

FÁTIMA CRISTIANE LOPES GOULARTE

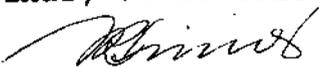
EFEITOS INDUZIDOS PELO VENENO DE *Micrurus nigrocinctus*
SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR - ASPECTOS MIOGRÁFICOS,
ELETROFISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DE PREPARAÇÕES
NEUROMUSCULARES ISOLADAS DE CAMUNDONGO.

ORIENTADORA: Profa. Dra. LÉA RODRIGUES SIMIONI

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Fátima Cristiane Lopes Goularte.

Tese apresentada ao Depto. de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Campinas, 02 de dezembro de 1993


Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
- Orientadora -

CAMPINAS

1993

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"PARA TODOS OS SERES HUMANOS
CONSTITUI QUASE UM DEVER PENSAR QUE,
O QUE JÁ SE TIVER REALIZADO É SEMPRE POUCO EM
COMPARAÇÃO COM O QUE RESTA POR FAZER".

(JOÃO XXIII)

A MEUS PAIS, WALTER E IZAURA,

A CARLOS MAGNO,

A MEUS IRMÃOS,

POR SEU AMOR E COMPREENSÃO, SEM OS QUAIS
ESTE TRABALHO NÃO SERIA POSSÍVEL.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Léa Rodrigues Simioni pela inestimável amizade, incentivo e dedicação durante a orientação deste trabalho.

Ao Prof Dr José Maria Gutiérrez, da Faculdade de Microbiologia do Instituto Clodomiro Picado - Costa Rica, pelo fornecimento da peçonha de *Micrurus nigrocinctus* e do soro anti-*M. nigrocinctus*.

À Prof^a Dr^a Maria Alice Cruz Hofling do Centro de Microscopia Eletrônica do IB - UNICAMP pela valiosa colaboração e orientação durante a etapa de estudo morfológico compreendida no trabalho.

Ao Prof Dr Marcos Dias Fontana pelo incentivo à visão crítica, pela amizade e valiosas sugestões durante a elaboração do trabalho.

Ao Prof Emérito Dr Oswaldo Vital Brazil pelos conselhos e ajuda na interpretação de muitos resultados.

Ao Prof Dr Carlos Alberto Flores pela amizade desde a elaboração dos primeiros gráficos no computador e pelo constante incentivo à visão crítica.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite pela amizade e pela inestimável ajuda durante a montagem dos experimentos que compõem esta tese.

À bióloga Stephen
trabalho de conversão de te

À biólogo José Luis
sobre o fungo *Trichurus nigroca*

À Dr Luciano
Neder do Centro de Micro
concessão ao uso do micro
unidade.

À Prof Dr Fernando
Brandão do Centro de
pela concessão ao uso do
sua unidade.

À biólogas Antônia
Sprogis do Centro de M
pela valiosa ajuda durant
suas ilustrações.

Às secretárias Solan
Elias Alípio e Rita do De

Aos colegas de labor
Santos Ferreira, pela ami

A todos que contrib
elaboração deste trabalho

a valiosa colaboração na
ês.

À ajuda na purificação do
ente da Costa Rica.

Às biólogas Fátima
nica do HC - UNICAMP, pela
nico de transmissão de sua

À química Márcia Cristina
Eletrônica do IQ - UNICAMP,
eletrônico de varredura de

Às biólogas
a e Adriane Cristina Sarti
atrônica do IB - UNICAMP,
morfológicas e preparo de

Às biólogas
dos Santos Basso, Gislaine
Farmacologia.

Às biólogas
Carlos Cogo e Cristina dos
ivo em todos os momentos.

Às biólogas
ou indiretamente para a
na formação.

ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO.....	01
II- OBJETIVOS.....	13
III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
1- Animais.....	14
2- Veneno.....	14
3- Solução Nutritiva.....	14
4- Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Camundongo...	14
5- Preparação Diafragma Cronicamente Desnervado de Camundongo.....	15
6- Preparação Músculo Extensor Longo dos Dedos (ELD) de Camundongo.....	15
7- Estudo Miográfico.....	16
8- Estudo Eletrofisiológico.....	19
9- Estudo da Liberação de Creatinoquinase em Músculo ELD de Camundongo.....	21
10- Estudo Morfológico.....	21
IV- RESULTADOS.....	23
Parte I - Estudo Miográfico.....	23
1- Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Camundongo...	23
1.1- Estimulação Indireta.....	23
1.2- Estimulação Direta.....	30

2- Preparação Diafragma Cronicamente Desnervado de Camundongo.....	32
Parte II - Estudo Eletrofisiológico.....	35
1- Potencial de Repouso.....	35
2- Potencial de Placa Terminal em Miniatura.....	39
Parte III - Estudo Morfológico.....	41
1- Microscopia Óptica.....	41
2- Microscopia Eletrônica.....	46
2.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
2.2- Microscopia Eletrônica de Varredura.....	53
3- Estudo da Liberação de Creatinoquinase em Músculo ELD.....	56
V - DISCUSSÃO.....	58
VI- RESUMO E CONCLUSÕES.....	65
VII- ABSTRACT.....	67
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

I - INTRODUÇÃO

As serpentes peçonhentas conhecidas popularmente como corais são as representantes da família Elapidae no continente americano. Esta família é constituída por mais de 120 espécies e subespécies, distribuídas nos gêneros *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides* (ROZE, 1982; CAMPBELL & LAMAR, 1989). O gênero *Micrurus*, que engloba provisoriamente as serpentes do gênero *Leptomicrurus* (ROZE, 1982), compreende todas as espécies encontradas nas Américas, com exceção da coral *Micruroides euryxanthus* do México e Estados Unidos. Esse gênero possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo nos Estados Unidos (*Micrurus fulvius*), México e América Central, estendendo-se ainda até o Uruguai e norte da Argentina (SHAW, 1971). As corais, como representantes da família Elapidae, são tanatofídios terrestres pertencentes à série proteróglifa, isto é, apresentam em sua dentição aparelho inoculador de veneno composto por presas curtas, permanentemente eretas e situadas na frente do maxilar.

A família Elapidae possui representantes na América, Ásia, África, Austrália e Nova Guiné, perfazendo um total de 43 gêneros. Dentre as serpentes elapídicas da Ásia e África destacam-se as "cobras" ou najas (*Naja naja* e *Ophiofagus hannah* da Ásia, e *Naja nigricolis*, *N. nivea*, *Hemachatus haemachatus*, da África), as "kraits" (várias espécies de *Bungarus* da Ásia), as "mambas" (várias espécies de *Dendroaspis* da África), etc.. Na Austrália e Nova Guiné, todas as serpentes peçonhentas conhecidas pertencem à família Elapidae.

No Brasil, apesar da existência de 9 espécies e de sua ampla distribuição geográfica, os acidentes causados pelas *Micrurus* são relativamente raros. Dos 70.600 acidentes ofídicos reportados pelo Programa Nacional de Ofidismo do Ministério da Saúde do Brasil, no período de junho de 1986 a dezembro de 1989, apenas 0,47% (333) são atribuídos às corais (RESENDE et al., 1989; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1990). A quase totalidade dos acidentes é provocada pela manipulação das serpentes, sem as devidas precauções e técnica, por indivíduos que as tomam pelas falsas corais (serpentes não peçonhentas e, muitas vezes, absolutamente inofensivas). Sua natureza inofensiva, juntamente com sua coloração atrativa (anéis alternados em vermelho, amarelo ou branco, e preto), tem em muitas ocasiões induzido ao seu manuseio, particularmente por crianças, e muitas vezes com impunidade.

Embora raros, os acidentes provocados pelas corais são frequentemente gravíssimos, podendo sobrevir a morte em poucas horas se as vítimas não forem tratadas convenientemente. Os sinais e sintomas do envenenamento por *Micrurus* são resultantes de uma paralisia progressiva da musculatura esquelética, a qual pode evoluir até falência respiratória e morte, ao menos que a vítima receba ventilação artificial. Os efeitos resultantes da paralisia ocorrem nas primeiras 2-6 horas do envenenamento, e podem levar até 48 horas para atingir intensidade máxima. Estes consistem em sintomas sistêmicos como euforia, náusea, vômito, salivação excessiva, parestesia na extremidade picada, ptose,

fraqueza, reflexos anormais, paralisia motora, depressão, dispnéia e paralisia respiratória (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

Apesar do grande número de espécies de corais, de sua ampla distribuição geográfica no continente americano, e da gravidade do acidente provocado pelas *Micrurus*, o estudo dos venenos de tais serpentes tem recebido pequena atenção. Em parte, isto ocorre pela dificuldade que seus hábitos subterrâneos e esquivos oferecem para sua captura, e da necessidade de condições adequadas para sua manutenção em cativeiro. Além disso, a extração do veneno é difícil e o rendimento de várias extrações é baixo, o que resulta em uma reduzida quantidade de veneno para estudo e fracionamento.

O envenenamento experimental por *Micrurus* fornece um amplo espectro de atividades farmacológicas, reproduzindo sinais e sintomas assinalados clinicamente. A partir dos estudos destas atividades, a peçonha de *Micrurus* ficou conhecida como neurotóxica (BRAZIL, 1914; MCCOLLOUGH & GENNARO, 1963; RUSSEL, 1967; ROSENFELD, 1971; SHAW, 1971; JIMENEZ-PORRAS, 1973; VITAL BRAZIL, 1965, 1980, 1987; MOUSSATCHÉ & MELÉNDEZ, 1979; VITAL BRAZIL et al, 1976/77; VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84; DALÓ et al., 1989), pois sua inoculação provoca hipotonia muscular, paralisia flácida dos músculos da face, pescoço, membros, tronco, laringe, faringe e da respiração, podendo levar à morte por falência respiratória. Ao contrário do que ocorre com o veneno das serpentes da família Viperidae, não foram observadas alterações no sítio da mordedura, tais como edema, hemorragia e necrose. Os venenos de *Micrurus* apresentam atividade

fosfolipásica A2, produzindo hemólise indireta *in vitro*, porém *in vivo* não causam hemólise intravascular ou hemoglobinúria. Efeitos nefrotóxicos também não são evocados por estes venenos em animais ou humanos. A atividade proteolítica é pequena ou nula, quando testada em substratos sintéticos ou naturais (VITAL BRAZIL & RANGEL PESTANA, 1909C; HOUSSAY & NEGRETE, 1918; ROSENFELD et al., 1959; MEBS, 1970; AIRD & SILVA, 1991).

O veneno das serpentes elapídicas apresenta neurotoxinas (NTXs) pós-sinápticas, podendo também encerrar NTXs pré-sinápticas, além de outros constituintes tóxicos tais como as cardiotoxinas e as fosfolipases (PLAs). A cardiotoxina atua em várias células do organismo despolarizando diretamente suas membranas e, conseqüentemente, interferindo com suas funções. Em concentrações elevadas pode provocar necrose celular (LAI et al., 1972). É encontrada nas peçonhas das "cobras" (*Naja*, *Ophiophagus*, *Hemachatus*) em concentrações de 50% ou mais (LEE, 1971) e possivelmente, nas de *Micrurus fulvius* do hemisfério norte (WEISS & McISAAC, 1971) e *Bungarus fasciatus* da Ásia (SHIAU LIN et al., 1972). Já as PLAs agem através da hidrólise da ligação éster na posição beta das moléculas dos fosfatídeos, dando lugar à formação de lisofosfatídeos (lisolecitina e lisocefalina) e liberação de ácidos graxos (em geral não saturados). Os lisofosfatídeos atuam como detergente na membrana das células, além de induzirem a liberação de histamina e outros autacóides. São os responsáveis pela atividade hemolítica indireta das peçonhas ofídicas. Nos músculos esqueléticos de vertebrados as PLAs podem inibir a transmissão neuromuscular por diferentes

modos de ação, sendo em geral, as PLAs básicas mais tóxicas que as PLAs ácidas ou neutras (LEE & HO, 1982). Toxinas com atividade fosfolipásica como a beta-bungarotoxina, crotoxina, taipotoxina e notexina (primeiro grupo) inibem a transmissão neuromuscular por agirem seletivamente sobre a terminação nervosa motora e são altamente tóxicas. Elas agem pré-sinápticamente, produzindo uma alteração trifásica na liberação evocada do transmissor (reviews by LEE & HO, 1982; CHANG, 1985; STRONG, 1987; HAWGOOD & SMITH, 1988), a qual compreende uma inibição inicial (atribuída à ligação da toxina ao sítio pré-sináptico específico), seguida por uma facilitação da liberação de acetilcolina e uma progressiva depressão até bloqueio irreversível da transmissão. A atividade fosfolipásica parece ser essencial para a neurotoxicidade dessas toxinas pré-sinápticas, uma vez que a sua inibição resulta em diminuição correspondente ou abolição da neurotoxicidade (CHANG, 1979; EAKER, 1978; KARLSSON, 1979; HAWGOOD & SMITH, 1988). Um segundo grupo de PLAs, compreendendo a PLA básica da *Naja nigricollis*, produz efeito miotóxico acentuado e também deprime a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos para a acetilcolina. O efeito pré-sináptico destas PLAs é usualmente mascarado por seus efeitos miotóxicos. O terceiro grupo, o qual inclui PLAs ácidas e neutras de vários venenos de serpentes, tem pequeno efeito sobre o nervo e músculo em baixas concentrações, sendo consideradas como PLAs não tóxicas. A seletividade de ação das PLAs sobre o nervo e músculo é dose-dependente. Em resumo, além dos efeitos pré-sinápticos, a maioria da PLAs apresenta algum efeito pós-sináptico e musculotrópico,

determinando uma redução na sensibilidade da região sub-sináptica à acetilcolina e induzindo contratura do músculo, especialmente quando em concentrações altas, além de mionecrose (LEE & HO, 1978).

A peçonha de *Micrurus frontalis* (a coral mais frequente no sul do Brasil e Argentina) apresenta apenas NTXs pós-sinápticas, que se ligam aos receptores colinérgicos da placa terminal sem no entanto provocarem despolarização. Dessa forma, tal veneno não induz alteração na quantidade de acetilcolina liberada pelo impulso nervoso. A administração de neostigmina é capaz de antagonizar perfeitamente o bloqueio e, portanto, a depressão respiratória e a paralisia flácida produzida pela peçonha em cães (VITAL BRAZIL et al., 1976/77). Já a peçonha de *Micrurus corallinus*, serpente de larga distribuição no Brasil (HOGE & ROMANO, 1972), norte da Argentina (ROZE, 1982) e provavelmente no Uruguai, age na junção neuromuscular através de NTXs pós e pré-sinápticas. Seu efeito caracteriza-se por um aumento da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (ação pré-sináptica) e redução de sua amplitude (ação pós-sináptica), porém sem alteração do potencial de repouso da membrana da fibra muscular. Estudos realizados por VITAL BRAZIL & FONTANA (1983/84) demonstraram que a ação pós-sináptica é reversível, enquanto a pré-sináptica é irreversível. Assim, a administração de neostigmina produz pequeno ou nenhum benefício sobre o bloqueio neuromuscular causado pela peçonha de *M. corallinus*. CRUZ-HOFLING et al (1983/84), investigando os efeitos do veneno bruto de *M. corallinus* sobre preparações nervo frênico-

diafragma, observaram alterações ultraestruturais nas terminações nervosas com depleção das vesículas sinápticas, alterações mitocondriais e o aparecimento de indentações em forma de ômega do axolema, entre outras. Estes resultados são concordantes com os estudos eletrofisiológicos de VITAL BRAZIL & FONTANA (1983/84), que indicam que o veneno tem ação predominantemente pré-juncional, bloqueando a liberação do neurotransmissor. Por outro lado, a *Micrurus fulvius* (serpente coral da América do Norte), cujo veneno exibe efeitos sobre a respiração através de NTXs pós-sinápticas que provocam a morte por falência respiratória (NEILL, 1957; RAMSEY & KLINKSTEIN, 1962; McCULLOUGH & GENNARO, 1963; PARRISH & KHAN, 1967), afeta também o sistema cardiovascular. A ação do veneno é essencialmente irreversível e a administração de neostigmina ou edrofônio não reverte o bloqueio neuromuscular (WEISS & McISAAC, 1971). Além disso, animais injetados com este veneno morrem por falência cardíaca mesmo na vigência de respiração artificial (LEE & PENG, 1966; LEE et al, 1968). Assim, o veneno da *M. fulvius*, provoca depressão do miocárdio, a qual contribui para a morte assim como a depressão respiratória. Isto ocorre pela presença de um componente análogo à cardiotoxina do veneno de Cobra (*Najas*), a qual exibe efeito despolarizante e tóxico direto sobre o músculo esquelético e cardíaco, respectivamente. Este veneno determina queda nos valores de potencial de repouso para -20 mV em 1h (8µg/ml), provavelmente por ação direta sobre a fibra muscular, tal como uma cardiotoxina, além de alterações histológicas (degeneração hialina) (WEISS & McISAAC, 1971).

A espécie *Micrurus nigrocinctus*, objeto deste estudo, está distribuída desde Chiapas no México, e através da América Central, até a costa do Pacífico na Colômbia (PETERS & OREJAS-MIRANDA, 1970). Ela representa a espécie de maior incidência na América Central (BOLAÑOS, 1982) (fig.1). Na Costa Rica existem duas subespécies, a *Micrurus nigrocinctus mosquitensis* e *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*, localizadas na costa Atlântica e Pacífica respectivamente (TAYLOR et al, 1974) e separadas geograficamente pelas Cadeias Montanhosas. Em ambas subespécies as fêmeas alcançam maior tamanho que os machos, sendo esta particularidade muito mais visível na subespécie *mosquitensis*. O comprimento total desta é, em média, 60,5 cm \pm 10 para os machos e 77,9 cm \pm 12,8 para as fêmeas; enquanto na subespécie *nigrocinctus* o comprimento total é de 61,9 cm \pm 9,1 para os machos e de 64,2 cm \pm 16,4 para as fêmeas. (SOLÓRZANO & CERDAS, 1988).

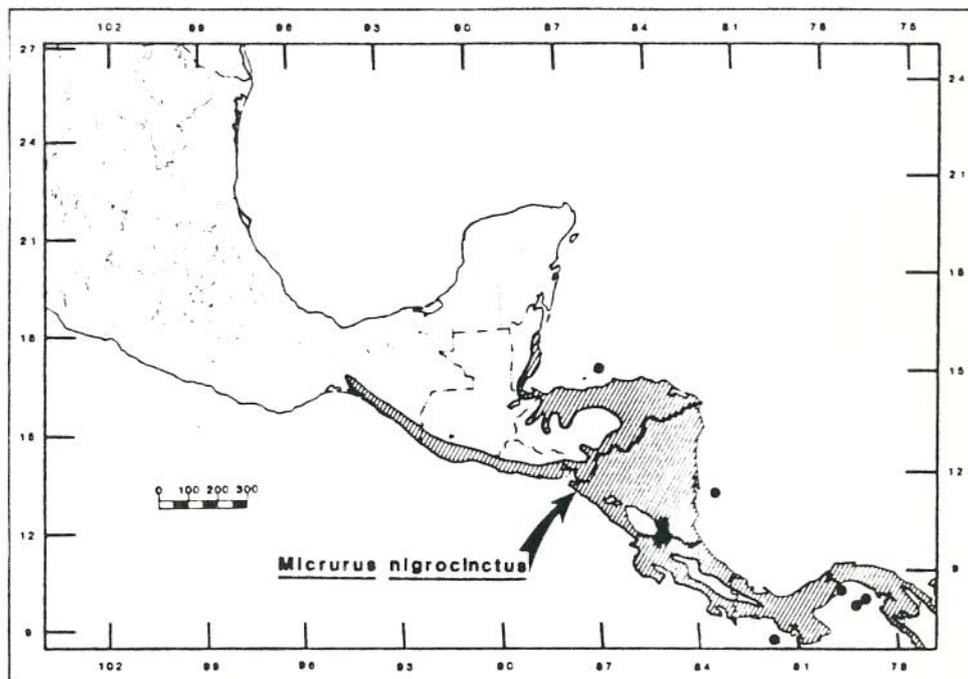
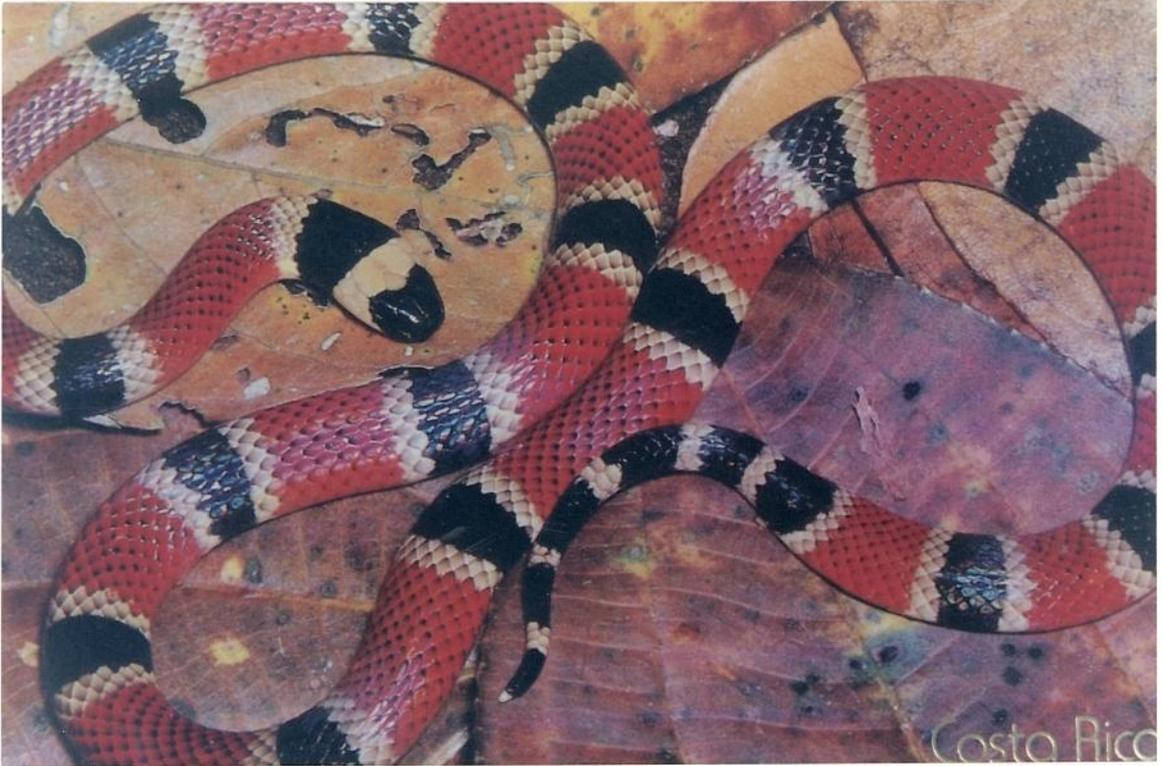


Fig. 1: *Micrurus nigrocinctus* E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA. É encontrada no México, América Central, exceto nas terras altas, e na costa Pacífica da Colômbia. A distribuição desta serpente na Colômbia não é extensa e não foi mapeada. (CAMPBELL & LAMAR, 1989)

Sobre o veneno de *Micrurus nigrocinctus*, sabe-se que é capaz de produzir bloqueio específico e irreversível dos receptores colinérgicos quando testado sobre diafragma cronicamente desnervado de cobaia (MOUSSATCHÉ & MELENDES, 1974, 1979). As respostas à histamina, adrenalina e noradrenalina não são afetadas significativamente após 30min de contato com 10ug/ml da peçonha, enquanto a resposta à acetilcolina encontra-se irreversivelmente abolida, mesmo após 3 horas de lavagem da preparação. Mais recentemente, verificou-se que uma fração (FII) isolada do veneno total, em doses de 2 - 6ug/ml e após 15 - 30min de contato, produz bloqueio reversível destes receptores sem alterar a contratura evocada por adrenalina, noradrenalina e histamina. A resposta contraturante à acetilcolina da preparação cronicamente desnervada de rato é abolida pela FII sem que se altere a resposta ao KCl. Tal bloqueio é parcialmente revertido por neostigmina (2 ug/ml), e a fração é classificada como tendo ação seletiva sobre os receptores colinérgicos nicotínicos (DALÓ et al., 1986).

Apesar das generalizações feitas a respeito das propriedades farmacológicas dos venenos de *Micrurus*, quanto à sua neurotoxicidade e ausência de efeitos locais, tais como necrose e hemorragia, alguns estudos têm apresentado fortes indícios da ocorrência de mionecrose após o envenenamento por algumas espécies de *Micrurus* (WEISS & McISAAC, 1971; GUTIÉRREZ et al, 1980, 1983, 1986, 1991; ARROYO et al, 1987). Tal efeito local está de fato presente, à semelhança do que ocorre com outras espécies de serpentes elapídicas como *Naja naja kaouthia*,

Bungarus fasciatus e *Dendroaspis jamenosi* (HOMMA & TU, 1971). Os estudos realizados com o veneno das duas subespécies de *Micrurus nigrocinctus*, bem como o de outras corais (*M. alleni*, *M. frontalis*, *M. carinicauda*, *M. surinamensis*) coletadas de diferentes regiões geográficas da América mostram indícios de uma atividade mionecrótica (GUTIÉRREZ et al, 1983). Quando administrados em músculo de camundongo, estes venenos provocam um efeito mionecrótico, o qual no entanto, não se reconhece por análise macroscópica do tecido, mas apenas pela análise histológica (necrose tipo miolítico) e elevação dos níveis de Creatinoquinase (CK) em soro. Porém, não há indícios de hemorragias, alterações vasculares, ou edema. As alterações histológicas provocadas pelo veneno de *Micrurus nigrocinctus* podem ser observadas já nos primeiros 15 minutos subsequentes à sua inoculação. As primeiras alterações sobre as fibras musculares são caracterizadas pelo aparecimento de áreas periféricas de degeneração muito similares às lesões delta descritas em outras patologias musculares, como a distrofia muscular Duchene (MOKRI & ENGEL, 1975). Estes dados sugerem então, que o sarcolema é o sítio primário de ação deste veneno. Em um estágio mais avançado de degeneração, o citoplasma é desorganizado em porções amorfas e densas, e as miofibrilas ficam alternadas com espaços vazios. Após 24 horas da inoculação, a aparência das fibras necróticas é mais hialina e a distribuição do material miofibrilar é mais homogêneo. Não ocorrem porém, em qualquer estágio, alterações vasculares tais como hemorragia e trombose (GUTIERREZ et al, 1986).

A atividade mionecrótica relativamente forte do veneno de *M. nigrocinctus* contrasta com seu débil efeito proteolítico, o que coincide com as observações já citadas sobre as atividades farmacológicas dos outros venenos elapídicos e de serpentes marinhas, que provocam um quadro miotóxico sem apresentarem atividade proteolítica significativa. Isto constitui um exemplo de que as toxinas responsáveis pelos efeitos necróticos não são necessariamente proteases e de que os efeitos proteolítico, hemorrágico e mionecrótico dos venenos não mostram uma correlação entre suas respectivas magnitudes, como ocorre com venenos de serpentes asiáticas (TU et al, 1969), norteamericanas (TU, 1977) e da Costa Rica (GUTIERREZ & CHAVES, 1980). MOUSSATCHÉ et al (1976) identificaram atividade hemorrágica, a nível pulmonar e intestinal de ratos, em duas frações do veneno de *M. nigrocinctus* procedente da Costa Rica, apesar de não terem observado indício de atividade hemorrágica na pele de rato e a nível histológico no tecido muscular. Estas observações sugerem que as toxinas responsáveis pela reação na pele não seriam as mesmas que atuam no pulmão (BONTA et al, 1970).

Os estudos sobre o veneno de *Micrurus nigrocinctus* são ainda insuficientes no sentido de se conhecer a gênese do bloqueio neuromuscular por ele induzido. Assim, o presente estudo tem como meta investigar a ação do veneno de *Micrurus nigrocinctus* sobre a junção neuromuscular e contribuir para a melhor compreensão da fisiopatologia deste tipo de envenenamento.

II - OBJETIVOS

* Estudo dos efeitos do veneno total de *Micrurus nigrocinctus* sobre a junção neuromuscular. Alterações miográficas, eletrofisiológicas e morfológicas resultantes de sua ação sobre preparações neuromusculares isoladas de camundongo.

* Contribuição ao esclarecimento da fisiopatologia do envenenamento por *Micrurus nigrocinctus*.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais

Camundongos machos (*Mus musculus* variedade *Albinus*) da raça Swiss provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP, com peso entre 25 e 35g. Estes foram mantidos em gaiolas e tratados com água e ração *ad libitum*.

2- Veneno

Veneno de *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*, gentilmente fornecido pelo Dr. José Maria Gutiérrez, Instituto Clodomiro Picado, Faculdade de Microbiologia da Universidade de Costa Rica, San José, Costa Rica.

3- Solução Nutritiva

Tyrode composto em mM por: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e Glicose 11,1.

4- Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Camundongo

Os animais foram anestesiados com Éter Etílico e sacrificados posteriormente pela secção e sangria dos vasos cervicais. A retirada da preparação foi realizada de modo semelhante à técnica descrita por BÜLBRING, 1946, para ratos. Esta consiste em dissecar a pele e músculos a nível do tórax e cuidadosamente

isolar o músculo diafragma juntamente com seu nervo motor (nervo frênico), tomando-se cuidado para não lesá-lo.

5- Preparação Diafragma Cronicamente Desnervado de Camundongo

Camundongos foram desnervados seguindo-se a técnica descrita por VITAL BRAZIL (1965) para ratos. Esta consiste na secção do nervo frênico esquerdo. Para proceder a desnervação, colocou-se o animal anestesiado em decúbito lateral direito, praticando-se uma incisão de aproximadamente 0,5 cm, perpendicular à linha mediana, no terço inferior da região lateral do tórax esquerdo previamente depilada. A incisão compreende a pele e a camada muscular delgada que recobre esta região. Ao longo do espaço intercostal cortou-se então, com tesoura, os músculos intercostais. Com um bastão de vidro com extremidade recurvada, prendeu-se o nervo frênico e procedeu-se a sua secção com uma tesoura, após sua exposição pelas bordas da ferida. Em seguida suturou-se a pele por meio de um ou dois pontos, conforme a extensão da ferida. Decorridos 15-27 dias, retirou-se o diafragma conforme descrito no item 4-.

6- Preparação Músculo Extensor Longo dos Dedos (ELD) de Camundongo:

Após a anestesia ter atingido nível cirúrgico realizou-se ampla incisão sobre a face ântero-lateral de uma das patas posteriores do animal, visualizando-se assim, os tendões dos músculos ELD e Tibial, bem como o músculo Tibial. Procedeu-se então, a secção dos tendões e a retirada do músculo Tibial, permitindo a exposição total do músculo ELD. Este foi dissecado

desde sua inserção tendínea distal até a proximal. Durante este procedimento, manteve-se a preparação umedecida com solução Tyrode, de composição descrita no item 3-.

7- Estudo Miográfico

7.1- Preparação Nervo Frênico - Diafragma de Camundongo:

A preparação foi colocada em cuba contendo 4 ml de solução Tyrode e presa através dos músculos das costelas, por dois ganchos (eletrodos para estimulação direta) existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a aeração feita com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂). O registro da força de contração muscular em resposta a estímulos supramaximais, foi realizado através de transdutor isométrico MYOGRAPH F-60 (NARCO BIO-SYSTEMS, INC), que se encontra acoplado a um fisiógrafo NARCOTRACE 40 (NARCO BIO-SYSTEMS, INC). O músculo foi submetido à tensão constante de 2g/cm (por meio de um fio preso à sua porção tendinosa e ao transdutor isométrico), e à estimulação elétrica através de pulsos gerados por estimulador S4KR (GRASS INSTRUMENTS).

A preparação foi submetida a estimulação indireta (nervo frênico) com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, ou direta, através de eletrodo conectado ao músculo diafragma submetido a prévia curarização, com pulsos supramaximais de 2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. A preparação foi submetida a um período de estabilização não inferior a 20 minutos, findo o qual adicionaram-se à cuba doses

de 1, 5, 10 e 20 ug/ml do veneno de *Micrurus nigrocinctus* para observação e registro da contração muscular.

Algumas preparações incubadas com o veneno foram submetidas a diferentes tratamentos:

- * Neostigmina (0,5-2,5 ug/ml)
- * 3,4-diaminopiridina (25 ug/ml)
- * Lavagem da preparação com nova solução de Tyrode

* Alteração da temperatura de incubação: a preparação foi mantida à temperatura ambiente (24-26°C) durante o tempo de incubação com o veneno.

* Soro anti- *M. nigrocinctus*: Em alguns experimentos o veneno foi previamente incubado com 5 ul de soro/ug, por 30 min à 37°C. Em outros as doses de 10 e 20 ul de soro/ug de veneno, foram respectivamente adicionadas após 10 e 20 min de incubação da preparação com o veneno.

7.2- Preparação Diafragma Cronicamente Desnervado de Camundongo:

O diafragma cronicamente desnervado foi submetido a uma tensão constante de 0,5-1g/cm através de um fio preso à sua porção tendinosa e ao transdutor isométrico MYOGRAPH F-60 (NARCO BIO-SYSTEMS, INC), que se encontra acoplado a um fisiógrafo NARCOTRACE 40 (NARCO BIO-SYSTEMS, INC).

A preparação foi incubada com o veneno de *M. nigrocinctus* (1, 5 e 10 ug/ml), registrando-se a contratura provocada por doses crescentes de acetilcolina (ACh), usando-se uma razão 2 entre tais doses. A curva dose-resposta da ACh foi realizada antes da adição da peçonha (condição controle) e após 60 min de

incubação. O mesmo protocolo foi realizado em preparações controle, na ausência do veneno. As curvas dose-resposta de ACh foram efetuadas à partir da dose que evocava uma resposta muscular mínima mensurável, até aquela que resultava em sua contratura máxima. Após cada adição de ACh, e observação da resposta contraturante do diafragma, procedeu-se a lavagem da preparação com nova solução de Tyrode (3 lavagens). Os resultados foram lançados em uma curva, onde cada ponto corresponde à porcentagem de resposta muscular evocada por uma dose de ACh, após a incubação com a peçonha (60 min), em relação à resposta evocada pela mesma dose durante a condição controle. O mesmo procedimento foi usado nas preparações controle.

Em alguns experimentos as preparações foram pré-tratadas com d-tubocurarina (dtc), ou com soro anti- *M. nigrocinctus*.

* dtc (10 ug/ml): Incubou-se a preparação com dtc durante 30 min, e em seguida através de sucessivas lavagens com solução de Tyrode (5 lavagens no período de 15 min), obteve-se total reversão do bloqueio da resposta contraturante à ACh (10 ug/ml). Após proceder a este controle, a dtc foi novamente adicionada ao banho por 30 min antes da adição da peçonha, a qual foi mantida em contato com a preparação por mais 30 min. Posteriormente, a mesma dose de ACh (10 ug/ml) foi adicionada. A estimulação direta do músculo foi simultaneamente registrada.

* Soro anti- *M. nigrocinctus* (10 ul/ug de veneno): Seguiu-se um protocolo semelhante aquele usado para dtc. A peçonha ensaiada sofreu prévia incubação com o soro por 30 min, à 37°C.

8- Estudo Eletrofisiológico

A preparação, com sua face torácica voltada para cima, foi fixada horizontalmente por meio de alfinetes, em cuba revestida de resina e silicone ("Dow Corning-Sylgard"). Esta foi preenchida com 3 ml de solução Tyrode de composição já descrita no item 3-. A temperatura foi mantida a 30-34°C com o auxílio de uma lâmpada de raios infravermelhos e a aeração realizada com o borbulhamento de carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂). Para a realização das observações eletrofisiológicas a cuba foi colocada na platina de microscópio estereoscópio (WILD M7 S- SWITZERLAND) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Usou-se a técnica convencional de registro com microeletrodo (FATT & KATZ, 1951). Os microeletrodos de vidro, preparados com o auxílio do "Vertical Pipete Puller" (modelo 700 D - David Kopf Instruments - Califórnia USA), foram preenchidos com KCl 3M, tendo uma resistência entre 8-25 MΩ. As micropipetas foram introduzidos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador "Leitz", para a medida do potencial de repouso (PR) e captação dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm). O eletrodo indiferente constituiu-se de um fio de platina incluído em tubo de vidro e submerso em mercúrio vivo, onde colocou-se um tubo curvo (para adaptação à cuba) preenchido com ágar-salina. O PR foi registrado "on line" usando-se microcomputador XT - DICOM (HAWGOOD & SMITH, 1989) com capacidade de registro para potencial de repouso, forma de onda dos potenciais, bem como as análises da amplitude e tempo para o pico dos potenciais

evocados. Os pptm foram registrados em osciloscópio TEKTRONIX e fotografados por câmara fotográfica POLAROID C-5C TEKTRONIX, ou em fisiógrafo GOULD RS 3400. A medida do PR foi feita na região das placas motoras terminais e também aleatoriamente em regiões distantes destas.

O estudo do efeito causado pela peçonha de *Micrurus nigrocinctus* foi realizado medindo-se o PR e o pptm antes e 5, 10, 15, 30, 45, 60-90 minutos após a adição do veneno, e comparando-se com os valores obtidos no controle. Quatro a 10 fibras foram empaladas em cada região, nos diferentes momentos de leitura durante o experimento. Para o registro dos pptm, foram empaladas 1-3 placas motoras. Os resultados mostrados constituem-se portanto, de uma média das várias medidas efetuadas a cada tempo de registro durante o período de experimento.

Algumas medidas do PR foram realizadas após incubação da preparação com d-tubocurarina (dtc) e α -bungarotoxina (α -BuTX), antes da adição do veneno (10 ug/ml):

* dtc (10ug/ml): Foi incubada com a preparação durante 15 min, ou até que o músculo não mais respondesse à estimulação do nervo frênico. Logo a seguir, adicionou-se a peçonha e procedeu-se o registro do PR durante o período já estabelecido.

* α -BuTX (3-5 ug/ml): Seguiu-se o mesmo protocolo estabelecido para a dtc, com um tempo de pré-incubação em torno de 50 min.

9- Estudo da Liberação de Creatinoquinase em Músculo ELD de Camundongo.

Após a retirada da preparação, segundo a técnica descrita no item 6-, o músculo ELD foi colocado em tubo de ensaio preenchido com 2ml de solução de Tyrode, e mantido sob aeração constante com carbogênio, à 37°C. Antes do início do experimento, procedeu-se a lavagem da preparação por um período de 30 a 60min, com intervalos de 15min. Posteriormente, alíquotas do banho (100ul) foram retiradas aos 0, 15, 30, 60 e 90 min de incubação com diferentes doses da peçonha (5, 10 e 20ug/ml). Estas foram analisadas usando-se o "kit" Sigma 520 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para determinação dos níveis de CK. Algumas preparações foram submetidas ao mesmo protocolo na ausência do veneno (controle negativo da liberação de CK), e outras foram incubadas com uma solução de Triton X-100 a 1% (controle positivo). Tais resultados foram lançados em um gráfico que relaciona a liberação de CK em UI, bem como sua porcentagem em relação à liberação máxima (100%) evocada pelo Triton X-100 aos 90 min de incubação. Uma unidade de CK corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 25°C.

10- Estudo Morfológico

Após a retirada da preparação, segundo a técnica descrita no item 4-, e separação do hemidiafragma, o músculo foi colocado com sua face torácica voltada para cima, em uma placa de Petri preenchida com 4ml de solução de Tyrode; foi fixado através de

alfinetes sobre o fundo preenchido com cera utilidade (uso odontológico), e mantido à 37°C, sob aeração constante com carbogênio. Alguns experimentos foram realizados à temperatura ambiente (24-26°C) ou com pré-incubação do veneno com o soro anti- *M. nigrocinctus* (7,5-8,5 ul/ ug de veneno) por 30 min à 37°C. Diferentes doses da peçonha (1, 5, 10 e 20ug/ml) foram adicionadas à cuba, e deixadas em contato com a preparação durante 60min. Preparações controle (sem veneno) foram submetidas às mesmas condições. Após a incubação, o músculo diafragma foi rapidamente submetido à fixação com Fixador Karnovsky (Glutaraldeído 3% + Paraformaldeído 1% em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,3) e dividido em pequenos fragmentos na região do nervo frênico. Estes foram separados em duas porções, para posterior observação dos aspectos ultraestruturais através da Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura. Assim, uma parte do material foi pós-fixada em Tetróxido de Ósmio 1%, contrastada em Uranila, e posteriormente, incluída em blocos de resina Araldite. Cortes semi-finos foram corados com Azul de Toluidina 0,5% + Borato de Sódio 0,5% para observação ao Microscópio Óptico; enquanto os cortes ultra-finos foram contrastados com Citrato de Chumbo para observação ao Microscópio Eletrônico Zeiss EM-952. A outra parte dos fragmentos do músculo diafragma foi submetida ao método KOH-Colagenase modificado, descrito por USHIKI, T. & IDE, C. (1988), e posteriormente passadas no ponto crítico, montadas sobre os "estubs" e metalizadas com ouro. Estas foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM - T300.

IV- RESULTADOS

PORTE I: ESTUDO MIOGRÁFICO1- Preparação Nervo Frênico - Diafragma de Camundongo:1.1- Estimulação Indireta:

Em 24 experimentos realizados, doses de 1 ug/ml (n=3), 5 ug/ml (n= 6), 10 ug/ml (n= 8) e 20 ug/ml (n= 7) do veneno foram adicionadas à solução nutritiva na cuba. Observou-se bloqueio dose-dependente da resposta contrátil do músculo, conforme mostram a Fig.2A, e a Tabela 1:

TABELA 1

	DOSE DO VENENO		
	5 ug/ml	10 ug/ml	20 ug/ml
TEMPO PARA BLOQUEIO 50%	84,3 ± 13min	38 ± 2,9min	30,6 ± 1,4min

Em dois experimentos a concentração de 5 ug/ml determinou bloqueio da resposta muscular inferior a 50% após 90 min de incubação. A dose de 1 ug/ml não reduziu de modo significativo a resposta contrátil ao final de 60 min. Nas doses mais elevadas (10 e 20 ug/ml) registrou-se contratura da preparação. Este efeito exibiu amplitude da ordem de $6,6 \pm 1,1$ mm e $7,3 \pm 1,8$ mm com 10 e 20 ug/ml do veneno, respectivamente.

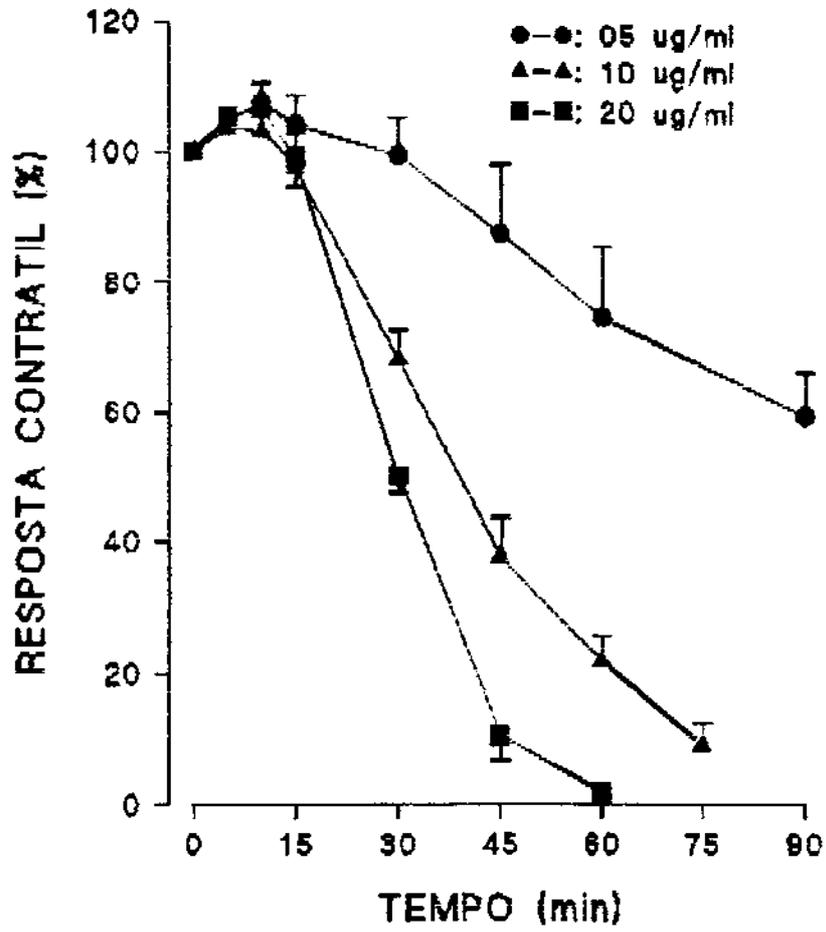
Vários tratamentos foram efetuados na tentativa de reverter ou impedir o bloqueio da resposta contrátil, induzido pela peçonha de *Micrurus nigrocinctus*:

* Neostigmina (0,5-2,5 ug/ml): Foi adicionada a 7 preparações, quando a resposta contrátil encontrava-se reduzida a $13,6 \pm 3,1\%$ do controle (fig.2B). Observou-se o efeito facilitatório da neostigmina sobre a resposta contrátil, induzindo rápido aumento da amplitude das contrações para valores de $65,2 \pm 12,2\%$ após 1 a 3 min de exposição, porém após este período o bloqueio voltou a instalar-se, evoluindo para bloqueio total. No entanto, este efeito facilitatório da neostigmina só esteve presente na vigência de uma resposta contrátil residual do músculo diafragma, pois quando adicionada após bloqueio total das contrações musculares nenhum efeito facilitatório foi observado (fig.2C).

* 3,4-diaminopiridina (25 ug/ml): Foi adicionada a 2 preparações, nas mesmas condições citadas anteriormente, porém nenhum efeito significativo sobre a resposta contrátil foi observado, mesmo quando adicionada a neostigmina (fig.2D).

Fig. 2: BLOQUEIO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DA PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO - DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO, SOB ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA INDIRETA. Observe o bloqueio dose-dependente da resposta contrátil, o qual é precedido de um pequeno aumento na amplitude das contrações (5-15%). Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 6-8 experimentos (2A). Em 2B e 2C, note que a neostigmina (neo) é capaz de induzir aumento parcial e transitório na amplitude das contrações apenas quando o bloqueio não é total. A 3,4-diaminopiridina (2D), bem como lavagens (W) sucessivas da preparação também mostraram-se ineficazes.

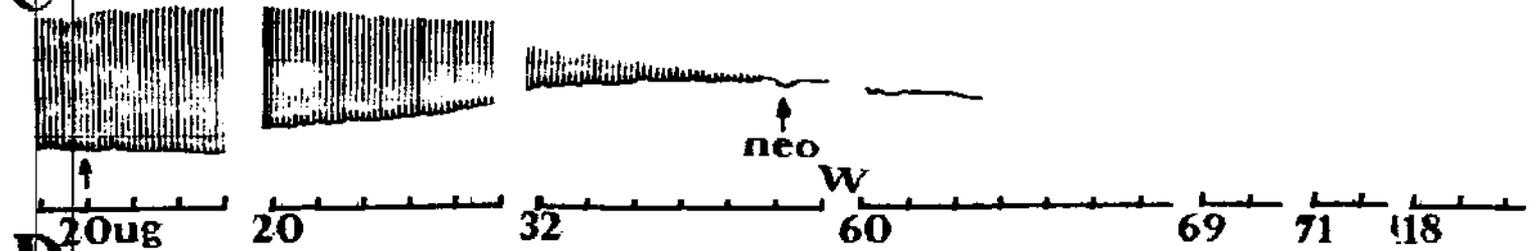
A



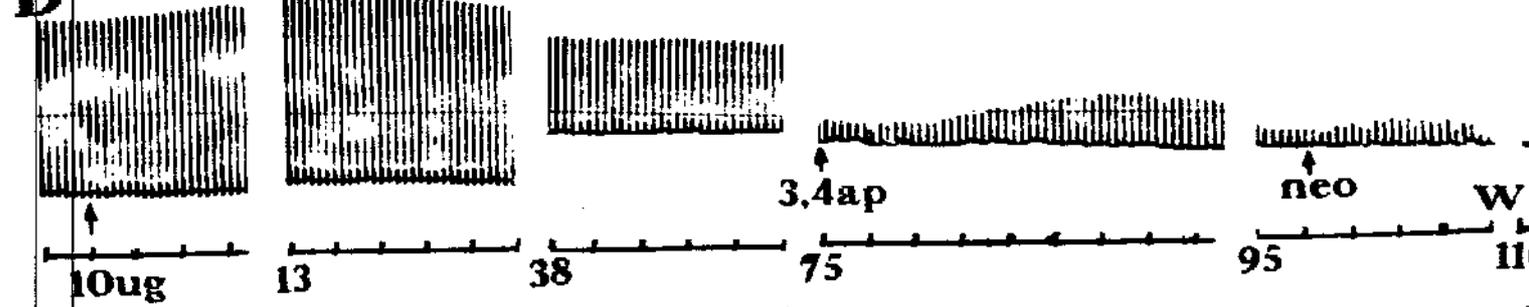
B



C



D



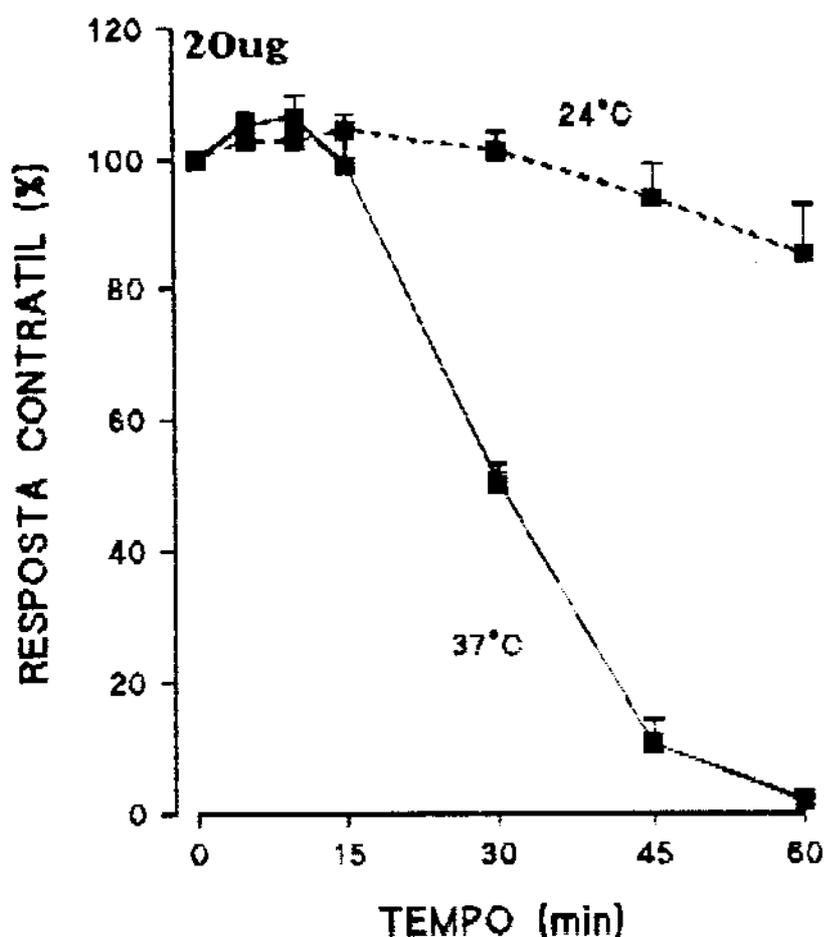
* Lavagem da preparação (W): Após a instalação de bloqueio total, repetidas lavagens da preparação durante 30 min foram ineficazes em reverter o bloqueio (fig.2B, 2C e 2D).

* Alteração da temperatura de incubação: Em 2 experimentos realizados usando-se a dose de 10 $\mu\text{g/ml}$, a peçonha foi adicionada simultaneamente a preparações mantidas à temperatura ambiente (24-26°C) e à 37°C. Observou-se a ausência de efeito nas preparações mantidas à temperatura ambiente e bloqueio total à 37°C (fig.3B). Além disso, foram realizados 3 experimentos com a dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ em preparações mantidas à temperatura ambiente, e 1 experimento à 37°C com o veneno previamente fervido. Observou-se que, apesar da dose de 20 $\mu\text{g/ml}$ ser capaz de induzir bloqueio total e contratura em tempo não superior a 60 min, tais resultados não ocorrem quando as preparações estão à temperatura ambiente, ou quando o veneno é fervido. A amplitude de contração muscular da preparação ao final de 60 min à 25°C é de $79,4 \pm 12,6\%$ em relação ao controle. Porém, quando no mesmo experimento, a temperatura foi novamente elevada à 37°C, observou-se rápida redução na amplitude das contrações até $57,2 \pm 14,9\%$ no primeiro minuto e instalação do bloqueio da ordem de $87 \pm 5\%$ ao final de 30 min (fig.3C).

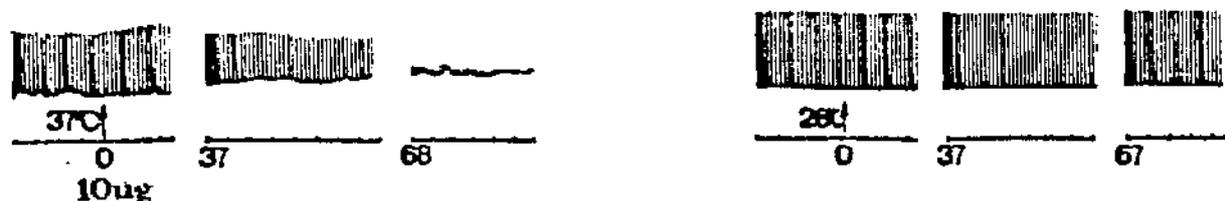
* Soro anti-Micrurus nigrocinctus: Foram realizados 2 experimentos, utilizando-se a dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ de veneno previamente incubado à 37°C, com 5 μl de soro/ μg de veneno, por 30 min. Estes experimentos foram simultâneos a outros em que o soro não foi utilizado. Observou-se a ausência de bloqueio total ao final de 60 min, e proteção de 60% da resposta contrátil

naquelas preparações em que o veneno foi pré-incubado com o soro (fig.4A). Proteção foi igualmente observada, quando se aumentou a dose do veneno para 20 ug/ml. Por outro lado, o bloqueio 100% ocorreu quando o veneno foi adicionado sozinho, ou quando pré-incubado com soro anti-botrópico. Em outro experimento o soro anti- *M. nigrocicntus*, na dose de 20 ul/ug de veneno, foi adicionado após 20 min da adição do veneno (10 ug/ml). Observou-se proteção superior a 80% sobre a resposta contrátil, tanto à estimulação elétrica indireta como direta (fig.4B). Proteção semelhante foi registrada quando a dose de 10 ul de soro/ug foi acrescentada 10 min após a adição do veneno. A porcentagem de diminuição na resposta contrátil (12-15%) após o tratamento com o soro, foi igual àquela registrada quando este foi adicionado sobre preparações controle.

A



B



C

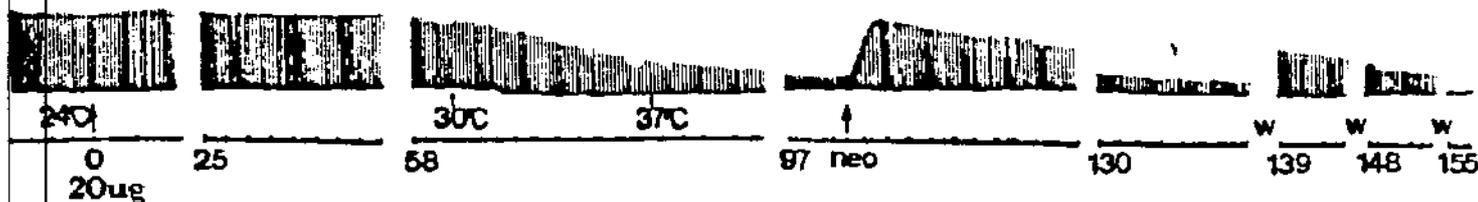


Fig. 3: EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O BLOQUEIO DA RESPOSTA CONTRÁTIL À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA INDIRETA DA PREPARAÇÃO DE CAMUNDONGO. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 2-4 experimentos. Observe o efeito protetor exercido pela temperatura (24-26°C), em preparações realizadas simultaneamente usando-se a mesma solução do veneno e músculos do mesmo animal (contralaterais) (3B e 3C).

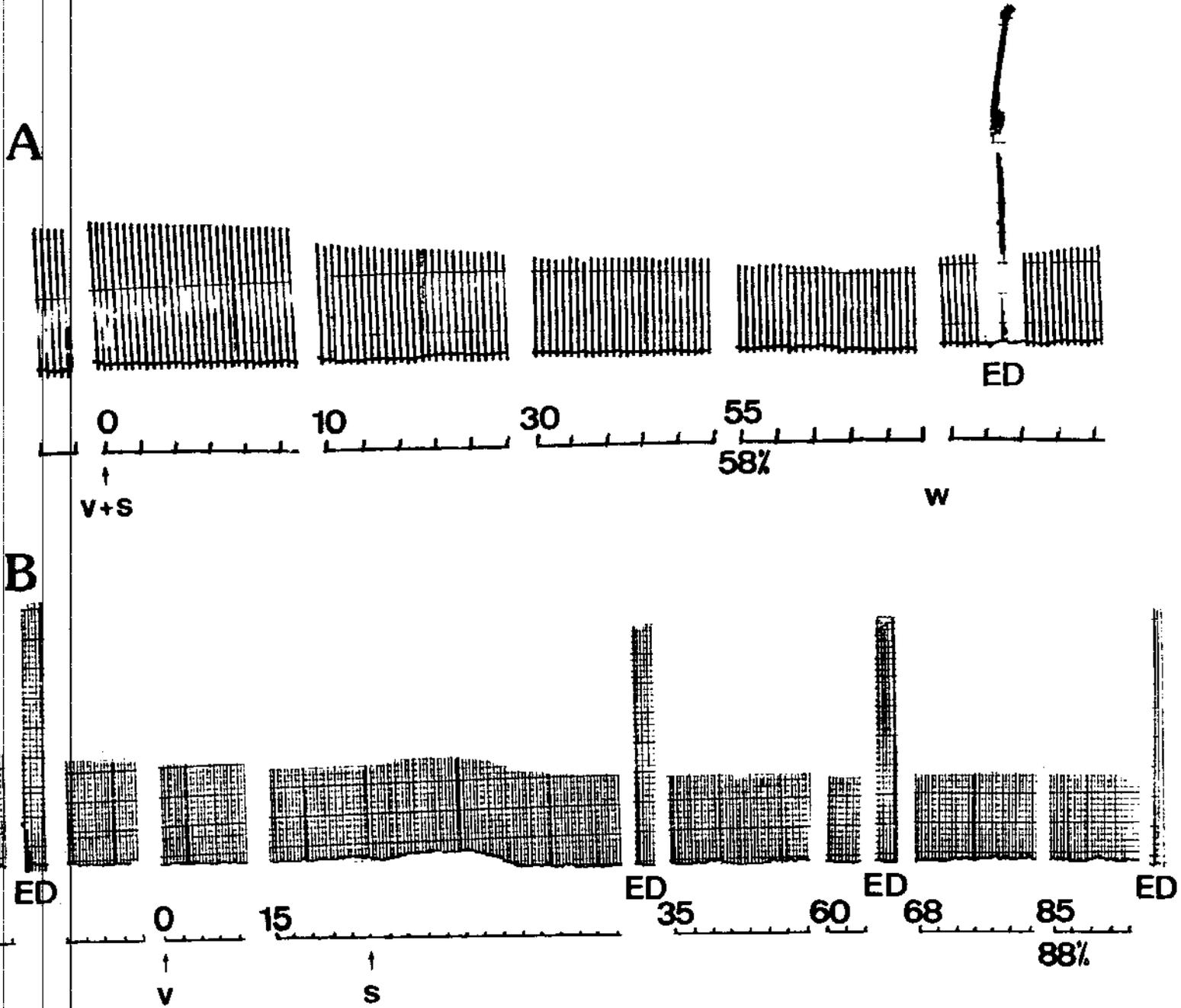


Fig. 4: AÇÃO PROTETORA *IN VITRO* DO SORO ANTI-*M. nigrocinctus* (S), SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA INDIRETA DA PREPARAÇÃO. Observe a preservação da resposta muscular quando o veneno (V= 10 ug) é pré-incubado com o soro (S= 5 ul/ug de V) (4A), ou quando o soro (20 ul/ug de V) é adicionado 20 min após o veneno (10 ug) (4B). ED: Estimulação Direta; W: Lavagem.

1.2- Estimulação Direta:

Neste grupo de experimentos foram utilizadas as doses de 5 ug/ml (n= 3), 10 ug/ml (n= 4) e 20 ug/ml (n= 3). À semelhança do que ocorre com as respostas à estimulação indireta, observou-se bloqueio dose-dependente da resposta contrátil (fig.5A). O tempo para bloqueio 50% está relacionado na tabela abaixo (tab. 2):

TABELA 2

	DOSE DO VENENO		
	5 ug/ml	10 ug/ml	20 ug/ml
TEMPO PARA BLOQUEIO 50%	85 ± 1,7min	51,8 ± 7,3min	22,7 ± 5,2min

O efeito contraturante é também dose-dependente. Observou-se contratura em 8 dos experimentos, sendo mais acentuada nas doses de 10ug/ml (9 ± 2mm) e 20 ug/ml (12,3 ± 4mm). Contratura de 5mm foi observada em apenas um dos experimentos usando-se 5 ug/ml de veneno.

* Lavagens sucessivas da preparação: Mostraram-se igualmente ineficazes em reverter o bloqueio total (fig.5B).

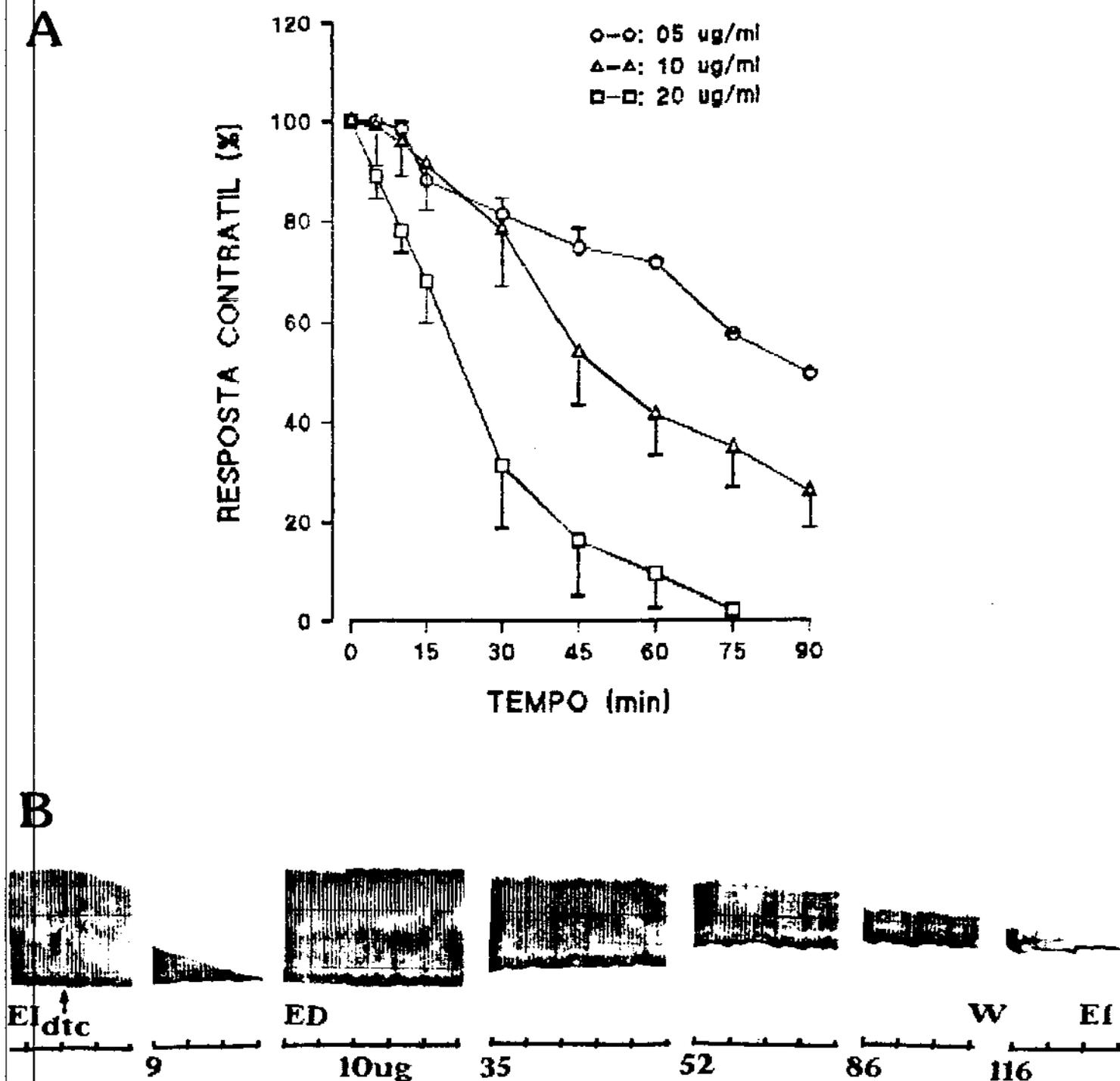


Fig. 5: BLOQUEIO DA RESPOSTA CONTRÁTIL À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DIRETA (ED) DO MÚSCULO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGO. Observe o bloqueio dose-dependente da resposta muscular. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3-4 experimentos (5A). EI: Estimulação Indireta; W: Lavagem.

2- Preparação Diafragma Cronicamente Desnervado de Camundongo

Observou-se que, tanto em condições controle como em preparações incubadas com o veneno (1, 5 e 10 ug/ml), a resposta muscular máxima foi obtida com a concentração de 160 ug/ml de ACh. Houve no entanto, redução importante na amplitude da resposta muscular de forma dose-dependente e sugestiva de bloqueio não competitivo. Além disso, o bloqueio da preparação mostrou-se irreversível quando a dose de 10 ug/ml foi utilizada (fig. 6).

Nos experimentos realizados com pré-tratamento observou-se:

* d-tubocurarina (dtc - 10 ug/ml): Foi capaz de promover proteção apenas parcial à contratura evocada pela ACh (10 ug/ml) quando esta foi adicionada após 30 min de incubação com o veneno (5 ug/ml) (fig. 7A).

* soro anti- *M. nigrocinctus* (20 ul/ug de veneno): Observou-se proteção total da resposta à ACh (10ug/ml), com o registro de 100% de sua resposta contraturante após 30 min da adição do veneno (fig. 7B).

Em experimentos com o músculo biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica de campo, a dose de 5 ug/ml de veneno induziu bloqueio total da contratura à ACh (20 ug/ml) após o bloqueio da resposta contrátil. Porém, não houve alteração da resposta muscular ao KCl (53,6 mM) (fig.7C)

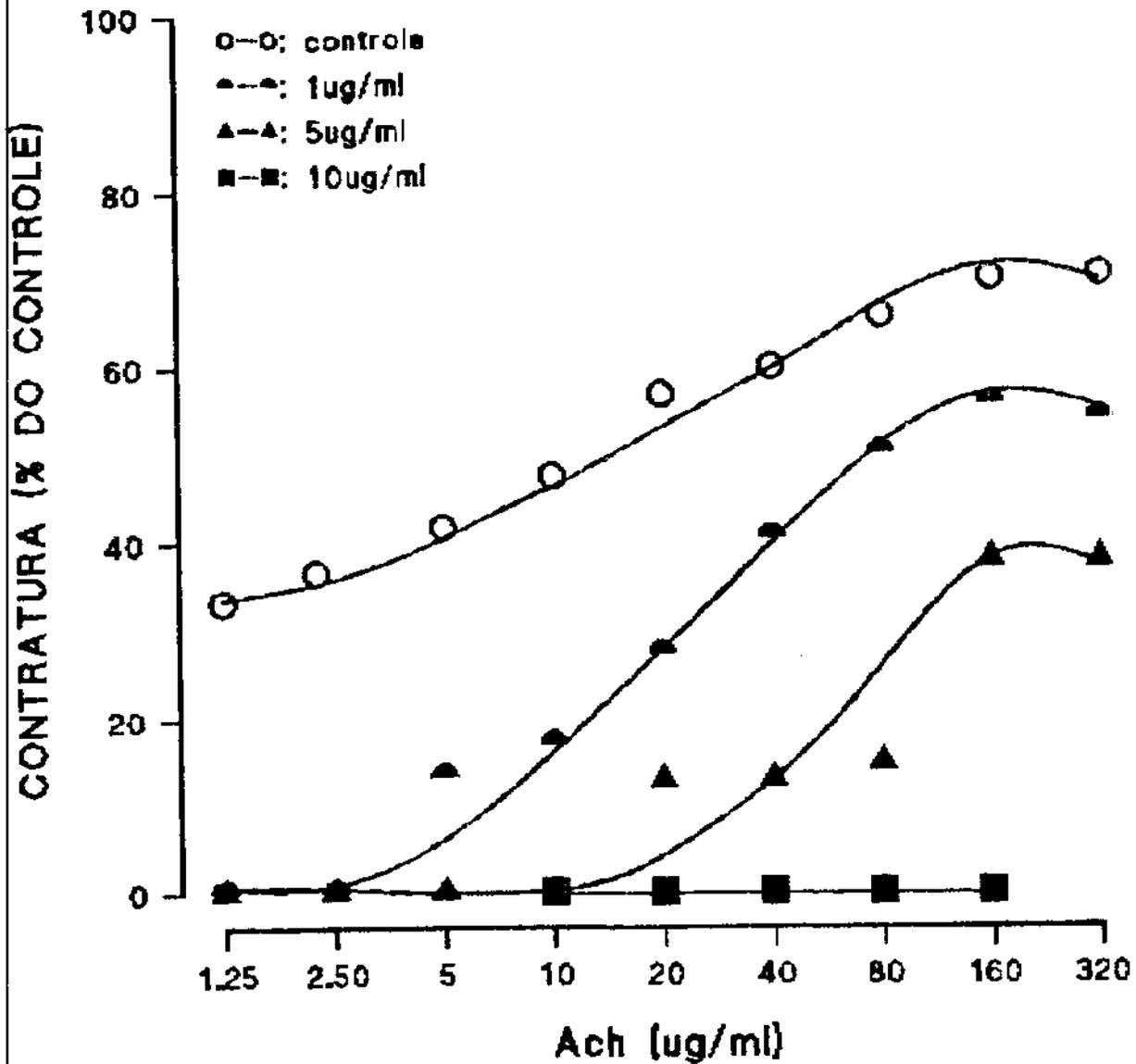


Fig. 6: EFEITO DO VENENO DE *M. nigrocinctus* SOBRE A CURVA DOSE-RESPOSTA DA ACETILCOLINA (ACh) EM DIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO DE CAMUNDONGO. Observe a redução da resposta máxima à ACh e o bloqueio irreversível induzido pela dose de 10 ug/ml do veneno. Cada ponto corresponde à média de 1-3 experimentos.

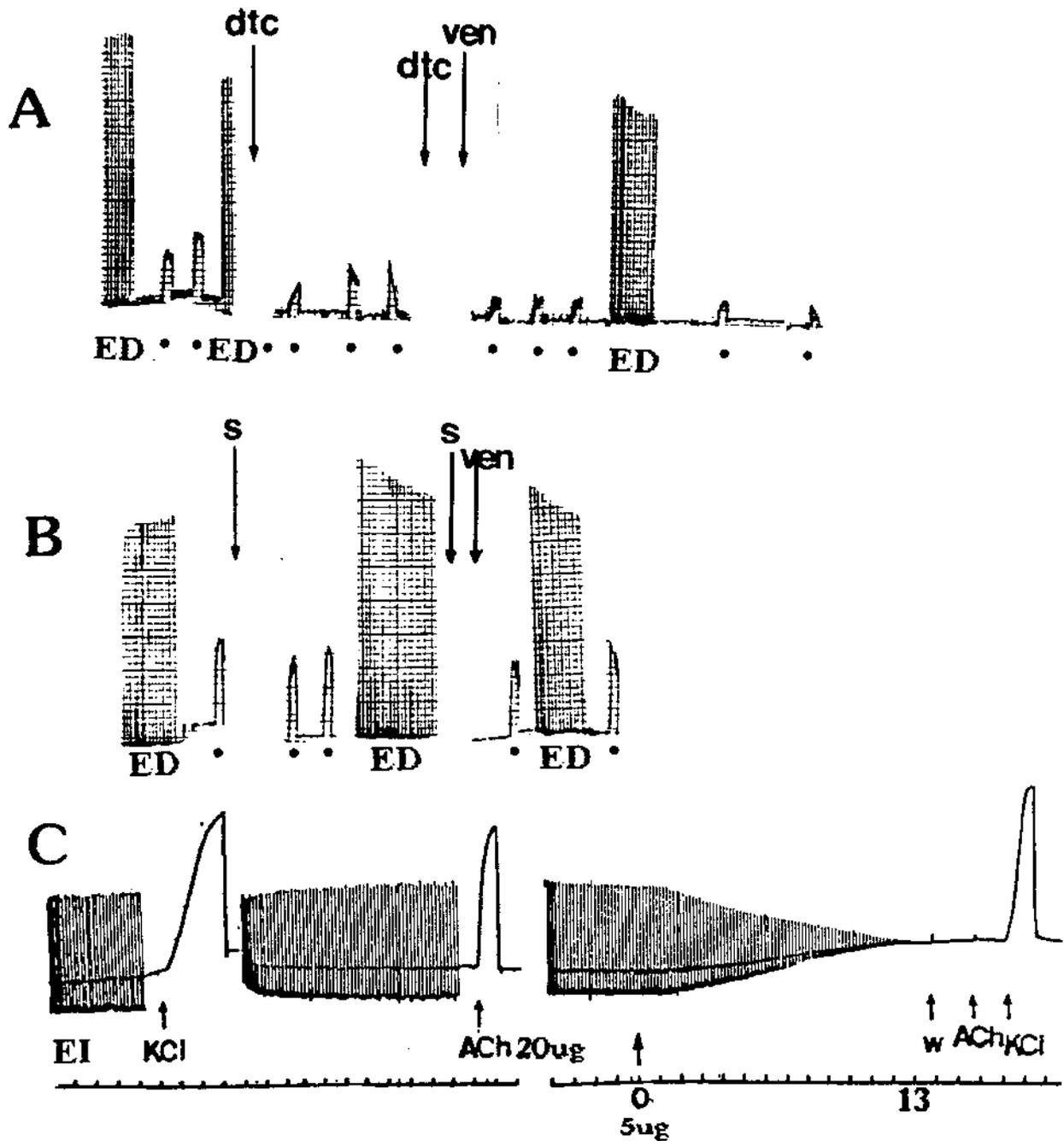


Fig. 7: EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DO MÚSCULO DIAFRAGMA COM D-TUBOCURARINA ANTES DA ADIÇÃO DO VENENO (ven= $5\mu\text{g}$), E DA PRÉ-INCUBAÇÃO DO VENENO COM O SORO ANTI- *M. nigrocinctus*. Note a proteção máxima exercida pelo soro (S= $20\text{ ul}/\mu\text{g}$ de ven.) (7B), enquanto a dtc (dtc= $10\mu\text{g}/\text{ml}$) (7A) promove proteção apenas parcial da resposta à Acetilcolina ($\bullet=10\mu\text{g}$). A resposta contrátil ao estímulo direto (ED) não sofreu alteração em ambas as preparações. Em 7C, a preparação biventer cervicis de pintainho mantém sua resposta muscular ao KCl ($53,6\text{ mM}$) após o bloqueio total das respostas à ACh e ao estímulo elétrico indireto (EI).

PARTE II - ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

1- Potencial de Repouso:

Em 21 experimentos realizados, doses de $1\mu\text{g/ml}$ ($n= 4$); $5\mu\text{g/ml}$ ($n= 4$); $10\mu\text{g/ml}$ ($n= 8$) e $20\mu\text{g/ml}$ ($n= 5$) do veneno total foram adicionadas à solução da cuba.

O veneno de *M. nigrocinctus* induziu redução dose-dependente do potencial de membrana da fibra muscular (fig.8A). Observou-se despolarização de evolução gradativa, a qual ocorreu igualmente na região de placa motora e na fibra muscular ($p > 0,05$ - teste t-Student)) (fig.8B). Apesar de tal observação, quando as duas regiões foram comparadas com os experimentos controle, verificou-se que o efeito despolarizante do veneno ocorreu primeiramente sobre a placa motora ($p<0,05$), ou seja, já aos 5 minutos de incubação, enquanto na fibra muscular ocorreu entre 15 e 30 min.

As doses de 1, 5 e $10\mu\text{g/ml}$ produziram despolarização de evolução lenta, a qual não ultrapassou 26% ao final de 90 min de incubação, em ambas regiões de observação. Por outro lado, a dose de $20\mu\text{g/ml}$ induziu despolarização de evolução mais rápida e próxima a 40%.

Os experimentos realizados com pré-tratamento da preparação mostraram os seguintes resultados:

* dte ($10\mu\text{g/ml}$): Esta foi adicionada em 3 preparações e promoveu uma proteção parcial sobre o efeito despolarizante do veneno ($10\mu\text{g/ml}$). Apesar de parcial, a proteção mostrou-se significativa ($p<0,05$) em relação aos experimentos realizados sem

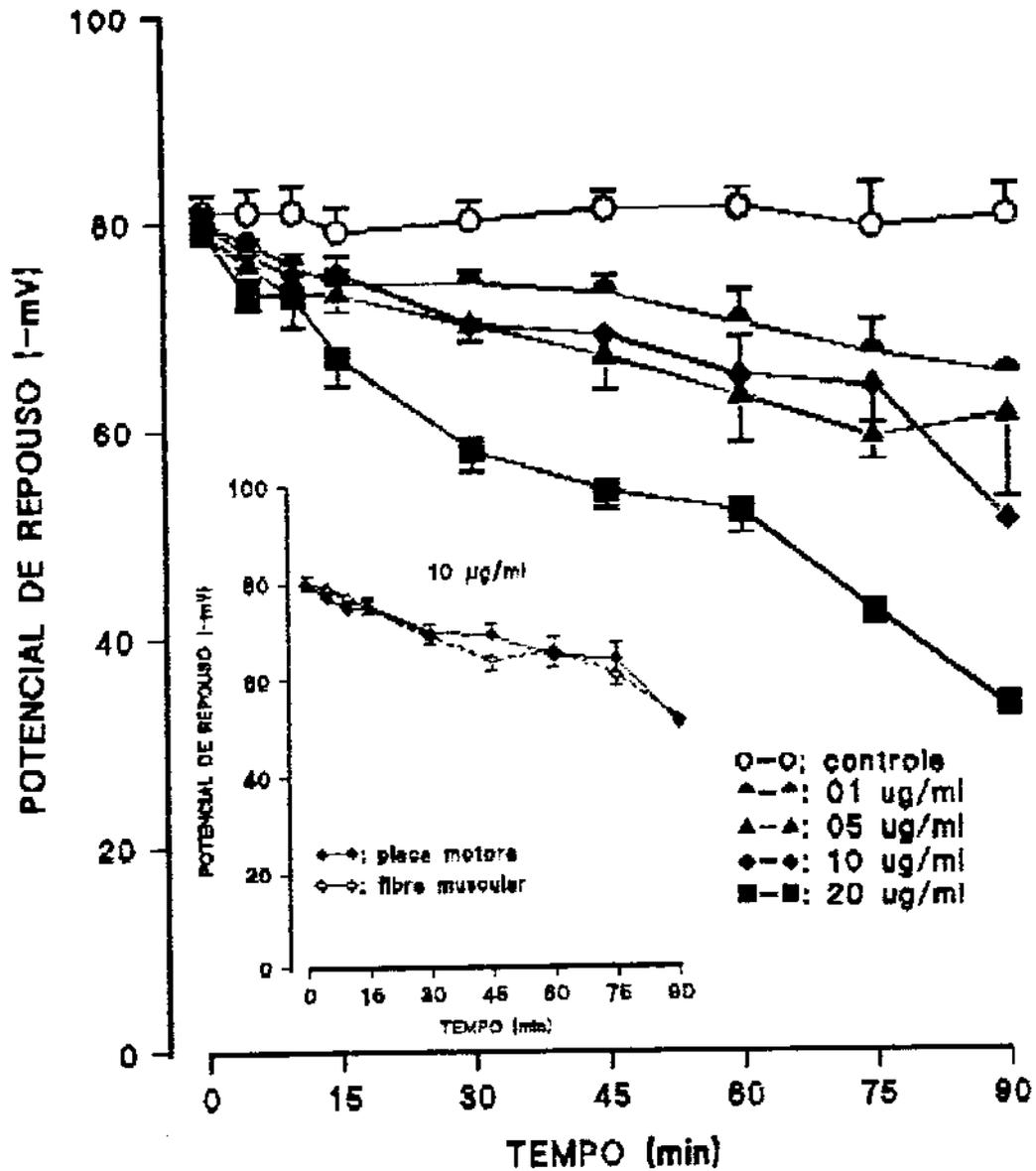


Fig. 8: EFEITO DESPolarIZANTE DO VENENO TOTAL DE *M. nigrocinctus* SOBRE O POTENCIAL DE REPOUSO DA PLACA MOTORA E FIBRA MUSCULAR. Note o efeito dose-dependente (8A) e a ocorrência de despolarização em ambas as regiões (8B). Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 4-8 experimentos.

o pré-tratamento. O efeito protetor da dtc foi mais acentuado na região da placa motora, na qual registrou-se despolarização somente após 30 min de incubação, porém de menor intensidade quando comparada com a observada nos músculos sem pré-tratamento ($p < 0,05$).

* α -BuTX (3-5 $\mu\text{g/ml}$): Foi adicionada em 4 preparações, registrando-se retardo ainda mais acentuado sobre a evolução do efeito despolarizante. Observou-se proteção total até 45 min após a adição do veneno, seguida de uma despolarização significativamente menor ($p < 0,05$) que a obtida com 10 $\mu\text{g/ml}$ de veneno em preparações sem pré-tratamento. O efeito da α -BuTX também foi mais acentuado na região da placa motora.

Ambos os pré-tratamentos foram capazes de proporcionar um retardo no aparecimento do efeito despolarizante do veneno (fig.9).

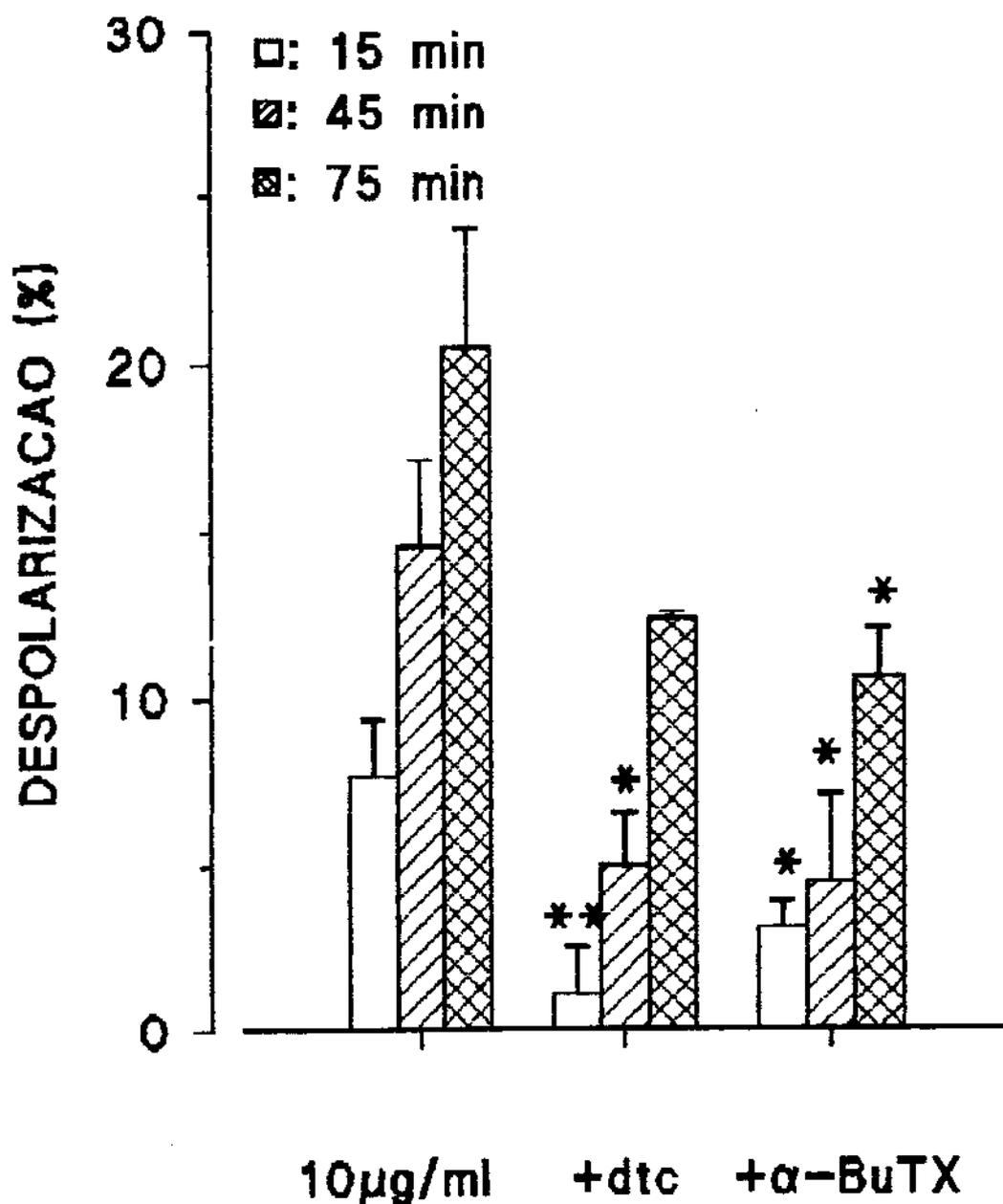
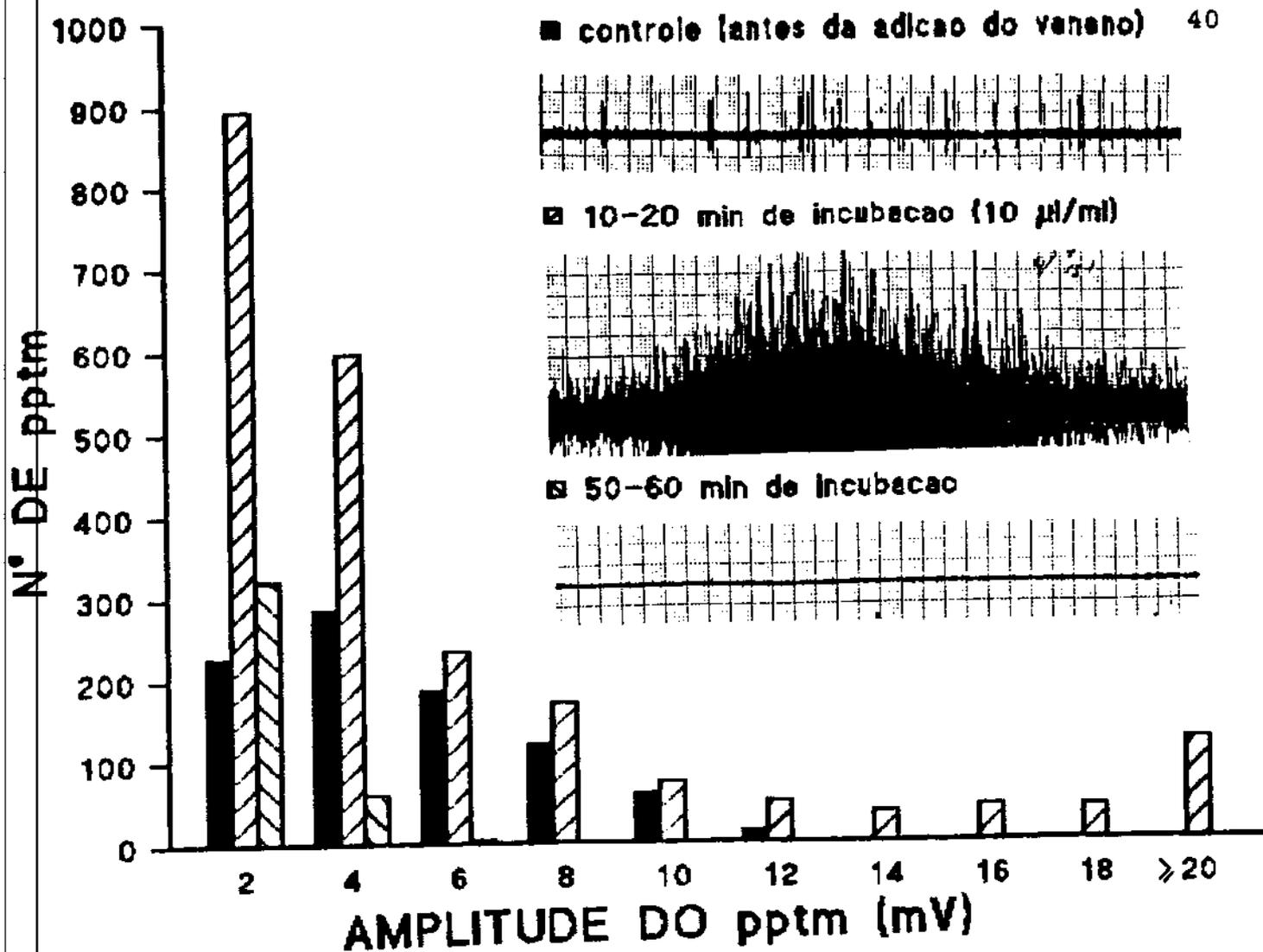


Fig. 9: EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DO MÚSCULO DIAFRAGMA COM D-TUBOCURARINA (dtc - 10 µg/ml) E COM α-BUNGAROTOXINA (α-BuTX). Note a proteção parcial exercida pelo pré-tratamento, sobre a porcentagem de despolarização induzida pelo veneno na região de placa motora. Cada barra corresponde à média ± erro padrão de 3-8 experimentos.

2- Potencial de Placa Terminal em Miniatura:

Os resultados correspondem aos registros de 14 experimentos usando-se as doses de $1\mu\text{g/ml}$ ($n= 1$); $5\mu\text{g/ml}$ ($n= 3$); $10\mu\text{g/ml}$ ($n=8$) e $20\mu\text{g/ml}$ ($n= 2$) do veneno total.

A ação do veneno de *Micrurus nigrocinctus* sobre os pptm caracterizou-se em geral, por um aumento da frequência e da amplitude destes potenciais durante os primeiros minutos de incubação. A seguir, exibiu uma diminuição progressiva da amplitude destes potenciais, até o seu desaparecimento dentro do ruído (fig.10). Esse efeito mostrou ter uma evolução dependente da dose empregada. Assim, concentrações de até $10\mu\text{g/ml}$ determinaram diminuição progressiva da frequência e amplitude dos pptm somente após 20 min de incubação, e seu total desaparecimento aos 60 min de observação. Usando-se $20\mu\text{g/ml}$ no entanto, o efeito surgiu mais precocemente, com inibição total dos potenciais aos 30 min.



FREQUÊNCIA DOS pptm (pptm/min ± erro padrão)

CONTROLE	VENENO (10µg/ml)	
	10 - 20 min	50 - 60 min
(21 placas motoras)	(20 placas motoras)	(26 placas motoras)
40 ± 5	113 ± 35	15 ± 4

Fig. 10: AÇÃO DO VENENO TOTAL DE *M.nigrocinctus* (10 µg/ml) SOBRE A AMPLITUDE E FREQUÊNCIA DOS pptm. Observe o aumento dos pptm nos primeiros minutos de incubação, seguido por um progressivo decréscimo de sua frequência e amplitude, até o desaparecimento.

PARTE III: ESTUDO MORFOLÓGICO

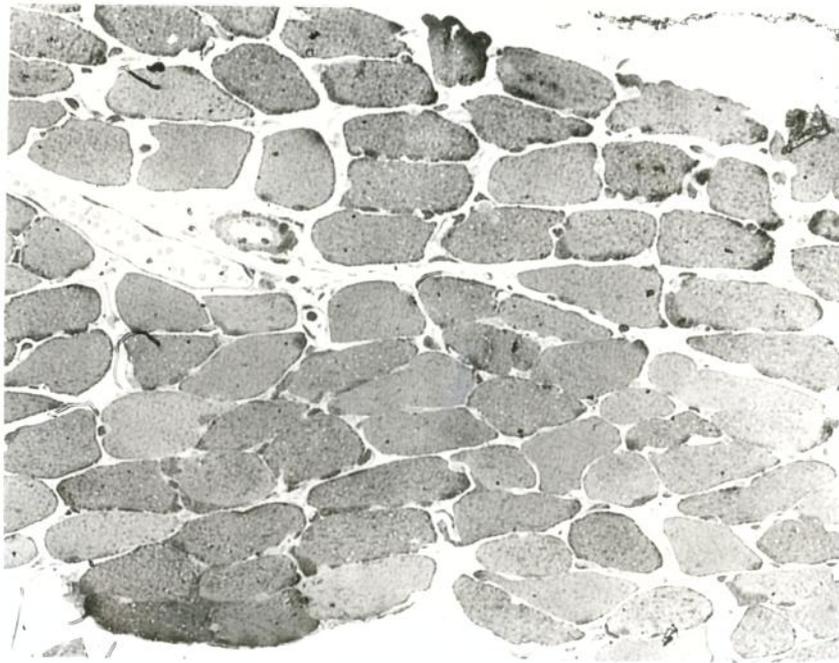
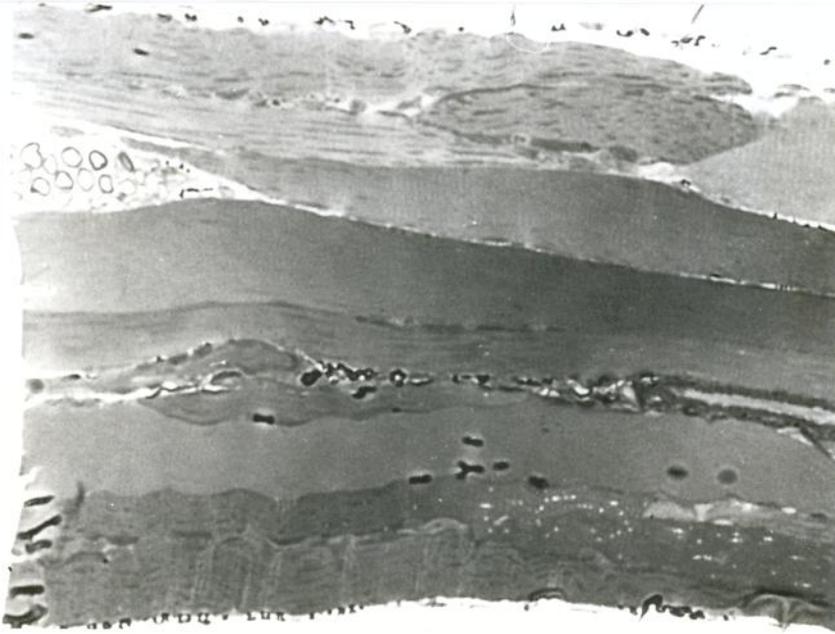
1- Microscopia Óptica

O veneno de *Micrurus nigrocinctus*, nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$, induziu mionecrose evidente sobre as preparações. Este efeito mostrou-se dose-dependente. A mionecrose caracterizou-se pelo aparecimento de alterações do tipo lesões delta sobre a membrana celular, regiões de hipercontração e condensação das miofibrilas alternando-se com espaços vazios no citoplasma, e regiões de lise com desorganização do material intracelular. Este tipo de mionecrose é classificado como miolítico (OWNBY & COLBERG, 1988), ou seja ocorre lesão celular conforme o descrito, porém não há alterações vasculares.

Tanto a pré-incubação do veneno com o soro anti-*M. nigrocinctus*, como a alteração da temperatura de incubação para 24-26°C, protegeram de modo evidente a fibra muscular do efeito mionecrótico do veneno. Esta proteção traduziu-se pela redução do número de fibras lesadas e da intensidade das lesões. (figs.11-19).

Fig. 11: Músculo Diafragma Normal / 60 min em sol. de Tyrode a 37°C: Corte longitudinal mostrando as fibras musculares com núcleos periféricos e estriações transversais. Presença de feixe, com axônios mielinizados. 435x

Fig. 12: Músculo Diafragma Normal / 60 min - 37°C: Corte transversal mostrando as fibras musculares com perfil poligonal e núcleos periféricos. À esquerda uma veia e uma artéria com aspectos normais. 320x



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Fig. 13: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 μ g) / 60 min - 37°C. Músculo diafragma em corte longitudinal: Mionecrose moderada com regiões de hipercontração das miofibrilas, levando a variação dramática do diâmetro da fibra muscular (seta). Espaços vazios, decorrentes da lise do sarcoplasma, são eventualmente observados (ponta de seta). 256x

Fig. 14: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 μ g) / 60 min - 25°C. Músculo diafragma em corte longitudinal: Proteção contra o efeito mionecrótico, fibras com morfologia normal. 408x

Fig. 15: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 μ g) pré-incubado com 8,5 μ l de soro anti- *M. nigrocinctus* / μ g de veneno durante 30min a 37°C / 60 min - 37°C. Músculo diafragma em corte longitudinal: Proteção contra o efeito mionecrótico, fibras com estrutura normal. Abaixo veia contendo hemácias. 383x

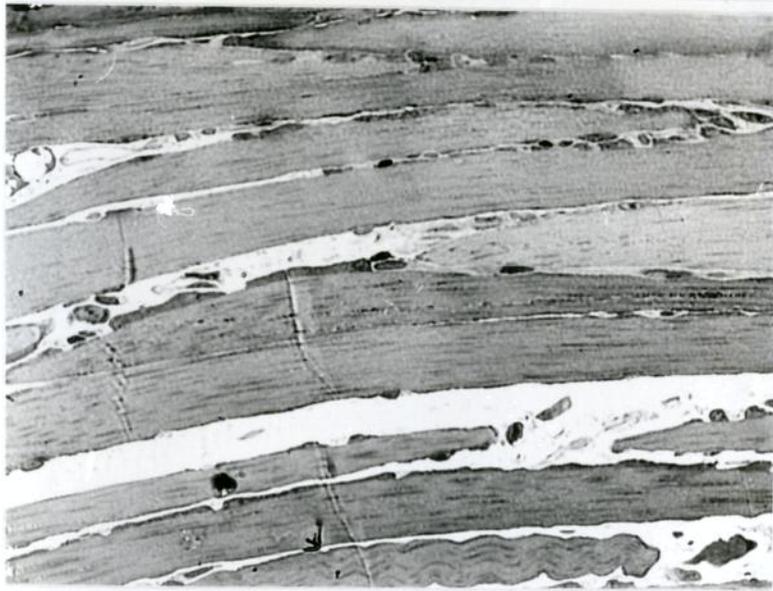


Fig. 16: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 μ g) / 60 min -37°C. Músculo diafragma em corte longitudinal: Mionecrose mais intensa em relação à dose de 10 μ g. Fibras apresentando hipercontração dos miofilamentos e espaços vazios (★), decorrentes da aglutinação anormal dos miofilamentos. Observe o aspecto floculento de algumas células, a presença de vacúolos e o perfil irregular dos limites celulares. 261x

Fig. 17: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 μ g) / 60 min -37°C. Músculo diafragma em corte transversal: Mionecrose severa com fibras apresentando lesões delta (seta), lise do sarcoplasma e miofibrilas densamente agrupadas (★). Observe a presença de microvacúolos e fibras de diâmetros irregulares, algumas hipertróficas com perfil globoso, outras com diâmetro diminuto. Fibras intensamente coradas (negras) indicando alterações mionecróticas estão também presentes. Os espaços vazios dentro do músculo, decorrem provavelmente da lise total de porções da célula. 358x

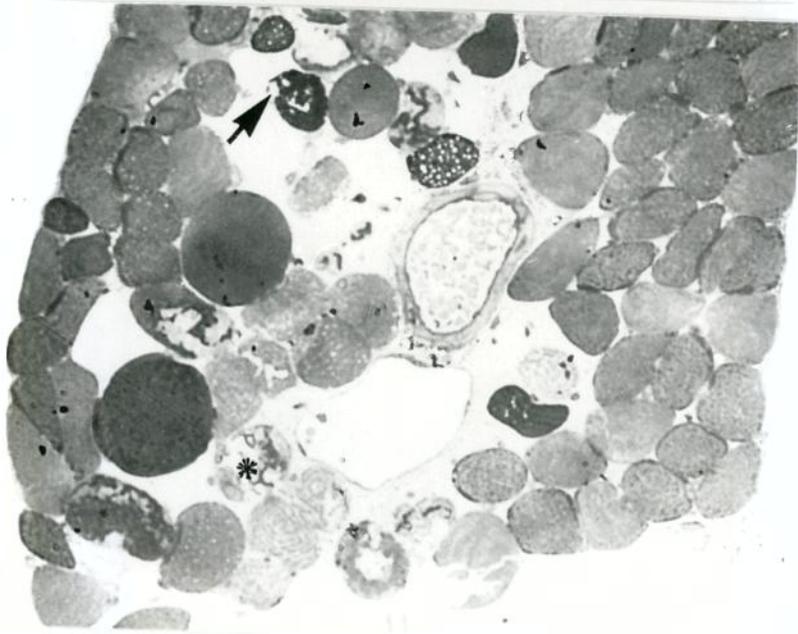
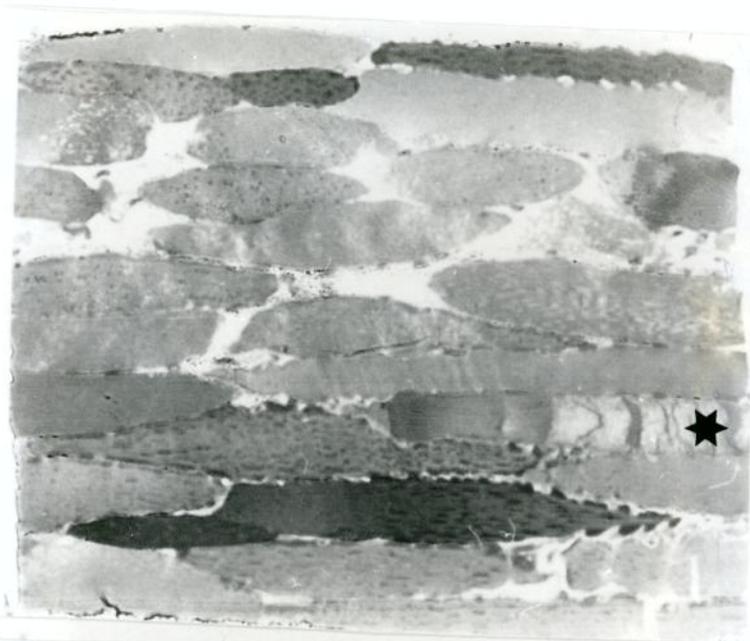


Fig. 18: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 µg) / 60 min -250C. Músculo diafragma em corte longitudinal: Redução drástica do número de fibras lesadas e da intensidades das lesões, o que se reflete na aparência normal das fibras. A alteração da temperatura promoveu proteção contra o efeito mionecrótico do veneno. 301x

Fig. 19: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 µg) / 60 min -250C. Músculo diafragma em corte transversal: Redução evidente na intensidade das lesões. As fibras apresentam-se sem lise do sarcoplasma, sem lesões delta, sem condensamento das miofibrilas. Um fascículo nervoso intramuscular e uma veia são visíveis no corte. 258x



2- Microscopia Eletrônica

2.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):

O exame das micrografias mostrou alterações ultraestruturais, com regiões de ruptura do sarcolema, desorganização das miofibrilas, inchaço das mitocôndrias com alterações nas cristas. Algumas células apresentaram vesículas nos espaços intracelulares, provavelmente provenientes de danos no retículo sarcoplasmático e túbulos T. À nível dos axônios, observou-se o aparecimento de vacúolos membranosos, mitocôndrias igualmente alteradas, axoplasma denso, e alterações no contorno da bainha de mielina. A célula de Schwann apresentou o mesmo padrão de alteração, com citoplasma "lavado" e vacuolar. Também observou-se desorganização do nodo de Ranvier, tanto da região nodal como paranodal, com aumento do comprimento do nodo. Quanto à junção neuromuscular (JNM), observou-se redução da fenda sináptica primária e secundária, e até o desaparecimento das dobras sinápticas em algumas JNM. O número de vesículas de acetilcolina no interior do terminal nervoso mostrou-se reduzido, com o aparecimento de indentações em ômega na membrana do terminal. Outras terminações parecem manter normal o número de vesículas sinápticas, mas estas encontram-se com diâmetros variados entre si.

Também a nível ultraestrutural, foi possível observar proteção da fibra muscular através da pré-incubação do veneno com o soro anti- *M. nigrocinctus*, ou reduzindo-se para 24-26°C a temperatura de incubação. (figs. 20-33).

Fig. 20: Micrografia Eletrônica de Junção Neuromuscular Controle / 60 min em sol. de Tyrode a 37°C. (Acima): Terminais motores (★) apresentando vesículas sinápticas com diâmetros uniformes polarizadas em direção às dobras juncionais, mitocôndrias normais, e acompanhado pela célula de Schwann (CS). A fibra muscular apresenta goteiras que alojam os terminais nervosos (fendas sinápticas primárias) e, em cada uma destas, o sarcoplasma forma dobras irregulares (fendas sinápticas secundárias) (S). A fibra muscular mostra aspecto normal, juntamente com suas mitocôndrias (M). 20308x

Fig. 21: Músculo Diafragma Controle / 60 min - 37°C. Corte longitudinal (Esquerda): Aspecto normal da fibra muscular, mostrando a organização das miofibrilas e sua divisão em sarcômeros, os quais são separados pela linha Z. As mitocôndrias apresentam-se em tamanho normal e o retículo sarcoplasmático com organização normal. 12096x

Fig. 22: Axônios Mielínicos Intramusculares de Preparação Controle / 60 min - 37°C. (Direita): Aspecto normal das mitocôndrias, dos neurofilamentos, microtúbulos, da bainha de mielina e das bainhas perineurais. 28473x

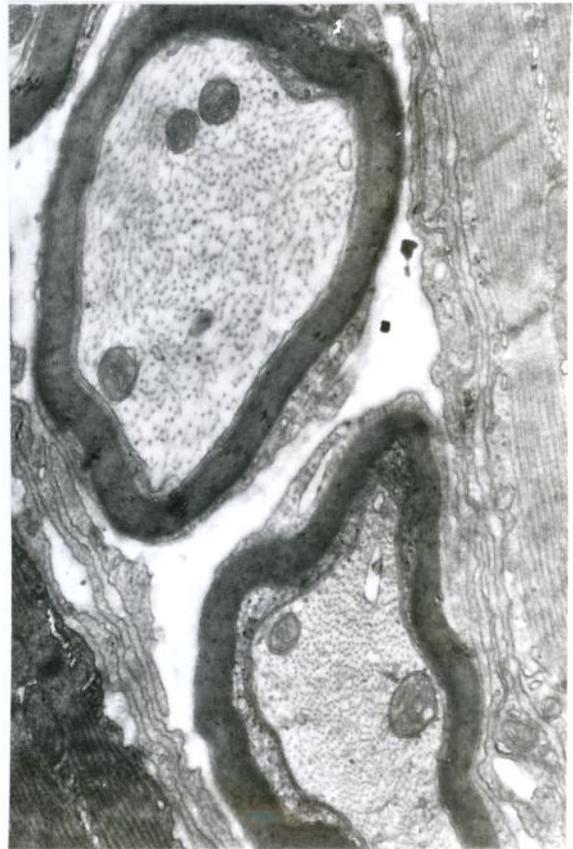
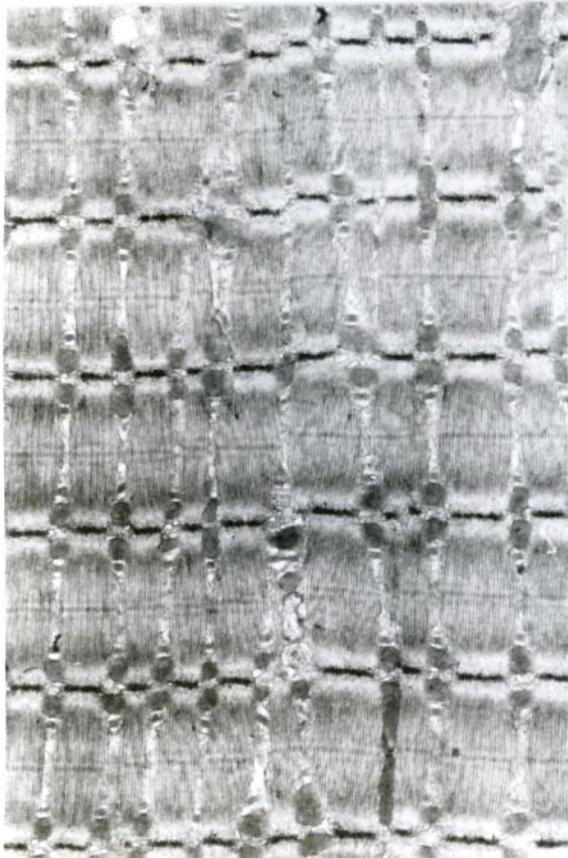
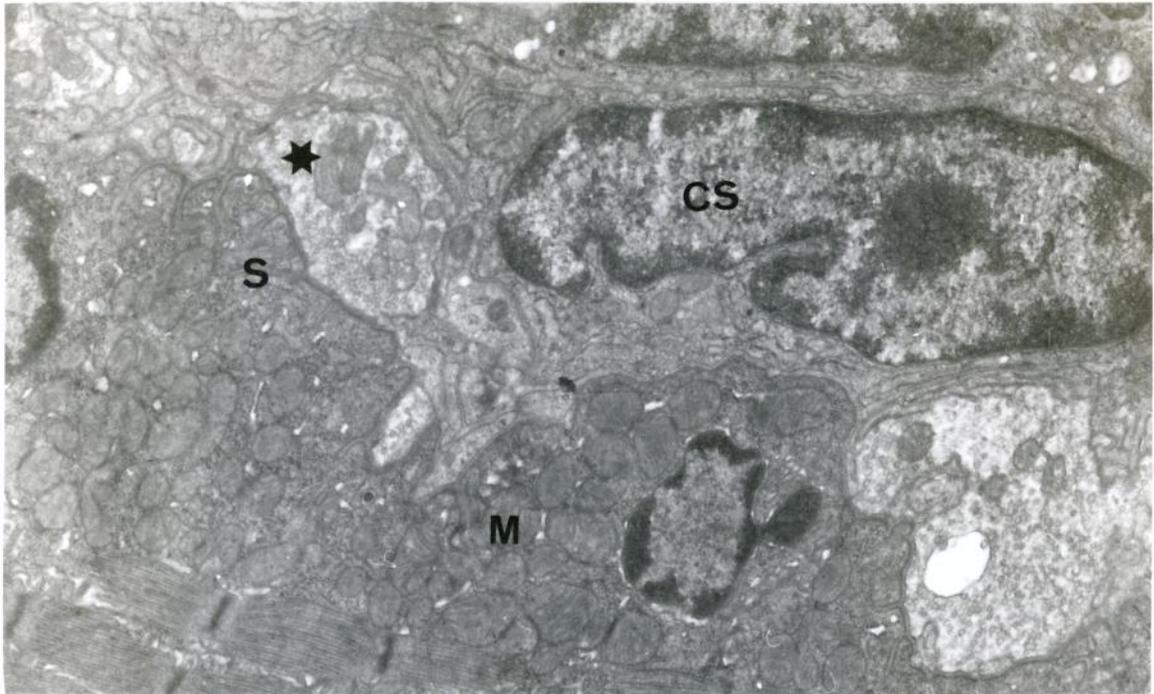


Fig. 23: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 µg) / 60 min - 370C. Axônio mielínico intramuscular (Acima à esquerda): Necrose, com o aparecimento de vacúolos e restos membranosos no interior do axoplasma, mitocôndrias rompidas e bainha de mielina com contorno anormal. A célula de Schwann apresenta sinais degenerativos, com vacúolos, mitocôndrias alteradas e citoplasma "lavado". 16100x

Fig. 24: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 µg) / 60 min - 370C. Nodo de Ranvier (Acima à direita): Alterações na estrutura do nodo de Ranvier e na região paranodal (★). Observe a assimetria do diâmetro do axônio. 29232x

Fig. 25: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 µg) / 60 min - 370C. Micrografia eletrônica mostrando duas fibras musculares em corte transversal (Abaixo): Regiões de ruptura do sarcoplasma (seta), com vesiculação do sarcoplasma, mitocôndrias inchadas e com cristas e matriz alteradas. Observe a desorganização das miofibrilas e do retículo sarcoplasmático. Note que a célula do canto superior não apresenta ainda alterações evidentes. 13824x



Fig. 26: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 µg) / 60 min - 370C. Micrografia eletrônica de Junção Neuromuscular: Terminal nervoso apresentando redução do número de vesículas sinápticas e formações vesiculares sobre o axolema (seta). Observe a superfície corrugada do axolema terminal. As fendas sinápticas primárias encontram-se menos profundas que na preparação controle. As mitocôndrias apresentam-se inchadas e com alterações nas cristas. 28800x

Fig. 27: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 µg) / 60 min - 370C. Micrografia eletrônica de Junção Neuromuscular: Terminal nervoso apresentando diminuição do número de vesículas sinápticas e indentações em ômega (seta). As vesículas sinápticas encontram-se com diâmetros variados entre si e, muitas vezes, polarizadas para a face oposta ao músculo. Observe ainda, edema das mitocôndrias e, à esquerda, uma goteira sináptica sem o terminal, e no lugar projeções digitiformes em corte longitudinal e transversal. Ocorre o desaparecimento das fendas sinápticas e formação de imensos vacúolos sarcoplasmáticos (V). A célula de Schwann mostra alterações das mitocôndrias. 13824x

Fig. 28: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 µg) / 60 min - 370C. Micrografia eletrônica de Junção Neuromuscular: Terminal nervoso com vesículas sinápticas de diâmetros bastante variados entre si. Contorno irregular do axolema, com o aparecimento das indentações em ômega e formações vesiculares. Ocorre desorganização das dobras juncionais e as projeções da célula de Schwann mostram cisternas de retículo endoplasmático rugoso bastante expandidas. 14500x

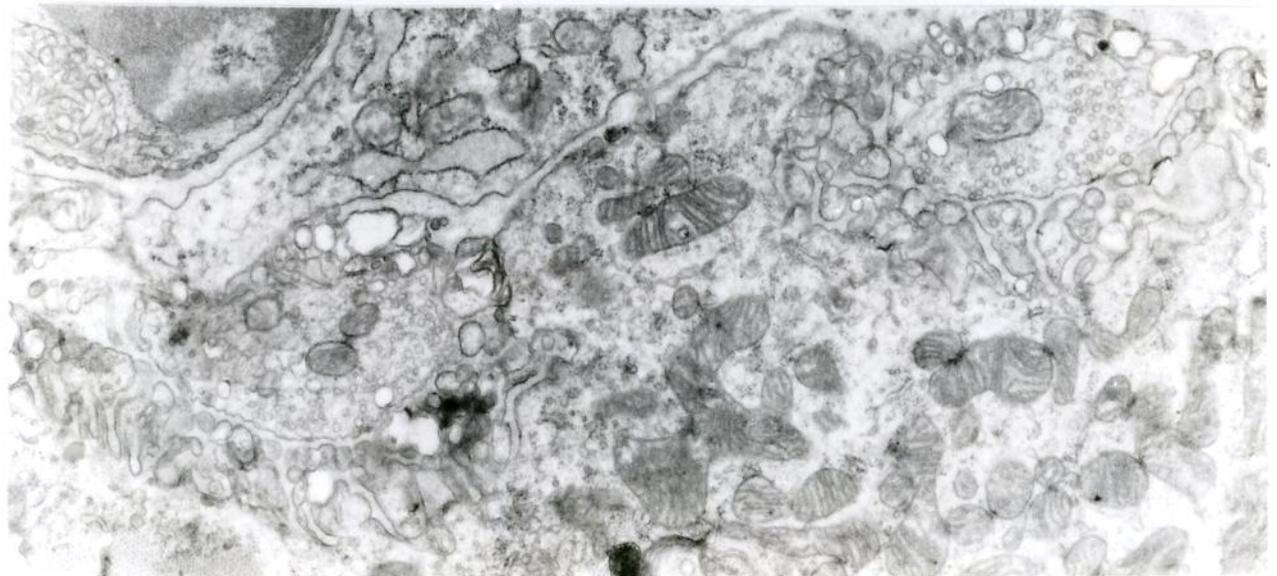
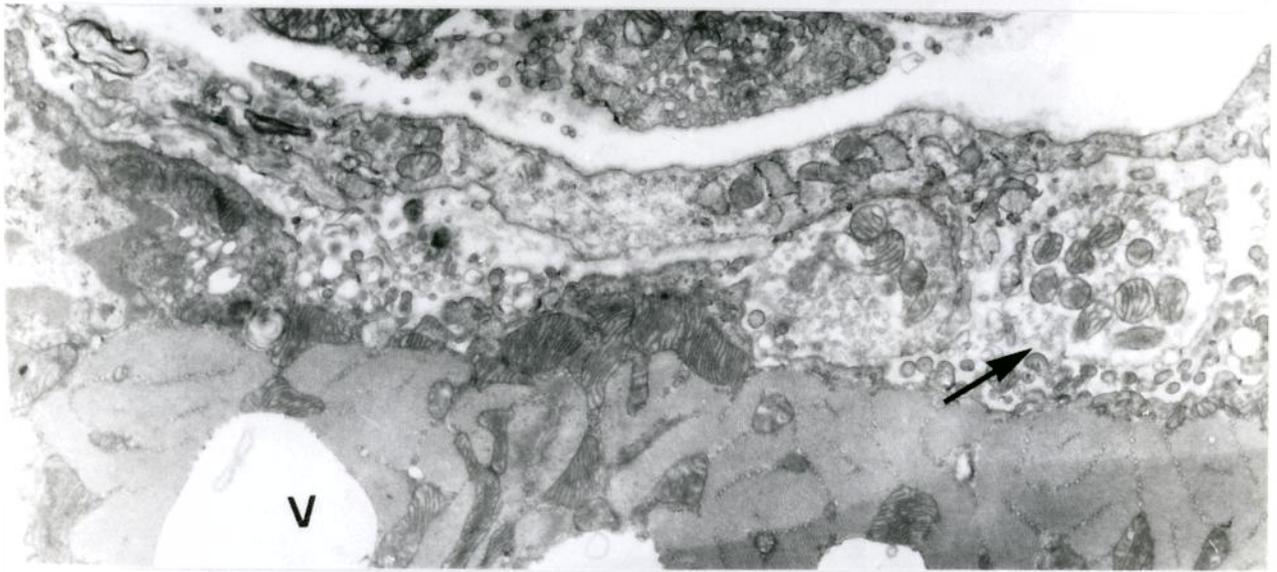


Fig. 29: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 μ g) pré-incubado com 7,5 μ l de soro anti- *M. nigrocinctus* / μ g de veneno durante 30min a 37°C / 60 min - 37°C. Fibra muscular em corte longitudinal: Proteção contra o efeito mionecrótico do veneno, fibras sem alteração evidente. 18655x

Fig. 30: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 μ g) pré-incubado com 7,5 μ l de soro anti- *M. nigrocinctus* / μ g de veneno durante 30min a 37°C / 60 min - 37°C. Fascículo intramuscular de axônios mielínicos. Alguns axônios estão íntegros ao lado de outros com alterações bastante acentuadas. A célula de Schwann mostra axoplasma "lavado" e inclusão mielínica. 16552x

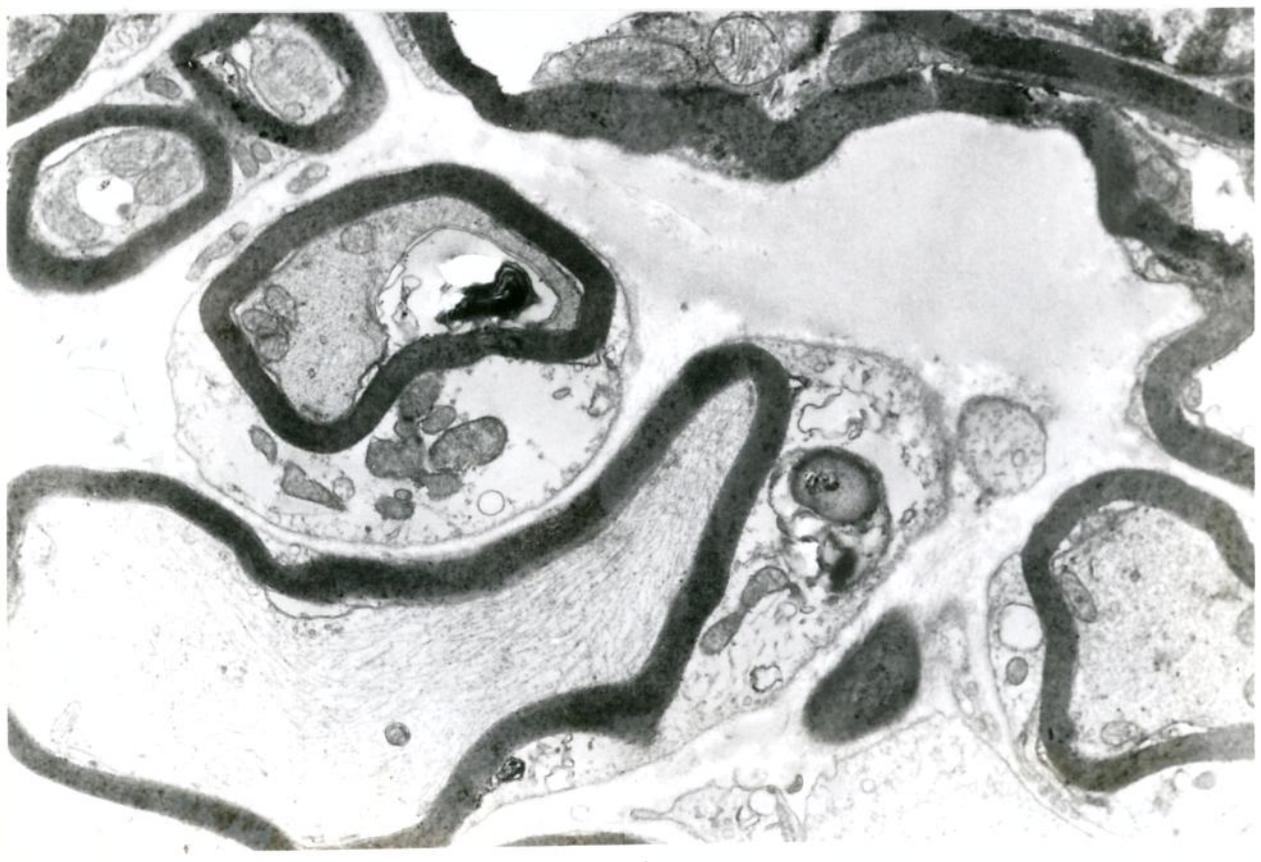
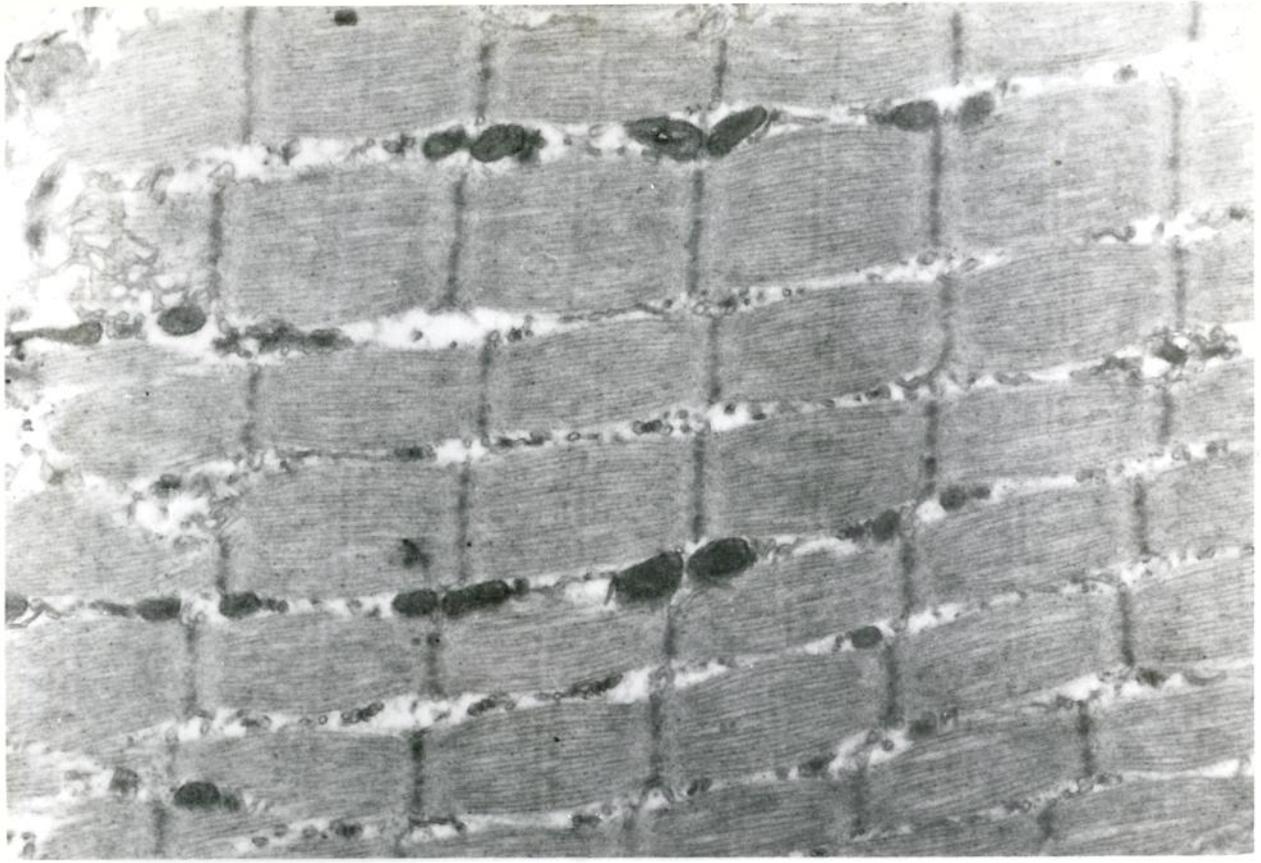


Fig. 31: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 μ g) pré-incubado com 7,5 ul de soro anti- *M. nigrocinctus* / μ g de veneno durante 30min a 37°C / 60 min - 37°C. Micrografia eletrônica de Junção Neuromuscular: Terminal nervoso aparentemente normal, porém com algumas vesículas de diâmetro variado, mitocôndrias normais. O contorno do axolema está regular e não há formações vesiculares sobre ele. As fendas sinápticas estão presentes e com aspecto normal, assim como a organização das miofibrilas. 32795x

Fig. 32: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 μ g) pré-incubado com 7,5 ul de soro anti- *M. nigrocinctus* / μ g de veneno durante 30min a 37°C / 60 min - 37°C. Micrografia eletrônica de Junção Neuromuscular: Terminal nervoso depletado de vesículas sinápticas e apresentando vacúolos membranosos. 19440x

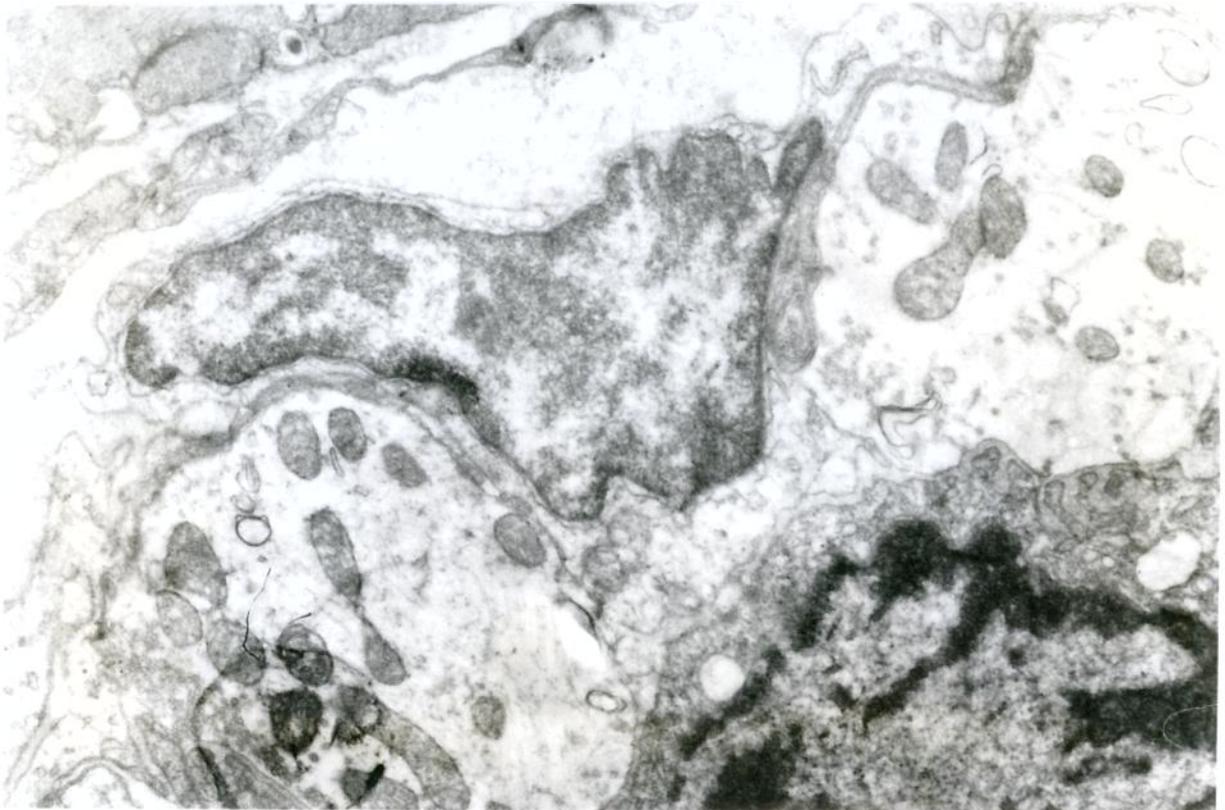
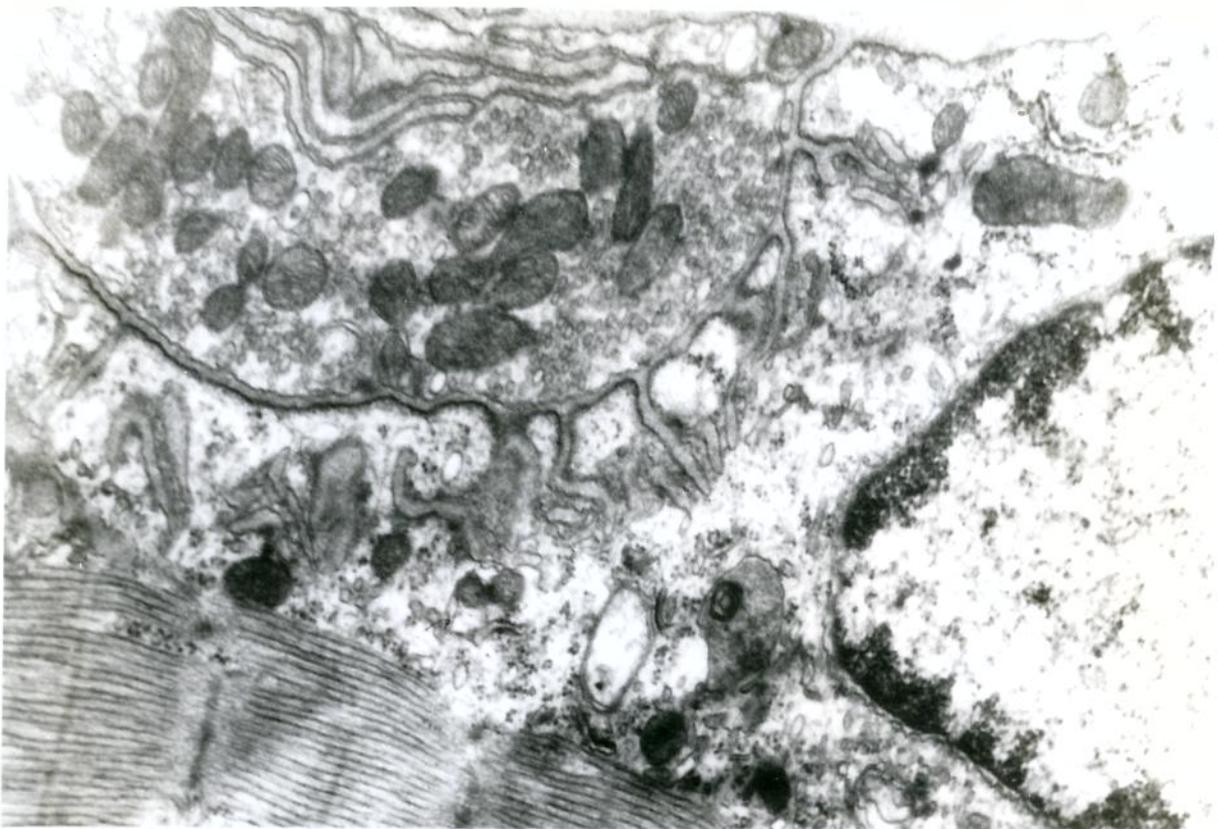


Fig. 33: Veneno total de *M. nigrocinctus* (20 μ g) / 60 min - 250C.
Axônio mielínico e fibras musculares em corte transversal:
Proteção evidente contra o efeito lesivo do veneno. 11232x



2.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

A MEV permite observação das estruturas em terceira dimensão, no que difere da MET que enfoca detalhes ultraestruturais de secções do tecido. Por esta razão, torna-se difícil identificar as alterações provocadas pelo veneno através desse método e correlacioná-las àquelas vistas pela MET. Através da MEV foi possível observar detalhes das fibras musculares individualizadas, após a digestão enzimática e hidrólise alcalina. Os feixes de fibras musculares nas preparações controle mostraram células com diâmetro uniforme, entremeadas por rede de capilares sanguíneos. O detalhe das fibras individualizadas permite identificar o trajeto das porções finais do axônio no momento da formação da placa motora. Permite ainda, localizar a região de arborização final do terminal nervoso, bem como o relevo da superfície da fibra muscular com suas estrias transversais. (figs. 34-39).

Nas preparações incubadas com o veneno (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$), estes detalhes são também observados. Aparentemente os sulcos da arborização final do terminal axônico são menos acentuados (figs. 38-40), o que parece corroborar as observações com a MET, onde as dobras juncionais dos terminais intoxicados apresentavam-se atenuadas.

Por outro lado, não foi possível observar fibras musculares mionecróticas. Provavelmente isto deveu-se ao fato de que estas são mais frágeis e portanto, susceptíveis a ação enzimática e hidrolítica, perdendo-se durante o processo. Além disso, o poder de resolução oferecido pela MEV é menor do que o da MET.

Fig. 34: Micrografia Eletrônica de Fibras Musculares Controle / 60 min em sol. de Tyrode à 37°C. (Acima à direita): Visão geral mostrando um feixe de fibras musculares e a rede de capilares sanguíneos. 304x

Fig. 35: Fibra Muscular Controle / 60 min - 37°C. (Acima à esquerda): Detalhe do feixe, apresentando uma fibra muscular com estriações transversais e as miofibrilas na sua porção inferior. Note o sulco formado pelo curso de um nervo sobre a fibra muscular. 2500x

Fig. 36: Junção Neuromuscular / 60 min - 37°C. (Abaixo): Ramificações do axônio pré-terminal, formando os botões sinápticos sobre a fibra muscular. 3594x

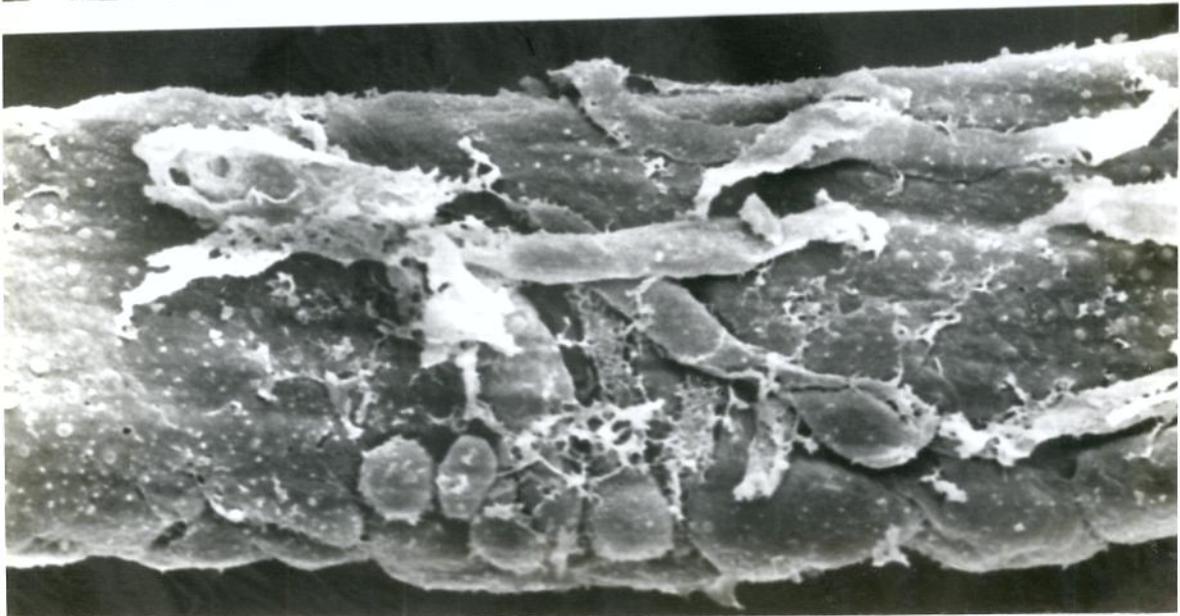
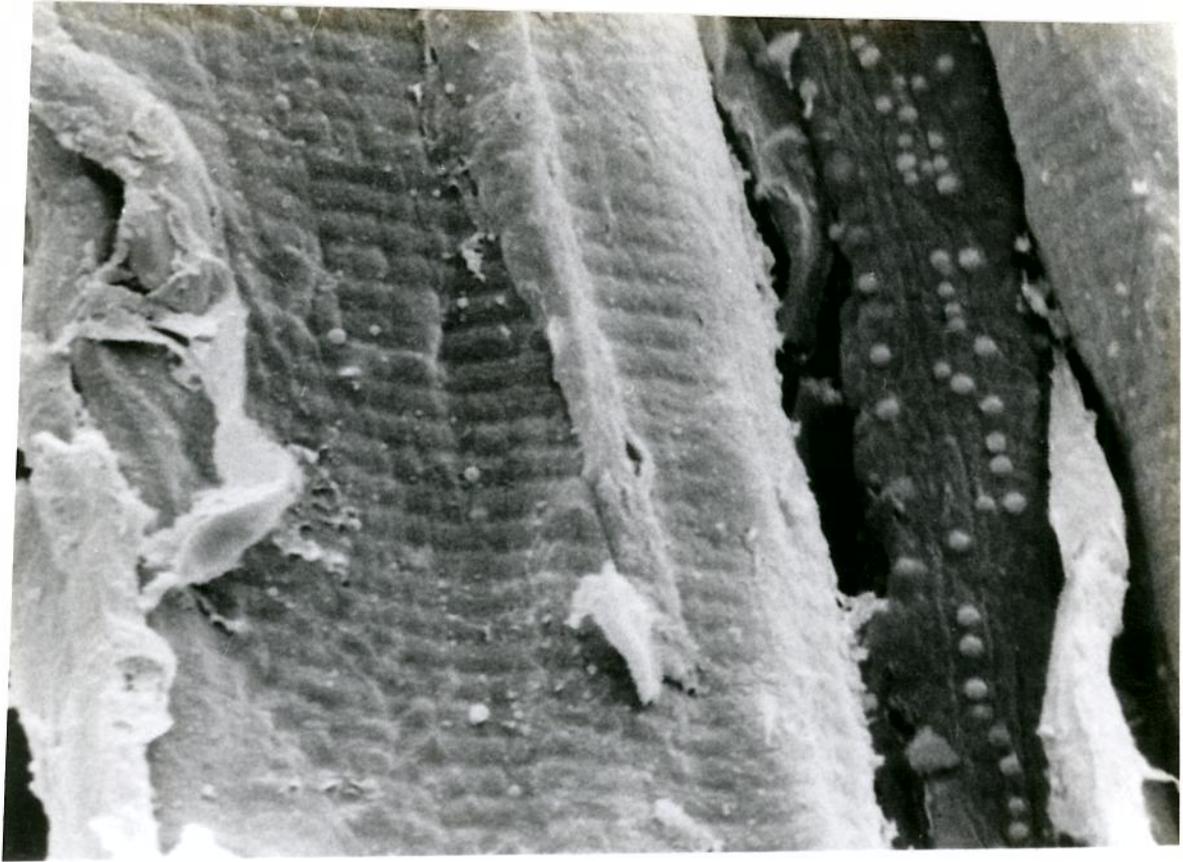


Fig. 37: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 μ g) / 60 min - 370C.
(Acima): Detalhe da estriação da fibra muscular. 6231x

Figs. 38 e 39: Veneno total de *M. nigrocinctus* (10 μ g) / 60 min - 370C.: Arborização final do axônio pré-terminal, mostrando a diminuição aparente da profundidade do sulco. 5400x 3571x



3- Estudo da Liberação de Creatinoguinase (CK) em Músculo ELD

A medida dos níveis de CK no líquido do banho mostrou significativo aumento após a incubação do músculo com 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *M. nigrocinctus*. A dose de 5 $\mu\text{g/ml}$ não induziu liberação significativa de CK ao final de 90 min de incubação, enquanto 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ foram capazes de aumentar respectivamente, 6 e 8 vezes a liberação no mesmo período de incubação. Por outro lado, comparando-se esses valores com aqueles determinados pelo Triton X-100 (1820 UI aos 90 min), verificou-se que o nível máximo de liberação induzido pelo veneno (20 $\mu\text{g/ml}$) correspondeu somente a $32,4 \pm 5,7\%$ da liberação induzida pelo Triton X-100. (fig. 40)

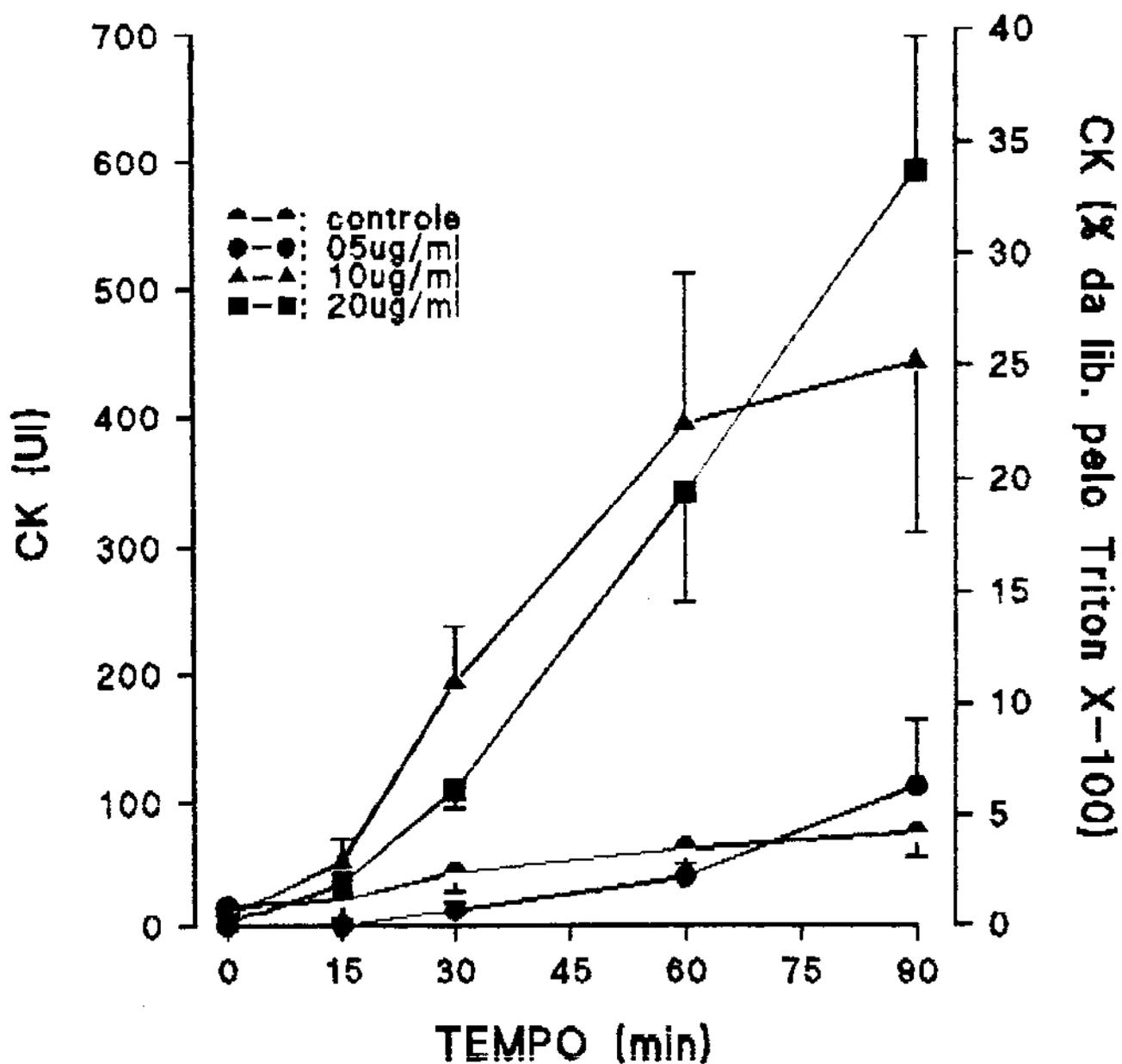


Fig. 40: LIBERAÇÃO DE CREATINOQUINASE (CK) EM MÚSCULO ELD DE CAMUNDONGO. Observe que a liberação de CK inicia-se somente após os 30 min de incubação com as doses de 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do veneno de *M. nigrocinctus*, enquanto a dose de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ não induz liberação. Note que os valores máximos encontrados após 90 min de incubação correspondem a uma porcentagem submaximal da liberação induzida pelo Triton X-100. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3-7 experimentos.

V- DISCUSSÃO

A serpente *Micrurus nigrocinctus* é a coral de maior incidência na América Central (BOLAÑOS, 1982). Apesar disso, seu veneno foi ainda alvo de pouca investigação quanto a sua atividade sobre a junção neuromuscular.

Classicamente, os venenos de serpentes corais são considerados como neurotóxicos. No entanto, estudos realizados por GUTIÉRREZ et al (1983) mostraram que o veneno de outras cinco espécies de serpentes corais é capaz de induzir mionecrose em camundongo, demonstrando então, a presença de potentes miotoxinas na composição destes venenos. No presente estudo ficou demonstrado que o veneno de *M. nigrocinctus* é capaz de causar importantes alterações miográficas, eletrofisiológicas, e morfológicas sobre a fibra muscular esquelética, nervos e terminação nervosa.

Verificou-se que o bloqueio das respostas contráteis à estimulação indireta e direta, induzido pelo veneno total de *M. nigrocinctus*, é dose-dependente. Embora o tempo para obtenção de bloqueio 50% das respostas musculares esteja muito próximo nos dois tipos de estímulo, direto e indireto, observou-se que o bloqueio total das contrações musculares ocorreu primeiramente nas preparações estimuladas indiretamente. Assim, a resposta ao estímulo direto ainda era visível quando o bloqueio total à estimulação indireta já se havia instalado. Tais resultados

mostram um efeito do veneno sobre a JNM, o qual é acompanhado por uma ação direta sobre a fibra muscular esquelética.

Por outro lado, observou-se que o início da ação bloqueadora do veneno ao estímulo indireto, é precedido por um pequeno aumento da amplitude das contrações (5-15%). Este efeito coincide com o período em que é detectado aumento na frequência e amplitude dos pptom em algumas placas motoras da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Tal período corresponde aos primeiros 15 min de incubação com as diferentes doses do veneno total. Sendo assim, o aumento da amplitude das contrações deve-se provavelmente ao aumento da liberação de acetilcolina pela terminação nervosa pré-sináptica. Este resultado é corroborado pelas alterações morfológicas, que mostram uma diminuição do número de vesículas sinápticas, e indentações do tipo ômega, em algumas terminações nervosas após 60 min de incubação com o veneno de *M. nigrocinctus* (10 µg/ml).

A administração de uma droga anticolinesterásica, tal como a neostigmina, não foi capaz de recuperar as respostas contráteis após a ocorrência do bloqueio total. Este resultado difere do obtido com a peçonha de *M. frontalis*, a qual apresenta apenas NTxs pós-sinápticas e cujo bloqueio é efetivamente antagonizado pela administração de drogas anticolinesterásicas (VITAL BRAZIL et al, 1976/77). No caso do veneno em estudo, observou-se somente uma reversão parcial e transitória da resposta contrátil, a qual provavelmente deveu-se ao efeito farmacológico facilitador característico da neostigmina, sobre a resposta residual do músculo diafragma ($13,6 \pm 3,1\%$) no momento

de sua adição. Da mesma forma, não se obteve sucesso quando foi adicionada uma droga bloqueadora dos canais de potássio, a 3,4-diaminopiridina, a qual atua portanto, retardando a repolarização do terminal nervoso e provocando aumento da liberação evocada da acetilcolina (THESLEFF, 1980). Tal resultado sugere que, embora o efeito pré-sináptico esteja presente e possivelmente participe da instalação do bloqueio neuromuscular, não seria o fator mais importante para a sua manutenção. Além disso, lavagens sucessivas da preparação com nova solução de Tyrode não reverteram o bloqueio da resposta muscular, corroborando nossa afirmação de que o bloqueio induzido pelo veneno de *M. nigrocinctus* é irreversível.

O bloqueio da resposta contraturante da ACh em preparações de diafragma cronicamente desnervado e biventer cervicis de pintainho sugere uma ação pós-sináptica do veneno sobre os receptores nicotínicos. Resultados como este já foram anteriormente reportados por MOUSSATCHÉ & MELENDES (1979), os quais mostraram que o bloqueio induzido pelo veneno de *M. nigrocinctus* sobre o diafragma cronicamente desnervado de cobaia, é irreversível e específico sobre os receptores colinérgicos da placa motora. Os autores verificaram nesta preparação, que a dose de 10 µg/ml do veneno induziu bloqueio total do receptor para a acetilcolina após 30 min de incubação, embora não tenha alterado a contratura evocada pela adrenalina, noradrenalina e histamina.

ARROYO et al (1987) isolaram no veneno de *M. nigrocinctus* um total de 17 frações, das quais muitas

apresentaram atividade miotóxica. Uma destas frações corresponde a aproximadamente 13% do peso total do veneno, representando o seu principal componente. É formada por uma fosfolipase A₂ ácida de peso molecular 12.000, a qual é responsável por importantes alterações ultraestruturais sobre a fibra muscular esquelética de camundongo. Este trabalho mostra que a toxina não precisa ser necessariamente básica para induzir miotoxicidade. Da mesma forma, MEBS & SAMEJIMA (1980) isolaram do veneno de *Pseudechis porphyriacus* uma fosfolipase A₂ neutra que exibe atividade miotóxica .

No presente estudo ficou demonstrado que o veneno total de *M. nigrocinctus* apresenta ação miotóxica sobre o diafragma de camundongo, a qual foi significativamente reduzida quando a temperatura de incubação foi alterada de 37°C para 24-26°C. Além disso, seu efeito bloqueador sobre as respostas contráteis da fibra muscular mostrou-se igualmente abolido a esta temperatura, ou quando o veneno foi previamente fervido. Tais resultados, sugerem uma possível inibição da atividade fosfolipásica do veneno nestas condições e portanto, redução de sua atividade sobre a JNM e a fibra muscular. Da mesma forma, quando utilizou-se o soro anti- *M. nigrocinctus* sobre as preparações de camundongo, observou-se proteção efetiva *in vitro* contra o efeito bloqueador das respostas contráteis, a qual foi acompanhada da redução do efeito miotóxico, e proteção da resposta à acetilcolina em músculo desnervado. A resposta contrátil do músculo diafragma mostrou-se preservada também quando se adicionou o soro após 10-20 min do início da incubação com o

veneno. Tal resultado corrobora os achados de GUTIÉRREZ et al (1991), que mostrou que o soro monovalente anti- *M. nigrocinctus* é efetivo em neutralizar, *in vivo*, a letalidade, miotoxicidade e a atividade PLA₂ do veneno, mesmo quando administrados em injeções independentes. O mesmo foi afirmado por COHEN (1966) para o veneno de *M. fulvius*.

As alterações ultraestruturais provocadas pelo veneno de *M. nigrocinctus* foram acompanhadas pela elevação na concentração de creatinoquinase (CK) na solução do banho. Houve portanto, correlação positiva entre os achados morfológicos e a variação dos níveis de CK encontrados. Desta forma, apenas as doses de 10 e 20 µg/ml induziram elevação significativa destes níveis, embora a dose de 5 µg/ml, que não interferiu sobre os níveis de CK, também tenha sido capaz de provocar bloqueio da resposta contrátil do músculo diafragma. Por outro lado, ficou evidente que o efeito do veneno sobre a resposta muscular não se deveu puramente a uma ação do tipo "detergente", como é o caso do Triton X-100, pois os valores de CK obtidos após 90 min de incubação (período superior ao necessário para bloqueio total da resposta contrátil do músculo ELD) mostraram-se inferiores aqueles obtidos com o Triton X-100. Apesar de tais tipos de experimentos terem sido realizados em preparações musculares diferentes, observou-se boa correlação entre os resultados de contração muscular encontrados no músculo diafragma e os encontrados no músculo ELD. O primeiro não foi utilizado para o estudo da liberação *in vitro* de CK por apresentar liberação aleatória, além de incluir a liberação de CK dos músculos

intercostais que permanecem aderidos ao diafragma na hora de sua retirada do animal, e que são lesados durante a "limpeza" da preparação isolada.

As alterações eletrofisiológicas induzidas pelo veneno traduziram-se pela despolarização das regiões da placa motora e fibra muscular, a qual ocorreu de modo simultâneo com o bloqueio da resposta contrátil do músculo diafragma. Além disso, o fato de uma despolarização precoce ter sido registrada sobre a placa motora sugere uma ação diferenciada do veneno sobre a membrana dessa região, ao menos nos estágios iniciais da intoxicação. Ainda, a ação protetora da dtc e da α -BuTX contra o efeito despolarizante do veneno corrobora a nossa conclusão. Estas substâncias são conhecidas por agirem sobre os receptores colinérgicos pós-sinápticos impedindo a ação despolarizante de drogas. A dtc atua por mecanismo competitivo (JENKINSON, D., 1960), enquanto a α -BuTX produz bloqueio específico e irreversível do receptor colinérgico (CHANG & LEE, 1963; LEE & CHANG, 1966), o que permite sua utilização no estudo e caracterização do receptor pós-sináptico (CHANGEUX et al., 1970; BARNARD et al., 1971; MILEDI & POTTER, 1971). A diminuição na porcentagem de despolarização mostrou que o receptor colinérgico pós-sináptico está envolvido na ação do veneno, pelo menos nas fases iniciais do envenenamento. Por outro lado, a manutenção de uma queda no PR mesmo após o pré-tratamento sugere também que um efeito inespecífico estaria envolvido neste processo. O trabalho de GUTIÉRREZ et al (1986) afirma que estudos imunológicos preliminares com o veneno de *M. nigrocinctus* indicam que há

moléculas do tipo cardiotoxina presentes neste veneno. Porém, para uma correlação com os resultados aqui registrados, torna-se necessário um estudo mais detalhado e específico desta ação.

As alterações na frequência e na amplitude dos pptom após incubação com o veneno de *M. nigrocinctus* sugerem que este atue em ambas as regiões, pré- e pós-sinápticas da junção neuromuscular. De modo geral, a diminuição da amplitude e frequência dos pptom coincidiu com a instalação do bloqueio das respostas musculares à estimulação indireta, mostrando uma interligação entre ambos os fenômenos. Alterações eletrofisiológicas evocadas por este veneno já foram anteriormente relatadas nos trabalhos de RODRIGUES-SIMIONI et al. (1990) e GOULARTE et al. (1993).

Finalmente, usando-se o veneno total, foi possível evidenciar correlações entre as alterações miográficas, eletrofisiológicas e morfológicas induzidas pelo veneno total de *M. nigrocinctus*, as quais poderão ser melhor esclarecidas com o fracionamento do veneno e estudo individualizado das frações.

VI - RESUMO E CONCLUSÕES

O veneno de *Micrurus nigrocinctus* foi estudado *in vitro* sobre preparações neuromusculares isoladas de camundongo. À partir de tais experimentos e seus resultados, chegamos às seguintes conclusões:

- 1) O veneno de *M. nigrocinctus* induz importantes alterações miográficas, eletrofisiológicas e morfológicas sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo;
- 2) O bloqueio total da resposta contrátil do músculo diafragma mostra-se dose-dependente, e irreversível mediante a adição de droga anticolinesterásica e lavagens sucessivas da preparação;
- 3) A temperatura de incubação é um importante fator para o efeito bloqueador e miotóxico do veneno, sugerindo que uma PLA₂ esteja envolvida nestes processos;
- 4) O soro anti- *M. nigrocinctus* é capaz de neutralizar *in vitro* a ação do veneno, tanto sobre a resposta muscular contrátil como sobre a miotoxicidade, mesmo quando for acrescentado após a adição do veneno;

5) As alterações ultraestruturais induzidas pelo veneno são acompanhadas por elevação correspondente dos níveis de CK na solução do banho. Por outro lado, o aumento de CK é submaximal quando comparado com a liberação dessa enzima provocada pelo detergente Triton X-100;

6) A ocupação irreversível dos receptores pós-sinápticos pelo veneno parece ser a causa mais provável do bloqueio neuromuscular observado, pelo menos nas fases iniciais da intoxicação. Além disso, os resultados eletrofisiológicos e morfológicos também evidenciam uma ação pré-sináptica do veneno sobre a JNM, porém esta não seria a mais importante na gênese do bloqueio neuromuscular;

7) Embora tenha sido evidenciada uma ação do veneno sobre a JNM, como classicamente os venenos de serpentes corais são conhecidos, o presente estudo demonstrou que o veneno de *M. nigrocinctus* possui também um importante efeito miotóxico. Este efeito parece capaz de influenciar o desenvolvimento progressivo do bloqueio neuromuscular observado.

VII - ABSTRACT

In the isolated mouse diaphragm, *Micrurus nigrocinctus* venom produces a dose-dependent blockade of the contractile response to electrical stimulation. This effect could not be reversed by repeated washing of the preparation or by the addition of an anticholinesterase. These observations suggest that, at least during the initial stages of poisoning, the mode of venom action involves binding of specific proteins to post-synaptic receptors. However, electrophysiological and morphological evidence suggests that the venom may also have a pre-synaptic action.

Although the venom component responsible for this response has not yet been identified, the fact that the temperature at which the experiment was performed could greatly influence the neuromuscular blocking and myotoxic actions of the venom suggests that a neurotoxic PLA₂ may be involved.

Both the neuromuscular blocking action and the myotoxicity of the venom could be prevented by a specific *M. nigrocinctus* antivenom. This protective effect was maintained regardless of whether the antivenom was added before or after the venom.

The muscle ultrastructural changes induced by the venom were accompanied by a corresponding increase in the release of

creatine kinase into the incubation medium. This release was, however, submaximal when compared to that induced by the detergent Triton X-100.

In conclusion, this work has demonstrated that, in addition to an action on the mammalian neuromuscular junction, *M. nigrocinctus* venom also has a pronounced myotoxic effect, which may well contribute to the progressive neuromuscular blockage seen with the venom. Both of the actions can effectively be prevented by a specific antivenom.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, S.D. & SILVA, N.J. (1991) Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. Comp. Biochem. Physiol., vol. 99B(2): 287-294.
- ARROYO, O.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O.; GUTIERREZ, J.M. & CERDAS, L. (1987) Skeletal muscle necrosis induced by a phospholipase A₂ isolated from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. Comp. Biochem. Physiol., 87B(4): 949-952.
- BARNARD, E.A.; WIECKOWSKI, J. & CHIU, T.H. (1971) Cholinergic receptor molecules and cholinesterase molecules at mouse skeletal muscle junctions. Nature (London), 234: 207-209.
- BRAZIL, V. (1914) La défense contre l'ophidisme. 2eme ed. São Paulo, Pocaí Weiss.
- BOLAÑOS, R. (1982) Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. Revta Costa Rica Cienc. méd., 3: 165-184.
- BONTA, I.T.; VARGAFTIG, B.B.; BHARGAVA, N. & VOS, C.J. (1970) Method for study of snake venom induced hemorrhage. Toxicon 8: 3-10.
- BÜLBRING, E. (1946) Observations on the isolated phrenic nerve; diaphragm preparation of the rat. Brit. J. Pharmacol., 1: 38-61.

- CAMPBELL, J.A & LAMAR, W.W (1989) The Venomous Reptiles of Latin America (London: Comstock), pp. 94, 143, 425
- CHANG, C.C. (1979) The action of snake venom on nerve and muscle. In: LEE, C. Y. (Ed.), Hdb. Exp. Pharm., Vol. 52, Snake Venom, Berlin-Heidelberg-New York, Springer, pp. 316-376.
- CHANG, C.C. & LEE, C.Y. (1963) Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., **144**: 241-257.
- CHANG, C.C. (1985) Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. Proc. natm. Sci. Council. (R.O.C.), **B9**: 126-142.
- CHANGEUX, J.P.; KASAI, M. & LEE, C.Y. (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A., **67**: 1241-1247.
- COHEN, P. (1966) *In vivo* neutralization of coral snake venom. Memórias do Instituto Butantan, **33**: 881-886.
- CRUZ-HOFLING, M. A; RODRIGUES-SIMIONI, L. & VITAL BRAZIL, O. (1983 / 1984) Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. Mem. Inst. Butantan, **47/48**: 95-105.

- DALÓ, N.; PERALES, J.; MUÑOS, R.; MARTINEZ, B. & MOUSSATCHÉ, H. (1986) Neuromuscular blocking activity of a fraction isolated from the venom of coral snake, *Micrurus nigrocinctus*. In: Second Panamerican Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. Arizona, 51.
- DALÓ, N.; PERALES, J.; MUÑOS, R.; MARTINEZ, B. & MOUSSATCHÉ, H. (1989) Neuromuscular blocking activity of a fraction isolated from the venom of coral snake, *Micrurus nigrocinctus*. Toxicon, 27(1): 40.
- EAKER, D. (1978) Studies of presynaptically active neurotoxic and myotoxic phospholipases A₂. In: C. H. Li (Ed.), Versatility of Proteins, Academia Press, New York, San Francisco, London, pp. 413-431.
- FATT, P. & KATZ, B. (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. Physiol. (London), 115: 320-370.
- GOULARTE, F.C.L.; COGO, J.C.; GUTIERREZ, J.M. & RODRIGUES-SIMIONI, L. (1993) Effects of *Micrurus nigrocinctus* snake venom on mouse and chick neuromuscular preparations. Toxicon, 31(2): 135-136.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYO, O.; CHAVES, F.; LOMONTE, B. & CERDAS, L. (1986) Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. Br. J. Exp. Path., 67: 1-12.

- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F. (1980) Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. Toxicon 18: 315-321.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; ROJAS, E. & BOLANOS, R. (1980) Efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* en ratón blanco. Toxicon, 18: 633-639.
- GUTIÉRREZ, J.M; LOMONTE, B.; PORTILLA, E.; CERDAS, L. & ROJAS, E. (1983) Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venom from five species. Toxicon, 21: 777-783.
- GUTIERREZ, J.M.; ROJAS, G.; PEREZ, A.; ARGUELO, I. & LOMONTE, B. (1991) Neutralization of coral snake *Micrurus nigrocinctus* venom by a monovalent antivenom. Brazilian J. Med. Biol. Res., 24: 701-710.
- HAWGOOD, B.J. & SMITH, C.H. (1988) Short Communication: The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials at frog neuromuscular junction. Toxicon, 00:000-000.
- HAWGOOD, B. J. & SMITH, C. H. (1989) The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials of the frog neuromuscular junction. Toxicon, 27: 272-276.
- HOMMA, M. & TU, A.T. (1971) Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomations. Br. J. Exp. Path., 52: 538-542.

- HOGE, A. R. & ROMANO, S. A. (1972) Sinopse das Serpentes Peçonhentas do Brasil. Mem. Inst. Butantan, 36: 109-202.
- HOUSSAY, B.A. & NEGRETE, J. (1918) Estudios sobre venenos de serpientes. III. Accion de los venenos de serpientes sobre las substancias proteicas. Rev. Inst. Bacteriol., (Dep. Nac. Higiene), 1: 341.
- JENKINSON, D. (1960) The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate. J. Physiol. (London), 152: 309-324.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. (1973) Reptile toxins. In: Biology Data Book, Vol. 2, p. 697. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), U.S.A.
- KARLSSON, E. (1979) Chemistry of protein toxin in snake venoms. In: C.Y. Lee (Ed.). Hdb. Exp. Pharm., Vol. 52, Snake Venom., Berlin-Heidelberg - New York, Springer, pp. 159-212.
- LAI, M.K.; WEN, C.Y & LEE, C.Y. (1972) Local lesions caused by cardiotoxin isolated from Formosan cobra venom. J. Formosan Med. Assoc. 71: 328.
- LEE, C.Y. (1971) Mode of action of cobra venom and its purified toxins. In: Simpson, I. I. (Ed.) Neuropoisons, Their Pathophysiological Actions. Vol.1. Phenum Press, N.Y. p.21.
- LEE, C.Y. & CHANG, C.C. (1966) Modes of action of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, 33: 555-572.

- LEE, C.Y.; CHANG, C.C.; CHIU, T.H. CHIU, P.J.S., TSENG, T.C. & LEE, S.Y. (1968) Pharmacological properties of cardiotoxin isolated from *Formosan* cobra venom. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exo. Path. Pharmk., 259: 360-374.
- LEE, C.Y. & HO, C.L. (1978) Pharmacology of snake toxin with phospholipase A2 activity. In: C.H. Li (Ed.), Versatility of Proteins, Academic Press, N.Y., pp. 433-446.
- LEE, C.Y. & HO, C.L. (1982) The pharmacology of phospholipases A2 isolated from snake venoms, with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In: H. Yoshida, Y.H. & Ebashi, S. (Eds.) Advances in Pharmacology and Therapeutics I, Pergamon Press, Oxford, N.Y., vol 4., pp. 37-52.
- LEE, C.T. & PENG, M.T. (1966) Modes of action of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission Mem. Inst. Butantan, 33: 555.
- MCCOLLOUGH, N.C. & GENNARO, J.F.Jr (1963) Coral snake bites in the United States. J. Florida med. Ass., 49: 968-972.
- MEBS, D. (1970) A comparative study of enzyme activities in snake venoms. J. Biochem, 1: 335.
- MEBS, D. & SAMEJIMA, Y. (1980) Purification, from Australian elapid venoms, and properties of phospholipases A which cause myoglobinuria in mice. Toxicon, 18: 443-454.
- MILEDI, R. & POTTER, L.T. (1971) Acetylcholine receptors in muscle fibers. Nature (London), 203: 599-603.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE (1990) Acidentes ofídicos: contribuição ao estudo da morbidade. Número 41, Ano IV., Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Brasília, D.F.
- MOKRI, B. & ENGEL, A.G. (1975) Duchenne dystrophy: Electron microscopic finding pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane at the muscle fiber. Neurology, 25: 1111-1120.
- MOUSSATCHÉ, H & MELENDES, T. (1974) Abstracts of the 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, p.99.
- MOUSSATCHE, H. & MELENDEZ, T. (1979) Some pharmacological observations with Elapidae and Crotalidae snake venom in the guinea-pig denervated diaphragm on the specificity of the cholinergic blockade by their venoms. Revta. bras.Biol., 39: 605-610.
- MOUSSATCHÉ, H.; YATES, A.; MELENDEZ, T. & MENDOZA, J. (1976) Preliminary report on the fractionation of the venom of *Micrurus nigrocinctus* and the pharmacological properties of the fractions. In: Program and abstracts of the 5th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, San José, Costa Rica, p.60.
- NEILL, W.T. (1957) Herpentologica, 13: 111.
- OWNBY, C. L. & COLBERG, T. R. (1988) Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). Toxicon, 26: 459-474.

- PARRISH, H.M. & KHAN, M.S. (1967) Bites by coral snake: Report of 11 representative cases. Th. Am. Med. Sciences, 235(5): 561-564.
- PETERS & OREJAS-MIRANDA, B.R. (1970) Catalogue of Neotropical Squamata. Pt. I Sankes. Bull. U. S. Natl. Mus.
- RAMSEY, C.F. & KLINKSTEIN, G.D. (1962) Coral snake bite: report of a case and suggested therapy. J. Am. med. Ass., 182: 949.
- RESENDE, C.C.; ARAÚJO, F.A & SALLENAVE, R.N.V.R. (1989) Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos: Brasil- junho de 1986 a dezembro de 1989. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, ministério da Saúde. Brasilia, D.F.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; COGO, J.C.; GUTIERREZ, J.M. & PRADO-FRANCESCHI, J. (1990) *Micrurus nigrocinctus* venom induced effects on isolated mouse phrenic-nerve diaphragm and chick biventer cervicis preparations. In: I Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia: Peçonhas e Envenenamento no Brasil (abstracts). Instituto Butantan, São Paulo, p.7.
- ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G. & KELEN, E.M.A. (1959) Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms, determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. Mem. Inst. Butantan, 29: 143.
- ROSENFELD, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl, W. & Buckley, E. (Eds.) Venomous Animals and Their Venoms, vol II. Venomous Vertebrates, p.345.
- ROZE, J. (1982) New World coral snakes (Elapidae): A taxonomic and biological summary. Mem. Inst. Butantan., 46: 305-338.

- RUSSEL, F.E. (1967) Bites by the Sonoral coral snake *Micruroides euryxanthus*. Toxicon, 5: 39-42.
- SHAW, C. E. (1971) The Coral Snakes, Genera *Micrurus* and *Micruroides*, of the United States and Northern México. In: Bucherl, W. & Buckley, E.E. (Eds.) Venomous animals and their venoms. New York: Academic Press. vol2, pp. 157-172.
- SHIAU LIN, S.Y.; HUANG, M.C. & LEE, C.Y. (1972) Isolation of cardiotoxic and neurotoxic principles from the venom of *Bungarus fasciatus*. J. Formosan Med. Assoc., 71: 350.
- SOLÓRZANO, A. & CERDAS, L. (1988) Ciclos Reproductivos de la Serpiente Coral *Micrurus nigrocinctus* (Serpientes: Elapidae) en Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 36(2A): 235-239.
- STRONG, P.N. (1987) Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: relationship between biochemical and electrophysiological approaches to the mechanism of toxin action. In: Dowdall, M.J. & Hawthorne, J.N. (Eds.) The Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function, Chichester: Ellis Hirwood. pp. 534-549.
- TAYLOR, R.T.; FLORES, A.; FLORES, G. & BOLANOS, R. (1974) Geographical distribution of Viperidae, Elapidae and Hydrophidae in Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 21: 383-397.
- THESLEFF, S. (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. Neuroscience, 5(8): 1413-1419.
- TU, A.T. (1977) Venoms: Chemistry and Molecular Biology., John Wiley.

- TU, A. T.; HOMMA, M. & HONG, B. S. (1969) Hemorrhagic, myonecrotic, thrombotic and proteolytic activities of viper venoms. Toxicon 6: 175.
- USHIKI, T. & IDE, C. (1988) A modified KOH-Collagenase Method Applied to Scanning Electron Microscopic Observations of Peripheral Nerves. Archs. Histol. Cytol., 51(3): 223-232.
- VITAL BRAZIL, O. (1965) Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. O Hospital, 68(4): 909-950.
- VITAL BRAZIL, O. (1980) Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Brasil., 26: 212-218.
- VITAL BRAZIL, O. (1987) Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., 29: 119-126.
- VITAL BRAZIL & RANGEL PESTANA, B. (1909c) Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophídico. VII. Ação proteolytica. Rev. Med. de São Paulo, 12: 442.
- VITAL BRAZIL, O. & FONTANA, M. D. (1983/1984) Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra *Micrurus Corallinus* na junção neuromuscular. Mem. Inst. Butantan, 47/48:13-26.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D. & PELEGRINI FILHO, A. (1976/1977) Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venim de *Micrurus frontalis*. Mem. Inst. Butantan, 40/41: 221-240.
- WEISS, R. & McISAAC, R.J. (1971) Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. Toxicon, 9: 219-228.