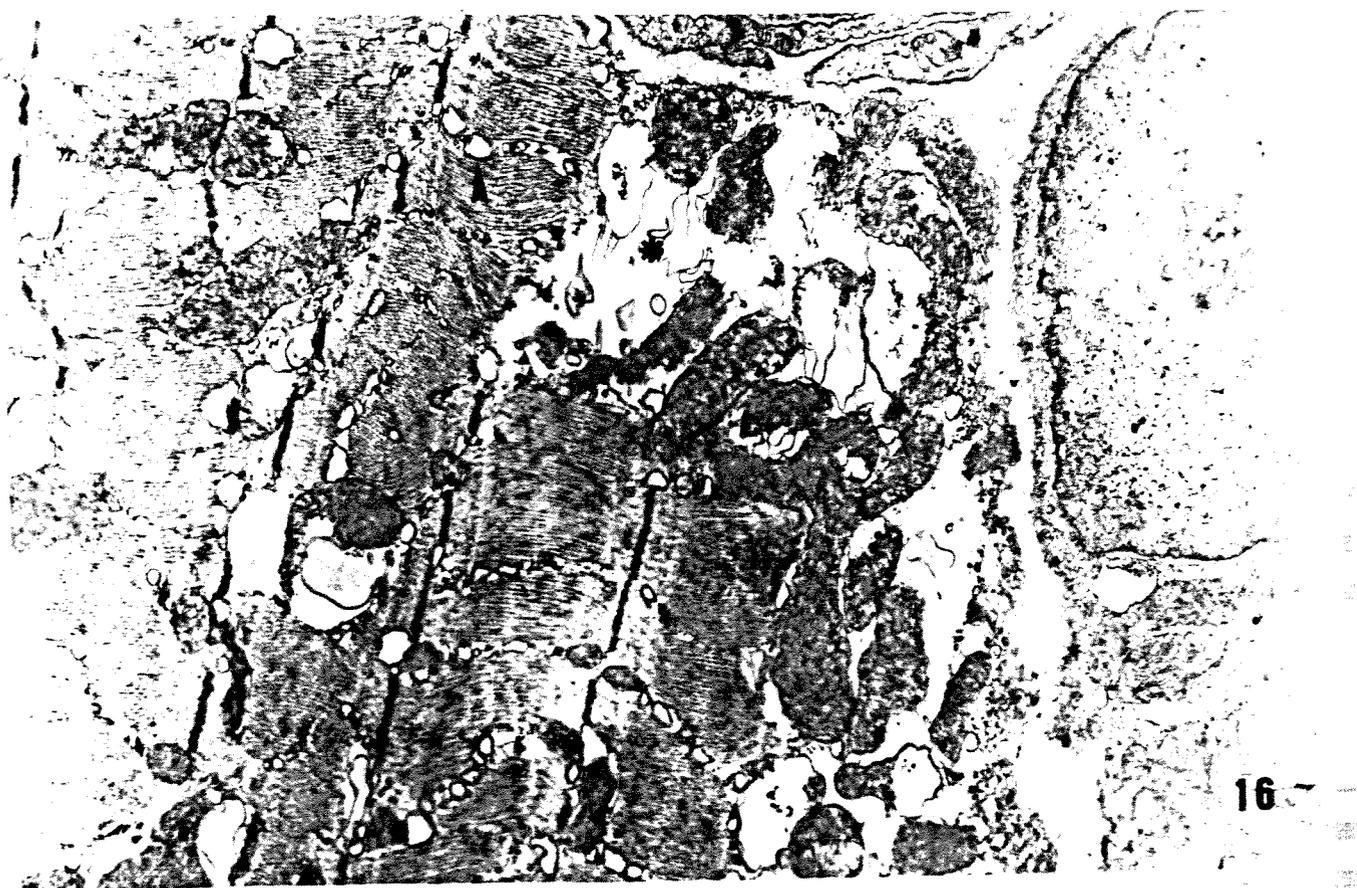


Figura 18: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx1. Corte transversal. Observar desorganização das lamelas de mielina (►) e a presença de vacúolos no citoplasma da célula de Schwann (→). 21600x.

Figura 19: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a toxina PhTx1. Notar corpos multilamelares originados da desorganização das lamelas de mielina, comprimindo estruturas intraxonais (→). Mitocôndrias no interior do axoplasma tumefeitas com perda de sua arquitetura interna. Vacúolos no citoplasma da célula de Schwann (►) e intramielínicos (►). 14688x.



Figura 20: Diafragma de camundongo após 45 min de incubação com a toxina PhTx1. Corte transversal de axônios pertencentes ao nervo frênico. Note descompactação das lamelas de mielina e compressão de estruturas do axoplasma em um axônio (→). Em outro, onde se identifica uma estrutura membranosa no interior de um vacúolo intraxonal (▶) e o agrupamento das estruturas do axoplasma em outra porção do axônio (✱). 7245x.

Figura 21: Axônios pertencentes ao nervo frênico, em corte transversal, após incubação por 60 min do músculo diafragma com a toxina PhTx1. Observe axônios com lamelas de mielina compactadas e axoplasma homogêneo. Outros axônios mostram vacúolos intramielínicos que direcionam-se para o axoplasma (→) e para o citoplasma da célula de Schwann (▶). O citoplasma destas células mostra aspecto "lavado". 9135x.

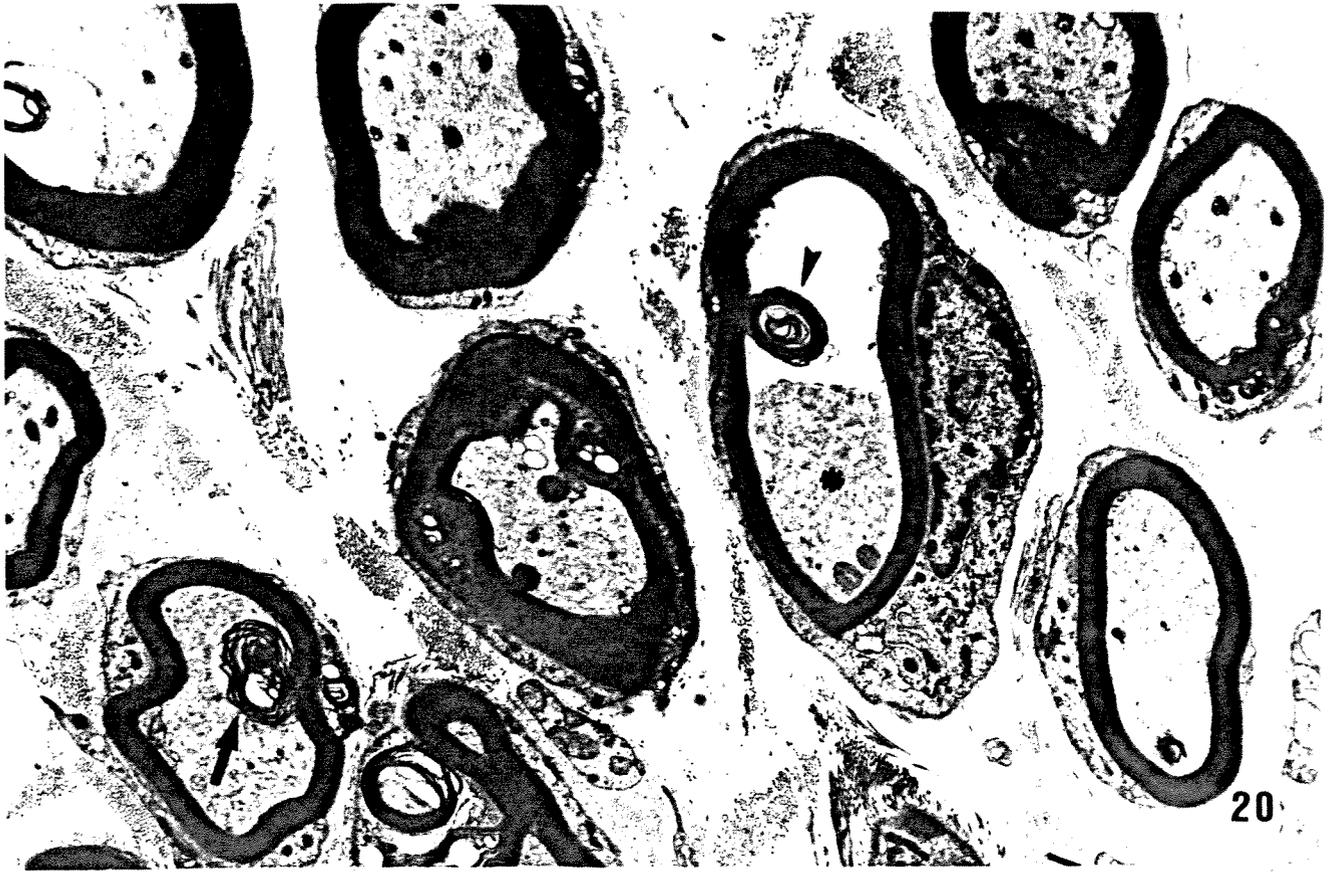


Figura 22: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx1. Corte transversal. Observe três terminais nervosos com axoplasma bem distribuído e poucas vesículas sinápticas mais concentradas nas zonas ativas. Em um dos terminais pode ser visto a formação de uma estrutura membranosa em proximidade à mitocôndrias ( ► ). Observe dobras pós-sinápticas regulares e profundas. A célula de Schwann com seus processos recobre os três terminais. 9936x.

Figura 23: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx1, em corte transversal. Observe uma JNM que apresenta goteira sináptica discretamente mais rasa que às observadas na figura anterior. 15120x.

Figura 24: Diafragma de camundongos após 60 min de incubação com a toxina PhTx1. Corte transversal. Note o terminal pré-sináptico repleto de vesículas sinápticas, acompanhando grande extensão da fibra muscular, e a perda da característica estrutural deste terminal, de "goteira sináptica". Observe a porção pós-sináptica com dobras longas e bem distribuídas ao longo da superfície da fibra muscular. Há poucas mitocôndrias na porção sub-sináptica. 17280x.



Figura 25: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx2, em corte transversal. Observe área necrótica atingindo grande número de fibras musculares através regiões nas fibras que apresentam áreas pálidas irregulares ( ✱ ), células com aparência amorfa ( \* ) e agrupamento de miofibrilas no interior da fibra ( ► ). Azul de toluidina 544x.

Figura 26: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx2, corte longitudinal. Note áreas de hipercontração ( ► ) e de estiramento ( ✱ ) nas fibras musculares esqueléticas e necróticas assinaladas. Azul de toluidina 1344x.

Figura 27: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a toxina PhTx2. Note a extensa vacuolização de algumas fibras musculares. Azul de toluidina 832x.

Figura 28: Diafragma de camundongo após 45 min de incubação com a toxina PhTx2, corte transversal. Observe a presença de vacúolos de diversas dimensões no interior das fibras musculares que apresentam contornos poligonais. Na periferia de algumas delas podem ser notadas áreas pálidas ( —► ). Azul de toluidina 1504x.

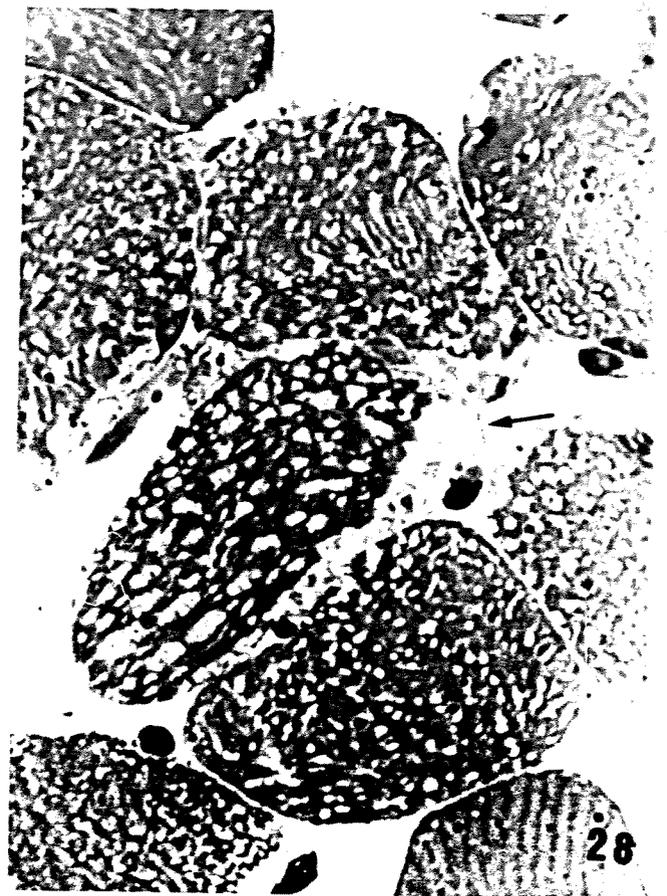
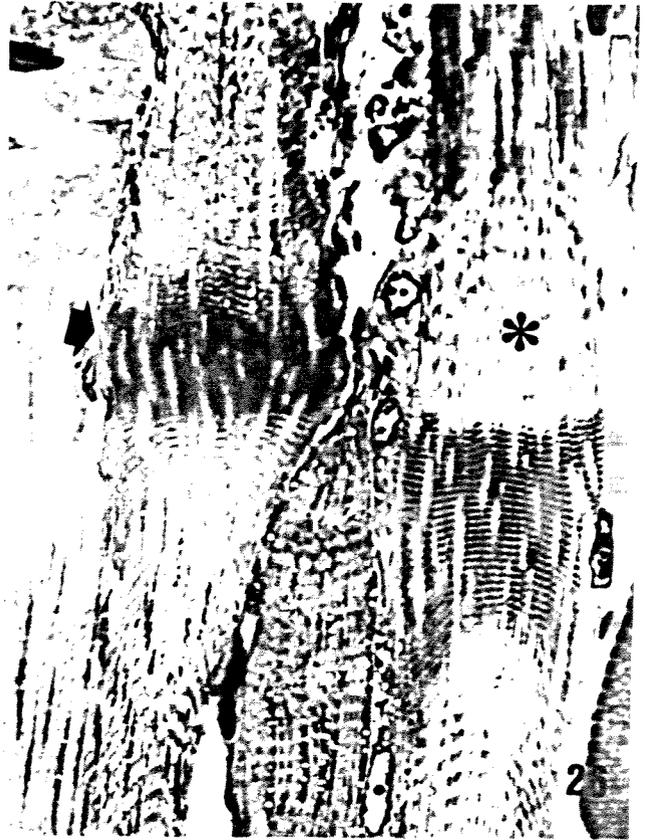
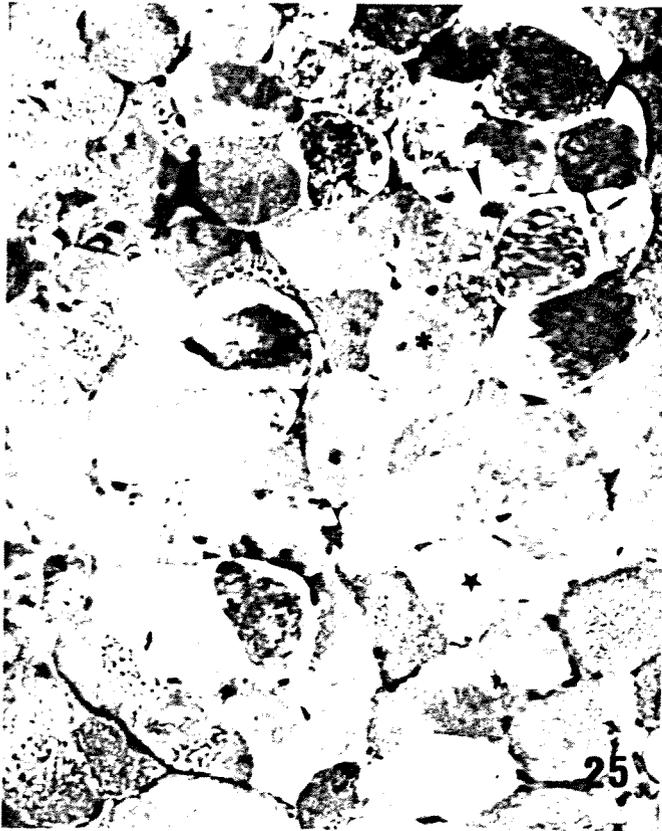


Figura 29: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a toxina PhTx2, em corte longitudinal. Observe as alterações estruturais indicativas de necrose destas fibras. Pode ser notado fibra com áreas pálidas irregulares (→), regiões de hipercontração (▶) e estiramento, regiões com perda de miofibrilas (\*). Azul de toluidina 424x

Figura 30: Diafragma de camundongo após 60 min de incubação com a toxina PhTx2, em corte transversal. Observe tumefação das fibras morfologicamente danificadas. Compare-as com as fibras vizinhas que apresentam contornos irregulares e miofibrilas bem arranjadas. As fibras apresentam, de forma geral, um aspecto heterogêneo quanto à forma, textura, tamanho e cor. Observe também vacuolização (▶), agrupamento de miofibrilas (→) e fibras com aparência amorfa (★). Azul de toluidina 640x.

Figura 31: Diafragma de camundongo após 60 min de incubação com a toxina PhTx2. Observe axônios sob corte transversal com descompactação das lamelas de mielina. Azul de toluidina 1728x.

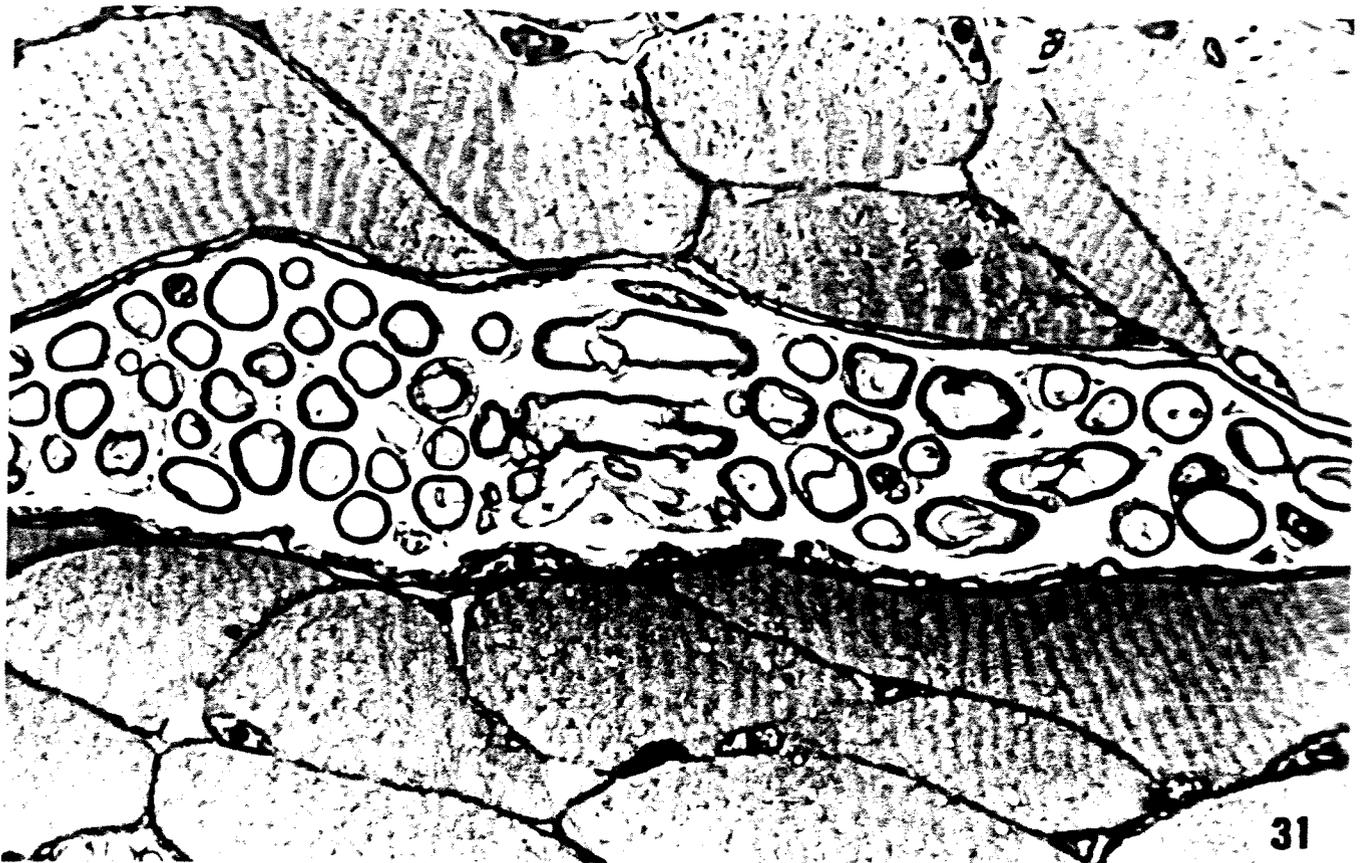
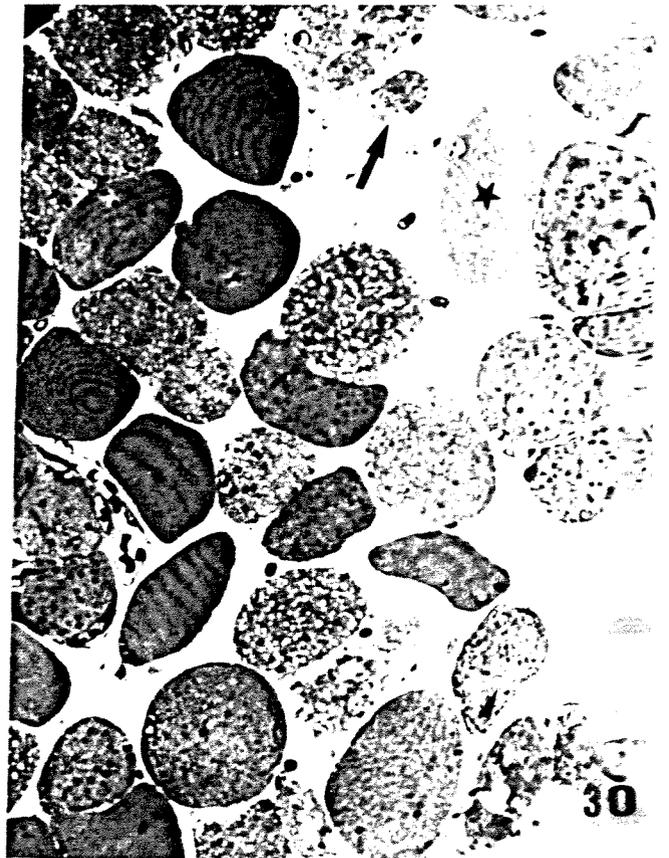


Figura 32: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx2. Corte longitudinal. Observe elétron-lucência representando aumento de volume sarcoplasmático, mais intenso, nas proximidades do sarcolema e no interior dos miofilamentos. Observe também rompimento dos miofilamentos e restos de material celular por entre as miofibrilas. 10368x.

Figura 33: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx2, corte longitudinal. Nesta micrografia pode ser notada tumefação do retículo sarcoplasmático e porções da cisterna terminal nas tríades (▶). Observe também a presença de estruturas filamentosas que parecem iniciar as formas enoveladas (→) e o desalinhamento das linhas Z. 10368x.

Figura 34: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a toxina PhTx2. Corte longitudinal. Note aumento de volume sarcoplasmático e restos de material celular. Há rompimento dos miofilamentos, vacuolização do retículo sarcoplasmático e da suas cisternas terminais pertencentes às tríades (▶). Observe a presença de uma estrutura membranosa - "whorl" (→). 35614x.

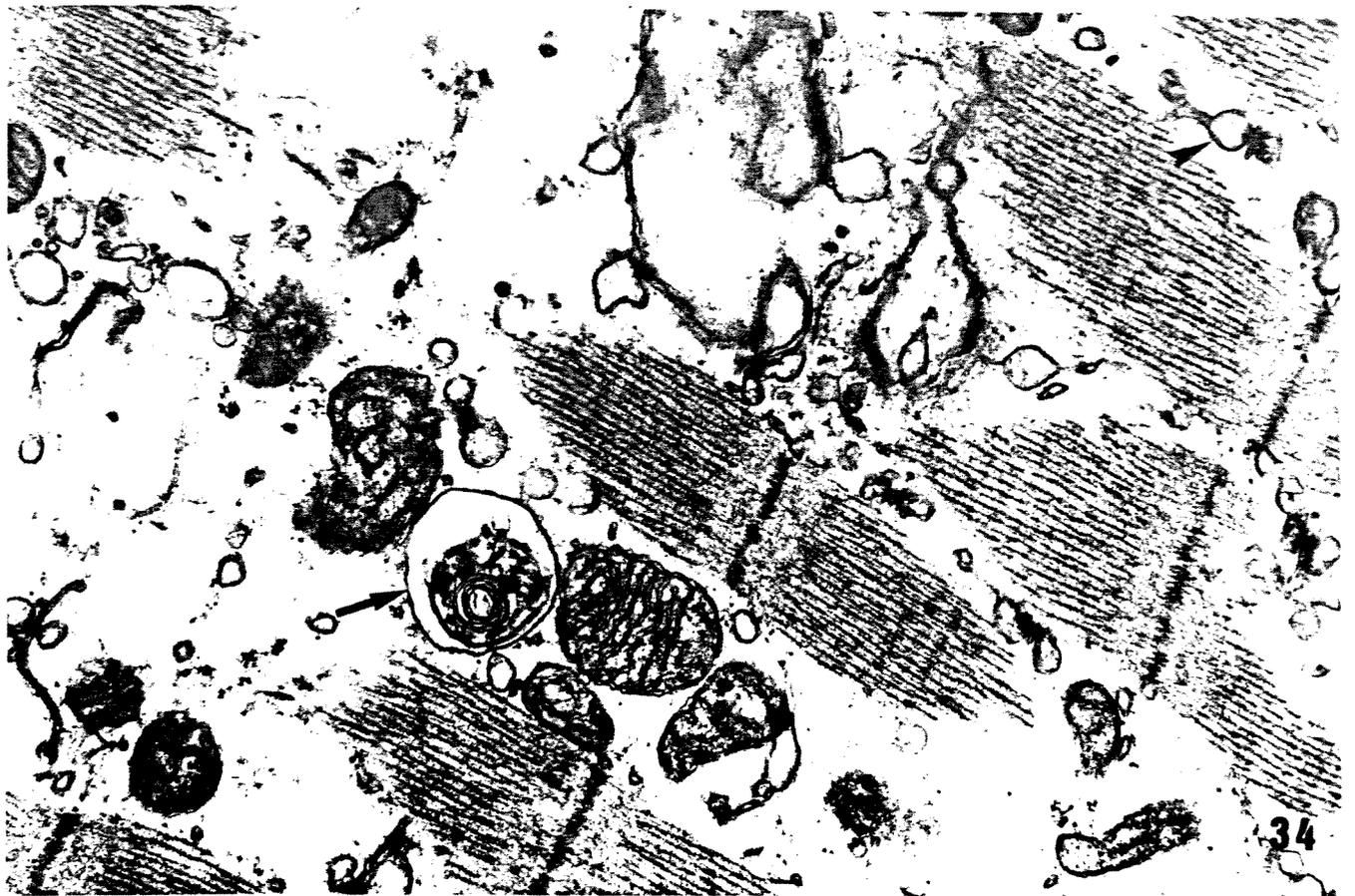
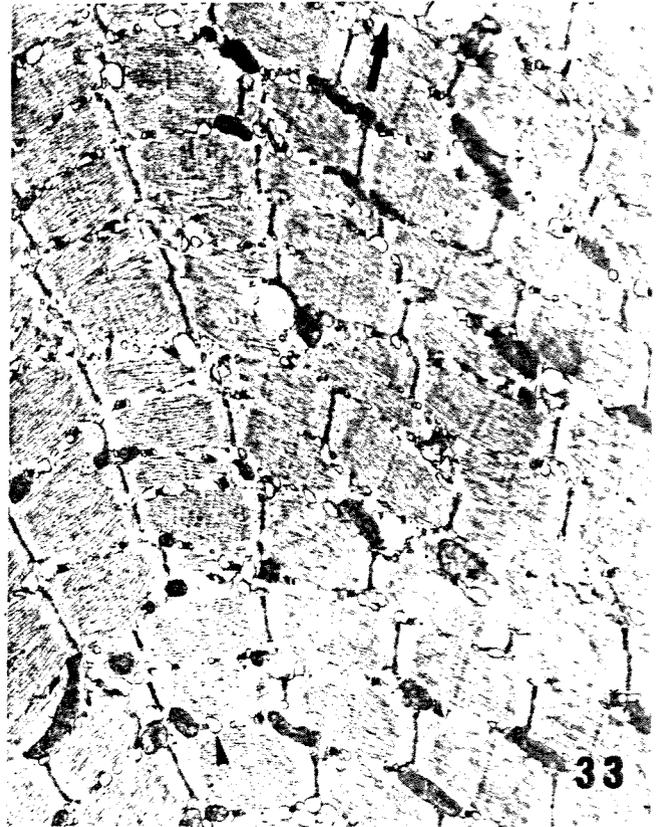


Figura 35: Diafragma de camundongo após 45 min de incubação com a toxina PhTx2. Corte transversal. Verifique sarcoplasma aumentado no interior da fibra muscular e restos de material celular no interior da fibra muscular. Há rompimento da membrana sarcoplasmática (→). 32164x.

Figura 36: Diafragma de camundongo após 60 min de incubação com a toxina PhTx2. Observe intensa necrose celular que apresenta áreas com acúmulo de miofilamentos que descrevem figuras aleatórias no interior da fibra. Estas figuras estão envoltas por zonas onde o volume sarcoplasmático está aumentado e há restos de material celular. 5775x.

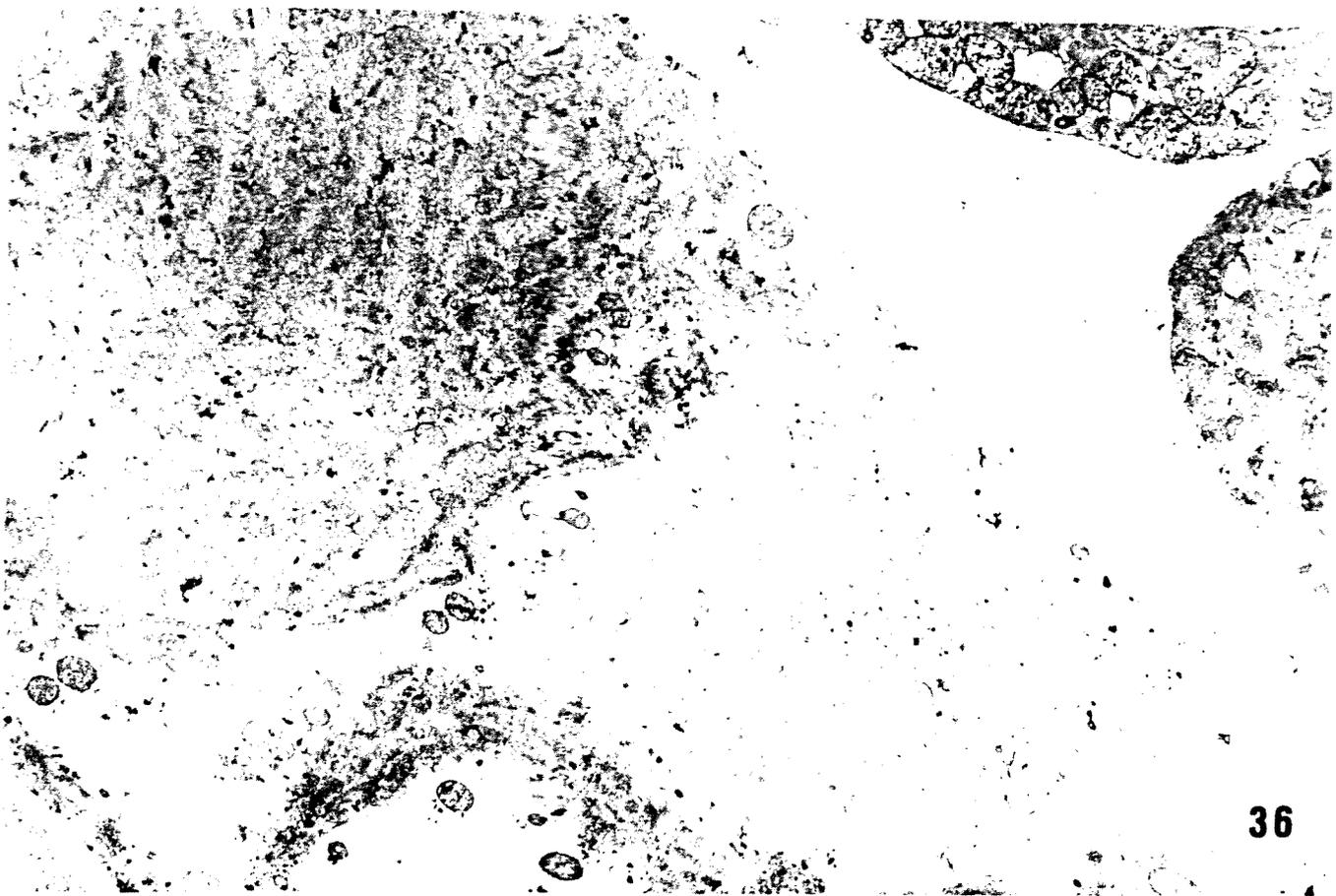
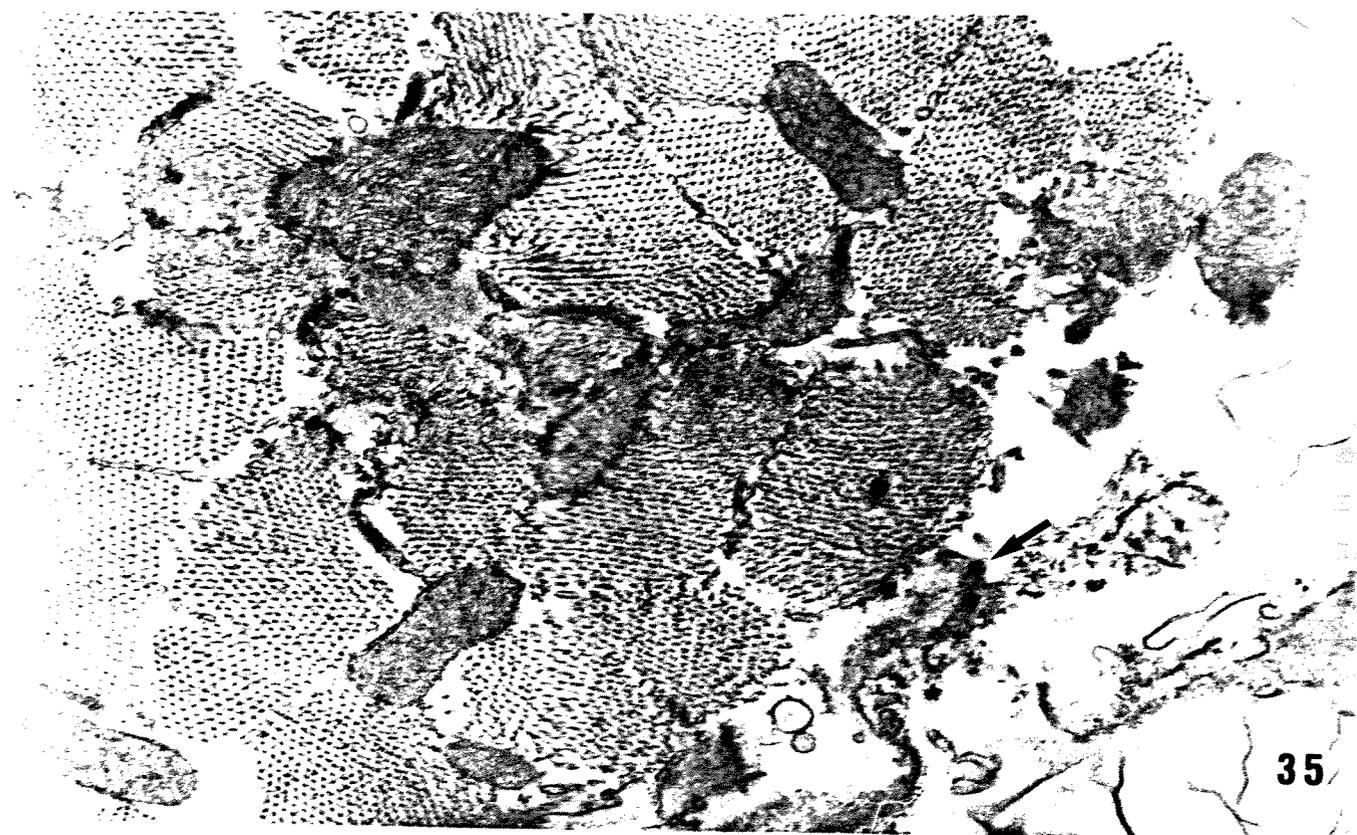


Figura 37: Axônios pertencentes ao nervo frênico, em corte transversal, após incubação por 15 min do músculo diafragma com a toxina PhTx2. Observe axônios com mielina descompactada, : vacúolos intramielínicos ( ► ) e no citoplasma da célula de Schwann ( ► ), e axoplasma com mitocôndrias tumefeitas e com perda da arquitetura de suas cristas. Há nesta micrografia a presença de um nodo de Ranvier ( ◻ ), que encontra-se distendido e com perda da organização das alças paranodais. Nele podem ser vistos retração e separação das alças terminais de mielina, a nível proximal e distal, intensa vacuolização do axoplasma e mitocôndrias desestruturadas. 17280x

Figura 38: Diafragma de camundongo após 45 min de incubação com a toxina Phtx2. Feixe nervoso em corte transversal. Note rompimento do perineuro ( ►► ). Alguns axônios apresentam descompactação de mielina; há a formação de vacúolo intramielínico que ocupa metade da luz do axônio, comprimindo o axoplasma ( ★ ). Observe tumefação mitocondrial e vacuolização no citoplasma da célula de Schwann ( ► ) e rarefação do endoneuro. 15120x.



Figura 39: Diafragma de camundongo após 60 min de incubação com a toxina PhTx2. Feixe nervoso em corte transversal. Observe rarefação de estruturas axoplasmáticas em um axônio (✱) e vacúolos no citoplasma da célula de Schwann (►). Outro axônio, em corte longitudinal, apresenta colapso axonal cujo estreitamento causou justaposição das lamelas de mielina. 18400x.

Figura 40: Axônios pertencentes ao nervo frênico, em corte transversal, após incubação por 60 min do músculo diafragma com a PhTx2. Observe axônios amielínicos estruturalmente íntegros e o citoplasma da célula de Schwann, que os envolve, com vacúolos de pequeno tamanho (►). Os demais axônios mielinizados apresentam vacuolização do citoplasma das células de Schwann e intramielínica, estando os microtúbulos e neurofilamentos do axônio situado no ângulo inferior esquerdo, distribuídos anormalmente. 11232x.

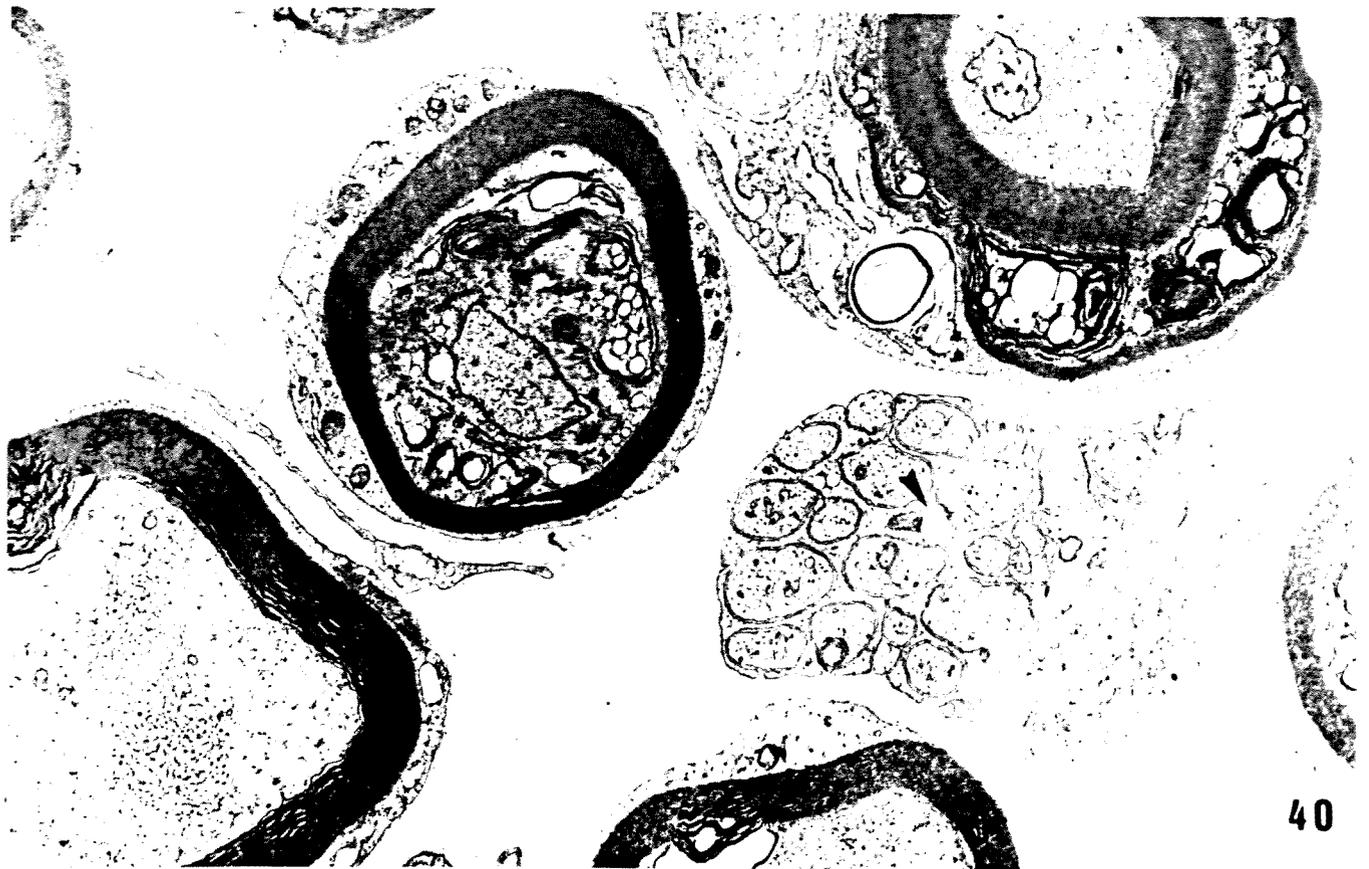


Figura 41: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a PhTx2. Observe JNM com terminal nervoso contendo vesículas sinápticas nas proximidades da fenda sináptica e o sequestro de algumas delas, em uma estrutura vacuolar. Note a existência de pequenos vacúolos no axoplasma e rarefação do axolema em algumas regiões do terminal nervoso. Há tumefação e degradação das cristas mitocondriais contidas em seu interior. A região pós-sináptica apresenta em dobras pós-juncionais com arquitetura modificada. Há formação de estruturas membranosas e vesiculares nesta área. 17280x.



Figura 42: Diafragma de camundongo após 15 min de incubação com a toxina PhTx2. Observe terminal pré-sináptico depletado de vesículas sinápticas, apresentando restos de material celular e vesículas com dimensões maiores. Há tumefação, degradação e por vezes rompimento de mitocôndrias no axoplasma. As dobras pós- sinápticas apresentam-se raras, alargadas na proximidade da fenda sináptica e escassas no percurso da placa motora. 19440x.

Figura 43: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a toxina PhTx2. Corte transversal. Note deslocamento das porções laterais do terminal nervoso em relação à fibra muscular esquelética, caracterizando princípio de desnervação. Observe também processos da célula de Schwann presentes na fenda sináptica. O terminal nervoso encontra-se parcialmente depletado de vesículas sinápticas e as dobras pós-sinápticas são escassas e estruturalmente alteradas. Há pequenos vacúolos no interior da fibra próximo às dobras pós-juncionais. 31218x.

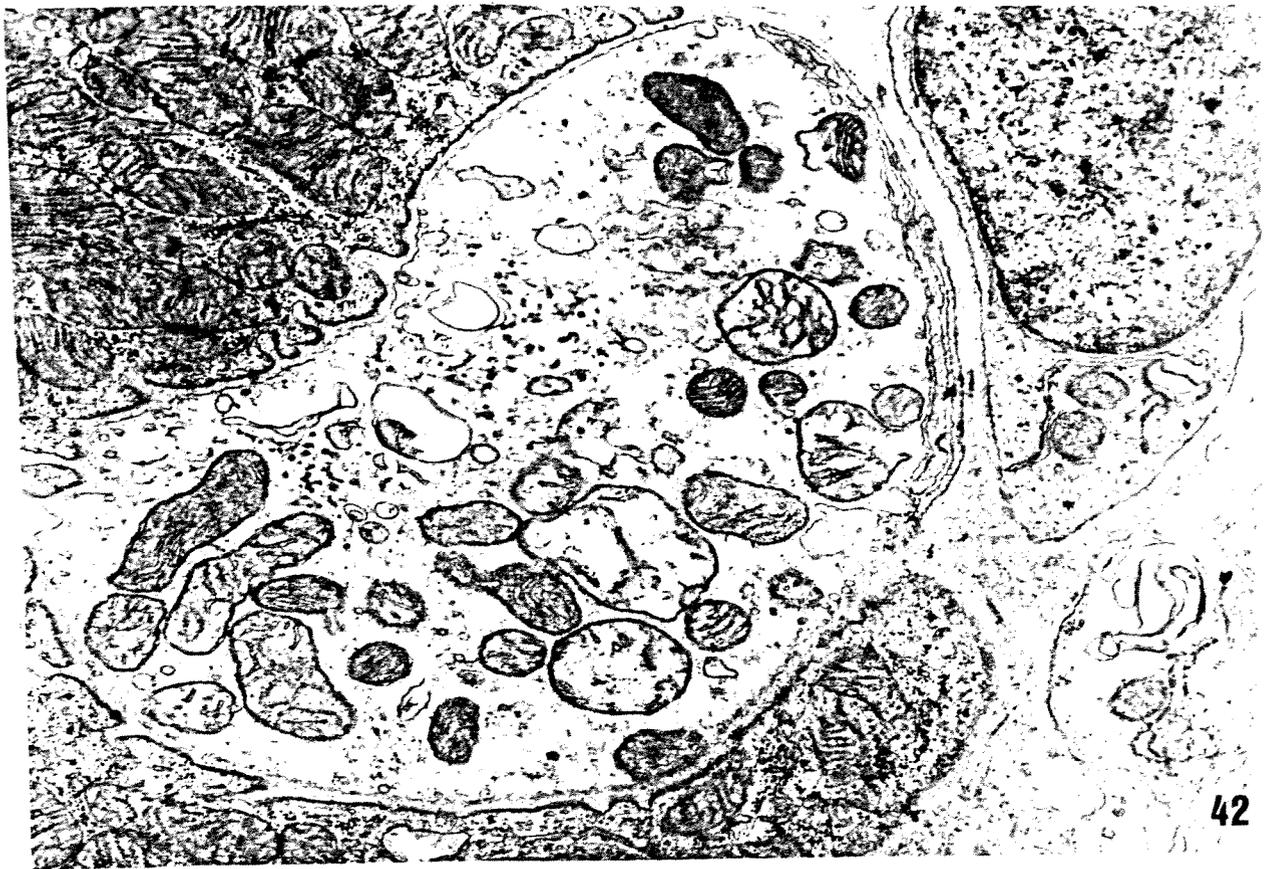
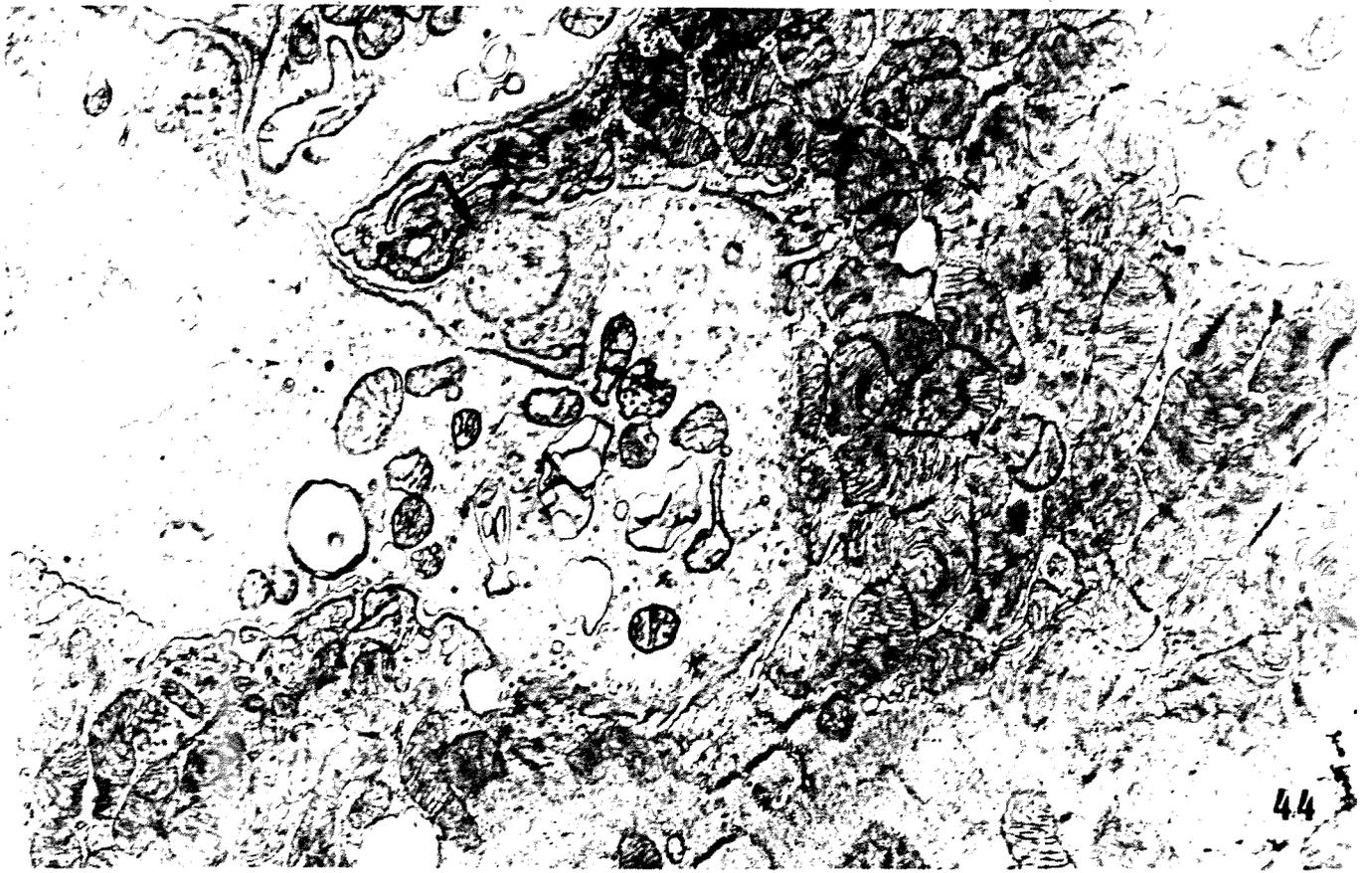


Figura 44: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a PhTx2, corte longitudinal. Observe JNM com terminal pré-sináptico que parece sofrer invaginação do axolema contendo vacúolos de pequeno e grande tamanhos e, mitocôndrias tumefeitas e com perda da arquitetura de suas cristas. Uma diminuta porção deste terminal mostra algumas vesículas sinápticas sequestradas (→→). A característica de goteira sináptica foi perdida, estando o terminal nervoso adentrado profundamente à fibra muscular. As dobras pós-sinápticas são rasas e escassas. 15120x.

Figura 45: Diafragma de camundongo após 60 min de incubação com a toxina 2. Corte transversal. Observe os terminais pré-sinápticos depletados de vesículas sinápticas, rarefação das estruturas do axoplasma e mitocôndrias tumefeitas. No terminal da esquerda vê-se invaginação do axolema (▶) que cria um novo compartimento e limita o espaço de atuação de umas poucas vesícula sinápticas. As dobras pós-sinápticas e imediações do músculo encontram-se normais. 26000x.



44



45

Figura 46: Diafragma de camundongo controle zero. Análise superficial de algumas fibras musculares através de MEV. Pode ser notado, claramente, a presença de estriações dispostas transversalmente ao eixo das fibras musculares, definindo as unidades básicas de contração deste tecido - o sarcômero. 5000x.

Figura 47: Diafragma de camundongo após 60 min de incubação em solução nutritiva na ausência de toxina (condição controle). Observe algumas fibras musculares com superfície praticamente lisa. As estruturas circunjacentes podem representar a complexa rede de vasos que estabelecem suprimento sanguíneo para estas células. 1250x.

Figura 48: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a PhTx2. Observe, em grande aumento, as fibras musculares com suas superfícies corrugadas, indicando estado de contração, ou encurtamento dos sarcômeros. Note irregularidade no diâmetro das fibras. 1875x.

Figura 49: Diafragma de camundongo após 30 min de incubação com a PhTx2. Observe, em pequeno aumento, algumas fibras musculares com suas superfícies corrugadas, outras apresentam-se mais lisas e, outras um aspecto misto. Note também o tecido conjuntivo que envolve estas fibras, compondo endomísio e perimísio. 375x.



## DISCUSSÃO

### ASPECTOS ELETROFISIOLÓGICOS

Em 1955, os estudos realizados por BARRIO com o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* indicaram que a ativação muscular provocada pelo veneno era devido à sua ação na JNM. Nestes estudos o autor utilizou injeção intraperitoneal e intravenosa do veneno e observou os sinais característicos do envenenamento por acidentes com esta aranha.

DINIZ (1963) identificou, por eletroforese e cromatografia, quatro substâncias distintas à partir do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, das quais uma apresentou atividade neurotóxica. O grupo deste mesmo autor isolou recentemente frações deste veneno que apresentavam letalidade e sinais como paralisia espástica e sintomas excitatórios e paralisia flácida em camundongos após injeção intracérebro-ventricular (DINIZ et al., 1990; REZENDE Jr. et al., 1991). Em 1992 obtiveram por cromatografia líquida seis toxinas, das quais a PhTx4 era específica para insetos, a PhTx1 e a PhTx3 eram letais para camundongos e a PhTx2 era letal para ambos, camundongos e insetos (DINIZ et al., 1992).

A PhTx1, purificada e sequenciada por DINIZ et al. (1990) e DINIZ et al. (1993) induziu através de injeção intracérebro-ventricular em camundongos

elevação do rabo, excitação e paralisia das extremidades posteriores (REZENDE Jr et al., 1991).

De acordo com os resultados eletrofisiológicos obtidos no presente trabalho verificou-se que a PhTx1, toxina derivada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, nas doses de 1 e 5 µg/ml não atua de forma aguda nos parâmetros fisiológicos das JNMs de músculo diafragma de camundongos.

Apesar do veneno bruto e da toxina 2, nas respectivas doses 5 µg/ml e 0,38 µg/ml, em preparação nervo frênico-diafragma de ratos produzirem despolarização das fibras musculares e aumento na frequência dos pptm (FONTANA & VITAL-BRAZIL, 1985 e dados não publicados), o estudo realizado nas placas motoras evidenciou que a frequência de liberação espontânea de ACh não se modificou até após 60 min de incubação do diafragma com a toxina 1. Assim os pptm observados na tela do osciloscópio apresentaram-se como aqueles encontrados nas condições controle.

A membrana da fibra muscular manteve estatisticamente ( $p > 0,01$ ) os valores dos PRs observados nas condições que precederam a adição da toxina ao banho, mostrando que a toxina 1 não foi capaz de induzir despolarização ou hiperpolarização neste tipo de preparação.

De acordo com a análise anterior, pode ser inferido que esta toxina não atua nos canais de sódio do terminal nervoso ou da própria fibra muscular, como fazem o veneno bruto e a toxina 2 (FONTANA & VITAL-BRAZIL, 1985; comunicação pessoal), pois os pptm e PRs não indicaram alterações no sentido de despolarização da fibra muscular diafragmática, e ainda, quando estímulos indiretos foram aplicados às fibras musculares, a amplitude das contrações não se modificou. Também pode ser afirmado que os canais de potássio não foram alvo direto desta toxina já que, a atividade elétrica dos terminais neuromusculares não foi modificada e principalmente porque os PRs se mantiveram dentro de um mesmo padrão.

O estudo miográfico através de estimulação elétrica indireta, mostrou que a toxina PhTx1 não é do tipo voltagem-dependente, e que tão pouco é sinergista ou antagonista para a ACh e seus derivados.

Concluiu-se portanto que esta toxina não deve atuar nem a nível pré, nem a nível pós-sináptico, no sentido de causar despolarização, hiperpolarização ou

bloqueio da condução do PA durante os 60 min de incubação do músculo com a toxina, nesta dose.

ANTUNES et al. (1992) demonstraram que o veneno bruto desta aranha produz contrações dose-dependente em vasos sanguíneos isolados de coelhos. REZENDE Jr et al. (1991) observaram que estas contrações, utilizando preparações de íleo de cobaias, não eram desencadeadas pela toxina 1, nem mesmo utilizando doses que correspondiam à aproximadamente 50% da DL50 para esta toxina. Ainda utilizando estas mesmas doses, não observaram em camundongos sinais como lacrimação, salivação e priapismo, que são característicos após acidentes com aranhas desta espécie.

Sabendo-se que a concentração de PhTx1 corresponde a 0,45% da proteína total do veneno (DINIZ et al., 1990), a dose desta toxina utilizada neste estudo, deveria ser suficiente para prontamente comprovar sua atividade sobre as JNMs e conseqüentemente, estas alterações serem relacionadas aos sinais observados clinicamente nos indivíduos acidentados com a aranha "armadeira".

A toxina PhTx1 pode ser um componente, significativamente ativo, em outros locais que não a JNM.

## ASPECTOS MORFOLÓGICOS

### PhTx1 e o tecido muscular

Os resultados morfológicos mostraram que esta toxina é neurotóxica e musculotrópica, confirmando os achados de CORDEIRO et al. (1988).

Experimentos de "binding" têm mostrado que esta toxina tem alta afinidade por um sítio receptor no músculo esquelético, não sendo deslocada após inúmeros processos de lavagem do material (Beirão et al., comunicação pessoal).

DINIZ et al. (1993) através de estudos com "cDNA library" do veneno da glândula da aranha *Phoneutria nigriventer* identificou e sequenciou a PhTx1. Através de pesquisa feita no banco de dados GenBank e EMBL os autores mostraram significativa homologia desta com a  $\omega$ -agatoxina IA e com sequência parcial da  $\omega$ -agatoxina IB.

Segundo ADAMS et al. (1990), a classe das agatoxinas, que são derivadas do veneno da aranha *Agelenopsis aperta*, atua como antagonista pré-sináptico, suprimindo a longo prazo a transmissão neuromuscular por bloqueio dos canais de cálcio voltagem-dependentes de neurônios sensoriais de ratos e de neurônios motores de sapos.

No presente trabalho as alterações morfológicas apontadas constituíram-se em alterações focais, às vezes restritas dentro da análise do hemidiafragma como um todo. Os achados para músculo esquelético em MO deram inicialmente uma perspectiva da extensão da lesão sofrida por este tecido até 60 min de incubação.

Os microvacúolos e a necrose de células isoladas foram os únicos achados em fibras musculares esqueléticas, visíveis ao MO. Ao MET corresponderam à vacuolização do sistema reticular sarcoplasmático.

Os mecanismos de danos miofilamentares vêm sendo exaustivamente estudados por diversos autores, como já abordado na revisão bibliográfica. De forma geral, estes estudos envolvem a atuação do íon cálcio, que aumentado a nível intracelular, poderia ativar mecanismos lisosomais (RODERMANN et al., 1982); depleção de ATP, proteases neutras e alteração de pH (DUNCAN & JACKSON, 1987); fosfolipase A2 (DUNCAN, 1988); formação de radicais livres (DUNCAN, 1989); e/ou hipóxia (McCALL & DUNCAN, 1989).

Assim como observado por MACDONALD et al. (1968) em pacientes com paralisia hipercalemica, e por SATO et al. (1971) na polimiosite crônica, a PhTx1, apesar de não constituir uma doença orgânica, também promoveu desorganização e rompimento miofibrilar associado a outras alterações ultraestruturais abordadas a seguir.

Os achados do estudo com toxina 1, quanto aos danos miofilamentares, mostraram que estes localizaram-se mais frequentemente nas proximidades da membrana sarcoplasmática. Eram acompanhados por área elétron-lucente e restos de material celular. Estas alterações sugerem um desequilíbrio iônico ou oncótico entre os compartimentos intra- e extracelular, e conseqüente desequilíbrio hídrico sofrido por estas células.

A vacuolização do sistema reticular sarcoplasmático, frequentemente observada por entre as miofibrilas e sob diversos tamanhos, em todos os tempos

analisados, devem ter originado de uma via comum ao aumento de volume sarcoplasmático, o que certamente não acometeu os túbulos T.

As alterações mitocondriais observadas no músculo diafragma de camundongos após incubação com a toxina 1 mostraram diversos graus de acometimento. Estas organelas mostraram estágios degenerativos precoces como tumefação e elétron-opacidade, que foram caracterizadas como lesões celulares reversíveis e, lesões irreversíveis, o desarranjo de suas cristas e membranas externas, indicando necrose celular. Segundo GHADIALLY (1988) a mitocôndria hidrópica ou tumefeita, como as encontradas neste estudo, origina-se da entrada de água ou soluto na organela e isto ocorre principalmente no compartimento interno da mesma, ou seja, na matriz mitocondrial, como também encontrado neste trabalho. A princípio esta organela aumenta de tamanho, sua matriz torna-se diluída com diminuição da densidade, e suas cristas deslocam-se para a periferia ou sofrem desorientação, encurtamento e redução no número. Com o tempo a matriz pode tornar-se diluída e pode haver inclusive quebra das membranas limitantes, como também foi observado neste experimento. A fisiopatogenia da tumefação mitocondrial pode ser passiva, como em situações de hipóxia, em que, por deficiência da produção de ATP, há diminuição da atividade da bomba sódio-potássio e entrada de água na célula, ou aguda, que é dependente de transporte de elétrons e pode ser originada por agentes como fósforo, cálcio, mercúrio, ácidos graxos, tirosina, vasopressina e outros. Este estresse tóxico sofrido por algumas células pode proporcionar acúmulo de água intracelular, levando à interrupção da produção de ATP e conseqüentemente, desencadear falha na bomba de sódio dependente de ATP e novamente inundação dos compartimentos intracelulares por água (GHADIALLY, 1988).

A marcante alteração mitocondrial, acompanhada por tumefação e ruptura de suas membranas e, desenvolvida anteriormente às alterações de outras organelas, foi observada por STRINGER et al. (1972) pelo uso do veneno da cobra *Crotalus viridis viridis* em músculo diafragma.

O aumento da pressão hidrostática a nível intracelular e conseqüentemente nas mitocôndrias, pode ter sido responsável pela tumefação e rompimento destas organelas. Também deve ser lembrado que estas alterações podem ter suas origens no aumento da concentração de cálcio no citosol, que conseqüentemente, seria sequestrado por estas organelas, gerando tumefação, e eventual intoxicação irreversível dessa organela (PUBLICOVER & DUNCAN, 1978; JOFFE, 1981). De qualquer forma, a liberação dos estoques intramitocondriais de cálcio deve ter

aumentado o nível citoplasmático deste íon, e isto pode ter sido responsável, ou ter colaborado para os danos miofibrilares, possivelmente por ativar o(s) mecanismo(s) proteolítico(s) de dano filamentar induzido por cálcio, citado anteriormente. Uma justificativa para esta hipótese foi a constante associação: dano miofilamentar e mitocôndrias desorganizadas ou rompidas, mas nunca danos miofilamentares com mitocôndrias íntegras. McCALL & DUNCAN (1989) observaram que a omissão de cálcio do meio de incubação do tecido muscular, estando o tecido sob hipóxia e, na presença ou ausência de atividade contrátil, o dano celular continuava, indicando que o dano pode ter originado do mal funcionamento da mitocôndria ou do retículo sarcoplasmático.

Neste estágio deve ser lembrada a similaridade entre determinadas porções das sequências de aminoácidos que constituem as toxinas PhTx1 e  $\omega$ -agatoxina IA referida por DINIZ et al. (1993). De acordo com ADAMS et al. (1990), esta última toxina causa, de forma geral, bloqueio nos canais de cálcio voltagem-dependentes. Como os resultados eletrofisiológicos aqui descritos não demonstraram qualquer manifestação de bloqueio da transmissão neuromuscular, e segundo BEIRÃO et al. (comunicação pessoal) esta toxina se liga com alta afinidade ao seu sítio receptor, poderia ser pensado que a neurotoxina utilizada neste estudo ligar-se-ia a um sítio receptor que, com os recursos eletrofisiológicos utilizados, não desencadeou alterações detectáveis, mas estas somente foram observadas a nível morfológico. Talvez o seu sítio de atuação pudesse inclusive ser um canal de cálcio, não do tipo voltagem-dependente, um outro tipo de proteína de membrana que, ao final de seu ciclo pudesse desencadear as alterações estruturais observadas, ou tivesse simplesmente uma atividade citolítica dependente de um sinergista, como ocorre com as cardiotoxinas (HARVEY, 1990).

Através do presente estudo o exato mecanismo que desencadeou as alterações de volume e os danos miofibrilares não pode ser afirmado. Podem ser supostos dois processos para tais alterações: (1) a PhTx1 pode ter aumentado a concentração intracelular do íon cálcio diretamente por mobilização do retículo sarcoplasmático, mitocôndria e/ou, indiretamente, por influxo do meio externo. O aumento deste íon por sua vez poderia provocar desequilíbrio iônico e hídrico e ativação do(s) mecanismo(s) de danos filamentosos induzidos por cálcio. A quantidade de íon cálcio mobilizada por este sistema deve, contudo, ter sido inferior à necessária para ativar o mecanismo contrátil do músculo esquelético, reafirmando os achados fisiológicos; ou (2) a toxina PhTx1 pode ter promovido o influxo de líquido extracelular e eletrólitos direta ou indiretamente, resultando num desequilíbrio osmótico que, conseqüentemente levou ao ingurgitamento das

organelas (mitocôndrias e retículo sarcoplasmático) num primeiro instante, e em seguida a liberação de íons cálcio. O aumento deste íon a nível citoplasmático poderia ter desencadeado o mecanismo citado anteriormente de dano miofilamentar, sem contudo, ser o seu nível citosólico, suficiente para alterar os potenciais bioelétricos do músculo.

### **PhTx1 e os axônios**

Os resultados morfológicos obtidos com os axônios do nervo frênico e a toxina PhTx1 mostraram principalmente descompactação das lamelas de mielina e formação de figuras mielínicas, vacúolos intramielínicos e no citoplasma da célula de Schwann.

CRUZ-HÖFLING et al. (1985) estudaram a ação do veneno da aranha "armadeira" em nervos periféricos e observaram a presença de vacúolos intraxonais e intramielínicos, estando este último associado a formação de corpos multilamelares. Estes mesmos achados foram obtidos por LOVE et al. (1986) pela utilização do venenos dos escorpiões *Centruroides sculpturatus* e *Leiurus quinquestriatus*, e já tinham sido identificados por POWELL & MYERS (1983) pela administração crônica de galactose, por TOWFIGHI et al. (1973) pela administração de hexaclorofeno e, mais recentemente, CRUZ-HÖFLING & VITAL-BRAZIL (comunicação pessoal) observaram em axônios de nervo frênico de diafragma de camundongos incubados com veratrina e, neste estudo, pela PhTx2.

Os corpos multilamelares formados nesta etapa do estudo provavelmente foram originados da descompactação das lamelas de mielina, como observado no decorrer da análise do material ao MET.

O mecanismo pelo qual foram desencadeadas as alterações referidas no caso do veneno dos escorpiões, da veratrina e da toxina 2, principalmente, deve ter diferido do desencadeado pela toxina 1. O veneno do escorpião *Centruroides sculpturatus* (MEVES et al., 1982) e da toxina 2 (FONTANA & VITAL-BRAZIL, comunicação pessoal) sabidamente ativam canais de sódio voltagem-dependentes, e a toxina 1 sabidamente não. O mecanismo que desencadeou o desequilíbrio hídrico na região internodal de forma a compor os vacúolos intramielínicos deve ter sido consequente ao mecanismo que desencadeou o desequilíbrio hídrico intraxonal, o qual não pode ser precisado aqui. No entanto, é sabido que o axolema internodal apresenta grande concentração de canais de potássio (WAXMAN & RITCHIE, 1985). Talvez estes canais pudessem ter sido ativados e, seguindo o

efluxo deste íon pudesse ter havido saída de líquido do axoplasma. O líquido que constituiu o vacúolo intramielínico acredita-se ter sido originado do axoplasma, devido a rapidez com que tal vacúolo foi formado e devido à proximidade deste compartimento com o vacúolo.

Provavelmente, diferentes mecanismos de ação levam a alterações morfológicas semelhantes em nervos periféricos. Essa suposição fundamenta-se na observação das anormalidades morfológicas causadas por venenos e toxinas com ações fisiológicas distintas.

A vacuolização do citoplasma da célula de Schwann também foi observada após incubação do diafragma de camundongo com a toxina 2. No entanto, os mecanismos básicos que desencadearam a vacuolização pela toxina 2 devem ter sido distintos dos que desencadearam a vacuolização pela toxina 1. No primeiro caso, como discutido adiante, os canais de sódio devem estar envolvidos, e neste último, se sugerido um aumento da concentração intracelular de cálcio, este seria consequentemente captado pelo retículo endoplasmático (COTRAN et al., 1994). Se não for o íon cálcio, simplesmente um desequilíbrio iônico acompanharia um desequilíbrio hídrico, e portanto levaria a tumefação do retículo endoplasmático.

De forma geral, as alterações desencadeadas pela PhTx1 sobre a mielina axonal e as células de Schwann podem ser caracterizadas como um padrão reversível para a célula, segundo COTRAN et al. (1994).

### **PhTx1 e as JNMs**

As JNMs analisadas após incubação com a toxina 1 nos tempos 15, 30, 45 e 60 min mostraram-se estruturalmente heterogêneas. Algumas assemelhavam-se aos controles (15 min), outras com diminuição do número de vesículas sinápticas (30 e 60 min) e outras com grande quantidade de vesículas sinápticas. Este último achado, associado à presença de goteiras sinápticas rasas e ao alongamento do terminal nervoso, esteve mais evidente após 60 min de incubação. Vale lembrar que as demais estruturas destes compartimentos encontravam-se bem preservadas. Este achado não foi observado na bibliografia consultada, portanto pode ser suposto que a exposição das JNMs à ação tóxica desta toxina deva ser a causa responsável pela alteração arquitetural observada, mas sem que houvesse comprometimento eletrofisiológico, pelo menos dentro dos recursos utilizados neste trabalho. Também pode ser pensado que a não uniformidade de comportamento

estrutural das JNMs pode ter algum significado dentro dos resultados eletrofisiológicos obtidos.

A opacidade do terminal nervoso foi observada por ALBUQUERQUE et al. (1971) após 60 min de incubação do músculo diafragma de ratos com a BTX. A BTX aumentou a permeabilidade do íon sódio a nível pré-sináptico. O referido terminal nervoso apresentou vesículas tumefeitas e compactadas, e mitocôndrias com suas cristas obliteradas.

Diminuição das vesículas sinápticas em terminais nervosos foi detectada sob ação da guanidina (CRUZ-HÖFLING & RODRIGUES-SIMIONI, comunicação pessoal) e sob ação da veratrina (CRUZ-HÖFLING & VITAL-BRAZIL, comunicação pessoal).

Estudos realizados por FAHIM (1989) quanto à remodelação da JNM após 5 dias de imobilização de um membro posterior, em ratos, mostraram que as JNMs sofriam rápida adaptação. Entre outros achados o autor observou mudanças regenerativas como a presença de pequenos terminais nervosos isolados uns dos outros pelo citoplasma da célula de Schwann, mas que ocupavam a mesma fenda primária. A fenda nesta ocasião era longa e levemente estreitada, e não apresentava o aspecto de goteira.

O aumento longitudinal da fenda pós-sináptica também foi observado após desuso por longo tempo dos músculos esqueléticos de gatos, por imobilização do membro posterior (ELDRIDGE et al., 1981).

Nestas circunstâncias é difícil imaginar uma resposta do tipo adaptativa e aguda do tecido à ação da toxina 1. Seria portanto, mais provável imaginar que esta toxina pudesse ter atuado direta ou indiretamente sobre uma estrutura do citoesqueleto (como filamentos de actina, miosina ou intermediários) das regiões pré e pós-sinápticas modificando-a e desta forma, após 60 min haveria uma resposta de deformação destas estruturas, observada ultraestruturalmente.

### **PhTx2 e o tecido muscular**

Quatro neuropeptídeos, ricos em cisteína, foram purificados a partir da toxina PhTx2 derivada do veneno da aranha "armadeira" *Phoneutria nigriventer* e apresentaram diferentes níveis de neurotoxicidade após injeção intracérebro-ventricular em camundongos. Foram eles Tx2-1, Tx2-5, Tx2-6 e Tx2-9 (CORDEIRO

et al., 1992). O neuropeptídeo menos tóxico pareceu ser o Tx2-9 que causou somente elevação da cauda e redução da mobilidade dos camundongos. É sabido que a PhTx2 causou sinais como salivação, lacrimação, priapismo, convulsões, paralisia espástica das extremidades anteriores e posteriores, e morte após injeção intracérebro-ventricular (REZENDE Jr. et al, 1991). Estes efeitos provavelmente ocorreram devido à ativação dos canais de sódio voltagem-dependentes nas membranas do músculo e nervo (FONTANA & VITAL-BRAZIL, comunicação pessoal).

Outros autores através de estudos com a técnica do "loose patch clamp" com músculo esquelético de sapo, têm acreditado que esta toxina prolongue a inativação e o processo de desativação dos canais de sódio, mas não descartaram uma possível alteração na cinética de ativação destes canais (ARAÚJO et al., 1993).

Estudos realizados em sinaptosomos demonstraram liberação do neurotransmissor glutamato decorrente do influxo de cálcio mediado por PhTx2, o que se fez, provavelmente, via despolarização da membrana pela entrada de sódio (ROMANO-SILVA et al., 1993).

O estudo morfológico, neste trabalho, veio complementar a extensa sequência de trabalhos que estão sendo desenvolvidos por diversos autores na tentativa de elucidar a ação das toxinas da aranha "armadeira".

As alterações encontradas nesta etapa do estudo progrediram, em suas intensidades, com o tempo de incubação do músculo diafragma com a toxina em questão.

Ao MO algumas fibras musculares apresentaram lesões focais em proximidade à fibras com aparência normal. As lesões aqui caracterizadas por regiões com áreas pálidas irregulares, vacúolos, áreas de hipercontração, fibras com lesão em delta, células com aparência amorfa e com miofibrilas agrupadas ao acaso, foram analisadas no MET e mostraram extensas alterações arquiteturais nos constituintes deste tecido. A proximidade entre áreas morfológicamente danificadas e áreas preservadas foi observada por DUNCAN (1987), em seus estudos sobre a função do aumento do cálcio intracelular na célula muscular esquelética. Os vacúolos observados ao MO podem ter representado a extensa vacuolização do sistema reticular sarcoplasmático, evidenciado através do MET em todos os tempos estudados. A vacuolização do retículo sarcoplasmático e das cisternas terminais

apresentaram diversos graus de acometimento, desde estados muito discretos até formas bastante volumosas. Os túbulos T não foram acometidos pela toxina 2, à maneira do que foi observado para a PhTx1.

O aumento de volume sarcoplasmático, mais acentuado nas proximidades do sarcolema e o rompimento de miofilamentos em extensas áreas das fibras musculares, ou concentrados em pequenos espaços, associados muitas vezes a restos de material celular, ao MO pode ter dado o aspecto de regiões com áreas pálidas irregulares, fibras com lesão em delta, células com aparência amorfa e miofibrilas agrupadas ao acaso, variando localização e extensão do dano.

Ao MET foram identificadas regiões de contração nas fibras musculares frequentemente indicando mionecrose, ou simplesmente o desalinhamento das linhas Z nas miofibrilas subsequentes. Estas regiões ao MO podem ter sido identificadas como fibras com aparência amorfa, regiões com áreas pálidas irregulares e, as próprias regiões de hipercontração.

Para interpretação destes resultados deve inicialmente ser lembrado que a fibra muscular esquelética deve apresentar canais de sódio localizados nas bases das dobras pós-sinápticas e cuja densidade diminui com a profundidade e o distanciamento das dobras (BOUDIER et al., 1992; LE TREUT et al., 1990; FLUCHER et al., 1989). Estes canais também devem encontrar-se nas membranas tubulares (T) caracterizando a corrente de sódio tardia, a qual apresentou sensibilidade diferente em relação aos canais da superfície da membrana às frações de TTX (CAILLÉ et al., 1978).

O músculo diafragma pareceu não ter, ou apresentou poucas fibras de contração rápida (FAULKNER et al., 1979 apud KILARSKI & SJÖRTRON, 1990). Portanto, segundo RUFF & WHITTLESEY (1993) as fibras de contração lenta apresentaram corrente de sódio mais lentas que as fibras de contração rápida na região da placa e na membrana extrajuncional e, segundo OGATA & YAMASAKI (1989) possuíam retículo sarcoplasmático menos desenvolvido.

Desta forma, a frequente ativação destes canais pela toxina 2 da aranha *Phoneutria nigriventer* deve ter promovido influxo de íons sódio (somada a ação da ACh liberada pelos terminais nervosos e conseqüente ativação destes canais voltagem-dependentes - discutida posteriormente) na membrana da fibra muscular esquelética. O influxo dos próprios íons sódio e/ou a conseqüente mobilização de íons cálcio do retículo sarcoplasmático deve ter gerado um desequilíbrio iônico

entre os compartimentos intra- e extracelular de forma a promover um consequente desequilíbrio hídrico. Segundo PARKER (1993), as células em geral buscam uma concentração macromolecular citosólica constante. Qualquer alteração que perturbe esta homeostase pode estimular mecanismos de compensação como tumefação ou retração da célula.

Outras toxinas que ativam canais de sódio, causaram de alterações similares no RS. A BTX, que deve ativar canais de sódio, afetou a estrutura da fibra muscular induzindo vesiculação das cisternas terminais e porções longitudinais do RS (WARNICK et al., 1971). A miotoxina *a* da *Crotalus viridis irridis* induziu lesões focais contendo áreas de vacuolização parcial, até 24 horas após a injeção da toxina, ou vacuolização total e perda da estriação às 48 e 72 horas, alterações estas vistas ao MO (OWNBY et al., 1976). Os estudos ao MET revelaram dilatação do RS e espaço perinuclear. Os autores atribuíram estas alterações à ativação de canais de sódio e consequente desequilíbrio osmótico.

A possível ativação do sistema reticular sarcoplasmático pode ter aumentado a concentração intracelular de íons cálcio a nível superior a  $10^{-7}$  M, desencadeando desta forma o mecanismo de contração dependente deste sistema (DUNCAN, 1987). O estado contrátil do músculo diafragma pode ser observado macroscopicamente no decorrer do procedimento experimental e foi comprovado através da análise de determinadas regiões do material ao MET e ao MEV, exclusivamente para esta toxina.

O aumento da concentração de cálcio intracelular pode ter sido originado, inclusive, através de efluxo deste íon das mitocôndrias. Segundo VERCESI (1993), em tecidos excitáveis o efluxo de cálcio das mitocôndrias ocorre através da troca dos íons sódio-cálcio.

A frequente ativação do mecanismo excitação-contração deste tecido pode ter desencadeado um prolongado tempo de exposição do aparato contrátil e demais estruturas a altas concentrações de íon cálcio, e este por sua vez, poderia ter acionado o mecanismo de dano miofilamentar descrito anteriormente para a toxina 1. Por outro lado, DUNCAN (1987) referiu que o aumento da concentração de cálcio intracelular pode não sido o principal fator na ativação de danos miofilamentares, mas sim, a duração e a magnitude do movimento ativo deste íon neste compartimento, como ocorre nas distrofias musculares. De qualquer forma, o provável mecanismo responsável pelo extenso grau de lesão observado após 60 min de incubação do músculo com a toxina 2 deve ter sido ativado pelo cálcio.

A presença das linhas Z na forma ondulada ou borrada ("streaming") observada durante análise do material incubado com a toxina 2 é um achado bastante comum em determinadas doenças como paralisia hipercalêmica (MACDONALD et al., 1968) e distrofia muscular (MILHORAT et al., 1966; FARDEAU, 1969 apud EDWARDS et al., 1984), e em condições fisiológicas como no exercício excêntrico (FRIDEN et al., 1981). O verdadeiro significado desta alteração ainda é desconhecido.

As mitocôndrias representam a principal fonte de ATP para as células animais. As enzimas pertencentes ao ciclo de Krebs encontram-se na matriz e, o sistema de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa dispõem-se dentro ou sobre a superfície da membrana interna e cristas (GHADIALLY, 1988). As mitocôndrias analisadas nesta etapa, assim como para a toxina 1, apresentaram diversos graus de acometimento estrutural. A tumefação desta organela foi um achado bastante frequente nos vários tempos de incubação e em restritas áreas do próprio músculo controle. Outros estados como perda da arquitetura das cristas internas, elétron-opacidade e rompimento da membrana externa também foram identificados. Como já abordado para as alterações desta organela induzidas pela toxina 1, a tumefação pode ser uma condição passiva por diferença de osmolaridade entre os meios intra- e extracelular, ou aguda, dependente do transporte de elétrons (GHADIALLY, 1988). Especificamente nesta situação é mais provável que tenha ocorrido o primeiro caso. Uma outra possível causa para esta tumefação, de acordo com PUBLICOVER & DUNCAN (1978) e JOFFE (1981), seria o sequestro de íons cálcio pelas mitocôndrias num primeiro momento, pelo aumento da concentração intracelular deste íon, tornando-as tumefeitas, e num segundo momento estas organelas liberariam o cálcio acumulado e sofreriam mudanças ultraestruturais.

Segundo GHADIALLY (1988) a tumefação artefactual por hipóxia é bastante difícil ou impossível de ser distinguida morfológicamente da de origem patogênica e, em situações controle, umas poucas mitocôndrias poderiam encontrar-se nesta situação. Desta forma a tumefação mitocondrial encontrada nas condições controle poderia ser de origem artefactual, mas as observadas nas demais fases de atuação da toxina 2 (e também da toxina 1) não se enquadrariam exclusivamente nesta causa, principalmente pelo extenso acometimento e pelos diversos estágios degradativos nos quais esta organela foi encontrada. Neste caso as alterações mitocondriais indicaram o estado necrótico destas células devido a ação da toxina 2, segundo o conceito de necrose celular estabelecido por COTRAN et al. (1994).

O rompimento da membrana sarcoplasmática evidenciado algumas vezes durante o estudo com esta toxina pode ter sido conseqüente à intensa tumefação sofrida pelas células em análise, como bem caracterizado na análise feita ao MO. MOKRI & ENGEL (1975), através de estudos realizados com biópsias musculares de pacientes com distrofia muscular de Duchenne, observaram que a lesão da membrana sarcoplasmática tornou livre a entrada de fluido extracelular rico em cálcio para dentro do espaço intracelular, e que esta alteração do meio iônico pode ter desencadeado além de contrações localizadas, alterações em organelas como nas mitocôndrias e retículo sarcoplasmático pelo sequestro de cálcio e possivelmente necrose da célula. Esta afirmação foi confirmada por CARPENTER & KARPATI (1989) que causaram necrose nas fibras musculares do músculo gastrocnêmio através de furos com fio de tungstênio. Observaram então áreas de hipercontração associadas a precipitado de cálcio, perda da estrutura sarcomérica nas proximidades das áreas hipercontraídas e formação de estruturas membranosas. Concluíram então, que com a lesão da membrana sarcoplasmática, havia ingresso de moléculas do meio extracelular como o cálcio, responsabilizado pelos achados de hipercontração e perda de material filamentar. A formação das figuras mielínicas deve ter tido sua origem nos fosfolipídeos de membrana (DAVENPORT, 1971 apud CARPENTER & KARPATI, 1989).

Os venenos das tarântulas *Dugesiella hentzi*, Girard e *Aphonopelma* sp estudado por OWNBY & ODELL (1983), após injeção intraperitoneal causaram no músculo diafragma de camundongos hipercontração, ruptura de sarcolema associados à presença de figuras mielínicas e dilatação do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias. Segundo estes autores tais venenos devem ter causado rompimento da membrana, expondo as células à ação do cálcio extracelular, e inferiram que a isquemia e a lesão celular tóxica poderiam alterar a bioquímica da membrana talvez por degradação dos fosfolipídeos por mecanismos como ativação de fosfolipases endógenas, peroxidação lipídica ou ligação covalente de metabólitos da toxina a macromoléculas da célula, o que também pode ter ocorrido neste estudo.

Na análise do tecido muscular incubado com a toxina 2 foi observada a presença de estruturas filamentosas e enoveladas provavelmente oriundas de restos membranares, também denominadas "whorls". Estas estruturas foram encontradas nos quatro tempos analisados, porém foram mais evidenciadas a partir dos 30 min de incubação. A origem exata destas estruturas é incerta. GHADIALLY (1988) sugeriu que elas poderiam aparecer em regiões de intensa justaposição de

mitocôndrias, onde suas membranas representariam sítios de danos focais e rearranjo da membrana do envelope mitocondrial. COTRAN et al. (1994) sugeriu que poderiam advir de distúrbios iônicos e regulação de volume induzidos por perda de ATP. Nestas condições haveria dilatação do retículo endoplasmático (no caso sarcoplasmático) e posteriormente, a formação destas estruturas. Este último autor caracterizou este tipo de lesão com um padrão reversível para a célula e característico de resposta aguda sofrida por ela. PAPADIMITRIOU et al. (1990) estudando as alterações desencadeadas pelo pincelamento de fixador Karnovsky diretamente sobre o tecido muscular, *in vivo*, observou a formação de estruturas membranosas em proximidade ao plasmalema, e inferiu que estas estruturas poderiam representar uma fonte de fosfolípídeo para a formação da membrana. Também notou a proximidade destas estruturas com o núcleo da fibra e com sistemas de Golgi, e argumentou que esta situação poderia ser uma resposta ativa da célula à lesão. CHEN & YATES (1967) estudando a ação de triparanol em músculo liso de hamsters observaram a presença de estruturas membranosas em associação com o retículo endoplasmático e os classificaram como corpos citoplasmáticos Tipo I. É interessante notar que estas estruturas foram frequentemente encontradas nos estágios iniciais dos processos degenerativos da célula. Neste estudo, estas estruturas podem ter sido originadas da degeneração sofrida pelas mitocôndrias, retículo sarcoplasmático e até, de restos membranares, pois houve comprometimento de todos os itens.

É interessante ressaltar que as alterações observadas nesta etapa do trabalho assemelharam-se às referidas para determinadas patologias, como um todo, para distrofia muscular de Duchenne e paralisia periódica hipercalêmica (MILHORAT et al., 1966; MACDONALD et al., 1968), e parcialmente, como no uso de anestésicos voláteis (DUNCAN, 1988) e exercício excêntrico (FRIDÉN et al., 1981). Nestas situações as principais alterações referidas foram fibras que apresentaram suas miofibrilas espaçadas irregularmente, degeneração de mitocôndrias, vesiculação do retículo sarcoplasmático, rompimento da membrana sarcoplasmática, linhas Z borradas, miofilamentos fragmentados e formação de figuras mielínicas.

As células que foram danificadas agudamente pela toxina 2 e pela toxina 1, no indivíduo vivo provavelmente seriam regeneradas, segundo NAIDOO (1993), a partir da diferenciação das células satélites, consideradas vestígios da embriogênese e encontradas entre a lâmina basal e o sarcolema da miofibra, em mioblastos, e conseqüentemente substituiriam a célula muscular danificada.

## PhTx2 e os axônios

Os axônios apresentaram basicamente três alterações estruturais: vacuolização intramielínica, vacuolização intraxonal associada à rarefação de estruturas intrínsecas e aumento de volume axoplasmático, vacuolização no citoplasma das células de Schwann e ocasionalmente desestruturação dos NRs.

As duas primeiras alterações citadas coincidiram com os achados de CRUZ-HÖFLING et al. (1985) em nervos periféricos de camundongos após injeção intraneural do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* e CRUZ-HÖFLING & VITAL-BRAZIL (comunicação pessoal) pela incubação de veratrina em axônios do nervo frênico de diafragma de camundongos.

Alterações similares em fibras nervosas foram observadas por CRUZ-HÖFLING & RODRIGUES-SIMIONI (comunicação pessoal) quando incubaram músculo diafragma com cloreto de guanidina. A guanidina tem efeito facilitador das contrações musculares que é seguido por bloqueio total das respostas do músculo à estímulos elétricos. Sugeriram que os efeitos estruturais provocados pela guanidina poderiam estar relacionados ao acúmulo de cálcio intracelular subsequente ao bloqueio dos canais de potássio.

Vacuolização intramielínica e formação de corpos multilamelares também foram observados após incubação do músculo diafragma com a toxina 1 (citado anteriormente) e por LOVE et al. (1986) após 1 hora da injeção intraneural do veneno do escorpião *Centruroides sculpturatus*. A administração crônica de galactose (POWELL & MYERS, 1983) e, hexaclorofeno (TOWFIGHI et al., 1973) também causaram vacuolização por entre as lamelas de mielina das fibras nervosas. Neste experimento, corpos multilamelares ou as chamadas figuras mielínicas foram encontradas projetando-se para a luz do axônio. Estas estruturas provavelmente originaram-se da descompactação das lamelas de mielina no decorrer do tempo de incubação com a toxina 2.

A descompactação das lamelas de mielina é um frequente achado artefactual (BABEL et al., 1970). Nos axônios mielinizados deste estudo, a descompactação observada pode realmente ter sido um achado artefactual, mas também pode ter representado o início do processo de formação de vacúolos intramielínicos, por mobilização de fluído do axoplasma dos internodos para o interior das linhas intraperiódicas.

A vacuolização intramielínica observada em alguns axônios deste estudo tem sido uma condição frequentemente encontrada em diversos outros estados, como citado anteriormente. Poderia ser concluído, portanto, que a condição fisiopatológica responsável por este achado seria comum para os diferentes casos. Assim, a ativação dos canais de sódio induzida pela toxina PhTx2 e consequente perda da homeostase iônica, pode ter ativado estruturas pertencentes à membrana do internodo e membrana paranodal, como por exemplo os canais de potássio (WAXMAN & RITCHIE, 1985), permitindo um grande efluxo deste íon que seria acompanhado por fluido do axoplasma, fluido este comprimido entre as lamelas de mielina.

A formação de vacúolos intraxonais nos internodos pode ter representado uma alteração sofrida pelos microtúbulos como causa indireta da ativação dos canais de sódio, mais concentrados nas proximidades dos NRs (LANDON & LANGLEY 1969; 1971 / apud ZAGOREN, 1984) e pouco concentrados, mas presentes, nos internodos (GRISSMER, 1986), e um consequente desequilíbrio osmótico e hídrico pelo influxo de água no axoplasma. Este novo conteúdo hídrico pode ainda ter comprimido as estruturas intrínsecas (microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias), caracterizando no MET a rarefação ou agrupamento ao acaso das mesmas, associado a um aspecto elétron-lucente. Outro aspecto que pode ser abordado dentro deste contexto foi a ativação de mecanismos que degradariam as estruturas contidas no axoplasma em resposta ao desequilíbrio osmótico imposto pela ativação dos canais de sódio, como sugerido por PARKER (1993). A rapidez com que este tipo de vacúolo se desenvolveu, durante os 60 min de incubação, poderia sugerir que o fluido edemaciacial tivesse sido derivado grandemente do axoplasma.

MOORE et al. (1986) realizaram estudos morfológicos agudos com a BTX em nervos de ratos e, após 3 horas, observaram tumefação axonal e retração da mielina paranodal nos NRs, tumefação nos axônios amielínicos, e acúmulo de fluido extracelular ao longo do internodo no espaço adaxonal, nas linhas intraperiódicas, acompanhado de retração do axônio. Segundo os autores esta toxina abre canais de sódio e provavelmente desencadeou influxo de fluido nestes compartimentos por efeito osmótico induzido por este íon.

As células de Schwann devem possuir canais de sódio nas superfícies das suas membranas (GRAY & RITCHIE, 1985), mas a função destes canais na geração do PA ou no processo de mielinização axonal ainda foi totalmente estabelecida (TRIMMER & AGNEW, 1989). Assim, uma possível causa para a presença de

vacúolos no interior do citoplasma destas células pode ter sido dada pela infusão de líquido no retículo endoplasmático, também resultante do desequilíbrio hídrico provocado pela ativação dos canais de sódio. O tamanho do vacúolo diferiu bastante durante os vários tempos de incubação, mostrando mais uma vez a progressão da lesão com o tempo de incubação do tecido com esta toxina. A presença de vacúolos no citoplasma das células de Schwann foi descrito por OCHOA et al., (1972) pelo uso de torniquete na altura do Joelho de balbúinos fêmeas mantido entre 1 e 3 horas, e foi acompanhado por alterações estruturais dos nervos periféricos como formação de edema intramielínico e periaxonal.

As mitocôndrias contidas, tanto no axoplasma, como no citoplasma da célula de Schwann apresentaram-se por vezes tumefeitas e com seus sistemas de cristas desorganizados. É viável admitir que o ingurgitamento desta organela também tenha sido conseqüente ao desequilíbrio hídrico. O processo de tumefação mitocondrial com esta causa foi baseado nos comentários feitos por GHADIALLY (1988) e COTRAN et al. (1994).

### **PhTx2 e as JNMs**

O terminal pré-sináptico foi extensamente atingido pela toxina PhTx2 na dose de 1µg/ml. A marcante depleção ou rarefação das vesículas sinápticas foi um achado constante nos diversos tempos analisados. CRUZ-HÖFLING et al. (1985) utilizando injeções intraneural do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em camundongos também observou vesículas sinápticas esparsas e tumefação do terminal pré-sináptico. FONTANA & VITAL-BRAZIL (1985; comunicação pessoal) nos seus experimentos eletrofisiológicos observaram bloqueio da condução neuromuscular após utilização do veneno bruto da aranha "armadeira" e para a toxina PhTx2, respectivamente. Portanto concluiu-se que os resultados morfológicos obtidos pela análise das JNMs para a toxina 2 estão de acordo com os achados eletrofisiológicos citados anteriormente e que esta toxina mimetiza os achados obtidos com o veneno bruto.

A frequente ativação dos canais de sódio na região do terminal nervoso e conseqüente ativação dos canais de sódio voltagem-dependente, associado possivelmente a este mesmo processo ocorrido na região dos NRs, levou à geração de PAs nas fibras nervosas. O conseqüente influxo de cálcio, no caso voltagem-dependente, mobilizou as vesículas de ACh para as zonas ativas, como observado nos terminais nervosos, e através da fusão destas com a membrana axolemal, houve a liberação de seu conteúdo na fenda sináptica. A depleção das vesículas no

interior do terminal nervoso deve ter ocorrido pela constante despolarização axonal e consequente impossibilidade da ressíntese deste mediador no terminal pré-sináptico.

Os vacúolos encontrados nesta área caracterizaram a tumefação do retículo endoplasmático presente neste local, e foram consequentes ao desequilíbrio hídrico imposto pela ativação frequente dos canais de sódio (COTRAN et al., 1994).

O edemaciamento das mitocôndrias teve origem nos processos anteriormente referidos e basearam-se nos comentários de GHADIALLY (1988) e COTRAN et al. (1994).

Os restos de material celular encontrados no terminal pré-sináptico principalmente após 60 min de incubação refletiram a degradação sofrida pelas estruturas intrínsecas em consequência ao desequilíbrio hídrico (PARKER, 1993).

DUCHEN & GOMES (1984) atestaram que os efeitos clínicos e morfológicos induzidos pelos venenos das aranhas do gênero *Latrodectus*, popularmente conhecidas como viúvas negra, marrom e vermelha, eram similares. A nível morfológico observaram tumefação dos terminais nervosos pertencentes às placas motoras, mitocôndrias danificadas e vesículas sinápticas depletadas, e o restante do axônio mostrou-se com aspecto normal.

Estudos realizados com as neurotoxinas taipoxina e notexina, derivadas do veneno de serpentes da família *Elapidae*, *Oxyuranus scutellatus* e *Notechis scutatus* que conhecidamente causam bloqueio na transmissão neuromuscular, demonstraram morfológicamente redução no número de vesículas sinápticas do terminal nervoso (CULL-CANDY et al., 1976).

O terminal pré-sináptico foi bastante modificado pela ação da BTX, segundo estudos realizados por ALBUQUERQUE et al. (1971). Nestes estudos utilizaram incubação de diafragma de ratos com BTX por até 60 min. Observaram a presença de vesículas esparsas, de maior tamanho que as observadas nos controle, e invaginação do axolema no botão do terminal nervoso. Também observaram a opacidade do terminal nervoso que apresentou mitocôndrias destruídas e vesículas tumefeitas e empacotadas. A porção pós-sináptica encontrou-se bem definida.

Todas as toxinas dos escorpiões atuam no sistema neuromuscular por modificações do canal de sódio (COURAUD & JOVER, 1984), nos sítios de ativação

ou inativação (KATZ & EDWARDS, 1972; MEVES et al., 1982; BARHANIN et al., 1982; JAIMOVICH et al., 1982), e os resultados dos experimentos morfológicos e fisiológicos mostram muitos pontos comuns com os resultados aqui apresentados, principalmente no que diz respeito ao disparo de repetidos PAs e depleção de vesículas sinápticas.

As demais alterações no terminal nervoso, como a invaginação do axolema observada após 60 min de incubação, representaram a desorganização celular frente ao desequilíbrio iônico e hídrico.

O terminal pós-sináptico apresentou dobras pós-juncionais pouco profundas e esparsas. Uma possível causa para este achado pode ter vindo do desequilíbrio hídrico imposto pela ativação dos canais de sódio localizados nas bases das dobras pós-sinápticas e com sua densidade diminuindo com a profundidade e o distanciamento das dobras (BOUDIER et al., 1992; LE TREUT et al., 1990; FLUCHER & DANIELS, 1989). Desta forma, o aumento de volume hídrico nesta região poderia distender as dobras, tornando-as rasas e infrequentes. Outra possível causa poderia ser a ação, direta ou indireta, da toxina 2 sobre elementos do citoesqueleto, desestruturando a arquitetura das dobras pós-juncionais, ou mesmo uma ação conjunta de ambas explicações.

### Correlação entre os achados ultraestruturais e sinais e sintomas clínicos

Estudos realizados com o veneno da aranha *Atrax robustus* em macacos, que sabidamente causam liberação de ACh na placa motora e por todo o sistema nervoso autônomo, mostraram inicialmente uma síndrome caracterizada por hipertensão e taquicardia associada ao coma, fasciculação muscular, salivação e lacrimação. Seguidamente o animal desenvolvia hipotensão e hipóxia com morte (DUNCAN et al., 1980). Nesta situação, os achados clínicos estão de acordo com os achados fisiológicos de outros autores.

O veneno da aranha viúva negra afeta principalmente os terminais sensoriais e motores particularmente de humanos, primatas e roedores. O indivíduo exprime clinicamente dor irradiada do sítio da picada, dificuldade respiratória, às vezes, hipertensão arterial, suor profuso, salivação, lacrimação, náuseas, vômito, oligúria e priapismo. Estes achados relacionam-se com a ação deste veneno na liberação do mediador químico, no caso a ACh (QUEIROZ, 1981; DUCHEN & GOMES, 1984).

Os sintomas clínicos referidos pelos indivíduos acidentados com aranha "armadeira", ou mesmo discretos sinais observados em animais de laboratório, quando confrontados com os achados ultraestruturais do músculo esquelético incubado com a toxina 2, auxiliaram no esclarecimento principalmente das câibras dolorosas e irradiação da dor do sítio de introdução do veneno. Estes sintomas são provavelmente oriundos da ativação dos canais de sódio voltagem-dependentes dos tecidos muscular e nervoso na área do ferimento. A propagação da ativação ao longo destes tecidos excitáveis deve gerar irradiação do estímulo, e a permanente despolarização, as câibras. A dor provavelmente é uma resposta das terminações nervosas livres estimuladas nesta área pelo próprio ferimento e pela ação tóxica do veneno.

## CONCLUSÕES

Nas condições experimentais do presente trabalho, os estudos eletrofisiológico e morfológico desenvolvidos com a toxina PhTx1 e o estudo morfológico desenvolvido com a toxina PhTx2, ambas derivadas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, permitiram as seguintes conclusões:

1. A PhTx1 não induz alterações miográficas e eletrofisiológicas nas referidas preparações.
2. A PhTx1, nas doses de 1 e 5 µg/ml, não atua nas JNMs de músculos esqueléticos de camundongos, nos sentidos de despolarização ou hiperpolarização.
3. A PhTx1 é miotóxica, pois revelou sinais de necrose de algumas fibras musculares já aos 15 min de incubação do músculo com a toxina.
4. A PhTx1 é tóxica para nervo, pois induziu alterações estruturais nos axônios do nervo frênico, de caráter osmótico.
5. A PhTx1 deve atuar nas membranas do músculo e nervo, em sítio tal que não promova alterações fisiológicas (detectáveis nestes estudos), mas somente estruturais.

6. As alterações estruturais induzidas pela PhTx1 expressam-se agudamente (15 min, no presente trabalho) e mantêm-se com a mesma intensidade até os 60 min.

7. A atividade miotóxica da PhTx2 é mais extensa que a apresentada pela PhTx1.

8. A miotoxicidade induzida pela PhTx2 é de caráter necrótico e provavelmente é decorrente de distúrbios do tipo iônico e hídrico na célula.

9. A PhTx2 é neurotóxica, pois induziu alterações estruturais progressivas nos axônios, provavelmente desencadeadas por desequilíbrio osmótico dos compartimentos intra- e extracelular.

10. As alterações morfológicas induzidas pela PhTx2 no músculo esquelético e axônios do nervo frênico são graduais, pois evoluíram ao longo do tempo de exposição do músculo à toxina.

11. O desequilíbrio osmótico dos compartimentos intra- e extracelular, que desencadeou as alterações ultraestruturais observadas, provavelmente advém da ação atribuída à PhTx2, ou seja, ativação dos canais de sódio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, B. C.; B. BIGLAND and J. M. RITCHIE (1952). The physiological cost of negative work. *Journal of Physiology*, **117**:380-390.
- ADAMS, M. E.; V. P. BINDOKAS; L. HASEGAWA and V. J. VENEMA (1990).  $\omega$ -Agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. *The Journal Biological Chemistry*, **265**:861-867.
- ALBUQUERQUE, E. X.; J. E. WARNICK and F. M. SANSONE (1971). The pharmacology of batrachotoxin. II. Effect on electrical properties of the mammalian nerve and skeletal muscle membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **176**:511-528.
- ANAND, R. (1983). Cellular membranes in Duchenne muscular dystrophy. *International Journal Biochemistry*, **15**:1211-1217.
- ANTUNES, E.; R. A. MARANGONI; S. D. BRAIN and G. de NUCCI (1992). *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon*, **30**:1011-1016.

- ARAÚJO, D. A. M.; M. N. CORDEIRO; R. DINIZ and P. S. L. BEIRÃO (1993). Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology* **347**:205-208.
- ARMSTRONG, R. B.; R. W. OGILVIE and J. A. SCHWANE (1983). Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *Journal Applied Physiology*, **54**:80-93.
- BABEL, J.; A. BISCHOFF and H. SPOEDLIN (1970). *Ultrastructure of the Peripheral Nervous System and Sense Organs. Atlas of Normal and Pathologic Anatomy*. A. BISCHOFF, ed. Saint Louis: The C. V. Mosby Company. pp 46-97.
- BARACOS, V.; P. RODEMANN; C. A. DINARELLO and A. L. GOLDBERG (1983). Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). *The New England Journal of Medicine*, **308**:553-558.
- BARHANIN, J.; J. R. GIGLIO; P. LEOPOLD; A. SCHMID; S. V. SAMPAIO and M. LAZDUNSKI (1982). *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**:12553-12558.
- BARRIO, A. (1955). Spastic action of the venom of the spider *Phoneutria fera*. *Acta Physiologica Latinoamericana*, **5**:132-143.
- BLOCH, R. J. and D. W. PUMOLIN (1988). Molecular events in synaptogenesis: nerve-muscle adhesion and postsynaptic differentiation. *American Journal of Physiology*, **254**:C345-C364.
- BOUDIER, J-L.; E. JOVER and P. CAU (1988). Autoradiographic localization of voltage-dependent sodium channels on the mouse neuromuscular junction using <sup>125</sup>I-alpha scorpion toxin. Preferential labeling of glial cells on the presynaptic side. *Journal of Neuroscience* **8**:469-1478.
- BOUDIER, J-L.; T. L. TREUT and E. JOVER (1992). Autoradiographic localization of voltage-dependent sodium channels on the mouse neuromuscular junction using <sup>125</sup>I- scorpion toxin. II. Sodium channel distribution on postsynaptic membranes. *The Journal of Neuroscience*, **12**:454-466.

- BUCARETCHI, F. (1992) Acidentes por *Phoneutria*. In: *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. S. Schvartsman, ed. São Paulo: Ed. Sarvier. pp 196-201.
- BÜCHERL, W. (1964a). Distribuição Geográfica dos Aracnóides Peçonhentos Temíveis. *Memórias do Instituto Butantan*, **31**:55-66.
- BÜCHERL, W. (1964b). Biologia dos Artrópodos Peçonhentos. *Memórias do Instituto Butantan*, **31**:85-94.
- BÜLBRING, E. (1946). Observation on the isolated phrenic nerve; diaphragm preparation of the rat. *British Journal of Pharmacology*, **1**:38-61.
- BRAZIL, V. and J. VELLARD (1925). Contribuição ao Estudo das Aranhas. *Memórias do Instituto Butantan*, **2**:5-77.
- BRAZIL, V and J. VELLARD (1926). Contribuição ao Estudo das Aranhas. *Memórias do Instituto Butantan*, **3**:243-299.
- CAILLÉ, J.; M. ILDEFONSE and O. ROUGIER (1978). Existence of sodium current in the tubular membrane of frog twitch muscle fibre; Its possible role in the activation of contraction. *Pflügers Archives* **374**:167-177.
- CALDWELL, J. H.; D. T. CAMPBELL and K. G. BEAM (1986). Na channel distribution in vertebrate skeletal muscle. *Journal of General Physiology* **87**:907-932.
- CALEY, D. W. and A. B. BUTLER (1974). Formation of central and peripheral myelin sheaths in the rat: an electron microscopy study. *American Journal of Anatomy*, **140**:339-348.
- CARPENTER, S. and G. KARPATI (1989). Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fibers. *Journal of Neurophathology and Experimental Neurology*, **48**:154-170.
- CATTERALL, W. A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annals Review Pharmacology and Toxicology* **20**:15-43.
- CATTERALL, W. A. (1993). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends in Neuroscience* **16**:500-506.

- CHEN, I-LI and R. D. YATES (1967). An ultrastructural study of opaque cytoplasmic inclusions induced by triparanol treatment. *American Journal Anatomy*, **121**:705-726.
- CHIU, S. Y. (1987). Sodium currents in axonal-associated Schwann cells from adult rabbits. *Journal of Physiology* **386**:181-203.
- CLOSE, R. I. (1972). Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, **52**:129-197.
- CORDEIRO, M. N.; L. REZENDE Jr and C. R. DINIZ (1988). Isolamento de Substâncias Farmacologicamente Ativas da Peçonha de *Phoneutria nigriventer*. *Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Proteicas*, **2**:120-123.
- CORDEIRO, M. N.; C. R. DINIZ; A. C. VALENTIN; V. R. D. von EICKSTEDT; J. GIROY and M. RICHARDSON (1992). The purification and amino acid sequences of fourTx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Letters* **310**:153-156.
- COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. and KUMAR, V. (1994). In: *Pathologic Basis of Disease*. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. Chap 1, pp. 1-34.
- COURAUD, F. and E. JOVER (1984). Mechanism of action of scorpion toxins. In: *Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate venoms*. New York: Marcel Dekker, Inc. Basel. Chap. 20, pp 660-668.
- CRUZ-HÖFLING, M. A.; S. LOVE; G. BROOK and L. W. DUCHEN (1985). Effects of *Phoneutria nigriventer* Spider Venom on Mouse Peripheral Nerve. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, **70**:623-640.
- CULL-CANDY, S. G.; J. FOHLMAN; D. GUSTAVSSON; R. LÜLLMANN-RAUCH and S. THESLEFF (1976). The effects of taipoxin and notexin on the function and fine structure of the murine neuromuscular junction. *Neuroscience*, **1**:175-180.
- DINIZ, C. R. (1963). Separação de Proteínas e Caracterização de Substâncias Ativas em Venenos de Aranhas do Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **35**:283-291.

- DINIZ, C. R.; M. N. ORDEIRO; L. REZENDE Jr; P. KELLY; S. FISCHER; F. REIMANN; E. B. OLIVEIRA and M. RICHARDSON (1990). The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Letters* **263**:251-253.
- DINIZ, C. R.; S. G. FIGUEIREDO; M. N. CORDEIRO; M. E. de LIMA PEREZ-GARCIA and V. R. D. von EICKSTEDT (1992). Toxicity of venom from spiders of the genus *Phoneutria*. *Toxicon*, **30**:5-6-B.
- DINIZ, M. R. V.; M. J. I. PAINE; C. R. DINIZ; R. D. G. THEAKSTON and J. M. CRAMPTON (1993). Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:15340-15342.
- DUCHEN, L. W and S. GOMEZ. (1984). Pharmacology of Spider Venom. Handbook of Natural Toxins II. In: *Insect Poison, Allergens and Other Invertebrate Toxins*. New York : Marcell Dekker, Inc. pp 483-512.
- DUNCAN, A. W.; J. TIBBALLS and S. K. SUTHERLAND (1980). Effect of Sydney funnel-web spider envenomation in monkeys, and their clinical implications. *The Medical Journal of Australia* **2**:429-435.
- DUNCAN, C. J. (1987). Role of calcium in triggering rapid ultrastructural damage in muscle: a study of chemically skinned fibers. *Journal of Cell Science* **87**:581-594.
- DUNCAN, C. J. and M. J. JACKSON (1987). Different mechanisms mediate structural changes and intracellular enzyme efflux following damage to skeletal muscle. *Journal of Cell Science* **87**:183-188.
- DUNCAN, C. J. (1988). The role of phospholipase A2 in calcium-induced damage in cardiac and skeletal muscle. *Cell Tissue Research* **253**:457-462.
- DUNCAN, C. J. (1989). Mechanisms that produce rapid damage to myofilaments of amphibian skeletal muscle. *Muscle and Nerve* **12**:210-218.
- ECKERT, R. and D. RANDALL (1988). In: *Animal Physiology: mechanisms and adaptations*. 3rd ed. New York: Freeman. Chap 10, pp.329-367.

- EDWARDS, R. H. T.; D. A. JONES; D. NEWHAM and S. J. CHAPMAN (1984). Role of mechanical damage in pathogenesis of proximal myopathy in man. *The Lancet* **10**:548-552.
- ELDRIDGE, L.; M. LIEBHOLD and J. H. STEINBACH (1981). Alterations in cat skeletal neuromuscular junction following prolonged inactivity. *Journal of Physiology (London)*, **313**:529-545.
- ENTWISTLE, I. D.; R. A. W. JOHNSTONE; D. MEDZIHRADSKY and T. E. MAY (1982). Isolation of a Pure Toxic Polypeptide from the Venom of the *Phoneutria nigriventer* and Its Neurophysiological Activity on an Insect Femur Preparation. *Toxicon* **20**:1059-1067.
- ESBÉRARD, C. A. (1991a). O Músculo. In: *Fisiologia*. M. M. AIRES. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. Cap. 21, pp.160-189.
- ESBÉRARD, C. A. (1991b). Fisiologia Geral da Sinapse. In: *Fisiologia*. M. M. AIRES. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. Cap. 20, pp.152-159.
- FAHIM, M. A. (1989). Rapid neuromuscular remodeling following limb immobilization. *Anatomical Record* **224**:102-109.
- FLUCHER, B. E. and M. P. DANIELS (1989). Distribution of Na channels and ankyrin in neuromuscular junction is complementary to that acetylcholine receptor and 43 Kd protein. *Neuron* **3**:163-175.
- FLUCHER, B. E. (1992). Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Developmental Biology* **154**:245-260.
- FONTANA, M. D. and O. VITAL-BRAZIL (1985). Mode of Action of *Phoneutria nigriventer* Spider Venom at the Isolated Phrenic Nerve - Diaphragm of the Rat. *Brazilian Journal Medicine Biological Research*, **18**:557-565.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C (1970). Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *Journal of Cell Biology*, **47**:488-499.
- FRIDEN, J.; M. SJÖSTRÖM and B. EKBLOM (1981). A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia* **37**:506-507.

- GHADIALLY, F. N. (1988). In: *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. Vol I, II. 3rd ed. London: Butterworths. pp. 191-328; 842-853.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. and B. J. HAWGOOD (1984). Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon* **22**:791-804.
- GRAY, P. T. A. and J. M. RITCHIE (1985). Ion channels in Schwann and glial cells. *Trends in Neurosciences*, **8**:411-415.
- GRISSMER, S. (1986). Properties of potassium and sodium channels in frog internode. *Journal of Physiology*, **381**:119-134.
- HARVEY, A. L. (1990). Cytolytic Toxins. In: *Handbook of Toxicology*. W.T. SHIER and D. MEB, eds. New York: Marcel Dekker, Inc. Chap. 1, pp. 1-58.
- JAIMOVICH, E.; M. ILDEFONSE; J. BARHANIN O. ROUGIER and M. LAZDUNSKI (1982). *Centruroides* toxin, a selective blocker of surface sodium channels in skeletal muscle: voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **79**:3896-3900.
- JAIMOVICH, E.; R. CHICHEPRTICHE; A. LOMBERT; M. LAZDUNSKI; M. ILDEFONSE and O. ROUGIER (1983). Differences in the properties of Na channels in muscle surface and T-tubular membranes revealed by tetrodotoxin derivatives. *Pflügers Archives* **397**:1-5.
- JACQUES Y.; G. ROMEY; M. T. CAVEY; B. KARTALOVSKY and M. LAZDUNSKY (1980). Interaction of pyrethroids with the sodium channel in mammalian neuronal cells in culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, **600**:882-897.
- JOFFE, M. (1981). Increased muscle calcium. A possible cause of mitochondrial dysfunction and cellular necrosis in denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry Journal*, **196**:663-667.
- JUNQUEIRA, L. C. U. and J. CARNEIRO. (1990). Tecido Nervoso. In: *Histologia Básica*. 7. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 9, pp. 120-145.
- KATZ, L. N. and C. EDWARDS (1972). The effect of scorpion venom on the neuromuscular junction of the frog. *Toxicon*, **10**:133-137.

- KILARSKI, W. and M. SJÖRTRÖM (1990). Systematic distribution of muscle fiber types in the rat and rabbit diaphragm: a morphometric and ultrastructural analysis. *Journal of Anatomy*, **168**:13-30.
- KOESTER, J. (1991). Resting membrane potential and action potential. In: *Principles of Neural Science*. E. R. KANDEL; J. H. SCHWARTZ and M. JESSEL., eds. New York: Elsevier. Chap. 5-8, pp. 49-86.
- LE TREUT, T.; J.-L. BOUDIER; E. JOVER and P. CAU (1990). Localization of voltage-sensitive sodium channels on the extrasynaptic membrane surface of mouse skeletal muscle by autoradiography of scorpion toxin binding sites. *Journal of Neurocytology* **19**:408-420.
- LOVE, S.; M. A. CRUZ-HÖFLING and L. W. DUCHEN (1986). Morphological Abnormalities in myelinated nerve fibres caused by *Leiurus*, *Centruroides* and *Phoneutria* Venoms and their prevention by tetrodotoxin. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, **71**:115-122.
- LUCAS, S. (1988). Spiders in Brazil. *Toxicon*, **26**:759-772.
- MASSACRIER, A.; F. COURAUD and P. CAU (1990). Voltage-sensitive sodium channels in mammalian peripheral nerves detected using Scorpion toxins. *Journal of Neurocytology*, **19**:850-872.
- MATTIELLO, A. C.; F. A. ARMANDO; S. B. P. CAVASIN and S. E. A. PEREZ (1989). *Estudo comparativo dos efeitos fisiológicos induzidos pelo exercício excêntrico e exercício concêntrico submáximos em humanos*. São Carlos. 47p. Trabalho de Iniciação Científica - Curso de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos.
- McCALL, K. E. and C. J. DUNCAN (1989). Independent pathways causing cellular damage in mouse soleus muscle under hypoxia. *Comparative Biochemistry Physiology*, **4**:799-804.
- MACDONALD, R. D. N. B. REWCASTLE; and J. G. HUMPHREY (1968). The myopathy of hyperkalaemic periodic paralysis. *Archives in Neurology*, **19**:274-287.

- MEVES, H.; N. RUBLY and D. D. WATT (1982). Effect of toxins isolated from the venom of scorpion *Centruroides sculpturatus* on the sodium currents of the node of Ranvier. *Pflügers Archives*, **393**:56-62.
- MILHORAT, A. T.; S. A. SHAFIQ and L. GOLDSTONE (1966). Changes in muscle structure in dystrophic patients, carriers and normal siblings seen by electron microscopy - correlation with levels of serum creatine phosphokinase. *Annals of the New York Academy of Science*, **138**:246-292.
- MOKRI, B. and A. G. ENGEL (1975). Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*, **25**:1111-1120.
- MOORE, G. R. W.; R. J. BOEGMAN; D. M. ROBERTSON and C. S. RAINE (1986). Acute Stages of Batrachotoxin-Induced Neuropathy: a Morphologic Study of a Sodium-Channel Toxin. *Journal of Neurocytology* **15**:573-583.
- MURPHY, R. A. (1990). Contração das Células Musculares. In: *Fisiologia*. R. M. BERNE; M. N. LEVY, 2. edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. Cap 22, pp.249-270.
- NAIDOO, P. R. (1993). EM evidence of myoblast origin in regeneration of human skeletal muscle explants. *Cell Biology International*, **17**:825-831.
- NEWHAM, D. J.; K. R. MILLS; B. M. QUIGKLEY and R. H. T. EDWARDS (1983). Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. *Clinical Science*, **64**:55-62.
- NODA, M.; S. SHIMIZU; T. TANABE; T. TAKAI and T. KAYANO (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**:121-127.
- NORTON, W. T. (1981). Formation, structure and biochemistry of myelin. In: *Basic Neurochemistry*. G. J. SIEGEL; R. W. ALBERS; B. W. AGRANOFF; R. KATZMAN, eds. 3rd ed. Boston: Little, Brawn and Company. Chap.4; pp. 63-92.
- OCHOA, J.; T. J. FOWLER and R. W. GILLIATT (1972). Anatomical changes in peripheral nerves compressed by pneumatic tourniquet. *Journal Anatomy*. **113**:433-455.

- OGATA, T. and Y. YAMASAKI (1989). High resolution scanning electron-microscopic study on the three-dimensional structure of the sarcoplasmic reticulum in slow (tonic) muscle fibers of the frog, *Rana nigromaculata*. *Cell Tissue Research*, **255**:669-672.
- OWNBY, C. L. and G. U. ODELL (1983). Pathogenesis of skeletal muscle necrosis induced by tarantula venom. *Experimental and Molecular Pathology* **38**:83-96.
- OWNBY, C. L.; D. CAMERON and A.T.TU (1976). Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis irridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. *American Journal of Pathology*, **85**: 149-166.
- PAPADIMITRIOU, J. M.; T. A. ROBERTSON; C. A. MITCHELL and M. D. GROUNDS (1990). The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers. *Journal of Structural Biology* **103**:124-134.
- PARKER, J. C. (1993). In defense of cell volume? *American Journal of Physiology* **34**:1191-1200.
- PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, H. de F. (1991). In: *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells*. 3rd ed. New York: Oxford University Press. Chap. 12, pp 384-394.
- POWELL, H. C. and R. R. MYERS (1983). Schwann cell changes and demyelination in chronic galactose neuropathy. *Muscle and Nerve*, **6**:218-227.
- PUBLICOVER J. S. and C. J. DUNCAN (1978). The use of A23187 to demonstrate the role of intracellular calcium in causing ultrastructural damage in mammalian muscle. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **37**:544-557.
- QUEIROZ, L. S. (1981). *Effects of neurotoxins on muscle and nerve in the mouse: morphological and physiological studies*. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de Londres.
- RAINE, C. S. (1984). Molecular organization of myelin. In: *Myelin*. P. MORELL, ed. 2nd ed. New York: Plenum Press. Chap. 1, pp. 1-41.

- REZENDE Jr, L.; M. N. CORDEIRO; E. B. OLIVEIRA and C. R. DINIZ (1991). Isolation of Neurotoxic Peptides from the Venom of the "Armed" Spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**:1225-1233.
- RITCHIE, J. M. and R. B. ROGART (1977). Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of a axonal membrane under the myelin sheath. *Proceedings of the National Academy of Science* **74**:211-215.
- RODEMANN, H. P.; L. WAXMAN and A. L. GOLDBERG (1982). The stimulation of protein degradation in muscle by calcium is mediated by prostaglandin E2 and does not require the calcium-activated protease. *The Journal Biological Chemistry* **10**:8716-8723.
- ROMANO-SILVA, M. A.; R. RIBEIRO-SANTOS; A. M. RIBEIRO; M. V. GOMES; C. R. DINIZ; M. N. CORDEIRO and M. J. BRAMMER (1993). Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca entry linked to rapid glutamate release: Studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. *Biochemistry Journal* **296**:313-319.
- ROSENBLUT, J. (1984). Membrane specialization at the nodes of Ranvier and paranodal and juxtaparanodal regions of myelinated central and peripheral nerve fibers. In: *The Node of Ranvier*. J. C. ZAGOREN ; S. FEDOROFF, eds Orlando: Academic Press, Inc. pp. 31-65.
- RUFF, R. L. and D. WHITTLESEY (1993). Sodium currents near and away from endplates on human fast and slow twitch muscle fibers. *Muscle and Nerve*, **16**:922-929.
- SALPETER, M. M. (1987). Vertebrate Neuromuscular Junctions: General Morphology, Molecular Organization, and Functional Consequences. In: *The Vertebrate Neuromuscular Junction*. M. M. Salpeter, ed. New York: Alan R. Liss, Inc. Chap. 1, pp. 1-54.
- SATO, T.; D. L. WALKER; H. A. PETERS; H. H. REESE and S. M. SHOM (1971). Chronic polymyositis and myxovirus-like inclusions. Electron microscope and viral studies. *Archives in Neurology*, **24**:409-418.

- SCHENBERG, S. and F. A. PEREIRA LIMA (1966). Pharmacology of the Polypeptides from the Venom of Spider *Phoneutria fera*. *Memórias do Instituto Butantan*, **33**:627-638.
- STRINGER, J. M.; R. A. KAINER and A. T. TU (1972). Myonecrosis induced by rattlesnake venom. An electron microscopy study. *American Journal of Pathology*, **67**:127-140.
- STRUM, J. M. and E. C. B. HALL-CRAGGS (1982). A method demonstrating motor endplates for light and electron microscopy. *Journal of Neuroscience Methods* **6**:305- 309.
- SWASH, M. and M. S. SCHWARTZ (1988). In: *Neuromuscular Diseases. A Practical Approach to Diagnosis and Management*. 2nd ed. London: Springer-Verlag. Chap 3, pp. 15-62.
- TOWFIGHI, J.; N. K. GONATAS and L. McCREE (1973). Hexachlorophene neuropathy in rats. *Laboratory Investigation*, **29**:428-436.
- TRIMMER, J. S. and W. S. AGNEW (1989). Molecular diversity of the voltage-sensitive Na channels. *Annual Review Physiology* **51**:401-418.
- USHIKI, T. and C. IDE (1988). A modified KOH-collagenase method applied to scanning electron microscopic observations of peripheral nerves. *Archives of Histology and Cytology* **51**:223-232.
- VENABLE, J. H. and R. COGGESHALL (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, **25**:407-408.
- VERCESI, A. E. (1993). Ca<sup>2+</sup> transport and oxidative damage of mitochondria. *Brazilian Journal Medicine Biological Research*, **26**:441-457.
- VITAL-BRAZIL, O. (1987). Spider Venoms Acting on the Sodium Channel. *Memórias do Instituto Butantan*, **49**:25-33.
- von EICKSTEDT, V. R. (1978/79). Estudo sistemático de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria keyserlingi* (Pickard-Cambridge, 1897) (*Araneae; Labidognatha; Ctenidae*). *Memórias do Instituto Butantan*, **42/43**:95-126.

- WARNICK, J. E.; E. X. ALBUQUERQUE and F. M. SANSONE (1971). The pharmacology of batrachotoxin. I. Effects on the contractile mechanisms and on neuromuscular transmission of mammalian skeletal muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **176**: 497-510.
- WAXMAN, S. G. and M. RITCHIE (1985). Organization of ion channels in the myelinated nerve fiber. *Science*. **228**:1502-1507.
- ZAGOREN, J. C. (1984). Cation binding at the node of Ranvier. In: *The Node of Ranvier*. J. C. ZAGOREN; S. FEDOROFF, eds. Orlando: Academic Press, Inc. pp. 69-89.