

---

André Marchi Durigon

**EFEITOS DA PEÇONHA DE *Bothrops neuwiedi pauloensis***  
**SOBRE PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE AVE E**  
**MAMÍFERO: - ASPECTOS MIOGRÁFICOS E ELETROFISIOLÓGICOS**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico - André Marchi Durigon.*

*Campinas, 01 de julho de 2003.*

*Prof. Dra. Léa Rodrigues Simioni*  
*- Orientadora -*

Campinas

UNICAMP - 2003

---

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

---

André Marchi Durigon

**EFEITOS DA PEÇONHA DE *Bothrops neuwiedi pauloensis*  
SOBRE PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE AVE E  
MAMÍFERO: - ASPECTOS MIOGRÁFICOS E ELETROFISIOLÓGICOS**

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

Orientação: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Campinas

UNICAMP - 2003

---

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

842204008

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP D934e
V	EX
TOMBO BC/	S 70 10
PROC.	16-P-117/04
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/02/04
Nº CPD	

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

CM00193838-B

BIB ID 310641

D934e

**Durigon, André Marchi**

Efeitos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre preparações neuromuscular de ave e mamífero – Aspectos miográficos e eletrofisiológicos / André Marchi Durigon. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

**Orientador : Léa Rodrigues Simioni**

Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Peçonhas. 2. junção neuromuscular. 3. Eletrofisiologia. 4. Venenos – efeito fisiológico. 5. Diafragma. I. Léa Rodrigues Simioni. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

**Orientador:**

**Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni**

**Membros:**

**Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni**

**Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi**

**Profa. Dra. Yoko Oshima Franco**

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

**Data: 01/07/2003**

UNICAMP  
CENTRO CENTRAL  
CAMPUS CIRCULANTE

---

Ofereço este trabalho aos meus amados pais, Luiz Francisco Durigon (*in memoriam*) e Cecília Marchi Durigon, pelos firmes princípios morais que guiaram suas vidas e por me conduzirem às atividades intelectuais.

Aos meus queridos irmãos, José Luís, Ciro Francisco e Marcelo, pelos constantes incentivos.

À minha querida esposa, Cláudia, por acreditar e sempre me apoiar nas horas mais difíceis e amargas de minha vida, pelo seu infinito amor e magnífica devoção à família.

Ao meu querido filho, André, por estar sempre ao meu lado com seu olhar de ternura e por fazer tudo valer a pena.

---

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, meus sinceros agradecimentos pela orientação e enorme paciência, compreensão, apoio moral, quando tudo parecia impossível e pelo incentivo que me fez enxergar a realidade da vida. Consegui amadurecer com suas palavras, hoje, tenho condições de continuar. Obrigado!

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, pela co-orientação e apoio, pelo incentivo e preocupação humana, por me acolher sem nunca dizer não e pelas palavras sinceras que só um irmão consegue pronunciar.

À Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi, pelo auxílio e pelas palavras de afeto e incrível entusiasmo.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pela amizade, orientação e alegria que sempre foram indispensáveis.

Ao Prof. Dr. Urbano Morato Ferraz Meirelles, pela ajuda, apoio e incentivo na arte de pensar, pelos bons conselhos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela ajuda nas traduções para o Inglês, sem a qual, tornar-se-ia muito penoso esse trabalho.

---

À Profa. Dra. Cadem Souccar da Faculdade Paulista de Medicina, pela ajuda, incentivo, dedicação e disponibilidade, e pelas palavras de carinho e força que me auxiliaram no caminho deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Thereza R. Lima Landman da Faculdade Paulista de Medicina, pela contagiante alegria e disposição.

Ao Prof. Dr. Antonio José Lapa da Faculdade Paulista de Medicina, pela disposição e boa vontade que lhe são comuns.

Ao Prof. Dr. Nadim Farah Heluany, pelo constante incentivo, pela ajuda, pelo tempo sempre disponível ao auxílio, pelas brincadeiras e humor contagiante. Pelo bom amigo que sempre foi.

À Profa. Dra. Maria Fátima Furtado do Instituto Butantan, pelas correções e grande incentivo.

Ao Prof. Stephen Anthony Shaw, pela orientação e ensino da língua Inglesa e pelo agradável convívio.

---

Ao amigo biólogo, Gildo Bernardo Leite, pela eficiente assessoria técnica ao longo deste trabalho, pelas palavras positivas e entusiastas, pela solidariedade e dedicação e pela prática humanitária.

À querida amiga e irmã, Profa. Dra. Caroline Ribeiro de Borja Oliveira, pela enorme amizade, dedicação, grande ajuda e incentivo, pela disposição e orientação, pelas idéias e pelas palavras sinceras de auxílio, jamais poderei retribuir o apoio que me dispensou! Maravilhoso ser humano! Sou eternamente grato!

Ao grande amigo, Cháriston André Dal Belo, pelo companheirismo e amizade, pela ajuda na elaboração dos conceitos eletrofisiológicos e pelo conforto de um grande amigo.

À afetuosa amiga, Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, grande conselheira, pelas palavras de incentivo, por apontar meus erros conceituais e indicar o caminho correto e pela enorme consideração. Me adotou como filho científico, não sei se estou à altura!

À amiga, Stella Regina Zamunér, pela ajuda e amizade.

À grande amiga, Sara Castro Hernandez, pela simplicidade, meiguice e alegria que se compara à de uma criança, pelos bons momentos que passamos no

---

## Agradecimentos

---

laboratório, pelo ótimo convívio e pela grande amizade.

Aos amigos do laboratório, Ercleison, Valdemir, Daniel, Ricardo, Joseane e Joseane Barros, Viviane e Rosany, obrigado pela convivência saudável e alegre!

Aos amigos, José Ilton, Aguinaldo e Miguel, que sempre estiveram disponíveis direta ou indiretamente.

Aos amigos, Gislaine, Dora, Rita, Fran, Hélio e Wanderley, pela disposição, pela ajuda e alegre convivência.

À biomédica, Maria do Carmo Gonçalo, da Faculdade Paulista de Medicina, pelos bons momentos, pela alegria constante e contagiante que lhe são características.

À grande amiga, Profa. Dra. Ana Cláudia Vallin da Cruz, da Faculdade Paulista de Medicina, que sempre se propôs a me ajudar, pela dedicação, pelos sinceros esforços e pelo tempo que passamos juntos numa convivência saudável e gostosa no laboratório ou mesmo na discussão de meus resultados.

---

À amiga, Maria Emília Yamamoto, da Faculdade Paulista de Medicina, pela amizade, boa conduta moral e enorme disposição.

À amiga, Mirtez Midori Tanae, da Faculdade Paulista de Medicina, pelos bons momentos e convivência agradável.

Aos queridos amigos Adonay Grassi, Adonay Grassi Jr., Irineu Burckarte, Maria José de Lima Burckarte, Ana Teresa Ferrari, e todos os amigos da SEIR que por um simples gesto e orações vibraram para que eu não sucumbisse frente aos desafios. Obrigado meus queridos amigos, meus queridos irmãos! Palavras são poucas para expressarem minha verdadeira e real gratidão! Obrigado!

Ao Sr. Reginaldo e todos os amigos da CJ – Parthenom – NMM pelos incentivos, apoio moral e palavras de esperança que me levantaram no momento correto. Pelas vibrações e fé depositadas para que esse trabalho atingisse seu objetivo. Obrigado!

Ao Sr. Dimas Wilmann Cangiani (in memoriam) e Sra. Izabel Vieira Cangiani, meus segundos pais, não há palavras de gratidão suficientes, me expresso numa única, obrigado!

---

## Agradecimentos

---

À Izabel Cristina, João Luiz e Mônica, Wagner e Solange, Rosângela e Emerson, Cláudio e Adriana e Larissa, obrigado pela amizade sincera.

Ao Instituto Butantan, Cevap, Instituto de Biologia da Unicamp e à Faculdade Paulista de Medicina.

À Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelos excelentes serviços prestados. Sou muito grato aos amigos: Wagner, Marcos, Mário e Profa. Maria Rita.

A todos os funcionários da Unicamp, amigos e alunos do curso de Pós-graduação do Departamento de Farmacologia, que, mesmo através de uma simples palavra ou um sorriso, ajudaram, de alguma forma, na realização deste trabalho.

À Unicamp, que possibilitou este trabalho. Obrigado!

A CNPq, pelo suporte financeiro.

---

## Pai

Agradeço ao sofrimento ontem vivido, pois dele retirei a essência.

Difícil foi trabalhar com vidas que, em prol da humanidade, forçosa ou espontaneamente, a qualquer momento estavam prontas a serem ceifadas e rogavam que fossem recolhidas.

Os dias amargos não tardaram a chegar, e a frase amiga que sempre se repetia, “Confia sempre, não percas as esperanças nas sombras do mundo”, me fazia enxergar a realidade dura, porém verdadeira.

Hoje é possível que a própria vida nos ameace com a dor e até mesmo com a morte, aguilhoando o ideal e escurecendo o próprio curso, porém, Tu me fizeste crer que neste mundo tudo passa, tudo se modifica, mas o que vem dos Céus jamais se perderá.

Abrandaste minhas deficiências com uma família maravilhosa e amigos de elevada moral.

Senhor, disseste em meu coração: segue em frente, mesmo que teus pés estejam sangrando e termina tua obra, honra aqueles que foram teus fiéis depositários, mostra tua fé e vibra com paixão pelo trabalho finalizado, agradece aqueles que foram “duros” contigo pois só queriam teu bem. Tu estava sempre

---

ao meu lado, a fim de mitigar minhas deficiências e despertar minha fé.

Falaste no fundo de minh'alma: "Acredita sempre e não te esqueças nunca que amanhã será um novo dia", e eu te respondi com os olhos marejados, **AMÉM!**

---

O método experimental é apenas uma técnica, infinitamente preciosa, mas deprimente. Exige do pesquisador um acréscimo de fervor para não fraquejar antes de atingir o objetivo a que ele se propõe, por esse caminho desnudo que é preciso seguir junto com o método.

O homem é um ser sentimental. Não há grandes criações fora do sentimento, e o entusiasmo esgota-se depressa, para a maioria deles, à medida que se afastam de seu sonho.

Louis-Ferdinand Céline. In: A vida e a obra de Semmelweis, 1924.

---

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>Xliii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>Xlix</b>

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>1. 1.</b>	As peçonhas e os acidentes ofídicos .....	<b>56</b>
<b>1. 2.</b>	Definições de peçonha e de veneno .....	<b>58</b>
<b>1. 3.</b>	Classificações dos animais peçonhentos .....	<b>60</b>
<b>1. 4.</b>	Gênero <i>Bothrops</i> .....	<b>62</b>
<b>1. 5.</b>	<i>Bothrops neuwiedi</i> .....	<b>63</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>68</b>

---

---

<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	70
<b>3. 1.</b>	Animais .....	71
<b>3. 2.</b>	Veneno .....	71
<b>3. 3.</b>	Ensaio biológico .....	72
<b>3. 3. 1.</b>	Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho .....	72
<b>3. 3. 2.</b>	Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo .....	74
<b>3. 3. 2. 1.</b>	Substituição do $Ca^{2+}$ pelo $Sr^{2+}$ .....	75
<b>3. 3. 2. 2.</b>	Estudo eletrofisiológico .....	75
<b>3. 3. 3.</b>	Estudo com d-tubocurarina (d-Tc) .....	76
<b>3. 4.</b>	Reagentes .....	77
<b>3. 5.</b>	Análise estatística .....	77
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	78
<b>4. 1.</b>	Estudo miográfico do veneno bruto .....	79
<b>4. 1. 1.</b>	Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho .....	79
<b>4. 1. 1. 1.</b>	Estimulação elétrica indireta .....	79

---

---

4. 1. 1. 1. 1.	Influência da temperatura sobre o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> .....	84
4. 1. 1. 2.	Estimulação elétrica direta .....	86
4. 2.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo .....	88
4. 2. 1.	Estimulação elétrica indireta e direta .....	88
4. 2. 1. 1.	Efeito da substituição do $Ca^{+2}$ pelo $Sr^{2+}$ .....	90
4. 2. 1. 1. 1.	Estudo com d-Tc .....	92
4. 3.	Medida de potenciais bioelétricos .....	94
4. 3. 1.	Potencial de repouso (PR) .....	94
4. 3. 1. 1.	Potencial de placa terminal em miniatura (pptom) .....	99
5.	<i>DISCUSSÃO</i> .....	102
6.	<i>CONCLUSÕES</i> .....	110
7.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	113
8.	<i>ANEXO</i> .....	128
	Protocolo 431-1 .....	129

---

<b>ACh</b>	<b>acetilcolina</b>
<b>d-Tc</b>	<b>d-tubocurarina</b>
<b>EP</b>	<b>erro-padrão</b>
<b>Fig.</b>	<b>figura</b>
<b>KCl</b>	<b>cloreto de potássio</b>
<b>Pág.</b>	<b>página</b>
<b>Pptm</b>	<b>potencial de placa terminal em miniatura</b>
<b>PR</b>	<b>potencial de repouso</b>
<b>RP</b>	<b>região de placa</b>
<b>DP</b>	<b>distante de placa</b>
<b>Tab.</b>	<b>Tabela</b>

---



---

## Figuras

	Pág.
Figura 1 Efeito do veneno de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta .....	81
Figura 2 Registro miográfico do efeito do veneno de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> sobre a preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta .....	82
Figura 3 Registro miográfico do efeito do veneno de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> sobre a preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta .....	83
Figura 4 Registro miográfico do efeito do veneno de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> sobre a preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta .....	85

---

- 
- Figura 5 Registro miográfico do efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho curarizada ..... 87
- Figura 6 Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta. .... 89
- Figura 7 Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta e na ausência de cálcio ..... 91
- Figura 8 Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta ..... 93
-

- 
- Figura 9 Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (20  $\mu\text{g/ml}$ ; n = 4), sobre a preparação músculo diafragma de camundongo. Leitura do registro dos potenciais de repouso dentro e fora de placa em relação aos seus controles ..... 98
- Figura 10 Representação gráfica do efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (20  $\mu\text{g/ml}$ ; n = 4) sobre a freqüência (pptm/min) e amplitude (mV) de potenciais bioelétricos obtidos de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo, nos tempos indicados na legenda ..... 100
- Figura 11 Registro de pptm em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo tratada com o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (20  $\mu\text{g/ml}$ ). ..... 101
-

## *Resumo*

---

No presente estudo, os efeitos farmacológicos do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram estudados em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo e *biventer cervicis* de pintainho.

Em preparações *biventer cervicis* de pintainho, na temperatura de 37 °C, o veneno, (1, 5, 10, 50 e 100 µg/ml) produziu bloqueio neuromuscular progressivo e dependente da concentração. Em baixas concentrações (1, 5, 10 e 20 µg/ml), as respostas ao KCl (13,4 mM), aplicado ao banho, foram parcialmente inibidas, enquanto que as respostas à ACh (110 mM ou concentrações cumulativas de 10<sup>-6</sup> - 10<sup>-2</sup> mM) permaneceram após a incubação com o veneno, e na vigência de bloqueio total. Em altas concentrações (50 - 100 µg/ml), o veneno causou contratura, inibiu as respostas à ACh, ao KCl e as contrações em resposta à estimulação elétrica direta. Estes efeitos não foram observados à temperatura ambiente (20 - 24° C), quando comparados aos obtidos a 37 °C.

Na preparação hemidiafragma de camundongo, na concentração de 20 µg/ml, o veneno inibiu irreversivelmente (60 ± 10 % de bloqueio;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ) as respostas à estimulação elétrica indireta. Na mesma preparação a concentração de 50 µg/ml do veneno determinou bloqueio completo das contrações musculares em resposta à estimulação elétrica indireta ( $n = 5$ ) e direta ( $n = 6$ ). Na ausência do Ca<sup>2+</sup> (1,8 mM), substituído pelo Sr<sup>2+</sup> (4 mM), o veneno (50 µg/ml) causou somente um bloqueio parcial (40,3 ± 7,8% de bloqueio;

---

---

$p < 0,05$ ;  $n = 3$ ) após 120 min de incubação. O registro eletrofisiológico demonstrou um aumento na frequência dos ppts (562 ± 3%;  $p < 0,05$ ), após 120 min de incubação. O veneno (20 µg/ml) determinou um aumento (25 ± 2%;  $p < 0,05$ ) na frequência dos potenciais gigantes em 9 das 10 placas examinadas após 30 min de observação (LEE et al., 1985). O registro do potencial de repouso mostrou que após 90 min de incubação com o veneno (20 µg/ml) houve uma redução no valor médio do potencial de membrana de  $-81 \pm 1,4$  mV para  $-41,3 \pm 3,6$  mV (24 fibras;  $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ) em regiões de placa terminal e de  $-77,4 \pm 1,4$  mV para  $-44,6 \pm 3,9$  mV (24 fibras;  $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ) em regiões distantes da placa.

Estes resultados indicam que o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* exibe neurotoxicidade em preparações neuromusculares isoladas e sugerem uma ação preferencial em sítios pré-sinápticos. Além disso, uma atividade enzimática parece estar envolvida na indução de seus efeitos farmacológicos, pois mostrou ser cálcio-dependente.

---

## *Summary*

In the present study, the pharmacological effects of *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom were studied in mouse phrenic nerve-diaphragm and chick biventer cervicis preparations. In chick preparations, venom (1, 5, 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) produced progressive, concentration-dependent neuromuscular blockade. At low venom concentrations (1, 5, 10 and 20  $\mu\text{g/ml}$ ), the responses to exogenously applied KCl (13.4 mM) were inhibited whereas those to acetylcholine (ACh, 110 mM alone or cumulative concentrations of  $10^{-6}$ - $10^{-2}$  M) were unaffected. At high venom concentrations (50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ), there was pronounced muscle contracture with inhibition of the responses to ACh, KCl and direct stimulation. These activities were not observed at 20-24°C compared to 37°C. At 20  $\mu\text{g/ml}$ , the venom irreversibly inhibited indirectly evoked twitches in mouse phrenic nerve-diaphragm preparations ( $60 \pm 10\%$  inhibition, mean  $\pm$  SEM;  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ). At 50  $\mu\text{g/ml}$ , the venom blocked indirectly ( $n = 5$ ) and directly ( $n = 6$ ) evoked twitches in mouse hemidiaphragms. When  $\text{Ca}^{2+}$  (1.8 mM) was replaced by  $\text{Sr}^{2+}$  (4 mM), the venom (50  $\mu\text{g/ml}$ ) produced only partial blockade ( $40.3 \pm 7.8\%$  inhibition;  $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ) after 120 min. The venom (20  $\mu\text{g/ml}$ ) increased the number of miniature end-plate potentials by a maximum of  $562 \pm 3\%$ , ( $p < 0.05$ ) after 120 min, and also increased the frequency of giant miniature end-plate potentials ( $25 \pm 2\%$ ,  $p < 0.05$ ) in 9 out of 10 end-plates after 30 min (LEE et al., 1985). By 90 min after the addition of venom (20  $\mu\text{g/ml}$ ), the resting membrane potential decreased from  $-81 \pm 1.4$  mV to

---

---

$-41.3 \pm 3.6$  mV (24 fibers;  $p < 0.01$ ;  $n = 4$ ) in the end-plate region, and from  $-77.4 \pm 1.4$  to  $-44.6 \pm 3.9$  mV (24 fibers;  $p < 0.01$ ;  $n = 4$ ) in regions distant from the end-plate. These results indicate that *B. n. pauloensis* venom is neurotoxic and has a presynaptic action. They also suggest that enzymatic activity may be involved in this pharmacological action.

---

# *1 - Introdução*

### 1.1. As peçonhas e os acidentes ofídicos

O estudo das peçonhas teve como precursor em nosso país João Batista de Lacerda que, no século retrasado, realizou, no Museu Nacional, algumas pesquisas de grande importância sobre a farmacologia do veneno das serpentes brasileiras. Deve-se, entretanto, a Vital Brazil o grande desenvolvimento que alcançaram no Brasil as investigações sobre as peçonhas, o estudo de animais peçonhentos e a profilaxia e tratamento dos acidentes causados por serpentes, escorpiões e aranhas (VITAL BRAZIL, 1982).

As serpentes do gênero *Bothrops* vivem, geralmente, em locais úmidos, onde habitam roedores, porém, podem ser encontradas também em zonas rurais e periferias de grandes cidades. De hábitos noturnos e certa agressividade, elas são conhecidas vulgarmente por: jararaca, jararacuçu, urutu, cotiara, jararaca-do-rabo-branco, boca-de-sapo e outros. De certa forma, a jararaca é a responsável pela quase totalidade dos acidentes no Sudoeste brasileiro (BRASIL, 2001).

---

---

O gênero *Bothrops* apresenta várias subespécies e com elevada distribuição geográfica. A *Bothrops neuwiedi pauloensis* é encontrada em regiões abertas do tipo campos e cerrados, nas zonas central e sul-ocidental do Estado de São Paulo. São solenóglifas, ou seja, apresentam presas com um canal central por onde caminha o veneno, localizadas na região anterior no maxilar superior (FONSECA, 1949).

Muitas espécies de serpentes fazem parte do gênero *Bothrops* e se encontram distribuídas do México até a Argentina (HOGE e ROMANO-HOGE, 1978).

No período de 1988 a 1993 foram notificados 12.639 casos de acidentes por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, com 43 óbitos (0,34 %). O diagnóstico quanto ao gênero da serpente foi realizado em 11.297 acidentes, sendo 9.828 (87%) por *Bothrops*, 1.359 (12 %) por *Crotalus* e 110 (1%) por *Micrurus*, e 41 casos de óbito, sendo 28 (68,3%) por *Bothrops* e 13 (31,7 %) por *Crotalus* (RIBEIRO et al., 1998).

Distúrbios da coagulação, hemorragia, edema e necrose local, são, geralmente, os sintomas evidenciados por pessoas que sofrem acidentes com picadas de serpentes botrópicas (HOMMA e TU, 1971; ROSENFELD, 1971).

---

## 1.2. Definições de peçonha e de veneno

As peçonhas são substâncias tóxicas elaboradas por glândulas especializadas (glândulas veneníferas), que servem a uma determinada função, denominada venenosa ou peçonhenta. A função peçonhenta desempenha papel relevante na sobrevivência do indivíduo, da colônia e da espécie. Através dela, os animais: a) defendem-se ou defendem a colônia da agressão de predadores (caso por exemplo, das abelhas e vespas sociais, das lagartas-de-fogo, de vários batráquios), b) defendem-se de eventuais predadores e capturam os animais que lhe servem de alimento (caso, entre muitos outros, dos celenterados, das lacraias, dos escorpiões, das aranhas, dos tanatofídios), c) paralisam certos animais – aranhas, lagartas ou mesmo insetos adultos que servirão de repasto às suas larvas (caso das vespas caçadoras), desempenhando, portanto, papel essencial em seu ciclo evolutivo.

Querem alguns autores que a palavra veneno não deva ser empregada no sentido de peçonha.

A confusão entre veneno ou peçonha nasce da leitura desatenta de livros franceses ou ingleses, traduzindo-se por mera analogia eufônica, “venin” por veneno e não por peçonha, como seria correto. Tanto em francês como em inglês, “poison” é que significa veneno (MELLO-LEITÃO, 1948).

---

Na realidade, veneno, “venin” e “venom” têm a mesma origem etimológica. Provém de *venenum*, palavra latina com várias acepções, dentre as quais as de veneno, peçonha. Peçonha e “poison” derivam, por sua vez, de *potio, onis* que significa, em latim, beberagem medicinal, remédio, poção, beberagem envenenada. A palavra peçonha tem significado mais restrito do que veneno, conforme está mencionado no parágrafo anterior e como esclarece CALDAS AULETE (1881) no verbete sobre veneno:

veneno, s.m., substância que tomada internamente ou aplicada sobre um corpo vivo é capaz de lhe destruir ou alterar as funções vitais. Se for um produto de secreção de um animal, toma vulgarmente o nome de peçonha (v.g. a peçonha da víbora).

Ao contrário, pois, daqueles autores, é absolutamente correto o emprego de veneno no sentido de peçonha por ter significado abrangente e por sua origem etimológica.

Assim é indiferente o dizer-se ou escrever-se peçonha de serpente ou veneno de escorpião. Errôneo seria usar a palavra peçonha para designar veneno, na acepção geral da palavra (VITAL BRAZIL, 1982).

---

### 1.3. Classificações dos animais peçonhentos

Os animais peçonhentos podem dividir-se em: a) animais peçonhentos vulnerantes; b) animais peçonhentos por contato; c) animais peçonhentos por projeção (VELLARD, 1946). Os primeiros, que constituem a grande maioria dos animais peçonhentos inoculam a secreção venenosa em suas vítimas através de cerdas, acúleos ou dentes, como por exemplo as serpentes. Os segundos elaboram substâncias tóxicas que, ao contactar com a mucosa da boca do agressor, promovem efeitos locais ou mesmo gerais que o desestimulam a persistir na agressão. Este grupo é representado por batráquios (VITAL BRAZIL e VELLARD, 1926, MYERS e DALY, 1976), cujas glândulas cutâneas elaboram substâncias tóxicas (sapos do gênero *Bufo*, rãs da família neotrópica *Dendrobatidae*).

Os animais peçonhentos do terceiro grupo são capazes de projetar a secreção de suas glândulas veneníferas. Como seus representantes, podem ser mencionadas as serpentes africanas da família Elapidae, *Naja nigricollis*, cuspideira preta como a denominavam os portugueses de Angola e a *Hemachatus haemachatus*, a "spitting" cobra do sul da África. Se a peçonha projetada por esses tanatofídios vier a atingir os olhos da vítima, provocará dor, cegueira passageira e conjuntivite subsequente.

---

---

As serpentes verdadeiramente venenosas ou peçonhentas podem ser classificadas, segundo sua dentição, em três famílias: Hydrophiidae, Elapidae e Viperidae, possuindo esta última duas subfamílias: Viperinae e Crotalinae (VITAL BRAZIL, 1982).

As glândulas que produzem o veneno destas serpentes são encontradas nos lados da cabeça e do pescoço, e enviam seus ductos pelas laterais supralabiais do maxilar, penetrando assim numa bolsa complexa que envolve a base dos dentes maxilares modificados em presas. O veneno consegue, assim, descer através de um canal central neles existentes (GANS, 1978).

As serpentes podem ser divididas também em cinco famílias: Viperidae, Crotalidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (MENGDEN, 1983; MEHRTENS, 1987; CAMPBELL e LAMAR, 1989). No Brasil, encontram-se as famílias Elapidae, Crotalidae e Colubridae. Apenas o gênero *Micrurus* (coral) da família Elapidae pode ser encontrada no Brasil. Pertencentes à subfamília Crotalinae podemos citar os gêneros: *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*. E na família Colubridae o gênero *Philodryas* (GANS, 1978; BRASIL, 2001).

Segundo CHIPPAUX et al. (1991), famílias, gêneros, espécies e subespécies diferentes podem exibir variações químicas na composição farmacológica dos venenos, gerando também variações de atividades biológicas.

---

#### 1.4. Gênero *Bothrops*

No período de 1990 a 1993, segundo a Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos (CNCZAP) do Ministério da Saúde, foram registrados 81.611 acidentes com uma média de 20 mil casos anuais. A média de incidência foi de 13,5 acidentes / 100 mil habitantes. A região Centro-Oeste apresentou o maior índice (33 acidentes/100 mil habitantes), logo em seguida pela região Norte (24 acidentes/100 mil habitantes), região Sul (16 acidentes/100 mil habitantes), região Sudeste (13 acidentes/100 mil habitantes) e com o menor índice, a região Nordeste (7 acidentes/100 mil habitantes) tomando evidente a falta de notificação dos acidentes ocorridos e as dificuldades de acesso aos serviços de saúde dessa região. Considerando os acidentes em que o gênero foi informado, o acidente por *Bothrops* foi responsável por 90,5 % dos casos, *Crotalus* por 7,7 %, *Lachesis* por 1,4 % e *Micrurus* por 0,4 % (BRASIL, 2001).

A toxicidade da peçonha de *Bothrops* é consideravelmente menor do que a do veneno da cascavel sul-americana, principalmente quando introduzida pelas vias intramuscular ou subcutânea (VITAL BRAZIL, 1911). Este fato explica serem os acidentes botrópicos, em geral, menos graves do que os crotálicos.

Segundo VITAL BRAZIL (1911), a peçonha botrópica produz estado de choque, intensa atividade proteolítica, coagulação sangüínea,

---

---

hemorragias, liberação de bradicinina, edema hemorrágico local e necrose tecidual (VITAL BRAZIL, 1982).

O veneno de *Bothrops* possui três tipos de atividades diferentes, a saber:

a) proteolítica ou necrotizante, causa edema inflamatório e necrose no local da picada.

b) hemorrágica, o sangue tende ao extravasamento dos capilares para a região da picada, levando a uma formação de equimose.

c) coagulante, afetando os fatores de coagulação, fator trombina, fator II e X (Nahas et al., 1979) atuam sobre o fibrinogênio que é depletado nesse processo, acarretando incoagulabilidade sangüínea.

Fatores como sangramento fora do local da picada, aparecimento de púrpura, sangramento extrateciduals (gengivorragia), insuficiência renal (glomerulonefrite aguda), septicemia (oriunda da região da picada) e choque podem determinar o óbito (JORGE e RIBEIRO, 1990).

### 1.5. *Bothrops neuwiedi*

MANDELBAUM et al. (1984) isolaram do veneno de *B. neuwiedi* (jararaca pintada) dois fatores hemorrágicos *neuwiedi* (NHF), composto de duas proteínas, NHFa e NHFb, com peso molecular de 46.000 e 58.000, respectivamente.

---

---

QUEIROZ et al., (1985), perceberam que a fração já citada era capaz de produzir uma série de lesões locais do tipo hemorragia, mionecrose e necrose, de maneira indireta. O fator hemorrágico *neuwiedi* analogamente ao veneno bruto é também capaz de produzir hemorragia, mionecrose e necrose nas artérias musculares. A dose mínima de NHFa e NHFb necessária para produzir hemorragia e mionecrose foi de 50 ng, enquanto que a dose mínima do veneno bruto para produzir o mesmo efeito foi 20 vezes maior. Portanto, o NHF é o principal fator responsável pelo efeito local do veneno de *Bothrops neuwiedi*. MORENO e PRADO-FRANCESCHI (1991), observaram em músculo *biventer cervicis* de ave, uma atividade contraturante e bloqueadora neuromuscular usando veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

Num estudo comparativo realizado com nove espécies do gênero *Bothrops* envolvendo a atividade PLA<sub>2</sub> das peçonhas, foi observado proteínas básicas, com atividade PLA<sub>2</sub> e/ou miotóxica nos venenos de *B. jararacussu*, *B. moogeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*. Porém, no veneno de *B. jararaca*, estas atividades mostraram-se discretas e não foram detectadas em pequenas concentrações de veneno de *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara* e *B. erythromelas* (MOURA DA SILVA et al., 1991).

---

As PLA<sub>2</sub> detectadas no veneno de serpentes que fazem parte do gênero *Bothrops* são, em certo grau, responsáveis pelos efeitos locais decorrentes do acidente. VIDAL e STOPPANI (1971), VIDAL et al. (1972), determinaram a atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> nos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. alternatus*. Outras fosfolipases A<sub>2</sub> foram isoladas de venenos botrópicos, assim, podem-se citar a *B. neuwiedi* (VIDAL et al., 1966), *B. asper* (ALAGON et al., 1980; GUTIERREZ et al., 1984), *B. alternatus* (NISENBON et al., 1986), *B. insularis* (COGO et al., 1998).

A literatura tem enfatizado que venenos de serpentes, pertencentes ao gênero botrópico, não apresentam atividade farmacológica destacável sobre a junção neuromuscular (VITAL BRAZIL, 1982). De certa forma, a literatura dispõe de poucos trabalhos que relatam o efeito neuromuscular desses venenos em preparações isoladas, exceto estudos realizados por RODRIGUES-SIMIONI et al., (1990), através de pesquisas com as frações oriundas dos venenos de *B. lanceolatus* (LOBO-ARAÚJO et al., 1990), *B. jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; HELUANY et al., 1992; OSHIMA-FRANCO et al., 2001), *B. insularis* (COGO et al., 1995), ação do veneno total de *B. pirajai* (COSTA et al., 1999), *B. insularis* (COGO et al., 1990,

---

---

1990b, 1993), e efeitos do veneno bruto de *B. neuwiedi pauloensis* (ZAMUNÉR et al., 1997; BORJA-OLIVEIRA et al., 2003 e DURIGON et al., (in press) ).

Mais recentemente, ZAMUNÉR et al. (1997) compararam o efeito de vários venenos botrópicos sobre a junção neuromuscular. Observaram que dos venenos botrópicos estudados, apenas o veneno de *B. neuwiedi* mostrou uma ação pré-sináptica quando ensaiado em baixas doses.

O estudo farmacológico dos venenos animais e de suas toxinas é da mais alta importância sob múltiplos aspectos. Em primeiro lugar, somente através dele é possível adquirir conhecimento adequado da fisiopatologia dos envenenamentos e instituírem-se medidas racionais e eficientes em seu tratamento.

Em segundo, tem revelado substâncias que vêm contribuindo, de modo decisivo, para o esclarecimento, principalmente em nível molecular, de vários fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos. Na realidade, certas toxinas são, hoje em dia, "instrumentos de pesquisa" indispensáveis nas mãos de fisiologistas, farmacologistas e patologistas (VITAL BRAZIL, 1982).

O estudo farmacológico dos venenos animais tem ainda revelado algumas substâncias promissoras em terapêutica, sendo possível, no futuro, a sua contribuição neste setor. Finalmente, o conhecimento da

---

estrutura química e das ações farmacológicas das toxinas pode contribuir para esclarecer relações taxonômicas entre animais venenosos (MAcCONNEL et al., 1976; MYERS e DALY, 1976).

---

## ***2 - Objetivo***

Estudar os efeitos farmacológicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre preparações neuromusculares, através do registro miográfico, em músculos *biventer cervicis* de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo, e do registro eletrofisiológico, em músculo diafragma de camundongo.

---

### ***3 - Materiais e Métodos***

### 3. 1. - Animais

Pintainhos da linhagem HY-Line W 36 foram utilizados com a idade de 4 a 8 dias, gentilmente fornecidos pela Granja ITO S/A.

Camundongos machos albinos Swiss, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP, com peso entre 25 e 35 g. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclos claro/escuro de aproximadamente 12 h e fornecimento de água e ração *ad libitum*. Este projeto, sob o protocolo nº 431-1 (anexo, p. 74), foi integralmente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) em quatro de julho de 2002.

### 3.2. - Veneno

O veneno da serpente de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi gentilmente cedido pelo Instituto Butantan, São Paulo - SP.

---

### 3.3. - Ensaio biológicos

#### 3.3.1. - Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

Os animais foram sacrificados sob anestesia com éter sulfúrico. A preparação foi isolada e montada de acordo com o método descrito por GINSBORG e WARRINER (1960). O músculo foi montado em uma cuba com capacidade para 5 ml contendo solução de Krebs, (em mM): NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl<sub>2</sub> 1,88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17; MgSO<sub>4</sub> 1,17; NaHCO<sub>3</sub> e Glicose 11,65. A solução foi arejada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e mantida a 37 °C.

O músculo foi submetido a tensão de 0,5 g/cm e estimulado por meio de eletrodos bipolares posicionados na região entre o tendão e o músculo com o objetivo de estabelecer uma estimulação de campo.

Estímulos supramaximais (de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração) provenientes de estimulador GRASS S48 foram aplicados ao músculo e as contrações musculares resultantes de estímulos elétricos

---

---

maximais e as contraturas em resposta à adição de KCl (13,4 mM) e ACh (60 e 120  $\mu$ M) foram registradas em fisiógrafo GOULD RS 3400 por meio de um transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM, durante 120 min. O registro das contraturas para KCl e ACh foi realizado com ausência de estimulação elétrica no início (antes da adição do veneno) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno).

Após um período de estabilização de 20 min, adicionaram-se à cuba concentrações individuais de 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu$ g/ml do veneno bruto para determinação dos efeitos sobre a contração muscular.

Em alguns experimentos, a ACh foi adicionada ao banho em doses maximais de forma cumulativa (concentração log-dose: 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 1mM, 3mM e 10 mM) antes e após a adição do veneno.

No estudo do veneno, foram realizados alguns experimentos usando-se a temperatura do banho entre 20 – 24 °C.

---

### 3.3.2. - Preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo

Os animais foram anestesiados com cloral hidratado (300 mg/kg) e mortos, posteriormente, por secção e exsangüinação dos vasos cervicais. A retirada do nervo frênico músculo diafragma foi cuidadosamente feita pelo método BÜLBRING (1946) modificado para camundongos. Após a retirada do diafragma, juntamente com o nervo frênico correspondente, o mesmo foi fixado, através dos músculos das costelas, por dois ganchos existentes na base da cuba, contendo 5 ml da solução nutritiva Tyrode, com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 0,49; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,1. A solução foi aerada constantemente com carbogênio (mistura de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>) e mantida a 37 °C. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 5 g/cm. A preparação foi exposta à estimulação elétrica (estimulador Grass S48) indireta (nervo frênico), com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de freqüência, ou direta, por meio de eletrodo conectado ao músculo diafragma previamente curarizado, com pulsos supramaximais de 2 ms de duração e 0,1 Hz de freqüência, por um período de 20 min. para estabilização. As contrações musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, através de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM.

---

### 3.3.2.1. - Substituição do $\text{Ca}^{2+}$ pelo $\text{Sr}^{2+}$

Algumas preparações incubadas com o veneno (50  $\mu\text{g/ml}$ ) foram submetidas à estimulação elétrica indireta em meio nutritivo Tyrode já descrito no item 3.3.2. (pág. 20) onde o  $\text{Ca}^{2+}$  (1,8 mM) foi substituído pelo  $\text{Sr}^{2+}$  (4 mM), (COGO et al., 1998; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1995).

### 3.3.2.2. - Estudo eletrofisiológico

O registro dos potenciais de repouso (PR) e dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptom) foram determinados, usando-se a preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. O músculo distendido em câmara de lucite com capacidade de 3 ml, à temperatura ambiente, foi imerso em solução nutritiva Tyrode e arejada constantemente pelo borbulhamento de carbogênio (mistura 95%  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , pH 7,4). Microeletrodos preenchidos com KCl 3M, e com uma resistência entre 10-25  $\text{M}\Omega$  foram introduzidos

---

---

intracelularmente tanto para a medida do PR das fibras musculares como para o registro dos pptrms, os quais foram registrados em osciloscópio TEKTRONIX, modelo 3 100 com memória e fotografados (câmara polaróide) ou registrados em papel no aparelho fisiógrafo GOULD RS3400. O PR foi registrado em osciloscópio TEKTRONIX cuja medida foi avaliada tanto na região das placas terminais como aleatoriamente em regiões distantes destas (fibras musculares). Os registros intracelulares, pptrm e PR, foram realizados aos 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 min após a adição de 20 µg/ml do veneno bruto e após a lavagem da preparação. O registro controle obedeceu aos mesmos parâmetros, porém, sem a adição do veneno bruto.

### 3.3.3. - Estudo com d-tubocurarina (d-Tc)

Preparações submetidas à estimulação elétrica direta foram previamente curarizadas. Após a realização de vários experimentos com a d-Tc (n = 3), determinou-se que a concentração necessária para se obter a curarização adequada em preparação músculo diafragma de camundongo e

---

---

músculo *biventer cervicis* de pintainho, seria de 5 e 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente.

Doses superiores a essa concentração produziam a mesma resposta.

### 3.4. - Reagentes

$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  MW 266,6 (Sigma – Aldrich Co), d-tubocurarina (Abbot Laboratórios do Brasil, Ltda, São Paulo - Brasil), ACh 110  $\mu\text{M}$  (Sigma Chemical Company, EUA), KCl 13,4 mM (Labsynt Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo - SP.).

### 3.5. - Análise estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos  $\pm$  erro padrão. A significância foi obtida através do teste não-pareado *t*-Student e considerado como  $p < 0,05$ .

---

## ***4 - Resultados***

## 4.1. Estudo miográfico do veneno bruto

### 4.1.1. Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

#### 4.1.1.1. Estimulação elétrica indireta

O bloqueio neuromuscular mostrou-se dependente da dose para as concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $n= 4-6$ ), pois, tais concentrações determinaram 50% de bloqueio após 119,  $64,5 \pm 4,3$ ,  $46,5 \pm 3,5$ ,  $30,7 \pm 3,0$  e  $24,0 \pm 4,2$  min de incubação, respectivamente (Fig. 1).

O veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, incubado com preparações neuromusculares isoladas, na concentração de 5  $\mu\text{g/ml}$ , determinou bloqueio completo e irreversível da resposta contrátil sob estimulação elétrica indireta em 120 min, sem, no entanto, inibir a resposta contraturante à ACh e ao potássio e sem produzir contraturas. A ocorrência de contratura foi dependente da concentração e iniciou-se a partir de 10  $\mu\text{g}$  de veneno/ml. Nesta concentração (10  $\mu\text{g/ml}$ ), o veneno produziu também bloqueio da resposta ao potássio sem

---

---

inibir a resposta à ACh. Concentrações mais elevadas (50 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ) determinaram bloqueio total das respostas contraturantes à ACh e ao potássio (Fig. 2 ).

Em preparação de pintainho tratadas com 20  $\mu\text{g/ml}$  de veneno ( $n = 4$ ), adicionou-se ao banho ACh em doses cumulativas antes e após a incubação do músculo *biventer cervicis*. A curva da ACh, em doses cumulativas, na vigência de bloqueio, foi semelhante àquela observada na ausência do veneno, ou seja, em condições-controle. A concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$  foi eficiente em determinar não somente o bloqueio completo das respostas musculares ao estímulo elétrico indireto mas também de causar uma marcante contratura (Fig. 3).

---

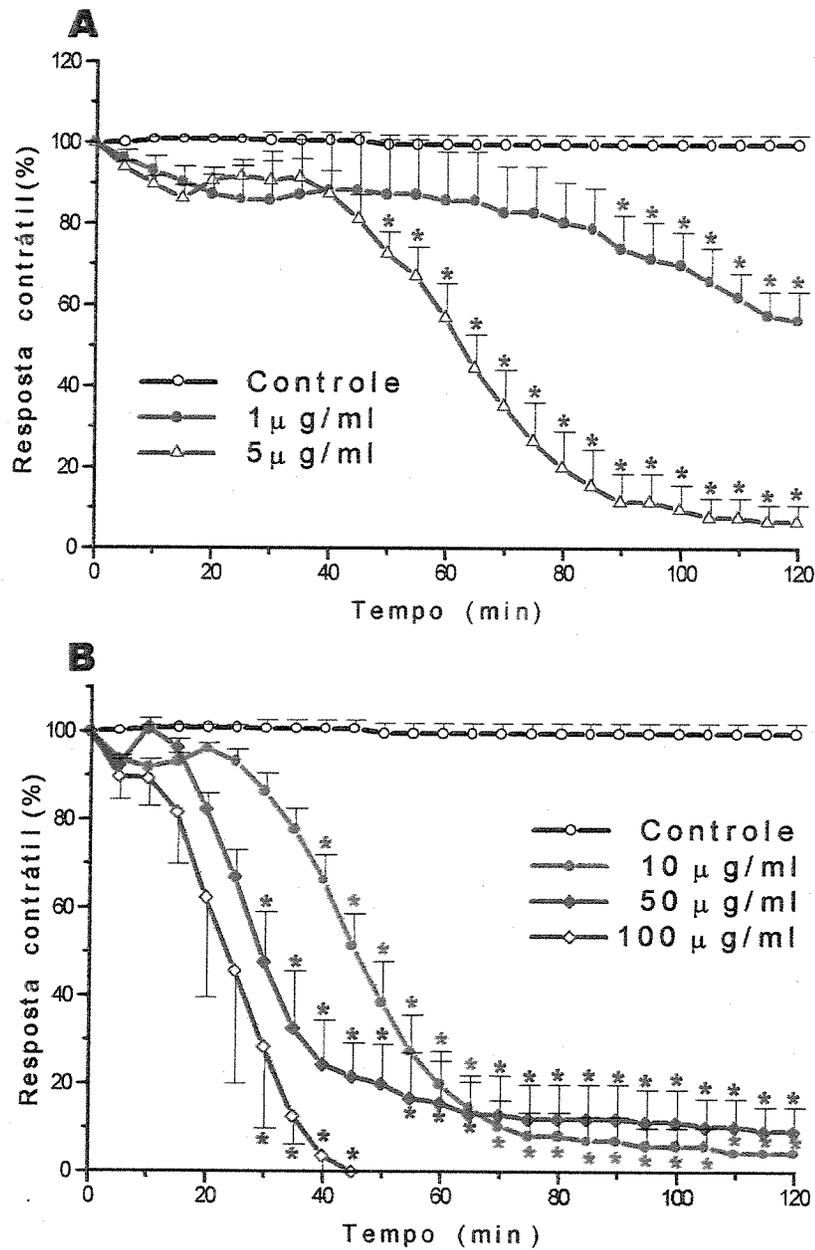


Figura 1. Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta. Em A, controle, 1 e 5 µg/ml. Em B, controle, 10, 50 e 100 µg/ml. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro padrão (n = 4 – 6). (\*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle (p < 0,05).

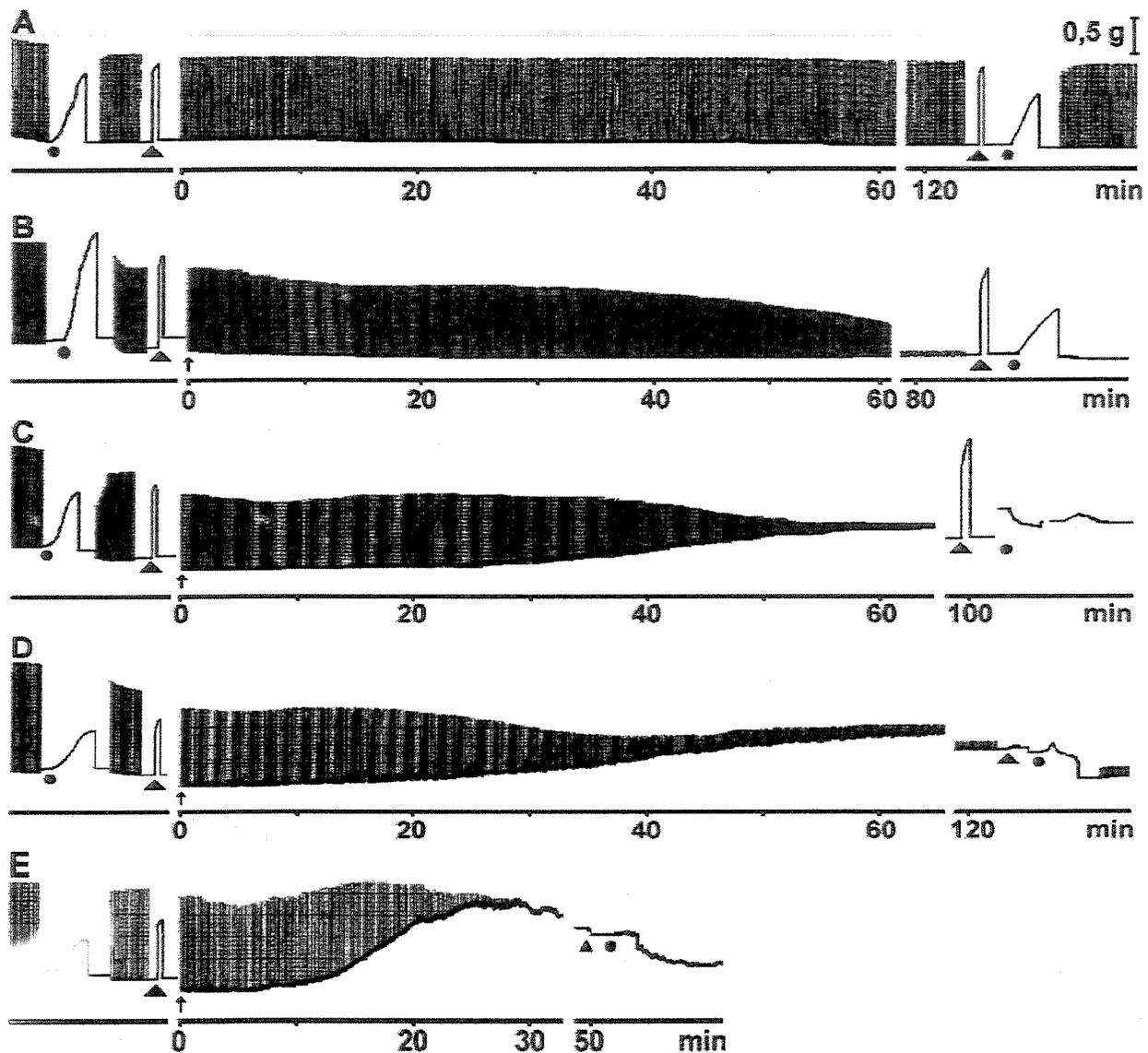


Figura 2. Registro miográfico do efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (pulsos supramaximais de 0,2 ms e 0,1 Hz). O banho foi mantido à temperatura de 37 °C. Em A, o controle realizado com a solução nutritiva Krebs. Em B, C, D e E, o efeito dose-dependente do veneno, que foi adicionado no tempo zero (indicado pela flecha), nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 µg/ml, respectivamente. A resposta contraturante para a adição de ACh (▲ 110 µM) e KCl (● 13,4 mM) foi registrada antes e após a adição do veneno. Calibração - 0,5 g/cm.

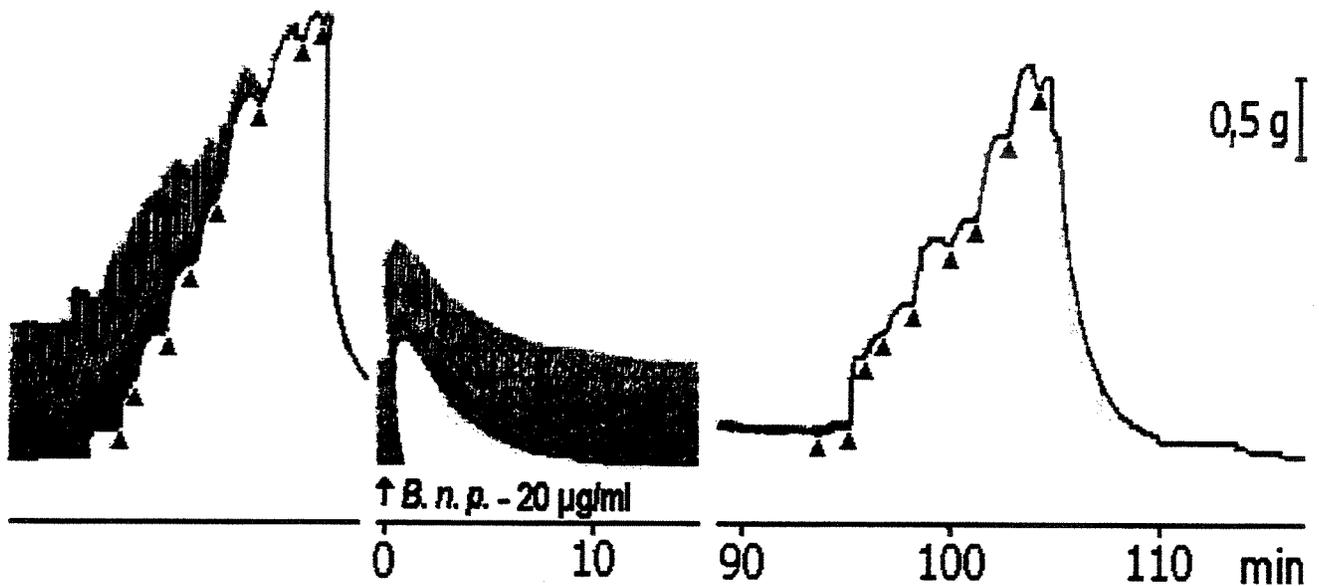


Figura 3. Registro miográfico do efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (pulsos supramaximais de 0,2 ms e 0,1 Hz). A temperatura do banho foi mantida a 37 °C. O veneno (20 µg/ml) foi adicionado no tempo zero (indicado pela flecha). Notar a resposta contraturante para as doses cumulativas de ACh (▲) em concentração log-dose (1µM, 3µM, 10µM, 30µM, 100µM, 300µM, 1mM, 3mM e 10 mM) antes e após a adição do veneno. Calibração - 0,5 g/cm.

#### 4.1.1.1.1. Influência da temperatura sobre o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*

Experimentos simultâneos, com músculos contralaterais e usando a mesma solução de veneno, mostraram que, em preparações mantidas à baixa temperatura (20 – 24 °C), o veneno (50 µg/ml; n = 4) não determinou bloqueio significativo após 100 minutos de incubação e nem mesmo contratura. Nestas condições, a resposta contraturante à adição de potássio e de ACh não foram afetadas (Fig. 4).

Nos experimentos-controle, o registro das contrações permaneceu estável (99,5% de resposta durante 120 minutos em solução nutritiva Krebs; n=4), assim como as respostas à ACh e ao potássio.

---

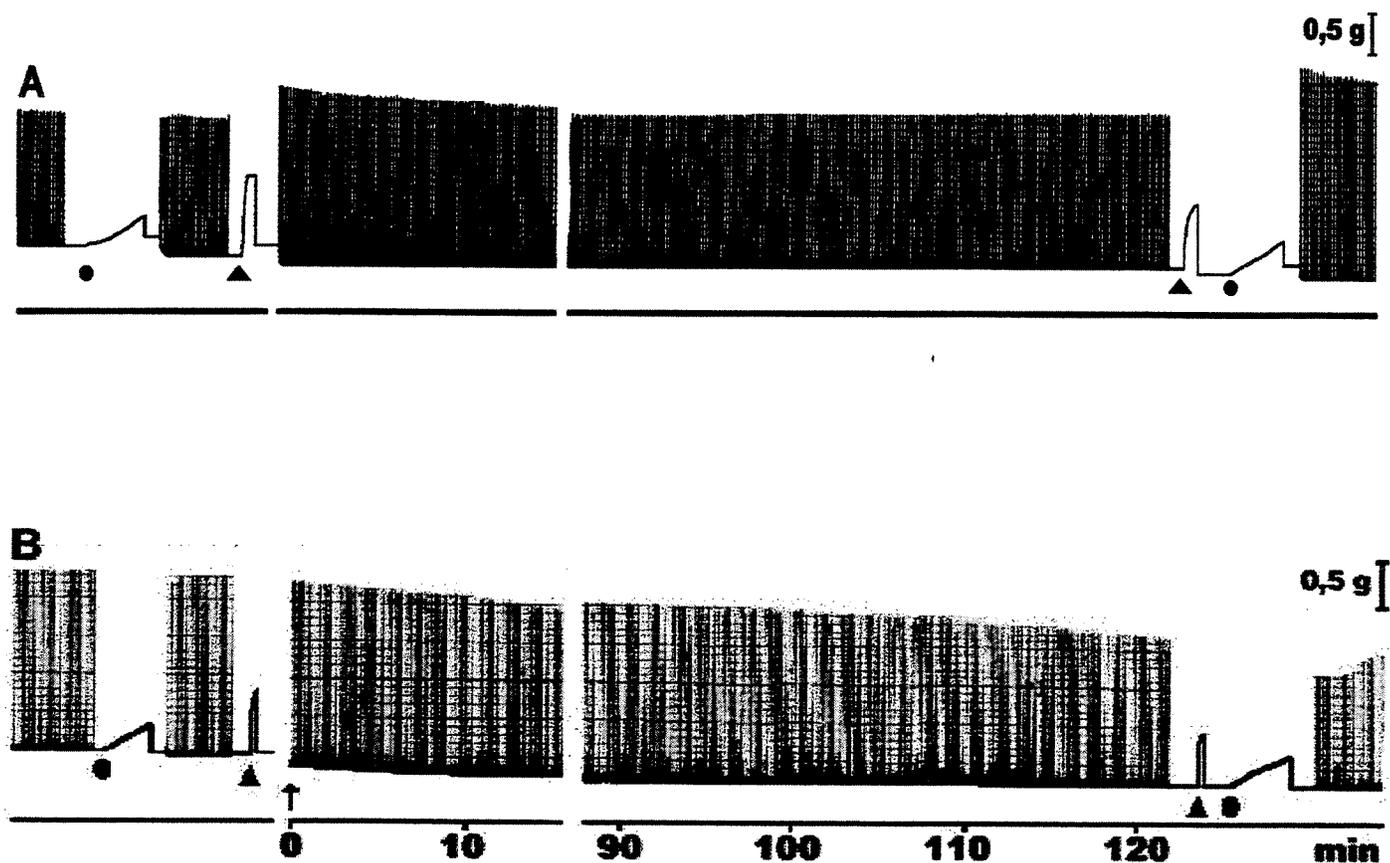


Figura 4. Registro miográfico do efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (pulsos supramaximais de 0,2 ms e 0,1 Hz). O banho foi mantido a baixa temperatura (20 °C). Em A, o controle, em B, o veneno, na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$ , foi adicionado no tempo zero (indicado pela flecha). A resposta contraturante para a adição de ACh ( $\blacktriangle$  110  $\mu\text{M}$ ) e KCl ( $\bullet$  13,4 mM) foi registrada antes e após a adição do veneno. A e B apresentam semelhante posição na escala de tempo. Calibração - 0,5 g/cm.

#### 4.1.1.2. Estimulação elétrica direta

Submetendo-se a preparação à estimulação elétrica direta e à incubação com d-Tc ( $8 \mu\text{g/ml}$ ,  $n = 3$ ), na maioria dos casos, obteve-se uma resposta residual proveniente de variações da estimulação de campo. Ao se utilizar concentrações superiores a  $8 \mu\text{g/ml}$  de d-Tc não foi observado aumento proporcional do bloqueio das contrações musculares, portanto, essa concentração de curare foi considerada como dose suficiente para a curarização total da preparação. A preparação curarizada foi submetida à estimulação elétrica direta antes e após 90 min de incubação com o veneno em duas diferentes concentrações 20 e  $50 \mu\text{g/ml}$ . Quando se utilizou a dose de  $50 \mu\text{g/ml}$ , mas não na dose de  $20 \mu\text{g/ml}$  ( $n = 3$ ), observou-se um bloqueio parcial das contrações musculares em resposta ao estímulo elétrico direto ( $60 \pm 7\%$ ;  $n = 3$ ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 5).

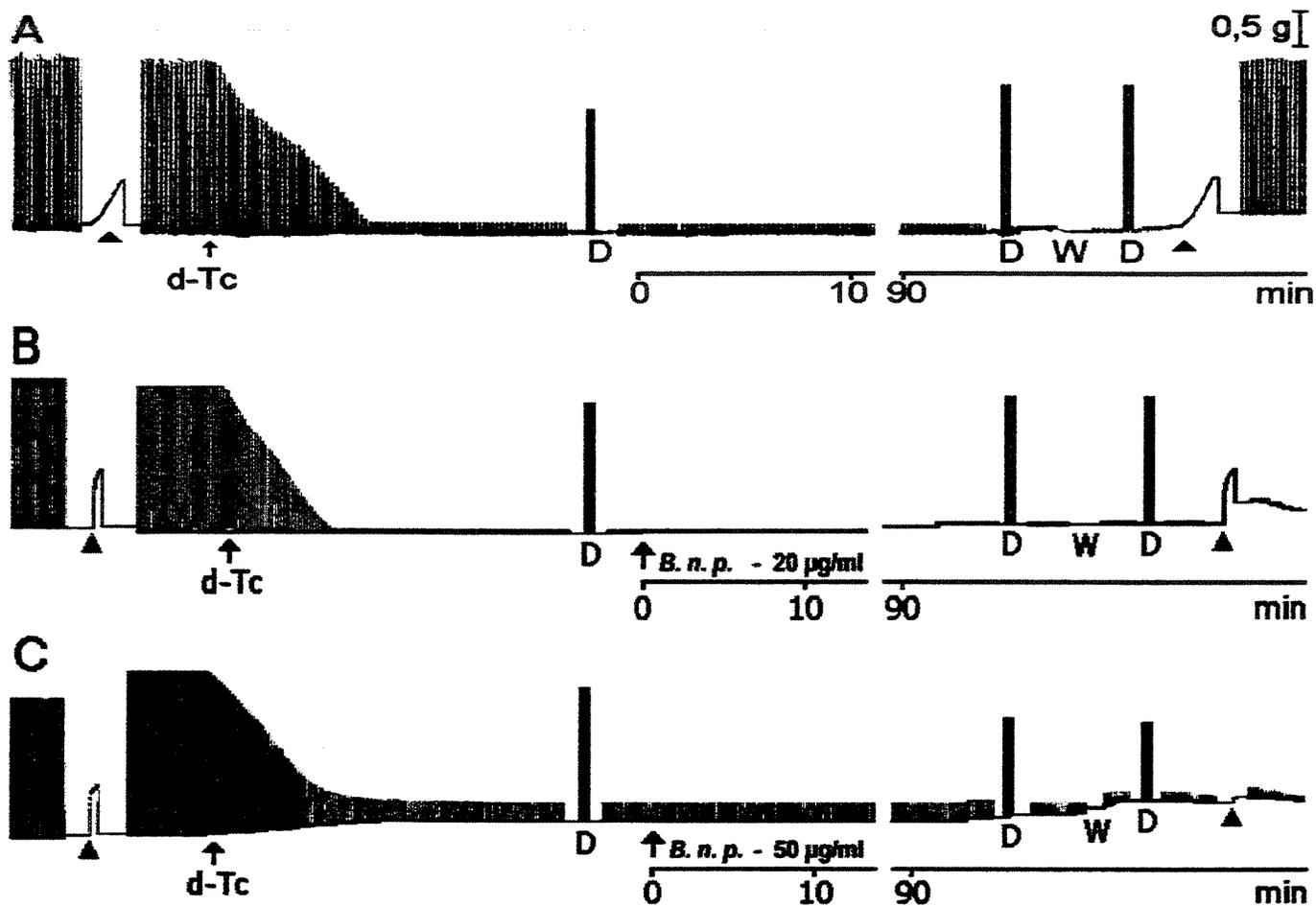


Figura 5. Registro miográfico do efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho curarizada. Estímulos elétricos diretos (40 V) foram aplicados antes e após a adição do veneno. A temperatura do banho foi mantida a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em A, o controle, em B e C, o veneno, nas concentrações de 20 e 50  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, foi adicionado no tempo zero (indicado pela flecha). A resposta contraturante para a adição de ACh ( $\blacktriangle$  110  $\mu\text{M}$ ) foi registrada antes e após a adição do veneno. Calibração - 0,5 g/cm.

## 4.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

### 4.2.1. Estimulação elétrica indireta e direta

A incubação da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta, com o veneno nas concentrações de 20 e 50  $\mu\text{g/ml}$  determinou um bloqueio irreversível e proporcional à concentração da resposta contrátil ( $60 \pm 10 \%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$  e  $96 \pm 3 \%$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente), após 120 min (Fig. 6 e 8B, C). O bloqueio neuromuscular mostrou-se dependente da dose para as concentrações de 20 e 50  $\mu\text{g/ml}$ , pois tais concentrações determinaram 50 % de bloqueio após  $110,7 \pm 7,0$  e  $40,0 \pm 12$  min de incubação, respectivamente (Fig. 6). Preparações submetidas aos mesmos parâmetros de estimulação, porém, na ausência de veneno (controle) estão ilustradas na Fig. 8A.

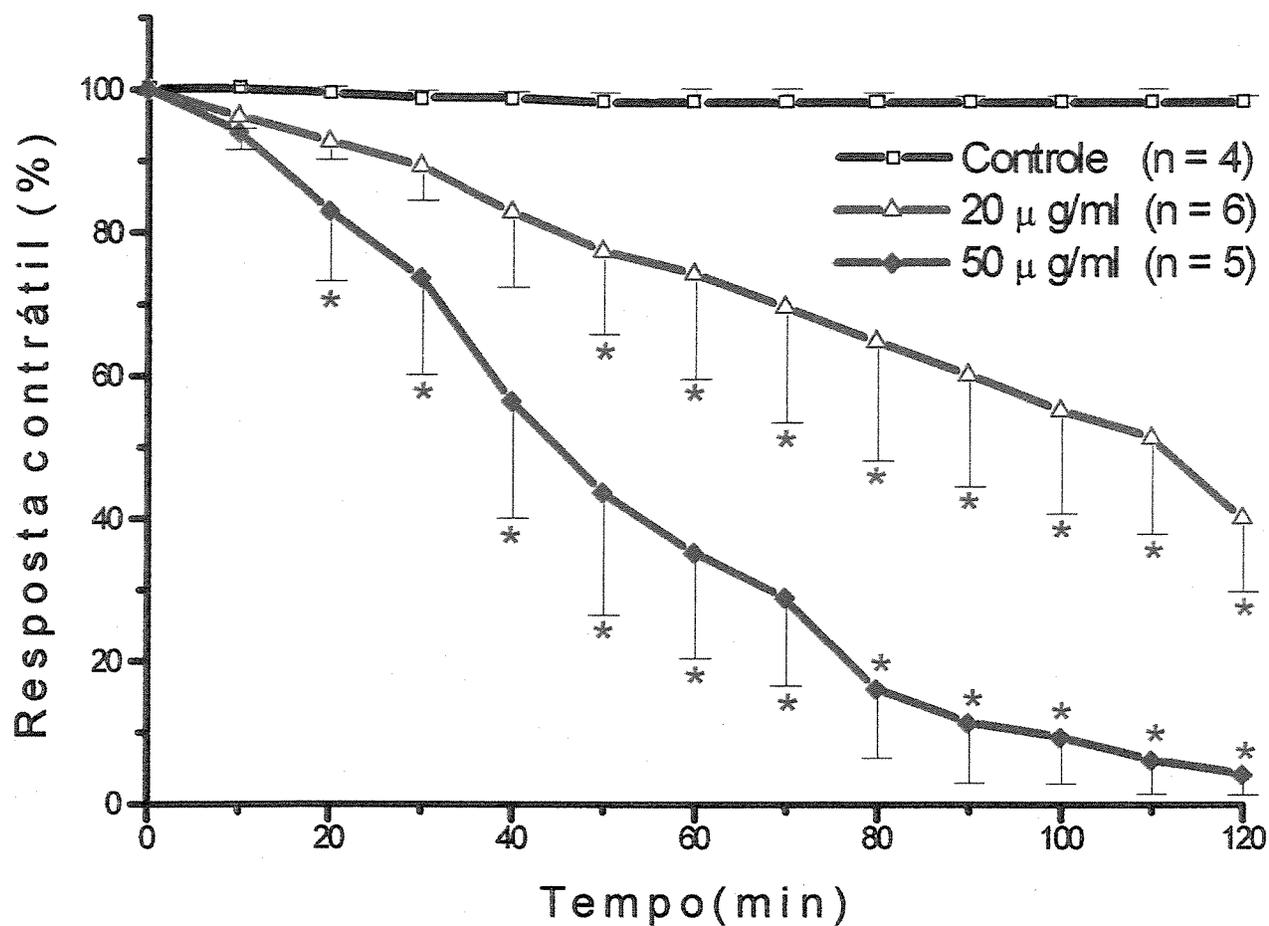


Figura 6. Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta. A temperatura foi mantida a 37 °C. Cada ponto representa a média de experimentos  $\pm$  erro-padrão (n = 4 – 6). (\*) nível de significância das concentrações individuais em relação ao controle (p < 0,05).

#### 4.2.1.1. Efeito da substituição do $\text{Ca}^{+2}$ pelo $\text{Sr}^{2+}$

Quando preparações incubadas com veneno (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) em Tyrode, com a substituição do  $\text{Ca}^{2+}$  (1,8 mM) pelo  $\text{Sr}^{2+}$  (4mM) foram observadas, até os 80 min, a inibição total do bloqueio e, aos 120 min, apenas um bloqueio parcial da resposta contrátil sob estimulação elétrica indireta ( $40 \pm 7,8\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ) (Fig. 7 e 8D). Nenhuma das preparações exibiu a contratura característica, observada em biventer cervicis, induzida pelo veneno em concentração igual ou superior a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Fig. 8B-D). Não houve o restabelecimento da resposta contrátil após sucessivas lavagens com a solução nutritiva Tyrode (Fig. 8B-D). Nenhum bloqueio neuromuscular significativo foi observado, quando se utilizaram concentrações inferiores a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

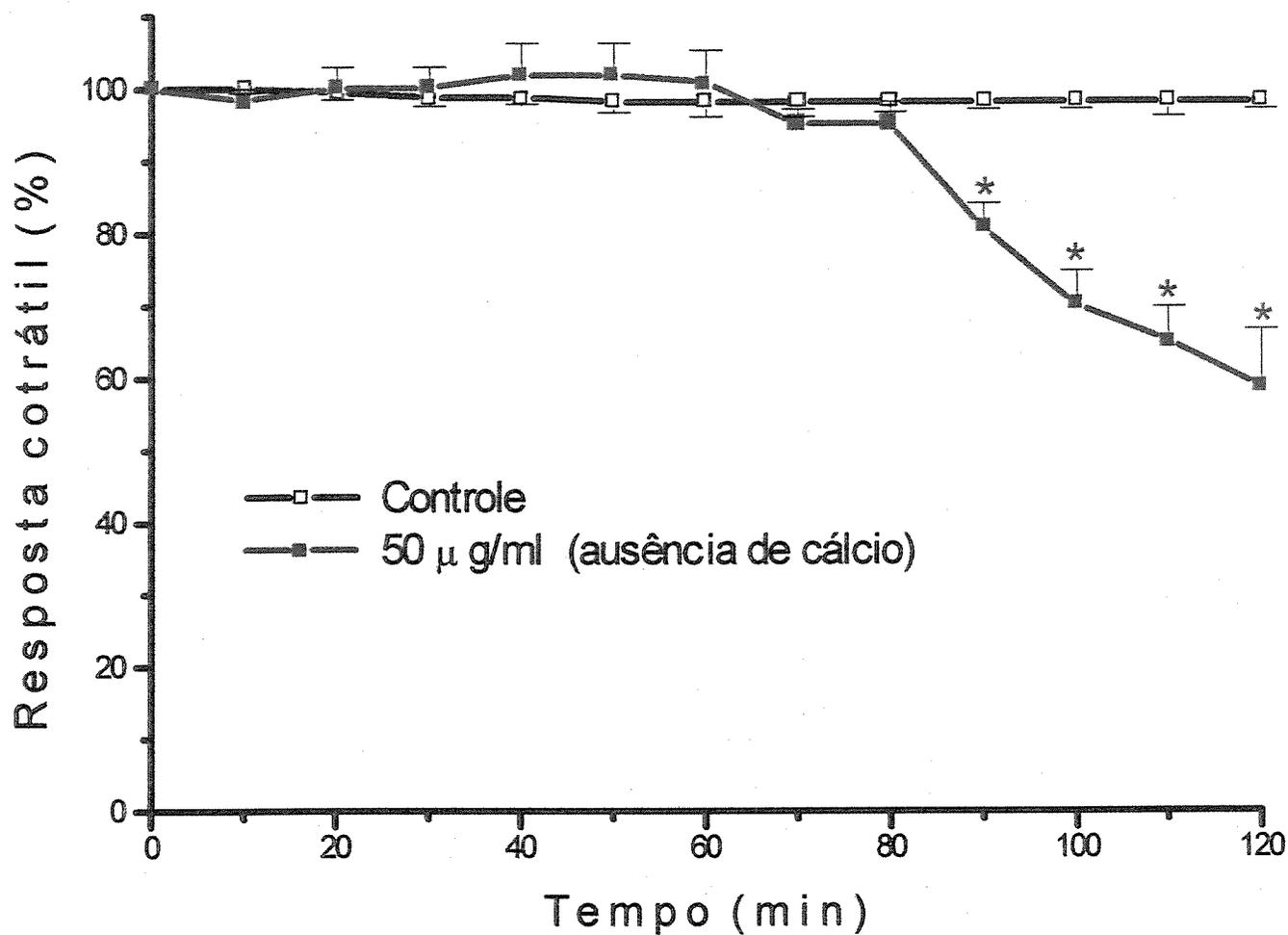


Figura 7. Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta e na ausência de cálcio. A temperatura foi mantida a  $37^{\circ}\text{C}$ . Cada ponto representa a média de experimentos  $\pm$  erro-padrão ( $n = 3$ ). (\*) nível de significância entre as concentrações individuais e o controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.1.1. Estudo com d-Tc

Na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$ , o veneno produziu inibição das contrações neuromusculares ( $80 \pm 8\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ) em resposta à estimulação elétrica direta em preparações previamente curarizadas (d-Tc, 5  $\mu\text{g/ml}$ ), (Fig. 8E).

---

---

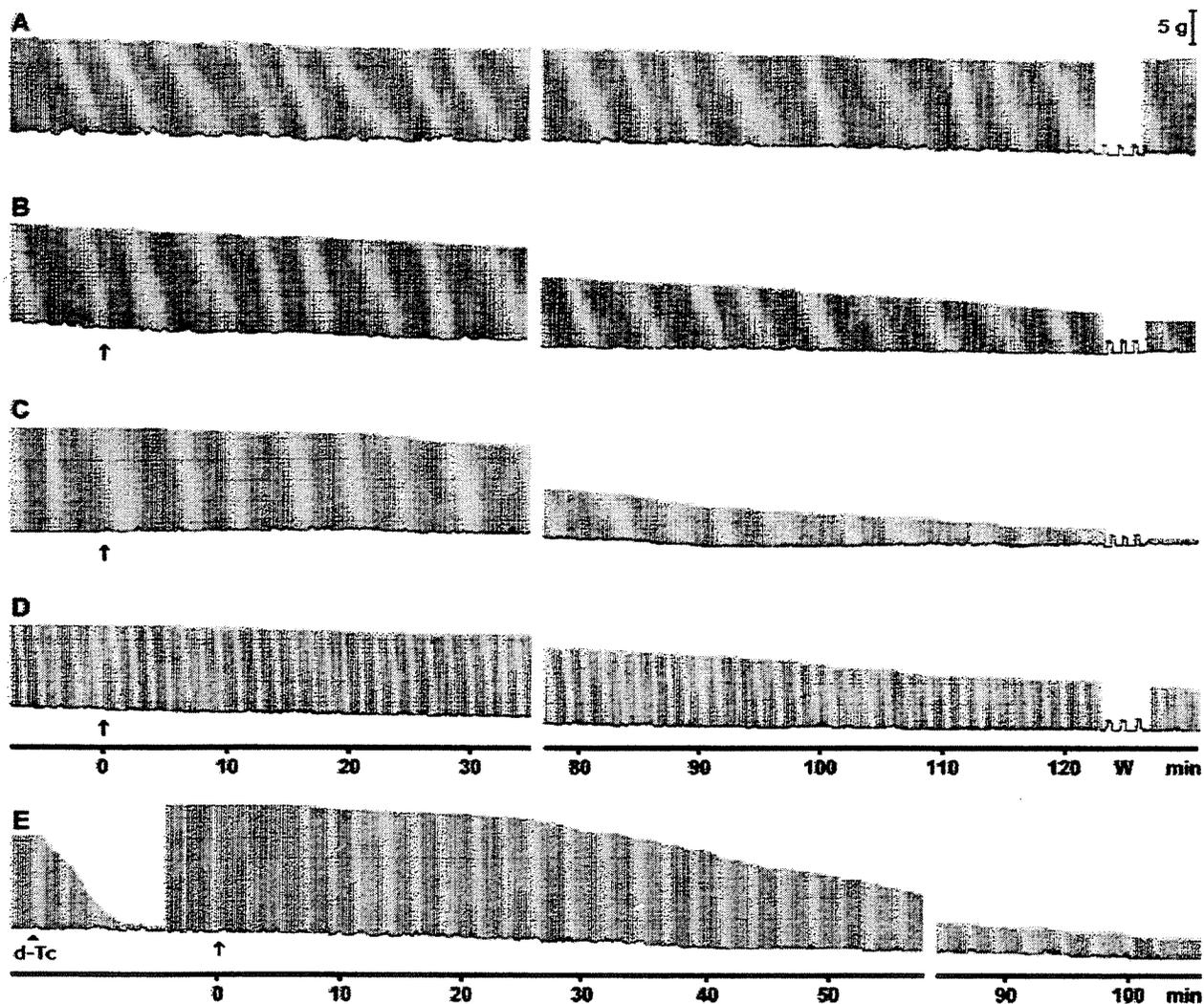


Figura 8. Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação elétrica indireta. Em A, registro controle (Tyrode; n = 4). Em B e C, após estabilização (15 min) no tempo zero (indicado pela fecha), o veneno na concentração de 20 e 50 µg/ml (n = 6 e n = 5), respectivamente, foi adicionado ao banho. Em D, efeito do veneno (50 µg/ml; n = 3), quando o Ca<sup>2+</sup> (1,8 mM) foi substituído por Sr<sup>2+</sup> (4 mM). Em E, 50 µg/ml do veneno (n = 6), sob estimulação elétrica direta, preparação curarizada (d-Tc 5 µg/ml). A, B, C e D apresentam semelhante posição na escala de tempo.

### 4.3. Medida de potenciais bioelétricos

#### 4.3.1. Potencial de repouso (PR)

Utilizou-se a preparação músculo diafragma de camundongo para a medida do PR em região de placa (RP) e distante de placa (DP). A medida do potencial de repouso da membrana muscular foi feita aos 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 min após a adição do veneno (20 µg/ml). Antes da adição, estabeleceu-se um controle. (Tab. 1 e 2).

Num tempo inferior a 15 e 30 min de incubação com o veneno, Tab. 1 e 2, nesta ordem, observou-se alteração significativa ( $p < 0,05$ ) do potencial de repouso ( $-74,45 \pm 1,87$ , RP) e ( $-67,87 \pm 3,05$ , DP), respectivamente. Aos 60, 90 e 120 min, em regiões da placa (RP) e distante da placa terminal (DP), observou-se uma diminuição do PR (RP:  $-80,75 \pm 1,38$  mV, controle, para  $-50,5 \pm 3,5$  mV;  $-41,29 \pm 3,63$  mV e  $-34,83 \pm 2,74$  mV) e (DP:  $-77,37 \pm 1,41$  mV, controle, para  $-54,25 \pm 2,25$

---

mV;  $-44,58 \pm 3,94$  mV e  $-36,33 \pm 3,19$  mV) respectivamente (em 24 fibras musculares;  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ), (Tab. 1 e 2, Fig. 9). Assim, não se observou diferença significativa nos valores de PR das fibras empaladas, na região da placa, ou fora dela, na concentração utilizada.

---

Tabela 1 - Medida do potencial de repouso da fibra muscular na RP (-mV) tratada com o veneno

	t <sub>0</sub>	t <sub>5</sub>	t <sub>10</sub>	t <sub>15</sub>	t <sub>30</sub>	t <sub>60</sub>	t <sub>90</sub>	t <sub>120</sub>
<b>Controle (Tyrode)</b>								
90	87	80	53	44	72	45	33	
86	88	78	75	50	65	40	44	
84	86	83	80	73	53	35	50	
66	80	78	54	43	50	50	54	
72	82	89	73	40	53	47	20	
72	67	79	80	80	60	55	34	
<b>Experimento 1</b>								
80	77	86	83	86	49	58	45	
90	83	74	80	89	35	43	38	
89	82	71	76	76	68	40	34	
75	80	88	72	70	70	35	30	
88	88	71	72	81	59	40	50	
88	90	90	80	74	63	65	36	
<b>Experimento 2</b>								
85	78	78	90	65	42	61	40	
73	80	76	72	82	65	48	40	
84	79	71	80	70	72	60	35	
89	72	80	72	82	53	68	50	
76	74	90	62	78	60	50	50	
74	75	72	68	79	57	60	50	
<b>Experimento 3</b>								
82	78	65	90	80	20	14	10	
80	89	70	70	63	20	19	12	
78	65	86	70	85	53	18	26	
82	70	80	73	60	20	12	23	
80	86	78	82	40	30	16	22	
75	90	70	80	43	23	12	10	
<b>Experimento 4</b>								
<b>Média</b>	80,75	80,25	78,45	74,45	68,04	50,50	41,29	34,83
<b>EP</b>	1,38	1,46	1,45	*1,87	*3,31	*3,50	*3,63	*2,74

Em cada experimento, determinou-se o PR em preparação músculo diafragma de camundongo, nos tempos indicados. Os dados correspondem à média  $\pm$  EP de quatro experimentos ( $p < 0,05$ ) com a concentração (20  $\mu\text{g/ml}$ ) do veneno bruto. (\*) nível de significância entre a concentração individual e o controle ( $p < 0,01$ ).

Tabela 2 - Medida do potencial de repouso da fibra muscular na região DP (-mV) tratada com o veneno

	t <sub>0</sub>	t <sub>5</sub>	t <sub>10</sub>	t <sub>15</sub>	t <sub>30</sub>	t <sub>60</sub>	t <sub>90</sub>	t <sub>120</sub>
Controle (Tyrode)								
86	72	80	83	64	74	60	50	
83	70	61	60	60	60	50	25	
86	81	83	72	60	51	40	35	
72	60	73	66	65	51	60	43	
67	87	73	90	50	49	57	53	
80	77	72	88	63	47	50	52	
Experimento 1.								
75	76	76	80	80	64	58	40	
86	66	66	90	86	64	46	42	
85	73	73	90	90	60	60	57	
83	80	80	87	90	50	60	42	
90	88	88	90	85	49	40	57	
78	85	85	80	84	70	60	26	
Experimento 2.								
72	80	75	60	73	62	69	40	
70	70	77	87	72	67	46	45	
72	82	77	75	77	71	60	37	
70	78	80	77	85	50	60	47	
74	85	82	80	75	58	62	50	
77	82	72	80	64	60	47	49	
Experimento 3.								
80	90	90	80	67	47	18	17	
70	65	73	78	45	36	12	20	
70	90	66	80	47	41	12	10	
87	90	90	68	50	35	17	11	
71	88	84	87	57	44	12	12	
73	74	60	60	40	42	14	12	
Experimento 4.								
Média	77,37	78,70	76,5	78,66	67,87	54,25	44,58	36,33
EP	1,41	1,75	1,68	2,00	*3,05	*2,25	*3,94	*3,19

Em cada experimento, determinou-se o potencial de repouso em preparação músculo diafragma de camundongo, nos tempos indicados. Os dados correspondem à média  $\pm$  EP de quatro experimentos ( $p < 0,05$ ) com a concentração (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) do veneno bruto. (\*) nível de significância entre a concentração individual e o controle ( $p < 0,05$ ).

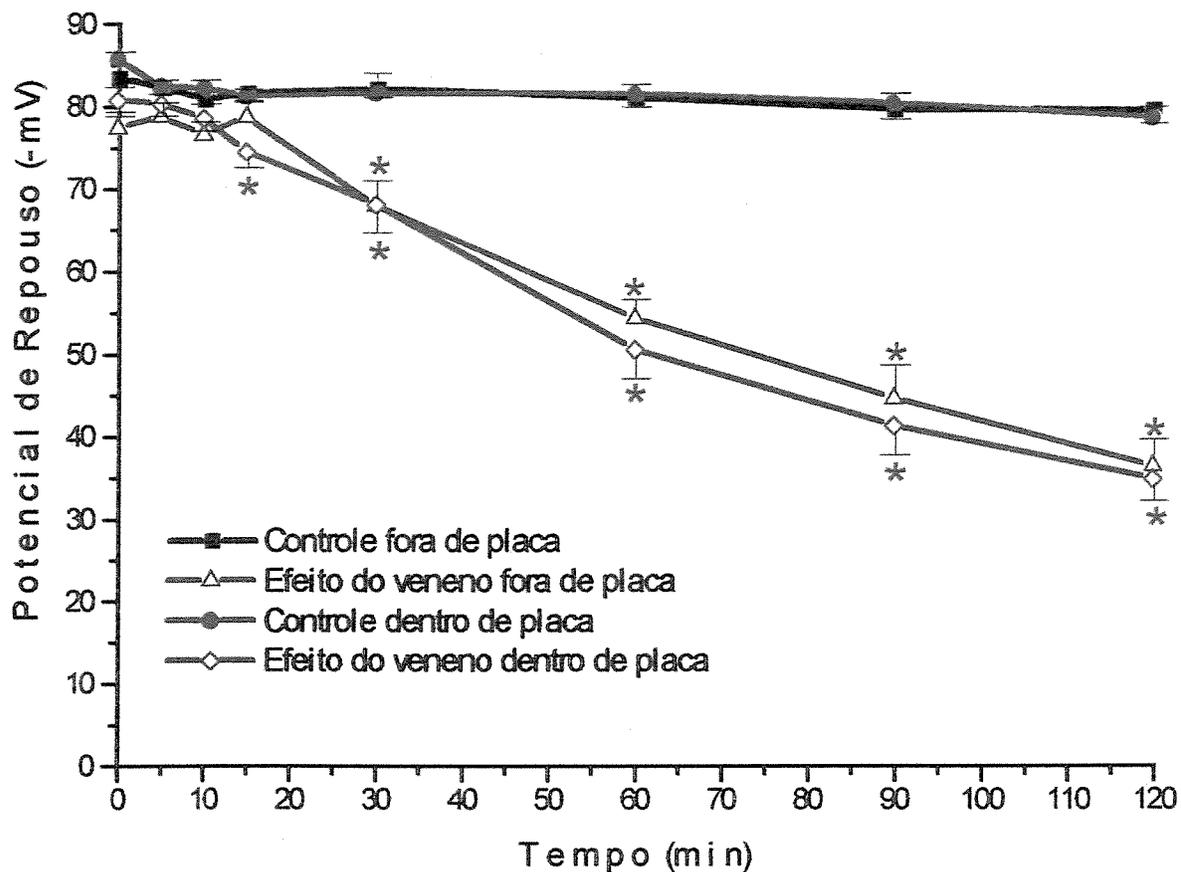


Figura 9. Efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (20  $\mu\text{g/ml}$ ; n = 4), sobre a preparação músculo diafragma de camundongo. Leitura do registro dos potenciais de repouso dentro e fora de placa em relação aos seus controles. Cada ponto nesta representação gráfica representa a média de experimentos  $\pm$  erro-padrão. (\*) nível de significância entre a concentração individual e os controles ( $p < 0,01$ ).

#### 4.3.1.1. Potencial de placa terminal em miniatura (pptm)

A ação do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (20 µg/ml; n = 4) sobre os pptms, caracterizou-se, de uma forma geral, por um aumento da frequência desses potenciais. Aos 5, 30, 60 e 90 min de incubação com o veneno, a frequência foi elevada de  $48 \pm 2$  (controle) para  $104 \pm 3$ ,  $134 \pm 6$ ,  $201 \pm 8$  e  $225 \pm 3$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente, chegando a  $281 \pm 3$  aos 120 min, (Fig. 10). Foi observado um aumento no número de potenciais gigantes em torno de  $25 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,05$ ).

A figura 11 mostra o aparecimento de “bursts” que não foram incluídos no histograma pela dificuldade encontrada em contar e medir os pptms das preparações tratadas com 20 µg/ml do veneno.

Estes resultados sugerem que o veneno bruto de *Bothrops neuwiedi pauloensis* atue de maneira facilitadora na transmissão sináptica, despolarizando também a região distante de placa.

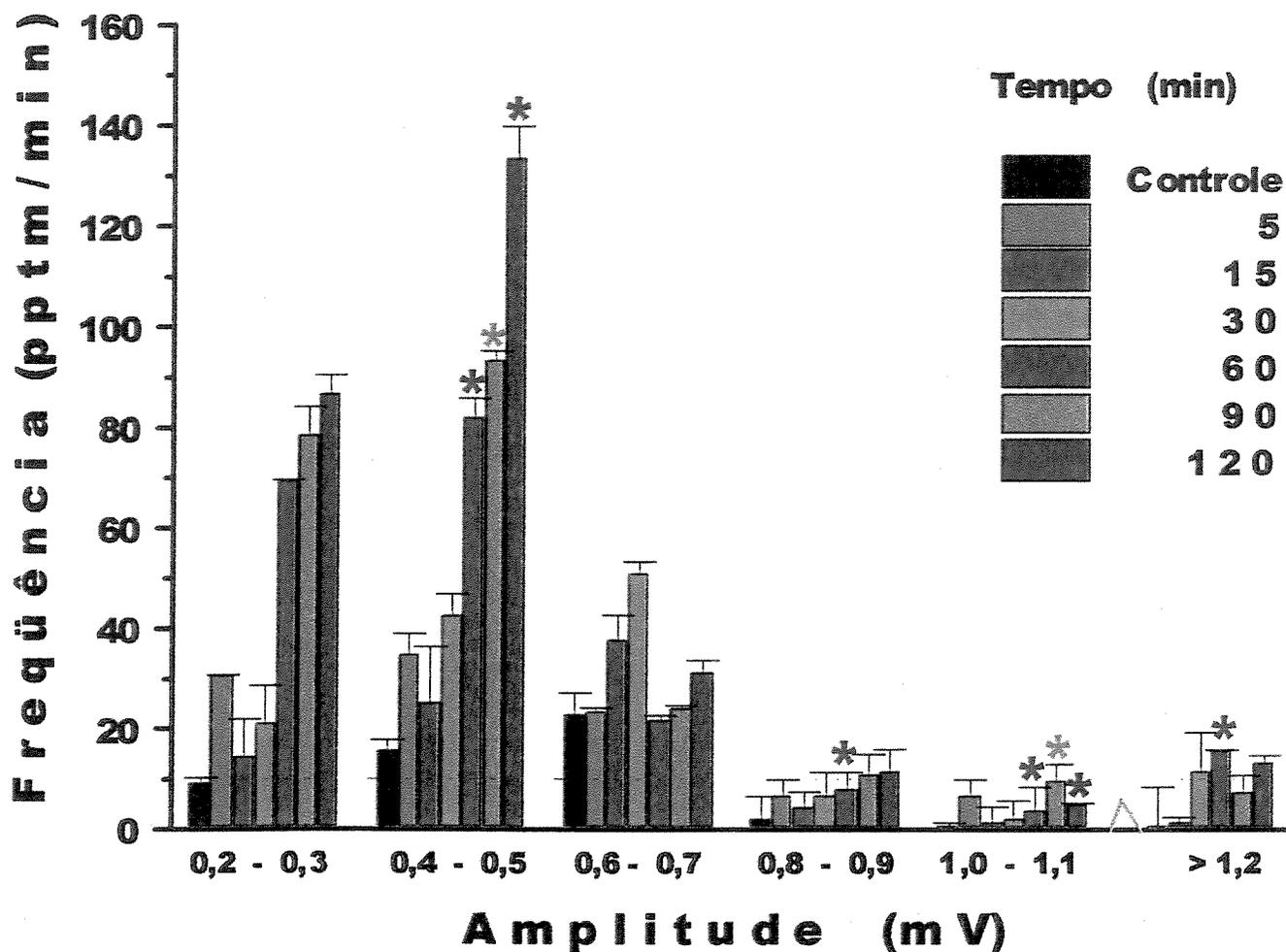


Figura 10. Representação gráfica do efeito do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (20  $\mu\text{g/ml}$ ;  $n = 4$ ) sobre a frequência (pptm/min) e amplitude (mV) de potenciais bioelétricos obtidos de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo, nos tempos indicados na legenda. Observar o aumento da frequência a partir dos 30 min ( $p < 0,05$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão.  $\Delta$ , leitura zero dos potenciais bioelétricos. (\*) nível de significância entre a concentração individual e o controle ( $p < 0,05$ ).

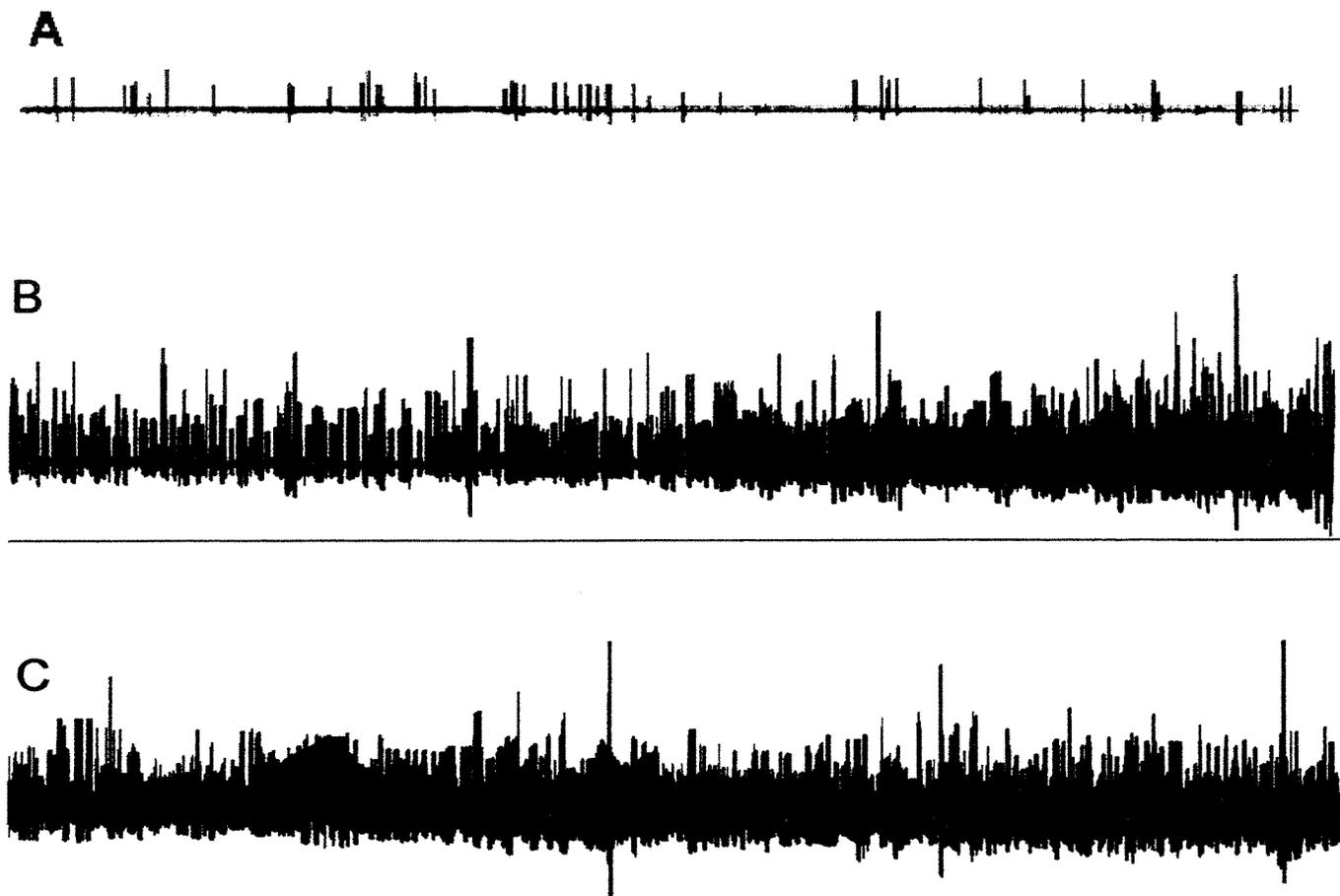


Figura 11. Registro de ptpm em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo tratada com o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Em A, o controle. Observar tanto em B como em C (60 e 90 min, respectivamente) o aumento imensurável de ptpms e o aparecimento de potenciais gigantes. Varredura: 2ms/cm. Calibração: 1mV/cm.

## ***5 - Discussão***

---

Embora os venenos botrópicos, de modo geral, não produzam nenhum sinal clínico de neurotoxicidade nos acidentes, o veneno de várias espécies pode produzir bloqueio neuromuscular *in vitro* (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; LOBO-ARAÚJO et al., 1990; HELUANY, et al., 1992; COGO et al., 1990, 1990b, 1993; ZAMUNER et al., 1997; COSTA et al., 1999; OSHIMA-FRANCO et al., 2001, BORJA-OLIVEIRA et al., 2003 e DURIGON et al., (in press)).

O bloqueio neuromuscular produzido pela incubação do veneno bruto (1, 5, 10 e 20 µg/ml) de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em preparação *biventer cervicis* de pintainho sugere que o bloqueio se deve a não interação com os receptores nicotínicos da placa motora, pois ficou mantida a resposta contraturante à ACh, após a incubação com o veneno (ZAMUNÉR et al., 1997).

A presença de componente(s) de ação pré-juncional na peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* é fortemente reforçada, não só pelo fato de ocorrer aumento na freqüência dos pptrms como também pelo aparecimento de potenciais gigantes, definidos como potenciais com uma amplitude média maior que os potenciais registrados na ausência de tratamento (LEE et al., 1985). Estes resultados sugerem fortemente que o veneno quando ensaiado em

---

---

concentrações inferiores a 20 µg/ml, produz bloqueio neuromuscular por atuar em sítios pré-sinápticos.

A inibição parcial da resposta contrátil sob estimulação elétrica direta, utilizando-se doses superiores a 50 µg/ml, nas preparações *biventer cervicis* de pintainho e nervo-frênico diafragma de camundongo, corrobora as suspeitas de que o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresenta, também, efeito miotóxico, quando ensaiado em doses elevadas (acima de 50 µg/ml) que ficou demonstrado nos estudos realizados por ZAMUNÉR et al., 1997 na mesma preparação. Esse efeito tem sido relatado para outros venenos botrópicos, como os de *Bothrops jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983), *Bothrops insularis* (COGO et al., 1993), *Bothrops pirajai* (COSTA et al., 1999), *Bothrops neuwiedi pauloensis* (BORJA-OLIVEIRA et al., 2003) e DURIGON et al., (in press)).

Em contrapartida, em concentração dez vezes menor, ou seja, 5 µg/ml, o veneno produziu um bloqueio irreversível das contrações musculares sob estimulação elétrica indireta sem abolir a resposta ao potássio e à ACh em preparação de ave. Portanto, o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, em baixas concentrações (5 a 20 µg/ml), exerce um efeito neurotóxico pré-sináptico, enquanto são necessárias altas

---

---

concentrações (50 a 200  $\mu\text{g/ml}$ ) para produzir um efeito miotóxico (ZAMUNER et al., 1997; BORJA-OLIVEIRA, et al., 2003 e DURIGON et al., (in press)). Baixas concentrações de veneno podem revelar a presença de neurotoxinas, enquanto altas concentrações podem ser necessárias para indicar a possível presença de componentes miotóxicos (HARVEY et al., 1994). A atividade pré-sináptica de uma neurotoxina pode abolir a contração evocada, sem afetar a resposta do agonista colinérgico e a resposta do músculo por contratura induzida pelo potássio (BARFARAZ e HARVEY, 1994), porém o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* também bloqueou a resposta ao potássio em concentrações mais altas (10  $\mu\text{g/ml}$ ), o que indica igualmente a presença de componentes miotóxicos.

Assim, o efeito miotóxico manifestou-se através do bloqueio da resposta ao potássio em preparação de ave e das contrações em resposta à estimulação elétrica direta em preparações curarizadas de ave e mamífero, da redução dos valores do potencial de repouso nas regiões distantes da placa motora em diafragma de mamífero, além da mionecrose e aumento na liberação da CK descritas por ZAMUNÉR et al. (1997), usando a concentração de 200  $\mu\text{g/ml}$  na mesma preparação. De fato, o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* promove uma considerável liberação de CK somente em doses

---

---

superiores a 100 µg/ml com correspondente miotoxicidade (ZAMUNÉR et al., 1997). O que é outro fator indicativo da presença de componente miotóxico no veneno, o qual exibe seu efeito quando o veneno é ensaiado em doses superiores a 20 µg/ml. As peçonhas botrópicas possuem a capacidade de liberar CK devido aos componentes que rompem a membrana celular. A CK é uma enzima que se situa ao nível de pontes entre os filamentos de miosina, na região M da fibra muscular e transfere grupos fosfato da fosfocreatina ao ADP, transformando-se em ATP (Reação de Lohmann), que é rapidamente utilizado pela célula como fonte imediata de energia para a contração muscular. Esta é uma enzima essencialmente citoplasmática, e seu aparecimento no líquido nutritivo ou no soro de indivíduos pode identificar alterações na permeabilidade da membrana muscular ou mesmo lesão celular (SUAREZ-KURTZ, 1983). Na literatura, são encontrados muitos autores que relacionam a lesão celular aos níveis de CK liberado (GUTIÉRREZ et al., 1980; MELO e SUAREZ-KURTZ, 1985; MELO e SUAREZ-KURTZ, 1987; MORENO e GUTIERREZ, 1988; CALIL-ELIAS et al., 2002; SOUZA et al., 2002; PRIANTI et al., 2003. Em todas as preparações de ave em que a temperatura do banho foi mantida a 37 °C, o veneno exibiu o efeito dose-dependente. Entretanto, nos experimentos realizados em temperatura ambiente

---

---

(20 - 24 °C), observou-se, ausência de contratura, e ainda, as respostas contraturantes à adição de potássio e acetilcolina estavam inalteradas, o que sugere que o efeito bloqueador neuromuscular deste veneno pode estar relacionado a um componente com atividade enzimática dependente da temperatura. O fato de adições do veneno às preparações nervo frênico-diafragma de camundongo em solução nutritiva (Tyrode), em que o cálcio foi substituído por estrôncio, ter demonstrado ausência de bloqueio, também sugere o envolvimento de componentes com ação enzimática neste efeito. O estrôncio substitui o cálcio na liberação do neurotransmissor, mas é um pobre ativador da ação catalítica (SCHIAVO et al., 2000).

Os venenos são compostos por misturas de toxinas e, segundo HARVEY et al., 1994, neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes que causam paralisia neuromuscular agem pré-juncionalmente, interferindo sobre a liberação de ACh ou pós-juncionalmente, bloqueando os receptores para à ACh. As fosfolipases neurotóxicas pré-sinápticas são potentes neurotoxinas que inibem especificamente a liberação de ACh das sinapses colinérgicas periféricas. Todas as fosfolipases neurotóxicas exibem o mesmo efeito trifásico sobre a liberação do neurotransmissor em preparações neuromusculares isoladas, ou seja, uma depressão inicial seguida por um aumento transitório e então uma inibição

---

---

progressiva levando a um bloqueio irreversível da neurotransmissão (CHANG, 1985, HAWGOOD, 1982). Algumas neurotoxinas pré-sinápticas consistem em uma única cadeia polipeptídica tais como a notexina do veneno de *Notechis s. scutatus* (HALPERT e EAKER, 1976) e a ammoditoxina (RITONJA e GUBENSEK, 1985).

A neurotoxina dimérica mais estudada, crotoxina de *Crotallus durissus terrificus* consiste numa associação não-covalente de uma subunidade básica (crotoxina B) e uma subunidade ácida não enzimática e não tóxica (crotopotina) (RADVANYI e BON, 1984; DELOT e BON, 1993).

A  $\beta$ -bungarotoxina encontrada nos venenos de serpentes do gênero *Bungarus* (KONDO et al., 1978) resulta de uma associação covalente de uma cadeia A (subunidade fosfolipásica  $A_2$ ) e uma cadeia B (um polipeptídeo não enzimático). As neurotoxinas multiméricas são formadas por uma associação não covalente de várias subunidades homólogas ( $PLA_2$ ) com, pelo menos, uma delas sendo enzimaticamente ativa.

Assim, o veneno total de *Bothrops neuwiedi pauloensis* deve encerrar toxinas que são potentes bloqueadores neuromusculares desde que determinou o bloqueio da transmissão do impulso nervoso

---

em doses semelhantes àsquelas usadas com venenos crotálicos. No entanto estas toxinas teriam sua atividade mascarada por miotoxinas cujos efeitos manifestam-se quando ensaiadas em concentrações crescentes a partir de 20  $\mu\text{g/ml}$ ).

---

---

## ***6 - Conclusões***

---

O veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentou características que sugerem sua atuação preferencial em sítios pré e pós-sinápticos, tais como:

⇒ A manutenção da resposta à ACh após bloqueio neuromuscular completo em baixas concentrações (5  $\mu\text{g/ml}$ ), sem induzir contratura ou abolir a resposta ao potássio, em preparação neuromuscular de ave.

⇒ Pronunciado aumento da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura, anterior à diminuição do potencial de repouso na placa terminal.

⇒ Presença de contratura e bloqueio da resposta ao potássio em altas concentrações (acima de 10  $\mu\text{g/ml}$ ), em preparação neuromuscular de ave.

⇒ Bloqueio das contrações diretamente evocadas, em preparações de pintainho e camundongo.

---

⇒ **Despolarização da fibra muscular esquelética em diafragma de camundongo.**

⇒ **A atividade do veneno parece estar relacionada com sua atividade enzimática, uma vez que mostrou ser temperatura e cálcio dependente.**

---

---

## ***7 - Referências Bibliográficas***

---

---

ALAGON, A. C.; MOLINAR, R. R.; POSSANI, L. D.; FLETCHER, PL JR.; CRONAN, J. E. JR.; JULIA, J. Z. Venom from the snake *Bothrops asper* Garman. Purification and characterization of three phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochem J**, 185: 695-704, 1980.

BARFARAZ, A.; HARVEY, A. L. The use of chick *biventer cervicis* preparation to assess the protective activity of six international reference antivenoms on the neuromuscular effects of snake venoms *in vitro*. **Toxicon**, 32: 267-72, 1994.

BORJA-OLIVEIRA, C. R.; DURIGON, A. M.; VALLIN, A. C. C.; TOYAMA, M. H.; SOUCCAR, C.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Braz J Med Biol Res**, 36: 617-24, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE - **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF, 1998, 131p.

---

---

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE - **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2<sup>a</sup> ed. - Brasília, DF, 2001, p. 9 – 36.

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

CALDAS AULETE, **Dicionário Contemporâneo da Língua Portuguesa**, Lisboa: Imprensa Nacional Lisboa, 1881.

CALIL-ELIAS, S.; THATTASSERY, E.; MARTINEZ, A.M.; MELO, P. A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Braz J Med Biol Res**, 35: 1233-5, 2002.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of America**. Ithaca: Comstock Publishing, p. 180-226, 1989.

CHANG, C. C. - Neurotoxins with phospholipase A<sub>2</sub> activity in snake venoms. **Proc Natl Sci Counc Repub China B**, 9: 126-42, 1985.

---

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29: 1279-303, 1991.

COGO, J. C.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Estudo da fração fosfolipásica  $A_2$  isolada do veneno de *Bothrops insularis* na junção neuromuscular. Campinas, 1995. (Tese - Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon*, 31: 1237-47, 1993.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops insularis* na preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongo. *Mem Inst Butantan*, 52: 78, 1990.

COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. The effects of *B. insularis* venom on isolated nerve muscle preparation. *Toxicon*, 28: 605, 1990b.

---

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J.R.; CORRADO, A.P.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; DONATO, J.L.; LEITE, G.B .; RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A<sub>2</sub> fraction. **Toxicon**, 36: 1323-32, 1998.

COSTA, P. D.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**, 37: 1143-53, 1999.

DELOT, E.; BON, C. - Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry**, 32: 10708-13, 1993.

DURIGON, A.M.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; DAL BELO, C. A.; OSHIMA-FRANCO Y.; COGO, J.C.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom in mouse nerve-muscle preparations. (in press).

FONSECA, F. - **Animais peçonhentos**. São Paulo: Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, 1949.

---

- 
- GANS, C. - **Biology of the Reptilia**. London: Academic Press, 1978
- GINSBORG, B. L.; WARRINER, J. The isolated chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation. **Brit J Pharmacol**, 15: 410-11, 1960.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Myonecrosis, hemorrhage and edema induced by *Bothrops asper* venom in white mice. **Toxicon**, 18: 603-10, 1980
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, 22: 115-28, 1984.
- HALPERT, J; EAKER, D. Isolation and aminoacid sequence of a neurotoxic phospholipase A from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. **J Biol Chem**, 251: 7343-7, 1976
- HARVEY, A. L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS, J. B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. **Toxicon** 32: 257-65, 1994.
-

---

HAWGOOD, B. J. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: Tu, A. T. (Ed.). **RATTLESNAKE VENOMS**. Their actions and Treatments, New York: Marcel Dekker, p. 121, 1982.

HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects Induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, 30: 1203-10, 1992.

HOGUE, A. R.; ROMANO-HOGUE, S. A. R. W. L. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the pit vipers Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. **Mem Inst Butantan**, 42: 179-310, 1978.

HOMMA, M.; TU, A. T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br J Exp Pathol**, 52: 538-42, 1971.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of Bothropstoxin. **Toxicon**, 26: 615-27, 1988.

---

---

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev Ass Med Brasil**, 36: 66-77, 1990.

KONDO, K.; NARITA, K.; LEE, CY. Amino acid sequences of the two polypeptide chains in  $\beta$ 1-bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus*. **Tokyo: J Biochem**, 83: 101-15, 1978.

LEE, C. Y.; TSAI, M. C.; TSAUR, M. L.; LIN, W. W.; CARLSSON, F. H.; JOUBERT, F. J. Pharmacological Study on *Angusticeps* -Type Toxins from Mamba Snake venoms. **J Pharmacol Exp Ther.**, 2:491-98, 1985.

LOBO-ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Efeitos na junção neuromuscular do veneno de *Bothrops lanceolatus*. **Mem Inst Butantan**, 52: 77, 1990.

MACCONNELL, J. G.; BLUM, M. S.; BUREN, W. F.; WILLIAMS, R. N.; FALES, H. M. Fire ant venoms: chemotaxonomic correlations with alkaloidal compositions. **Toxicon**, 14: 69-78, 1976.

---

---

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, 22: 193-206, 1984.

MEHRTENS, J. Living snakes of the world, New York: **Sterling Publishing**, p. 480, 1987.

MELLO-LEITÃO, A. C. Animais peçonhentos. **Serviço de Informação Agrícola**, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1948.

MELO, P. A.; SUAREZ-KURTZ, G. Effects of polyanions on the stimulation of sarcoplasmic enzyme release induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Braz J Med Biol Res**, 18: 754, 1985.

MELO, P. A.; SUAREZ-KURTZ, G. Interaction of *Bothrops* venom and antivenin on the release of creatine kinase from skeletal muscle. **Braz J Med Biol Res**, 20: 821-4, 1987.

MENGDEN, G. The taxonomy of Australian elapid snakes. **Records Australian Museum**, 35: 195-222, 1983.

---

MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J. M. Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. *Toxicon*, 26: 403-9, 1988.

MORENO, R. A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Estudo dos efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada). Neutralização de efeitos pelo soro anti-botrópico comercial. Campinas, 1991 (Dissertação - mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G. THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*, 29:713-23, 1991.

MYERS, C. W.; DALY, J. W. Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolution by studies of poison-dart frogs (*Dendrobatidae*). *Bull Amer Museum Nat Hist*, 153: 175, 1976.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb Haemost.* 41: 314-28, 1979.

---

NISENBOM, H. E.; SEKI, C.; VIDAL, J. C. Phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. *Toxicon*, 24: 259-72, 1986.

OSHIMA-FRANCO Y.; LEITE G.B.; SILVA G.H.; CARDOSO D.F.; HYSLOP S.; GIGLIO J.R.; DA CRUZ-HOFLING M.A.; RODRIGUES-SIMIONI L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. *Toxicon*. 39: 1477-85, 2001.

PRIANTI, A. C. JR., RIBEIRO, W.; LOPES-MARTINS, R.A.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; LEITE, G.B .; HYSLOP, S., COGO, J.C. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon*, 5: 595-603, 2003.

QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL A. P.; MANDELBAUM, F. R. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Braz J Med Biol Res*, 18: 337-40, 1985.

RADVANYI, F.; BON, C. Investigations on the mechanism of action of crotoxin. *J Physiol (Paris)*, 79: 327-33, 1984.

---

RIBEIRO L. A.; ALBUQUERQUE M. J.; PIRES DE CAMPOS V.A.F.; KATZ, G; TAKAOKA N.Y.; LEBRÃO, M. L. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988 - 93. **Rev Assoc Med Brasil**, 4: 312-318, 1998.

RITONJA, A.; GUBENSEK, F. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase  $A_2$  from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. **Biochim Biophys Acta**, 828: 306-12, 1985.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESSE, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, 10: 475-89, 1983.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; COGO, J. C.; ASSAKURA, M. T.; MANDELBAUM, F. R. Muscular-blocking activity of *Bothrops moojeni* venom and its active fraction. **Mem Inst Butantan**, 52: 77, 1990.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.C.O.; GÍGLIO, J.R.; JIANG, M.S.; FLETCHER, J. E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitivity  $Ca^{2+}$  stores in the muscular effects of Bothropstoxin, a lys49 phospholipase  $A_2$  myotoxin. **Toxicon**, 33: 1479-89, 1995.

---

ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. **Venomous animals and their venoms**, New York: Academic Press, 1971, p. 362-95

SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiol Rev**, 80:717-66, 2000.

SOUZA, F. A.; SPENCER, P.J.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. <sup>60</sup>Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. **Toxicon**, 40: 1101-106, 2002.

SUAREZ-KURTZ, G. - Enzyme release from skeletal muscle. **Braz J Med Biol Res**, 16: 283-90, 1983.

VELLARD, J. Enfermedades producidas por animales venenosos. Nociones Generales. In: Cardini, C. e Beretervide, J. J. (Ed.). **Terapêutica Clínica**, 4ª parte. Buenos Aires: "El Ateneo", p. 247, 4ª parte, 1946.

VIDAL J. C.; MOLINA H, STOPPANI, A.O. A general procedure for the isolation and purification of phospholipase A isoenzymes from *Bothrops* venoms. **Acta Physiol Lat Am** 22: 91-109, 1972.

VIDAL J. C.; MOLINA H.; STOPPANI, A.O. Purification of phospholipase A of venom of *Bothrops neuwiedi*. **Rev Soc Argent Biol** 42: 138-52, 1966.

VIDAL J. C.; STOPPANI, A. O. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch Biochem Biophys** 145: 543-56, 1971.

VITAL BRAZIL. **La défense contre l'ophidisme**. 2. ed. São Paulo: Pocaí & Weiss, 1911, p. 48.

VITAL BRAZIL, O. **Peçonhas**. In: CORBETT, C. (Ed.). **Farmacodinâmica** 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1982. p. 1044 – 74.

VITAL BRAZIL; VELLARD, J. **Contribuição ao estudo dos batráchios**. **Mem Ins Butantan**, 3: 7, 1926.

---

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

---

## ***8 - Anexo***

---



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 131 - 1, sobre "Efeito do veneno de Bothrops neuviiedi pauloensis sobre prepa-  
rações neuromusculares de mamíferos e aves"  
sob a responsabilidade de Lea Rodrigues Simon

..... está de acordo  
com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de  
Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na  
Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04/07/2002

Campinas, 04 de julho de 2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº "....., entitled ".....

.....  
is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian  
College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional  
Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on  
 / /.

Campinas 04 de julho de 2002.

Prof(a) Dr(a) Alba R.M. Souza Brito  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP