

RICARDO STELLATI PEREIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DOS
EFEITOS DO VENENO DE *CROTALUS*
DURISSUS TERRIFICUS ADULTA E
JUVENIL SOBRE A JUNÇÃO
NEUROMUSCULAR**

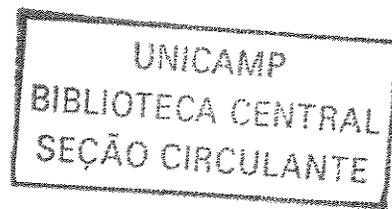
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia e Toxicologia, Curso de Especialização em Cirurgia Dentista – Ricardo Stellati Pereira.

Campinas, 30 de março de 2004.

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

CAMPINAS

2004



RICARDO STELLATI PEREIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO
VENENO DE *CROTALUS DURISSUS*
TERRIFICUS ADULTA E JUVENIL SOBRE A
JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÉA RODRIGUES SIMIONI

CAMPINAS

2004

UNIDADE	UNICAMP
Nº CHAMADA	P414e
V	EX
TOMBO BC/	62680
PROC.	16.86.05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,00
DATA	03/2/05
Nº CPD	

Bibid 338092

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

P414e

Pereira, Ricardo Stellati

Estudo comparativo dos efeitos do veneno de *crotalus durissus terrificus* adulta e juvenil sobre a junção neuromuscular / Ricardo Stellati Pereira. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Léa Rodrigues Simioni
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Serpentes. 2. Variação (Biologia). 3. Crotoxina. 4. Idade. 5. Peçonhas. 6. Purificação. 7. Toxicologia. I. Léa Rodrigues Simioni. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Profa. Dra. Caroline Ribeiro de Borja Oliveira

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

Data: 30/03/2004

200502043

DEDICATÓRIA

A Deus,
por permitir a vida e o aprendizado.
Humildemente vos digo,
Obrigado, meu Pai.

Aos meus pais, Durval e Cida,
alicerces da minha vida,
Orgulho-me todos os dias por tê-los comigo.
Dizer que os amo parece pouco...

Aos meus irmãos, Daniela e Roberto,
fontes inesgotáveis de amor, bondade e aprendizado.
Amo vocês.

A Josiane,
mulher a quem dedico meu amor
e minha vida.
Ao seu lado, a vida se torna mais bela,
mais feliz e mais intensa.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Léa Rodrigues-Simioni, desejo mais do que agradecê-la. Queria poder manifestar em palavras a admiração e respeito que tenho por sua pessoa. Mais do que oportunidade, me ofereceu bondade; mais do que cobranças, permitiu que eu mesmo as fizesse; mais do que tudo, confiou em mim. Resta-me apenas dizer, que tenho orgulho de ser seu aluno. Obrigado.

A Gildo Bernardo Leite, por sua valiosa ajuda e companheirismo, muito obrigado meu amigo.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pelas sugestões e discussões para a integralização deste trabalho.

Ao amigo Cháriston, por sua colaboração e contribuição no meu aprendizado.

À Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, por compartilhar seu conhecimento e tempo tão preciosos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado, por suas sugestões para a finalização deste trabalho.

À amiga Saraguacy Hernandes, por ser tão solícita e prestativa. Sarinha, você é inigualável ! Te adoro.

Aos amigos do laboratório, Josiane Barros, Priscila, Lílian, Valdemir e Emílio. Obrigado pela torcida e apoio para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e Prof. Dr. Marcos Toyama, pela contribuição bioquímica e parceria.

À Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, pela oportunidade de participar do Programa Estágio Docente (PED), pelos ensinamentos e sugestões.

À amiga Carol, por estar presente e ser tão prestativa nos momentos de maior necessidade, muito obrigado.

Aos meus futuros sogros José e Angela, meus sinceros agradecimentos pelo apoio, em todas as suas formas, incentivo e interesse em minha formação.

A tia Lola, pela ajuda e orientação na língua estrangeira, pelo estímulo ao meu trabalho, carinhosamente ... obrigado tia !

A todos os funcionários da Unicamp que, de alguma forma, tenham contribuído para a realização deste trabalho, obrigado.

Ao amigo Wanderley, por sua ajuda nas questões " burocráticas" e nos momentos de descontração. Valeu!

À minha mãe e ao meu pai, espero fazê-los sentirem-se orgulhosos hoje e sempre. Amo vocês !

Ao tio Valdir e tia Jurema, pelo apoio e interesse, obrigado. Vocês são meus heróis.

À tia Sueli e Paolo, obrigado pela torcida e por todas as horas acumuladas que ficaram me ouvindo falar sobre o andamento do meu trabalho.

Ao tio Aldo e tia Darci, sempre prontos a me atender em quaisquer questões, obrigado.

A todos os demais familiares e amigos, meu muito obrigado.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

	Resumo	xiv
	Abstract	17
1.	Introdução	20
1.1	Classificação das serpentes	22
1.2	Dados epidemiológicos	22
1.3	Gênero <i>Crotalus</i>	23
1.4	Peçonha	24
1.4.1	Modo de ação da peçonha	25
1.4.2	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt)	26
1.5	Soroterapia	29
2.	Objetivos	34
3.	Materiais e Métodos	36
3.1	Animais	37

3.2	Veneno	37
3.3	Ensaio biológicos	38
3.3.1	Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho	38
3.3.2	Determinação da Dose Letal mediana (DL50)	39
3.4	Ensaio bioquímicos	39
3.4.1	Purificação do veneno total de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	40
3.4.1.1	Cromatografia de exclusão molecular	40
3.4.2	HPLC de fase reversa	40
3.4.3	Eletroforese em PAGE-SDS	41
3.4.4	Determinação quantitativa de proteínas (microbiureto)	42
3.4.5	Determinação da atividade PLA ₂	42
3.4.6	Determinação da atividade da crotamina	42
3.5	Análise estatística	43
4.	Resultados	44
4.1	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) Adulta	45
4.2	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) 1º mês	49
4.3	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) 2º mês	53

4.4	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt)4º mês	57
4.5	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) 5º mês	61
4.6	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) 6º mês	64
4.7	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) 7º mês	67
4.8	Estudo comparativo dos resultados obtidos	70
4.9	Cromatografia de exclusão molecular em HPLC	77
4.10	Eletroforese em PAGE-SDS	79
4.11	Atividade fosfolipásica e proteolítica do complexo crotoxínico	81
4.12	Tabela de composição do veneno de Cdt do Vale do Paraíba/SP	83
4.13	Valores da DL50 de venenos de Cdt adultas e juvenis do 2º mês	85
5.	Discussão	86
6.	Conclusão	94
7.	Referências bibliográficas	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CrTx	Crotoxina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IV	Via intravenosa
JNM	Junção neuromuscular
min	Minutos
PLA₂	Fosfolipase A ₂
SAV	Soroterapia Antiveneno
TC	Tempo de Coagulação
Txs	Tromboxanas
T 50%	Tempo necessário para a obtenção de 50 % de bloqueio neuromuscular
T 90%	Tempo necessário para a obtenção de 90 % de bloqueio neuromuscular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

Tabela 1	Composição do veneno de Cdt	84
Tabela 2	Determinação da dose letal mediana (DL50)	85

FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt Adulta	46
Figura 2	Registros miográficos correspondentes ao veneno de Cdt Adulta	47
Figura 3	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt do 1º mês	50
Figura 4	Registros miográficos correspondentes ao veneno de Cdt do 1º mês	51
Figura 5	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt do 2º mês	54
Figura 6	Registros miográficos correspondentes ao veneno de Cdt do 2º mês	55
Figura 7	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt do 4º mês	58
Figura 8	Registros miográficos correspondentes ao veneno de Cdt do 4º mês	59
Figura 9	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt do 5º mês	62
Figura 10	Registros miográficos correspondentes ao veneno de Cdt do 5º mês	63

Figura 11	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt do 6º mês	65
Figura 12	Registros miográficos correspondentes ao veneno de Cdt do 6º mês	66
Figura 13	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt do 7º mês	68
Figura 14	Registros miográficos correspondentes ao veneno de Cdt do 7º mês	69
Figura 15	Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt em todos os tempos de extração	71
Figura 16	Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt Adulta e do 1º ao 7º mês	72
Figura 17	Registro do efeito de Cdt sobre as respostas contratantes ao KCL e ACh	74
Figura 18	Registro do T50% de todos os venenos estudados	75
Figura 19	Registro do T90% de todos os venenos estudados	76
Figura 20	Perfil de eluição do veneno total de Cdt em HPLC	78
Figura 21	Padrão eletroforético do veneno de Cdt do Vale do Paraíba/SP	80
Figura 22	Registro do perfil da atividade fosfolipásica A ₂ e proteolítica do complexo crotaxínico	82
Quadro 1	Acidente Crotálico	32

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* adulta e juvenil, do Vale do Paraíba/SP, sobre a junção neuromuscular. Para tanto, avaliou-se a atividade neurotóxica dos venenos de Cdt, através da técnica miográfica, em preparações *biventer cervicis* de pintainho e realizou-se análise bioquímica comparativa de todos os venenos utilizados.

Foram ensaiadas diferentes doses do veneno total de Cdt, no estudo miográfico (0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$), sendo que a partir da curva dose-efeito obtida, elegeu-se a concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ para os ensaios posteriores.

A 37°C os venenos estudados produziram bloqueio neuromuscular irreversível da resposta contrátil, em tempo inferior a 120 min e afetaram as respostas contraturantes à ACh (55 e 110 μM) e ao KCl (20 mM). O tempo necessário para a obtenção de 50% de bloqueio neuromuscular, na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, foi significativamente menor ($p < 0.05$) para o 1º e 2º meses de vida das serpentes de Cdt juvenis. Os dados mostraram que há diferença significativa quanto à toxicidade dos venenos estudados *in vitro*, não havendo uma relação direta entre a atividade bloqueadora neuromuscular e os valores da DL50.

Por meio da análise da Cromatografia de exclusão molecular em HPLC e da confirmação pela análise do padrão eletroforético dos venenos de *Crotalus juvenis*, do 1º ao 7º mês de extração, pode-se afirmar que ocorre variação na composição dos principais componentes do veneno total e dos componentes que compõem a crotoxina (três isoformas de crotapotina e uma de PLA₂), fato este

também verificado na tabela de composição do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nos diferentes meses de extração.

Diante do exposto, pode-se concluir que: 1) Ocorre variação ontogenética no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, proveniente do Vale do Paraíba/SP. 2) A variação na potência dos venenos de Cdt juvenis observada, em comparação com a potência do veneno de Cdt adulta, leva a acreditar que, ao menos nos dois primeiros meses de vida, as serpentes de Cdt produzam isoformas mais tóxicas de crotoxina (alta toxicidade com baixa atividade enzimática), sendo doravante substituída por isoformas menos tóxicas (moderada toxicidade com alta atividade fosfolipase A₂).

ABSTRACT

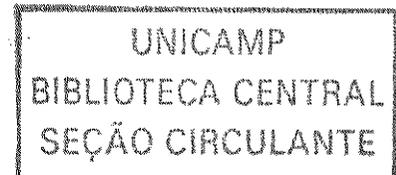
The objective of this study was to compare the effects of the poison *Crotalus durissus terrificus* adult and juvenile, from Vale do Paraíba/SP, on the neuromuscular junction. For so much, we decided to evaluate the neurotoxic activity of the poisons of Cdt, through the miographic technique, in chick isolated *biventer cervicis* muscle preparations and accomplish comparative biochemical analysis of all of poisons used.

Five concentration (0.5, 1.0, 5.0, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$) of Cdt were researched, and starting from the curve dose-effect obtained, the concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$ was chosen for the subsequent rehearsals.

At 37°C all of the poisons studied produced irreversible neuromuscular blockade, in least time at 120 minutes and they affected the contractures to exogenous ACh (55 and 110 mM) and KCl (20 mM). The time for obtaining 50% of neuromuscular blockade, at concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$, was significantly smaller ($p < 0.05$) for the 1st and 2nd months life of the snakes juvenile Cdt, results these in consonance with the literature.

Through the analysis of Molecular Exclusion Cromatography in HPLC and of the confirmation for the analysis of the pattern eletrophoretic of the poisons juvenile *Crotalus*, of the 1st to the 7nd month extraction, we believe that it happens variation in the composition of the main components of the total poison and of the components that compose the crotoxin (three crotapotine isoforms and one of PLA₂); fact this also verified in the table of composition of the poison of *Crotalus durissus terrificus*, in the different extraction months.

Before the exposed, it can be ended that: 1) it happens ontogenetic variation in the poison of *Crotalus durissus terrificus*, from Vale do Paraíba/SP. 2) the variation in the potency of the poisons of juvenile Cdt observed, in comparison with the potency of the poison of Adult snakes, in the group to believe that, at least in the first two life months, snakes of Cdt produce more poisonous isoforms of crotoxin (High toxicity with low enzymatic activity), being substituted from now on by less poisonous isoforms (Moderate toxicity with high activity PLA₂).



1. INTRODUÇÃO

Os acidentes por animais peçonhentos constituem problemas de saúde pública (ROSENFELD, 1972; WHO, 1981; REID e THEAKSTON, 1983; NEW et al., 1985; JORGE e RIBEIRO, 1989; THEAKSTON, 1989; SOERENSEN, 1990; ROSENFELD, 1991) nos países em desenvolvimento, dada a incidência, a gravidade e as seqüelas que causam. No Brasil, o Ministério da Saúde (BRASIL, 1986) tornou obrigatória, a partir de 1986, a notificação dos acidentes ofídicos. De 1986 a 1989 foram notificados, no Estado de São Paulo, 8.721 casos de acidentes ofídicos. Entre os acidentes graves devem ser ressaltados os causados por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Existem aproximadamente três mil espécies de serpentes em todo o mundo, sendo que apenas 410 são consideradas venenosas para o homem (BARRAVIERA, 1993). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorrem entre 19 mil a 22 mil acidentes ofídicos por ano (BRASIL, 1991). Existem por volta de 250 espécies de serpentes, sendo que destas, 70 são peçonhentas. A maioria destes acidentes deve-se a serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, sendo raros os produzidos por *Lachesis* e *Micrurus* (AMARAL et al., 1986).

O estudo das variações ontogenéticas nos venenos de serpentes possui importância tanto do ponto de vista da ciência básica como no campo clínico (LOMONTE et al., 1983).

Estudos comparativos prévios nos quais foram avaliados venenos de serpentes adultas, juvenis e recém-nascidas da mesma espécie, tanto do ponto de vista bioquímico como farmacológico, têm demonstrado que existem diferenças significativas em algumas de suas propriedades, tais como: letalidade, atividade enzimática, padrões eletroforéticos, efeitos locais e outros (MINTON, 1967; FIERO et al., 1972; REID e THEAKSTON, 1978; GUTIERREZ et al., 1980; MEIER e FREIVOGEL, 1980).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES

As serpentes venenosas que existem no Brasil pertencem a duas famílias: Elapidae e Viperidae (subfamília Crotalinae). No Brasil, o único gênero da família Elapidae é o *Micrurus*, cujas espécies são conhecidas popularmente por corais. Na família Viperidae, subfamília Crotalinae, são seus representantes no Brasil os gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*.

1.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os acidentes ofídicos são de importância médica em função do número de pessoas atingidas e pela gravidade que apresentam, constituindo-se assim problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento. Após o Ministério da Saúde ter tornado obrigatória a notificação dos acidentes ofídicos, de junho de 1986 a dezembro de 1989 foram notificados 70.799 casos. Os dados foram obtidos a partir do Sistema de Vigilância Epidemiológica implantado nas unidades federadas do Brasil. Em relação ao gênero da serpente, a maioria dos acidentes foi causada por serpentes do gênero *Bothrops* (86,16%), seguido pelos gêneros *Crotalus* (8,94%), *Lachesis* (2,39%), *Micrurus* (0,63%) e não-peçonhentas (1,88%) (BARRAVIERA, 1993).

No Estado de São Paulo, nos anos de 1986 a 1990, observou-se a seguinte freqüência: 86% dos acidentes envolvendo serpentes pertenceram ao gênero *Bothrops*;

12,9% *Crotalus* e 1,1% *Micrurus*. Não há relatos de acidentes por serpentes do gênero *Lachesis* no Estado de São Paulo (BRASIL, 1993).

Das notificações de acidentes ofídicos de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, segundo o gênero a que a serpente pertencia, 90,5% foram de acidentes botrópicos, 7,7% crotáticos, 1,4% laquétrico e em 0,4% dos acidentes, as serpentes pertenciam ao gênero *Micrurus* (BRASIL, 1997). RIBEIRO e JORGE, 1990, constataram que os acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Crotalus*, quanto à sazonalidade e horário do dia em que ocorreram, foram semelhantes aos causados por *B. jararaca*, embora os acidentes crotáticos tenham sido causados, em sua maioria, por serpentes consideradas adultas. Isto explica a grande porcentagem de picadas na perna, pois são mais comumente causadas nos acidentes com serpentes adultas. Esta localização da picada está relacionada aos hábitos terrestres da maioria das serpentes peçonhentas brasileiras, as quais desferem o bote a uma distância que, como regra, não ultrapassa um terço de seu próprio comprimento (ROSENFELD, 1972).

Segundo SAZIMA, (1988), serpentes *B. jararaca* jovens apresentam maior propensão a desferir botes defensivos em comparação com as adultas.

1.3 GÊNERO CROTALUS

As espécies de serpentes do gênero *Crotalus* são conhecidas popularmente por cascavéis, boicininga, boiçununga, cobra de guizo e maracá, sendo encontradas em todo o Brasil, e freqüentes nas regiões secas e pedregosas, não sendo encontradas nas florestas e

nas matas úmidas a leste da Serra do Mar. Na Amazônia, aparecem em lugares mais secos e elevados, tais como Santarém, Serra do Cachimbo e alguns cerrados. As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus*, e distribuídas em cinco subespécies: *terrificus*, *collilineatus*, *cascavella*, *ruruima* e *marajoensis* (BRASIL, 1998; JORGE e RIBEIRO, 1990). São responsáveis por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões.

Do ponto de vista epidemiológico, as *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos (90%) ocorridos no País; contudo o acidente crotálico apresenta o maior índice de letalidade em razão da frequência com que evolui para insuficiência renal aguda ou insuficiência respiratória (BRASIL, 1998).

O gênero *Crotalus* se caracteriza por pertencer à família Viperidae, que incluem as serpentes que possuem o mais complexo aparelho peçonhento, através do qual inoculam seu veneno. Classificam-se como solenóglifas por possuírem presas móveis na região frontal da boca.

As serpentes do gênero *Crotalus* são facilmente identificáveis por meio de sua cauda, que é composta por vários anéis córneos, formados cada qual ao final de uma ecdise, engastados entre si, e que ao ser agitada emite um som como de um chocalho.

Também é identificada por ser um tanatofídeo por possuir fosseta loreal, que funciona como uma espécie de radar, por ser um órgão sensorial termorreceptor extremamente sensível.

1.4 PEÇONHA

A peçonha é produzida e mantida em um par de glândulas, situadas na base da cabeça, acentuando o aspecto triangular da cabeça de algumas serpentes.

Existem músculos que rodeiam tanto a glândula como a presa, que se contraem no momento da picada, projetando a presa para frente e injetando a peçonha na vítima.

1.4.1 MODO DE AÇÃO DA PEÇONHA

Em geral, o modo de ação da peçonha é o mesmo dentro de um mesmo gênero, mas pode haver variações ontogênicas, sazonais e regionais:

- a) ontogênicas: em muitas serpentes ocorre uma variação na composição da peçonha produzida pelo filhote em relação à do adulto;
- b) sazonais: em alguns animais a época do ano pode interferir na peçonha;
- c) regionais: entre serpentes do mesmo gênero, mas geograficamente distantes, podem ocorrer variações na composição dos constituintes da peçonha.

A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* atua de várias formas em nosso organismo, portanto, de acordo com sua ação pode-se classificá-la em neurotóxica, miotóxica e coagulante .

Neurotóxica - as frações neurotóxicas do veneno crotálico são aquelas que produzem efeitos tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. A neurotoxicidade do veneno crotálico é produzida principalmente pela fração crotoxina, que tem ação pré-sináptica e atua nas terminações nervosas, inibindo a liberação da acetilcolina. Um dos efeitos importantes da crotoxina é o bloqueio da transmissão neuromuscular. A manifestação da ação neurotóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nos seres humanos, caracteriza o chamado "fácies miastênico" - ptose palpebral uni ou bilateral e paralisia da musculatura da face (ROSENFELD, 1971; VITAL BRAZIL, 1980). Há oftalmoplegia, podendo existir dificuldade de acomodação, midríase, visão turva, até cegueira e diplopia. Há relatos raros de ocorrência de paralisia da musculatura intercostal e/ou diafragmática (VITAL BRAZIL, 1966).

Miotóxica - produz lesões de fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) com liberação de enzimas e mioglobina para o sangue e, posteriormente, para a urina (mioglobinúria). O local primário da ação da crotoxina no músculo é a membrana plasmática, estando relacionado à hidrólise de fosfolipídios (KINI e EVANS, 1989). A ação miotóxica do veneno manifesta-se nas dores musculares generalizadas e no escurecimento da urina, sendo o óbito geralmente causado por insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 1987);

Coagulante - as alterações observadas nos fatores de coagulação estão relacionadas à enzima tipo trombina, sendo essa uma das frações do veneno que tem a capacidade de transformar fibrinogênio em fibrina *in vivo*. Isto acaba levando a um consumo de fatores de coagulação, e por fim, incoagulabilidade sanguínea (RAW et al., 1986). Geralmente não há

redução no número de plaquetas. As manifestações hemorrágicas, quando presentes, são discretas (ALEXANDER et al., 1998).

1.4.2 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt)

O veneno de *Crotalus* tem sido investigado, tanto biológica como farmacologicamente, desde 1938, foram isoladas do veneno total as frações denominadas: crotoxina, crotamina, convulxina e giroxina (SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, 1938).

A crotoxina é o principal componente tóxico e responsável pela elevada toxicidade do veneno (VITAL BRAZIL, 1972a); atua nas terminações nervosas, bloqueando a transmissão neuromuscular, e é portanto, responsável pela paralisia respiratória e dos músculos esqueléticos, em condições experimentais. É composta de duas subunidades: uma proteína com características básicas (CB), que possui atividade fosfolipásica (PLA₂) (HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971; RUBSAMEN et al., 1971; BREITHAUPT, 1976), com peso molecular compreendido entre 14.500 e 16.400 dáltons, e uma proteína ácida (CA) denominada crotapotina, com peso molecular compreendido entre 8.000 e 9.500 dáltons. A crotapotina não tem nenhuma atividade catalítica, mas, quando adicionada à subunidade básica, aumenta sua atividade farmacológica (BON et al., 1979). Porém, os dados obtidos por LANDUCCI et al (1995), sugerem que a crotapotina poderia estar interagindo com as PLA₂ extracelulares, geradas durante os processos inflamatórios, levando a uma redução da atividade hidrolítica destas fosfolipases.

A crotapotina é denominada proteína “chaperone”, pois teria a função de impedir as ligações inespecíficas da PLA₂ na membrana celular, facilitando, desta forma, a manifestação de seus efeitos tóxicos (BOUCHIER et al., 1991).

Estas duas subunidades, ácida e básica, formam um complexo molar de proporção 1:1, denominado crotoxina (BREITHAUPT, 1976). Sua atividade neurotóxica se deve provavelmente à inibição do influxo do íon cálcio, necessário à liberação da ACh pelos impulsos nervosos (VITAL BRAZIL et al., 1979).

A ação pré-sináptica produz uma alteração trifásica na liberação evocada do transmissor (LEE e HO, 1982; CHANG, 1985; STRONG, 1987; HAWGOOD et al., 1988; RODRIGUES-SIMIONI et al., 1990): inibição inicial atribuída à ligação da toxina ao sítio pré-sináptico específico, seguida por facilitação da liberação de ACh e progressiva depressão, até o bloqueio irreversível da neurotransmissão. A CrTX também bloqueia o efluxo de Na⁺ de microvesículas excitáveis, causado pela carbamilcolina, em preparação de órgão elétrico de *Torpedo marmorata*, exibindo, portanto, também uma ação pós-sináptica (BON et al., 1979); o efeito pós-sináptico da crotoxina foi originalmente observado por VITAL BRAZIL, 1966, em preparação isolada de diafragma cronicamente desnervado de rato.

São descritos dois modelos para explicar a interação da crotoxina com a membrana pré-sináptica; o modelo da dissociação e o modelo do complexo ternário transiente. O modelo da dissociação diz que quando a CrTX se aproxima do seu receptor na membrana celular, a crotapotina se dissocia da PLA₂, deixando-a livre para se ligar ao receptor. No modelo do complexo ternário transiente, a CrTX primeiramente se uniria ao receptor da membrana e só então ocorreria a dissociação de seus componentes, com liberação da crotapotina, enquanto a PLA₂ permaneceria ligada ao receptor (DELOT e BON, 1993).

A crotamina é uma neurotoxina polipeptídica de baixo peso molecular, de caráter fortemente básico, identificada pela primeira vez por GONÇALVES e VIEIRA, em 1950; é encontrada no veneno de serpente da espécie *Crotalus durissus terrificus*, de certas regiões do Brasil e Argentina. É uma proteína de ponto isoelétrico igual a 10,3, massa molecular de 4.800 dáltons e com três pontes de sulfeto (GONÇALVES, 1956). Apresenta um pequeno número de resíduos de aminoácidos comparados com outras neurotoxinas (RYDEN et al., 1973, YANG, 1974). Quando injetada intraperitonealmente em ratos causa depressão respiratória, lacrimejamento, paralisia espástica das patas posteriores, convulsão e morte. A crotamina, em baixas concentrações, é capaz de induzir um efeito anestésico cujo mecanismo de ação é desconhecido (MACIN et al., 1997).

Em função da presença ou não de crotamina no veneno de Cdt, duas variedades regionais (BARRIO e VITAL BRAZIL, 1951) de veneno podem ser identificadas nesta espécie:

Tipo I – (Brasil, Argentina) – “crotamine-positive”: induz numa primeira fase, ataque espasmódico em camundongos e ratos; rigidez muscular em cães. Posteriormente, hipotonia muscular e paralisia flácida.

Tipo II – (Brasil) – “crotamine-negative”: produz apenas hipotonia muscular e paralisia flácida.

A giroxina é farmacologicamente pouco conhecida. Em condições experimentais, em camundongos, produz uma síndrome convulsiva. Seu isolamento foi descrito por BARRIO, 1961.

A convulxina é responsável por convulsões, distúrbios circulatórios e respiratórios; é uma toxina de alta massa molecular que se comporta como uma proteína homogênea (PRADO-FRANCESCHI, 1970 ; VITAL BRAZIL, 1972b). Atua em plaquetas, induzindo a sua agregação, liberação de ATP e formação de tromboxanas (Tx_s) (VARGAFTIG et al., 1980).

1.5 SOROTERAPIA:

Os soros heterólogos antivenenos são concentrados de imunoglobulinas obtidos através da sensibilização de diversos animais, e os mais utilizados são os de origem eqüina. No Brasil, os laboratórios que produzem esses imunoderivados para a rede pública são: Instituto Butantan (São Paulo), Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais) e Instituto Vital Brasil (Rio de Janeiro) (BRASIL, 1998).

A soroterapia antiveneno (SAV), quando indicada, é um passo fundamental no tratamento adequado dos pacientes picados pela maioria dos animais peçonhentos. A dose utilizada deve ser a mesma para adultos e crianças, visto que o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade possível de veneno circulante, independente do peso do paciente. A sua aplicação (ver Quadro 1) deve ser preferencialmente realizada em postos de atendimento médico (BRASIL, 1993).

A via de administração recomendada é a intravenosa (IV) e o soro pode ser administrado, diluído ou não, lentamente, entre 20 e 60 minutos, sob estreita vigilância médica e da enfermagem. A freqüência de reações à soroterapia parece ser menor quando o antiveneno é administrado diluído. A diluição pode ser feita, a critério do médico, na razão

de 1:2 a 1:5, em soro fisiológico ou glicosado 5%, infundindo-se na velocidade de 8 a 12 mL/min, observando, entretanto, a possível sobrecarga de volume em crianças e em pacientes com insuficiência cardíaca (BRASIL, 1998).

A freqüência relatada de reações precoces à soroterapia é muito variável, de 4,6% até 87,2%. A maioria destas reações ocorre durante a infusão do antiveneno e nas duas horas subseqüentes. Normalmente são consideradas leves, porém, é conveniente que os pacientes sejam mantidos em observação, no mínimo por 24 horas, para a detecção de outras reações que possam ser relacionadas à soroterapia.

Os sinais e sintomas mais freqüentemente observados são: urticária, tremores, tosse, náuseas, dor abdominal, prurido e rubor facial. Mais raramente são observadas reações precoces graves, semelhantes à reação anafilática ou anafilactóide. Nestes casos, os pacientes podem apresentar arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque e/ou quadro obstrutivo das vias respiratórias.

A fisiopatologia das reações precoces à soroterapia ainda não se encontra estabelecida. Admite-se que a grande quantidade de proteínas heterólogas poderia determinar uma formação de agregados de proteínas ou de imunocomplexos, ativando o sistema complemento. A ativação deste sistema levaria à formação de anafilotoxinas que, por sua vez, poderiam determinar a liberação direta de mediadores químicos dos mastócitos e basófilos, principalmente a histamina.

Uma reação tardia, também conhecida como Doença do Soro, decorrente da soroterapia, pode ocorrer após 5 a 24 dias. Os pacientes podem apresentar febre, artralgia, linfadenomegalia, urticária e proteinúria. A incidência real destas manifestações é subestimada, pois muitos pacientes não retornam ao serviço em que foram tratados, ou

talvez, nem foram corretamente orientados para procurar novamente o médico no caso da ocorrência dos sintomas acima relatados. Os mecanismos mais prováveis incluem a formação de complexo imune entre antiveneno e veneno, com ativação e consumo de Complemento (BRASIL, 1993).

**CLASSIFICAÇÃO QUANTO À GRAVIDADE E TRATAMENTO ESPECÍFICO DE
ACIDENTES OFÍDICOS
(BRASIL, 1997)**

Quadro 1. ACIDENTE CROTÁLICO

Gravidade	Manifestações					Número ampolas/via
	Fácies Miastênica / visão turva	Mialgia	Urina vermelha ou marrom	Oligúria ou anúria	Tempo de coagulação (TC)	
Leve	ausente ou tardia	ausente ou tardia	ausente ou tardia	ausente ou tardia	normal ou alterado	5/IV
Moderada	discreta	discreta	pouco evidente ou ausente	ausente	normal ou alterado	10/IV
Grave	evidente	presente	presente	presente ou ausente	normal ou alterado	20/IV

* Soro anticrotálico ou soro antibotrópico-crotálico (uma ampola = 10ml)

2. OBJETIVOS

O presente estudo propõe:

- 1- Avaliar, comparativamente, a atividade neurotóxica do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* adulta e juvenil, proveniente do Vale do Paraíba/SP, sobre a junção neuromuscular (JNM), em preparação isolada m. *biventer cervicis* de pintainho.
- 2- Realizar a análise bioquímica dos venenos estudados neste trabalho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Nos ensaios farmacológicos foram utilizados pintainhos machos, HY-LINE W36 de quatro a oito dias de idade, fornecidos pela Granja Globo Aves Agrovícola Ltda (Mogi-Mirim/SP). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 sem luz).

3.2 VENENOS

Todos os venenos de serpentes utilizados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo do Centro de Estudos da Natureza-CEVAP da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP – São José dos Campos e procederam de espécimes capturadas na região do Vale do Paraíba. Cascavéis adultas e suas crias, as cascavéis recém-nascidas, foram mantidas em cativeiro, sob as mesmas condições de alimentação, estresse e clima. Os venenos das serpentes jovens foram extraídos mensalmente, mantidos em banho de gelo e posteriormente em dessecador a 4°C em geladeira

3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.3.1 PREPARAÇÃO MÚSCULO *BIVENTER CERVICIS* DE PINTAINHO

Para estes experimentos foram utilizados pintainhos machos, HY-LINE W36 de quatro a oito dias de idade, anestesiados com Halotano (CRISTÁLIA – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda – Itapira/SP).

Os músculos foram removidos e montados em cubas de 5 mL, em banho orgânico,(GINSBORG e WARRINER, 1960), contendo solução de Krebs (mM): NaCl 118,7, KCl 4,7, CaCl₂ 1,88, KH₂PO₄ 1,17, MgSO₄ 1,17, NaHCO₃ 25,0, e glicose 11,65, pH 7,5; aerados com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), submetidos a uma tensão constante de 0,5 g/cm e estimulados através de eletrodos bipolares, posicionados na região de transição entre o tendão e o músculo, de modo a proceder uma estimulação de campo.

Utilizou-se estimulador GRASS S48 (QUINCY. MA. U.S.A) com estímulos supramaximais de 0,1 Hz de frequência, 6-8 V e 0,2 ms de duração. O registro da força de contração muscular e a resposta a estímulo elétrico, foi realizado através de transdutor isométrico load Bell BG 10GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400. Contraturas por acetilcolina exógena (ACh 55 µM e 110 µM por 60 s) e KCl (20mM por 180 s) foram obtidas para testar as atividades neurotóxicas e miotóxicas (HARVEY et al, 1994). Após a estabilização por 20 min, os venenos foram adicionados ao banho. Os experimentos foram realizados à temperatura de 37° C.

3.3.2 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA (DL50)

A DL50 das peçonhas de Cdt adultas e Cdt 2º mês foi determinada em camundongos.

A via foi através da veia caudal, e a sobrevivência dos animais foi avaliada 24 horas após. Foram utilizados camundongos pesando de 30 a 40 g, empregando-se seis (6) animais para cada dose. As peçonhas foram dissolvidas em solução salina, para a obtenção da solução estoque, a partir da qual prepararam-se quatro soluções de concentrações que guardavam entre si uma razão de 1,25. Para o cálculo da DL50 foi usada a metodologia descrita por WEILL (1953).

3.4 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

A purificação e os ensaios bioquímicos (eletroforeses) foram realizados no Laboratório de Bioquímica/ I.B. – Unicamp, do Prof. Dr. Sérgio Marangoni.

Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau HPLC, grau seqüência ou de alto grau de pureza (SIGMA, Aldrich Chemicals, Merck e Bio Rad).

3.4.1 PURIFICAÇÃO DO VENENO TOTAL DE *Crotalus durissus terrificus*

3.4.1.1 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Aproximadamente vinte miligramas do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foram purificados em uma coluna de exclusão molecular Protein Pack SW 300 (Waters), acoplada ao sistema de cromatografia líquida de baixa pressão “APPS (HPLC) bio preparative – LC 650E”. O sistema cromatográfico foi previamente equilibrado com tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm, as frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a 20°C.

Ao final de cada corrida, o cromatograma foi analisado em um integrador de frações Waters 470, que possibilita a quantificação dos picos em porcentagem de amostra.

3.4.2 HPLC DE FASE REVERSA

O veneno total de Cdt e suas frações foram purificados em HPLC de fase reversa. O sistema cromatográfico usado foi o HPLC – PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 1,0 mL e uma coluna μ -bondapak C-18 0,78 X 30 cm, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5. A eluição das

amostras foi realizada, usando-se um gradiente linear com acetonitrila 66%. As frações foram monitoradas a 280 nm.

3.4.3 ELETROFORESE EM PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada, seguindo-se a metodologia descrita por LAEMMLI, 1970. As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas, utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (30%T, 0,8%C). O gel de concentração a 5% foi preparado, utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito, utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 207%. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de miniplaca SE 250 Migthy Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 40mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C, o excesso de corante foi removido em ácido acético 7%.

Também foram utilizadas, para a análise do grau de homogeneidade molecular das amostras, as eletroforeses em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por SCHAGGER e VON JAGOW, 1987, usando um sistema de eletroforese descontínuo e um gel de corrida a 10%.

3.4.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS (MICROBIURETO)

As dosagens de proteínas em solução foram realizadas pelo método de microbiureto, de acordo com a metodologia descrita por ITZHAKI e GILL, 1964. A curva-padrão de proteínas foi obtida com o soro albumina bovina (Sigma), sendo considerado, para a construção da curva-padrão, o coeficiente de extinção em 280nm = 0,666.

3.4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PLA₂

Neste método foi utilizado um substrato cromogênico derivado do p-nitroanilida, segundo método descrito por CHO e KÉZDY, 1991. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 4 mg/mL, para os testes de fosfolipase A₂. As amostras foram incubadas junto com o substrato, tampão Tris-HCl, pH 8,0, cálcio por 20 min. Ao final deste tempo, as amostras foram lidas em um espectro UV-VIS a 450nm.

3.4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CROTAMINA

A determinação da atividade da crotamina de cada um dos picos foi avaliada segundo o método descrito por OWNBY et al., 1988.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não pareado *t*-Student, com valor $p < 0,05$ considerado como significativo.

4. RESULTADOS

4.1 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) Adulta

O veneno total de serpentes adultas foi ensaiado nas doses ($\mu\text{g/ml}$) de : 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 (Figura 1). A ação do veneno de Cdt na JNM tende a ser dose-dependente, com bloqueio completo e irreversível da contração muscular em resposta ao estímulo elétrico indireto; assim, verifica-se que o efeito do veneno em relação ao tempo de bloqueio é inversamente proporcional.

A partir da curva dose-efeito obtida, elegeu-se a dose de 1 $\mu\text{g/ml}$ para os ensaios posteriores de comparação. Na dose escolhida, o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 50% (T50%) foi de $35,5 \pm 4,5$ min e o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 90% (T90%) foi de $49,5 \pm 9,5$ min.

Os resultados mostraram uma possível ação pré-sináptica do veneno de Cdt, pois na vigência de bloqueio total, a preparação respondeu à adição exógena de ACh e potássio com contratura (Figura 2). A representação gráfica do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh é mostrado na página 74 (Figura 17).

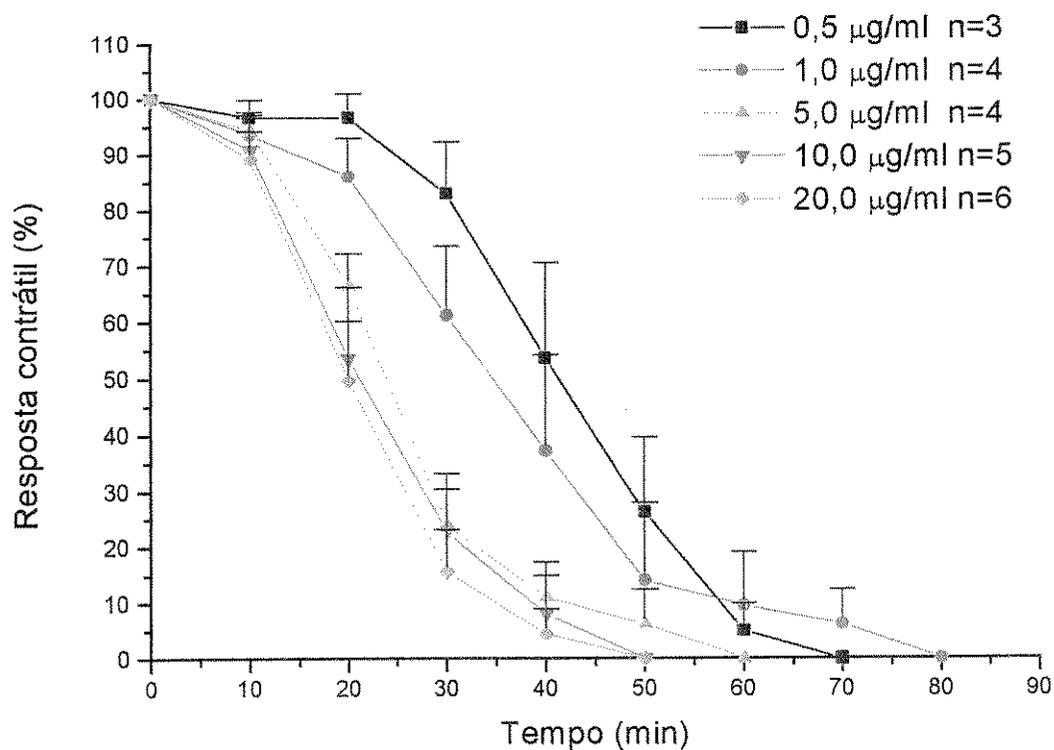
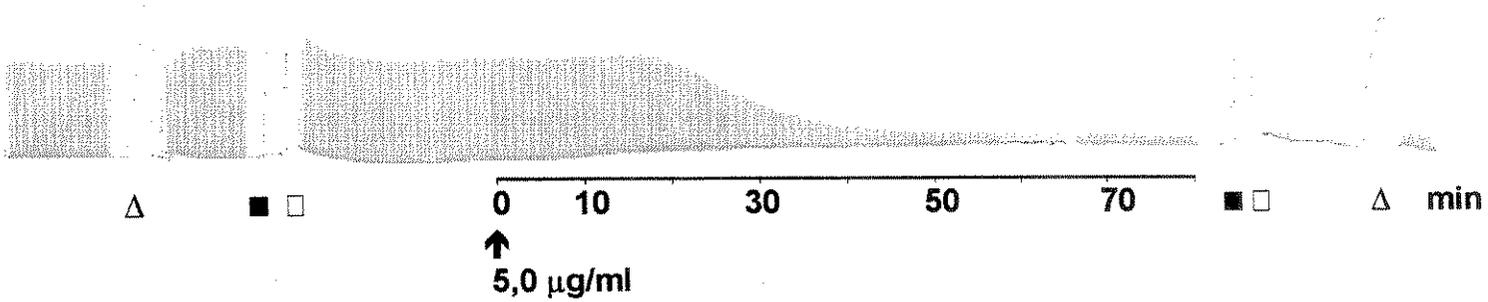
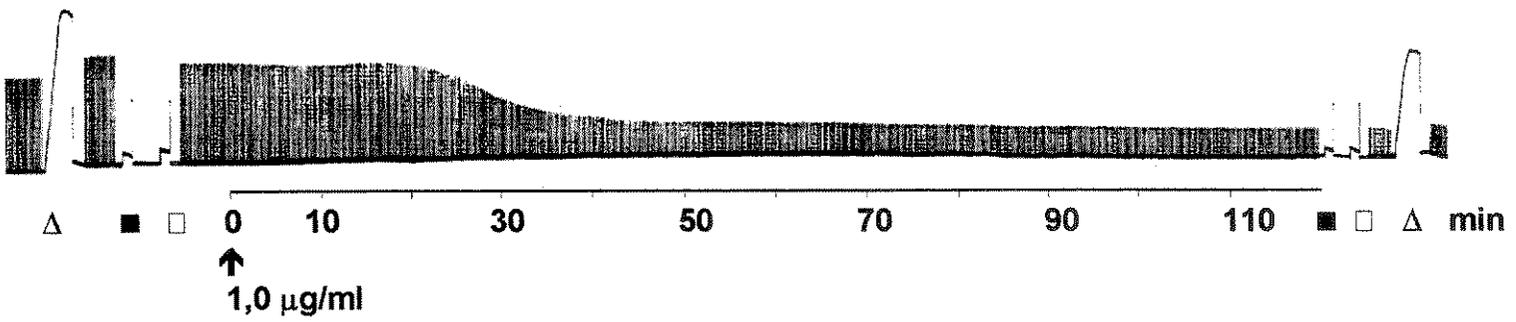
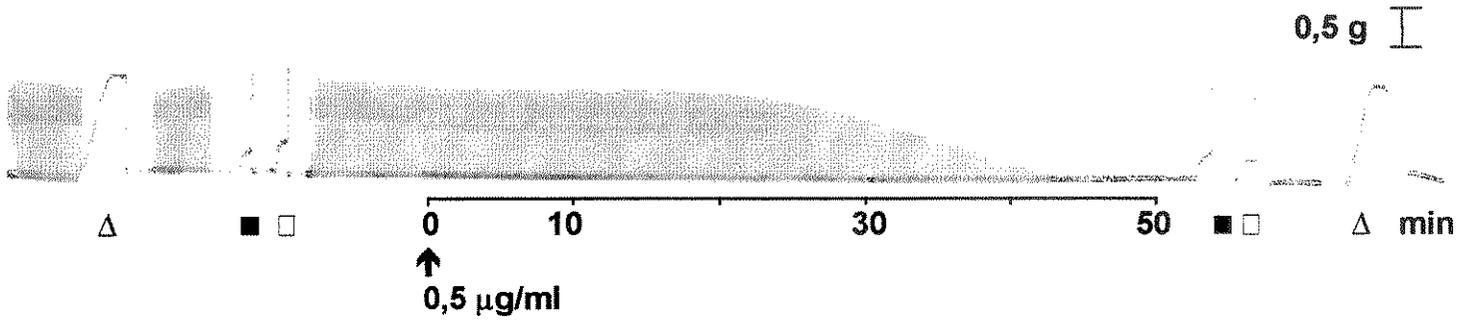
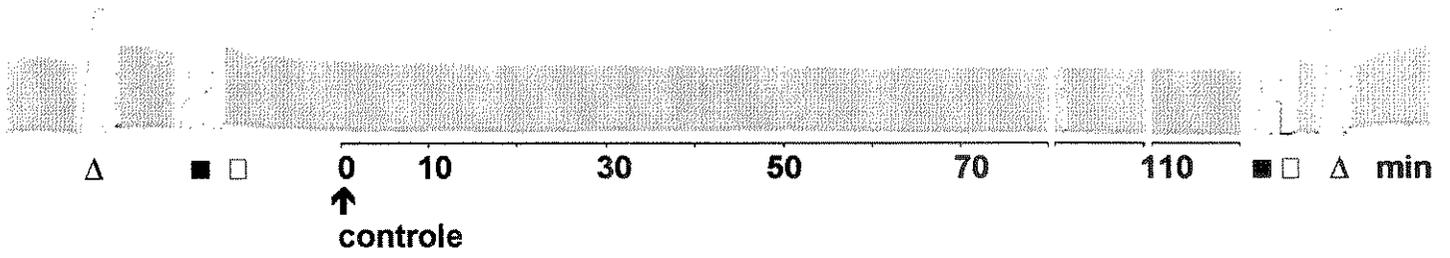


Figura 1 – Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt Adulta, nas doses de 0,5 , 1,0 ,5,0 , 10,0 e 20,0 µg/ml, sobre a preparação *m. biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro-padrão.



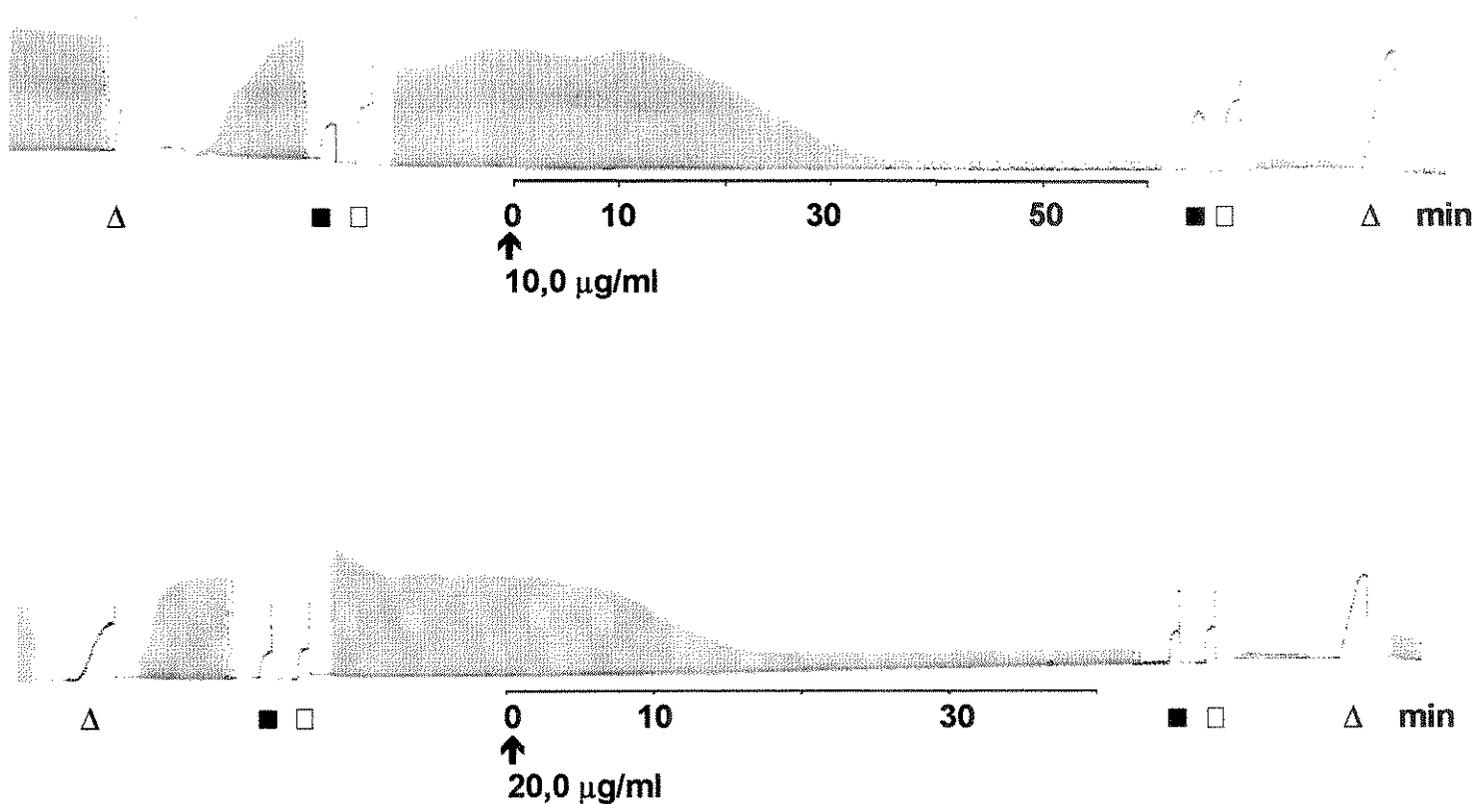


Figura 2 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt Adulta, nas respectivas doses indicadas, em preparações *m. biventer cervicis* de pintainho.

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 µM; □ ACh 110 µM; ↑ Adição do veneno; 0,5 g $\bar{\text{I}}$ tensão

4.2 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) 1º mês

Foram ensaiadas as doses ($\mu\text{g/ml}$) de : 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0, conforme Figura 3. A ação do veneno de Cdt na JNM tende a ser dose-dependente, com o bloqueio completo e irreversível da contração muscular em resposta ao estímulo elétrico indireto; assim, verifica-se que o efeito do veneno em relação ao tempo de bloqueio é inversamente proporcional.

A partir da curva dose-efeito obtida, elegeu-se a dose de 1 $\mu\text{g/ml}$ para os ensaios posteriores de comparação. Na dose escolhida, o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 50% (T50%) foi de $25,1 \pm 0,81$ min e o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 90% (T90%) foi de $41,0 \pm 4,0$ min.

Os resultados mostraram uma possível ação pré-sináptica do veneno de Cdt pois na vigência de bloqueio neuromuscular total, a preparação respondeu à adição exógena de ACh e potássio com contratura (Figura 4). A representação gráfica do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh é mostrado na página 74 (Figura 17).

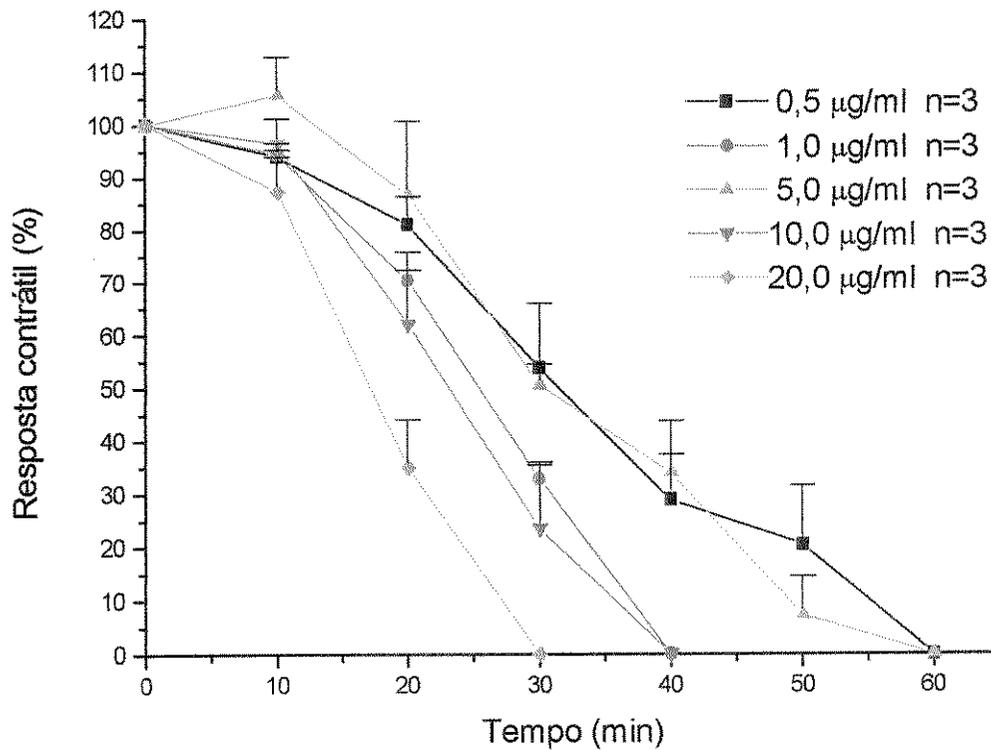
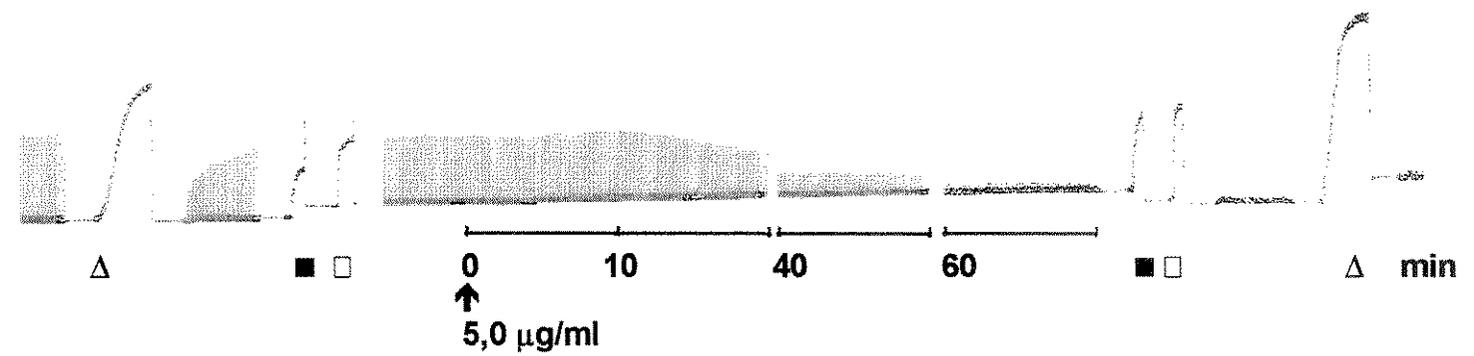
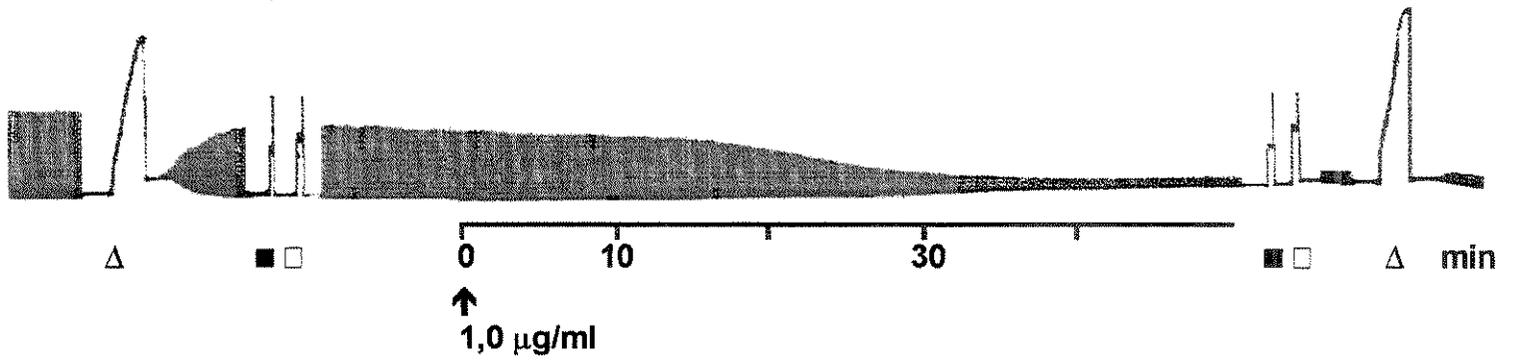
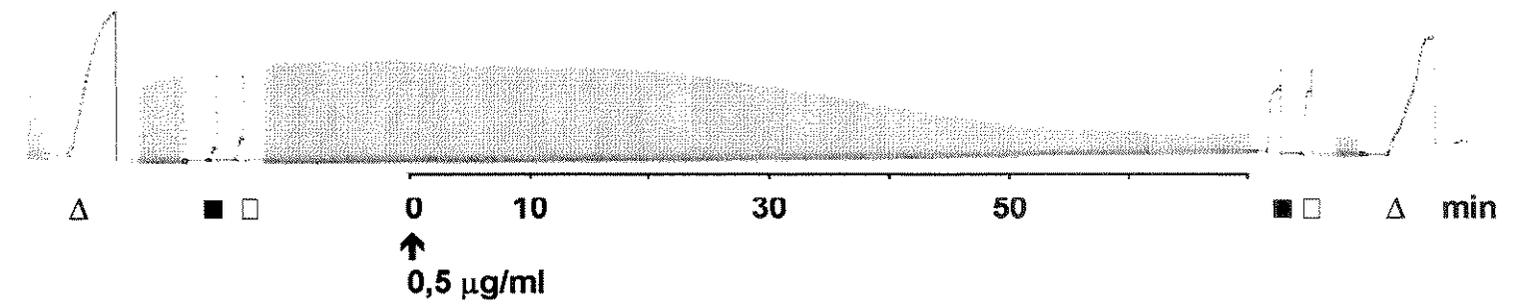
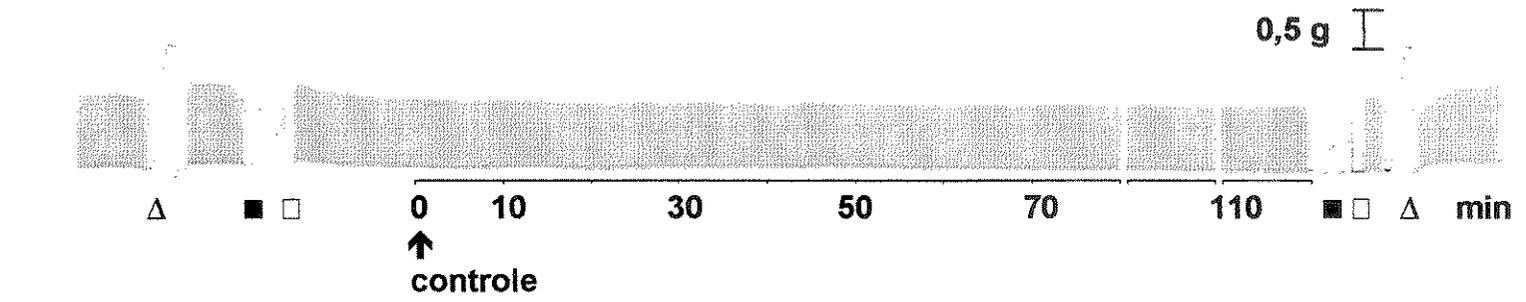


Figura 3 – Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt 1º mês, nas doses de 0,5 , 1,0 ,5,0 , 10,0 e 20,0 µg/ml, sobre a preparação *m. biventer cervicis* de pintainho sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro-padrão.



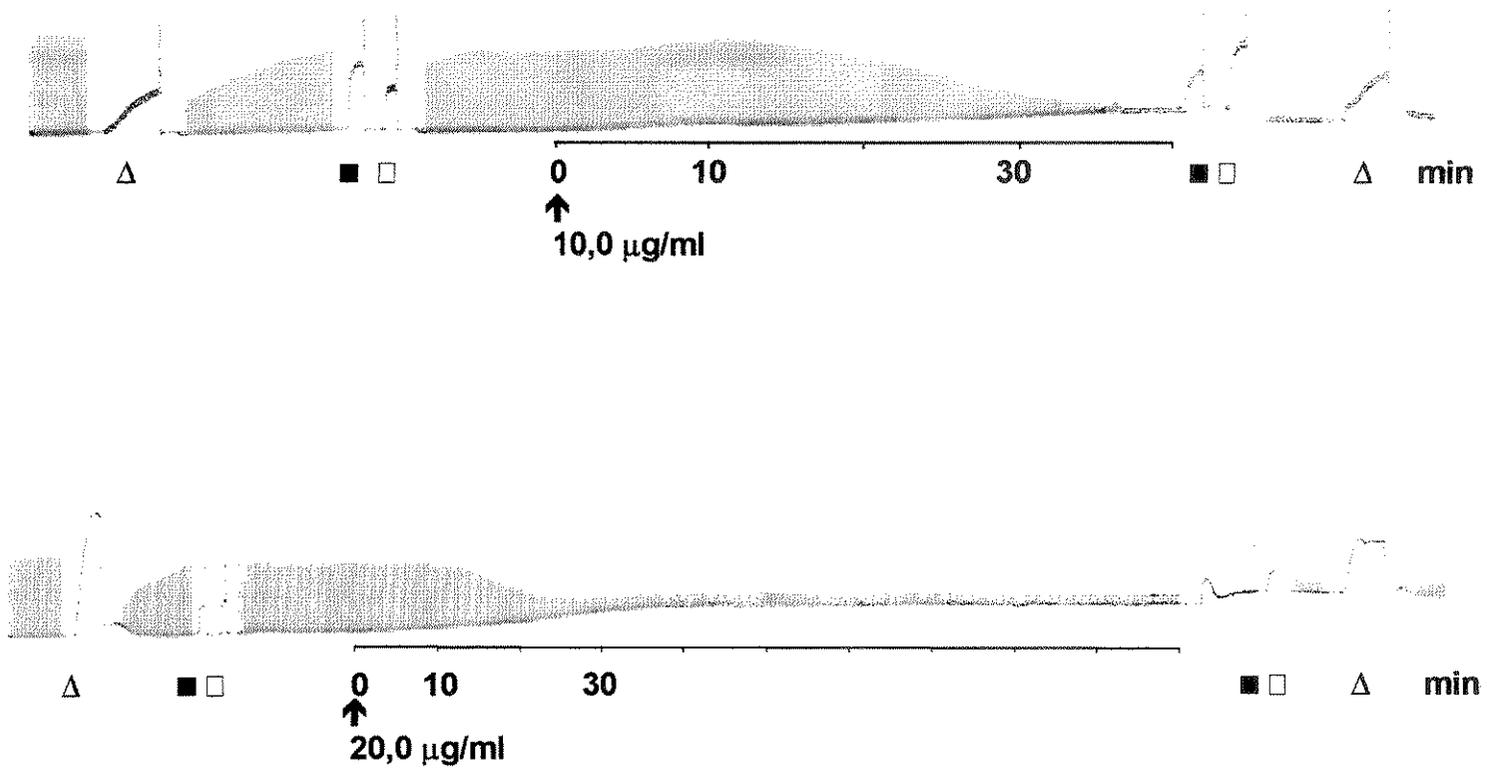


Figura 4 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt 1^o mês, nas respectivas doses indicadas, em preparações *m. biventer cervicis* de pintainho

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 µM; □ ACh 110 µM; ↑ Adição do veneno; 0,5 g tensão

4.3 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) 2º mês

Foram ensaiadas as doses ($\mu\text{g/ml}$) de : 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0, conforme Figura 5. A ação do veneno de Cdt na JNM tende a ser dose-dependente, com o bloqueio completo e irreversível da contração muscular em resposta ao estímulo elétrico indireto; assim, verifica-se que o efeito do veneno em relação ao tempo de bloqueio é inversamente proporcional.

A partir da curva dose-efeito obtida, elegeu-se a dose de 1 $\mu\text{g/ml}$ para os ensaios posteriores de comparação. Na dose escolhida, o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 50% (T50%) foi de $25,1 \pm 2,6$ min e o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 90% (T90%) foi de $33,7 \pm 2,7$ min.

Os resultados mostraram uma possível ação pré-sináptica do veneno de Cdt, pois na vigência de bloqueio neuromuscular total, a preparação respondeu à adição exógena de ACh e potássio com contratura (Figura 6). A representação gráfica do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh é mostrado na página 74 (Figura 17).

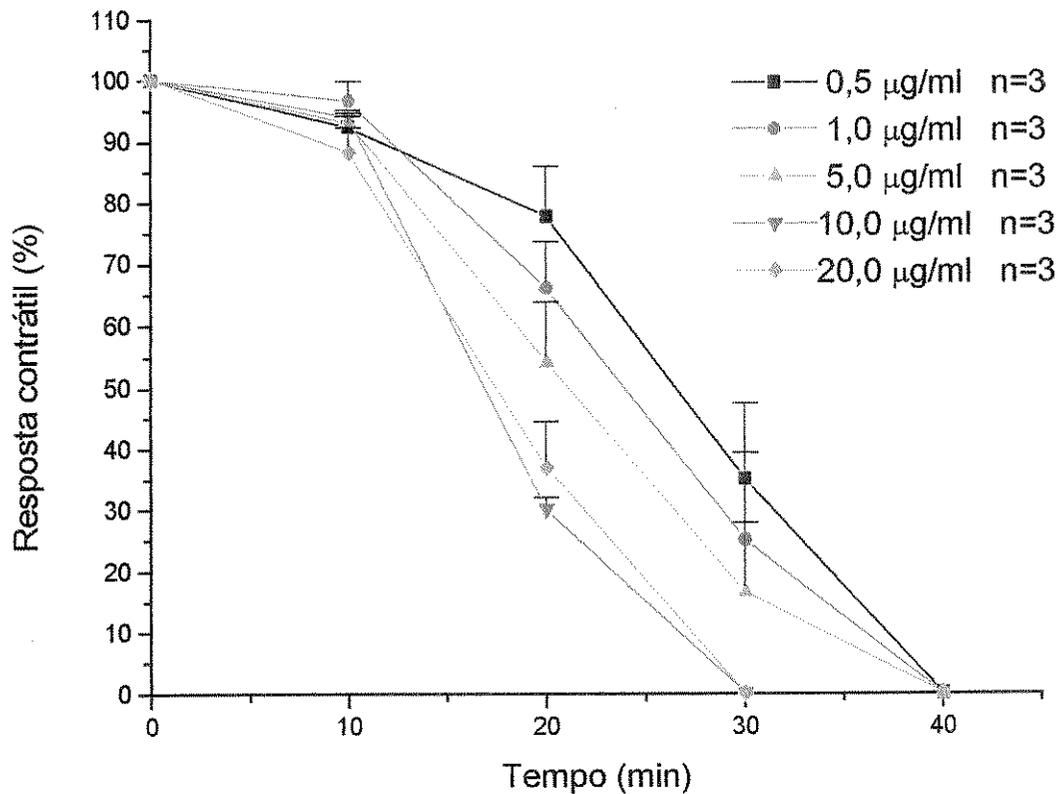
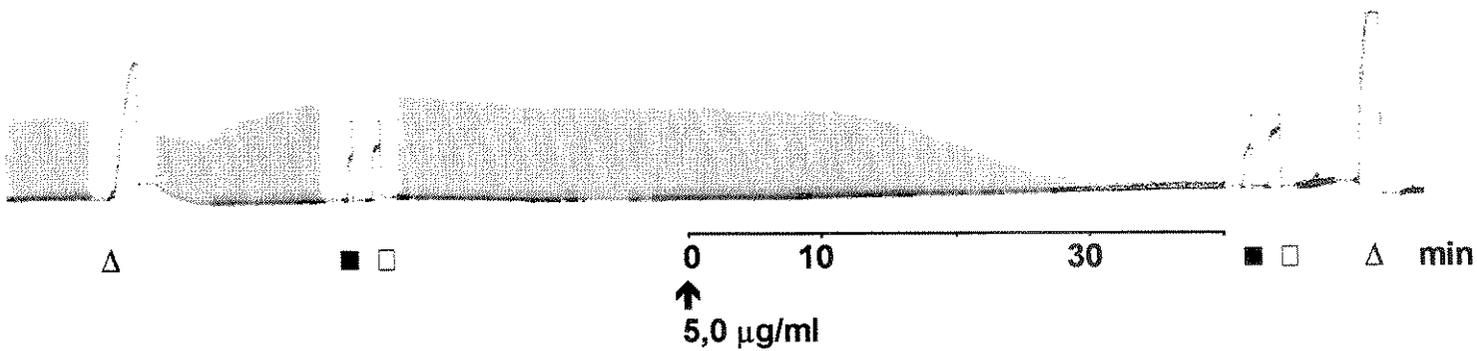
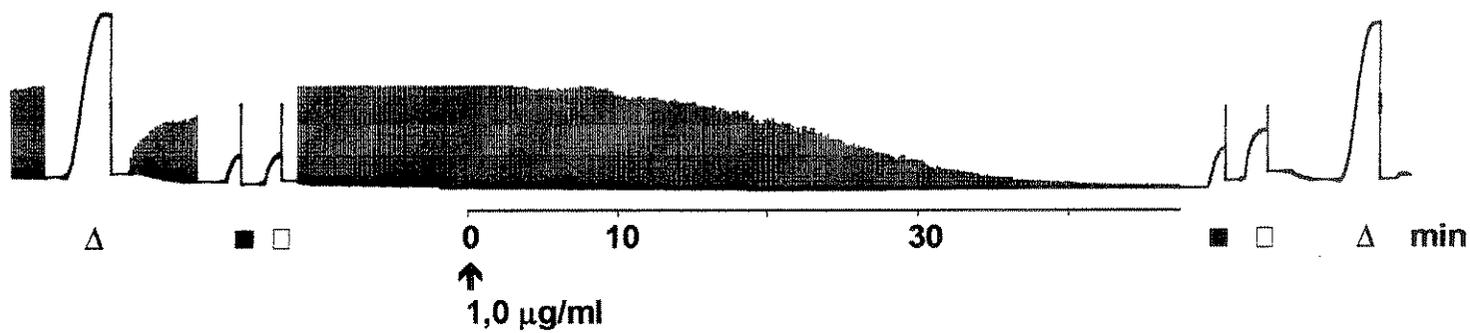
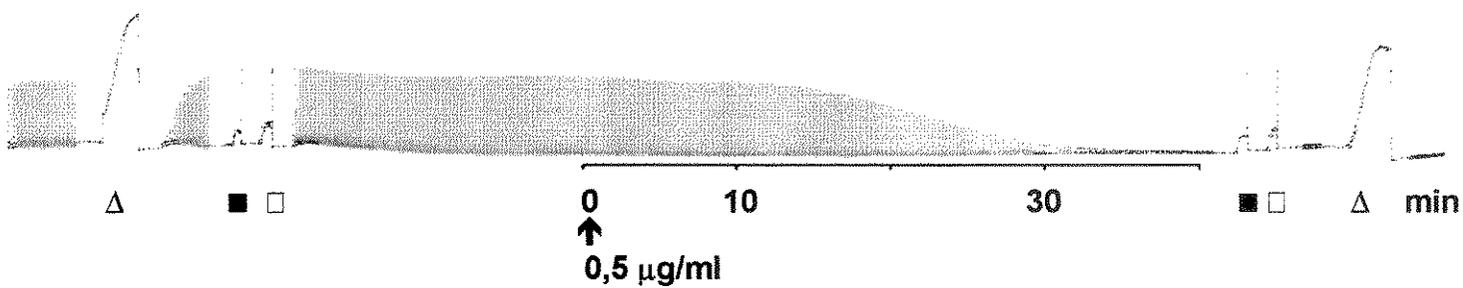
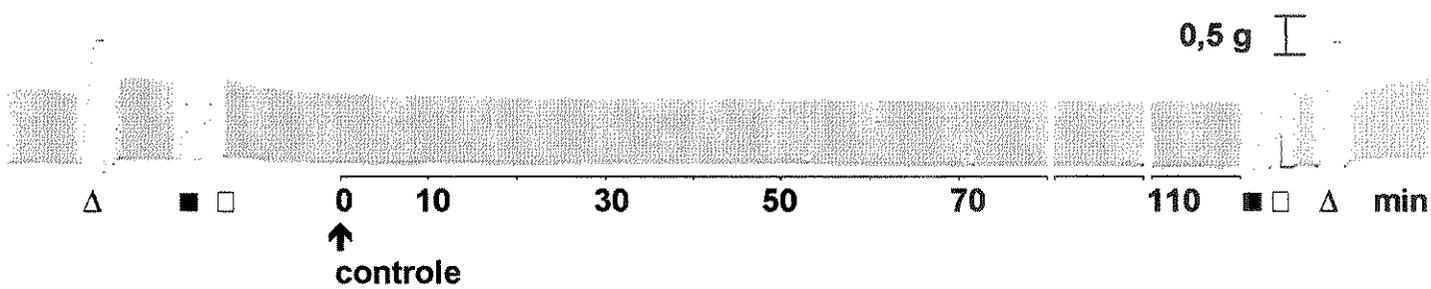


Figura 5 – Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt 2º mês, nas doses de 0,5 , 1,0 , 5,0 , 10,0 e 20,0 µg/ml, sobre a preparação *m. biventer cervicis* de pintainho sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro-padrão.



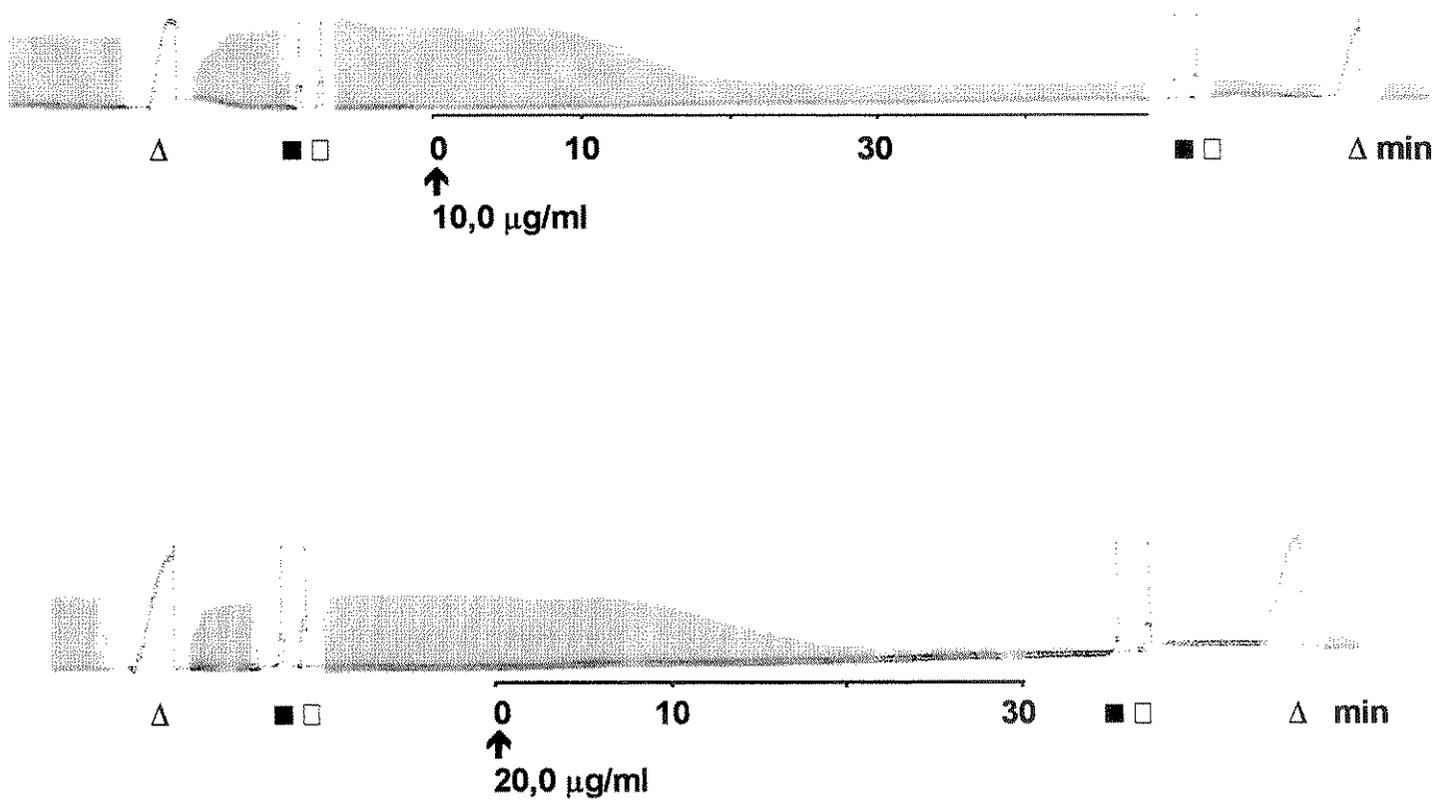


Figura 6 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt 2º mês, nas respectivas doses indicadas, em preparações *m. biventer cervicis* de pintainho.

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 µM; □ ACh 110 µM; ↑ Adição do veneno; 0,5 g \perp tensão

4.4 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) 4º mês

Foram ensaiadas as doses ($\mu\text{g/ml}$) de : 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0, conforme Figura 7. A ação do veneno de Cdt na JNM tende a ser dose-dependente, com o bloqueio completo e irreversível da contração muscular em resposta ao estímulo elétrico indireto; assim, verifica-se que o efeito do veneno em relação ao tempo de bloqueio é inversamente proporcional.

A partir da curva dose-efeito obtida, elegeu-se a dose de 1 $\mu\text{g/ml}$ para os ensaios posteriores de comparação. Na dose escolhida, o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 50% (T50%) foi de $35,1 \pm 6,1$ min e o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 90% (T90%) foi de $48,3 \pm 4,6$ min.

Os resultados mostraram uma possível ação pré-sináptica do veneno de Cdt pois na vigência de bloqueio neuromuscular total, a preparação respondeu à adição exógena de ACh e potássio com contratura (Figura 8). A representação gráfica do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh é mostrado na página 74 (Figura 17).

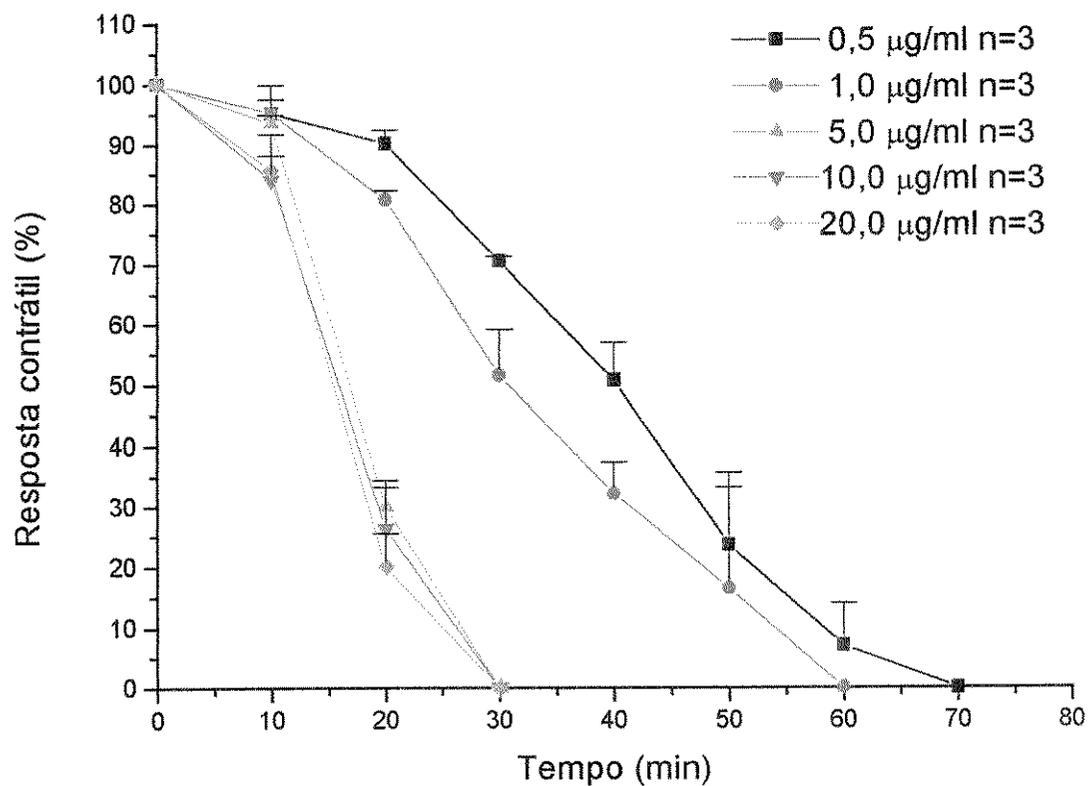
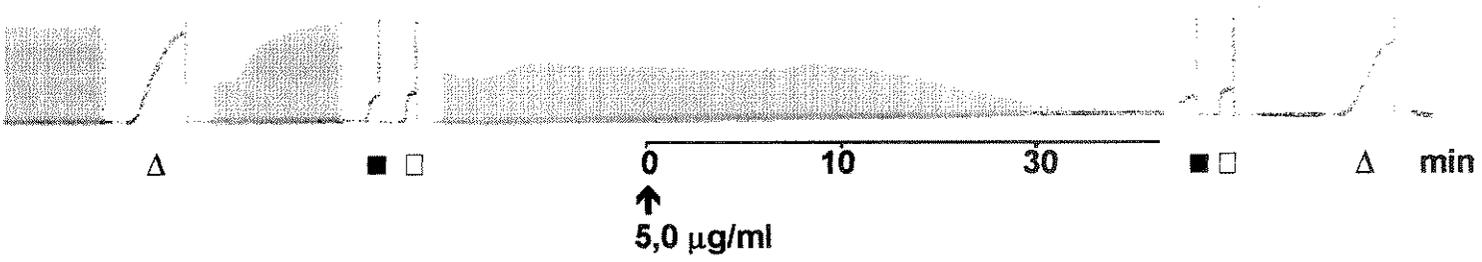
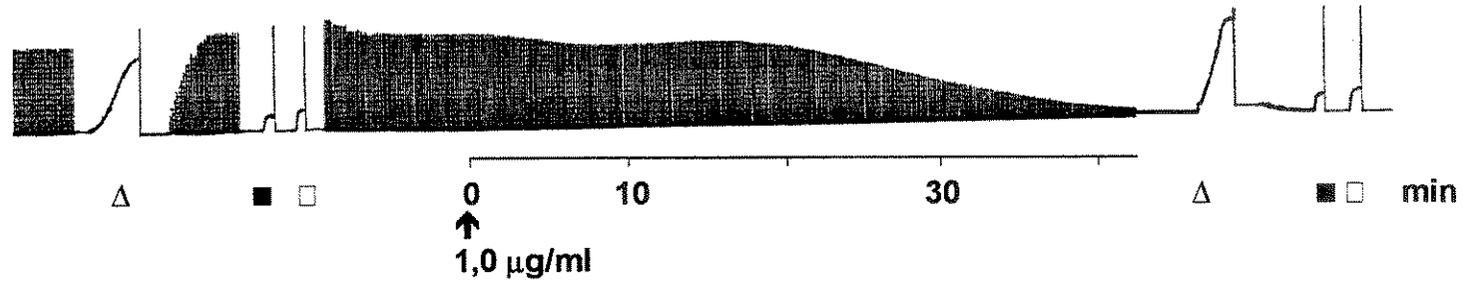
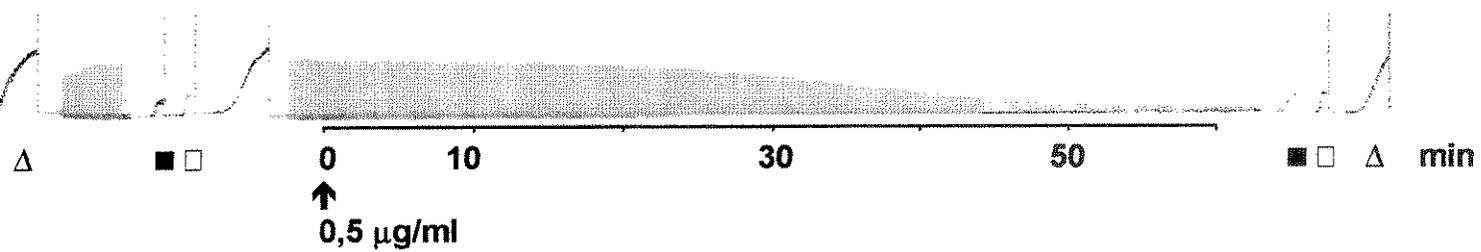
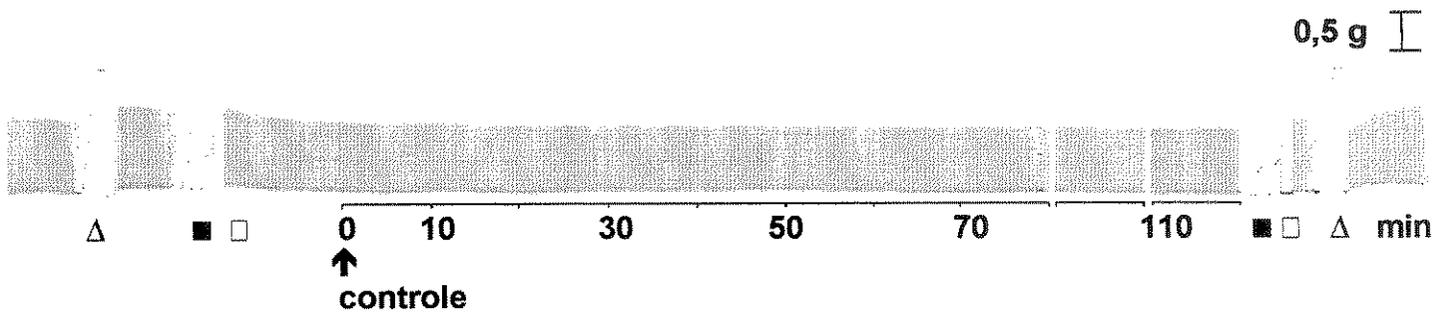


Figura 7 – Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt 4º mês, nas doses de 0,5 , 1,0 ,5,0 , 10,0 e 20,0 µg/ml, sobre a preparação m. *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro-padrão.



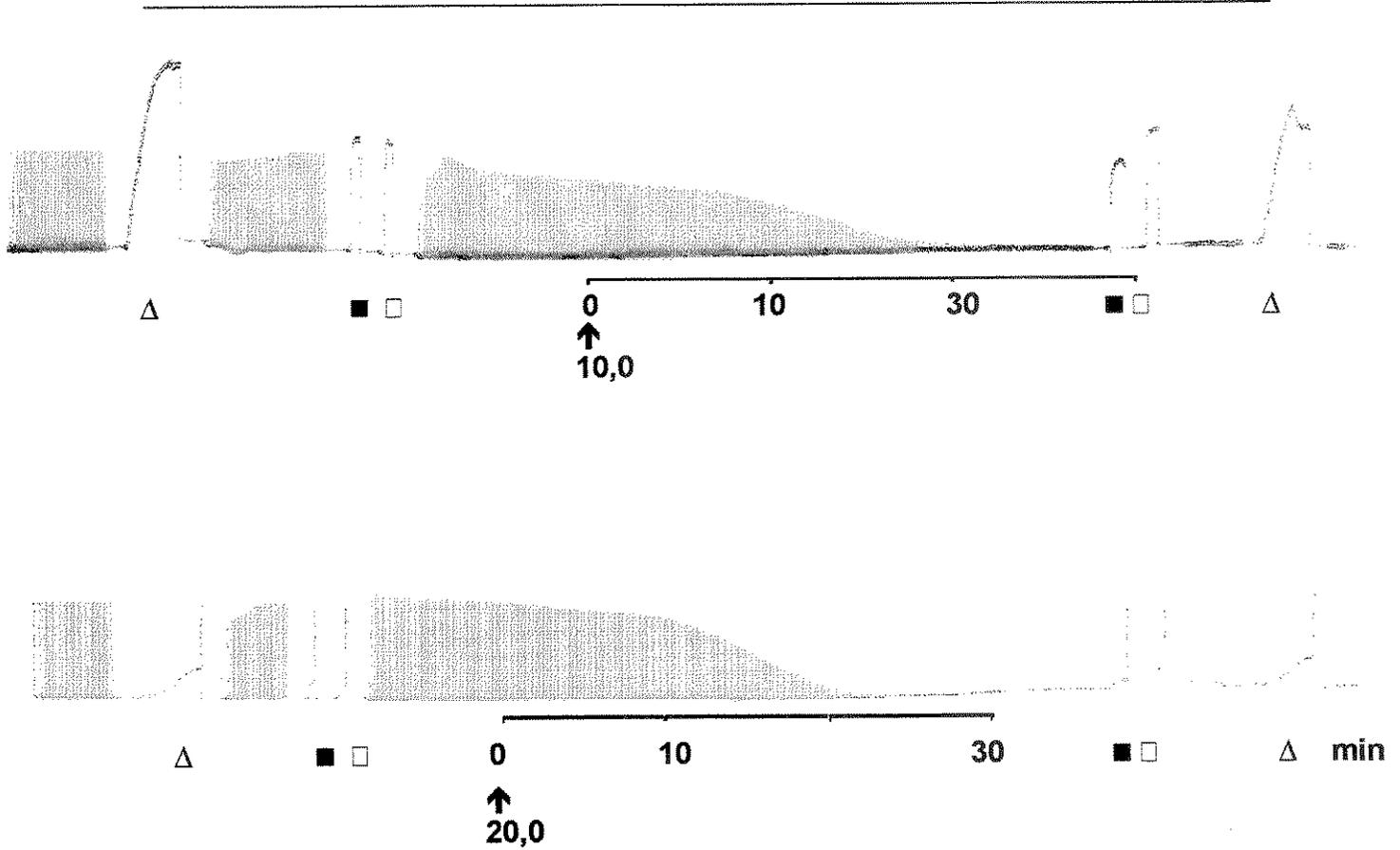


Figura 8 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt 4^o mês, nas respectivas doses indicadas, em preparações *m. biventer cervicis* de pintainho.

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 μM; □ ACh 110 μM; ↑ Adição do veneno; 0,5 g \perp tensão

4.5 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) 5º mês

Foi ensaiada a dose de 1,0 µg/ml, conforme Figura 9. A ação do veneno de Cdt na JNM promoveu o bloqueio completo e irreversível da contração muscular em resposta ao estímulo elétrico indireto

O tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 50% (T50%) foi de $30,6 \pm 0,8$ min e o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 90% (T90%) foi de $42,3 \pm 1,1$ min.

A partir da curva dose-efeito eleita, pode-se observar uma possível ação pré-sináptica do veneno de Cdt, pois na vigência de bloqueio neuromuscular total, a preparação respondeu à adição exógena de ACh e potássio com contratura (Figura 10).

A representação gráfica do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh é mostrado na página 74 (Figura 17).

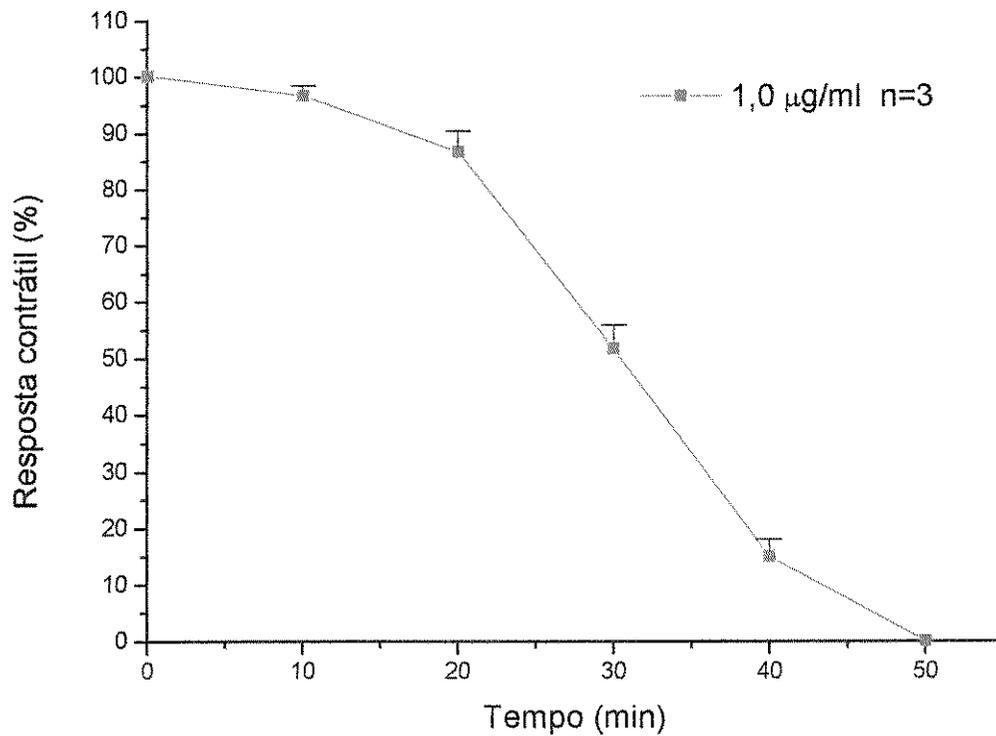


Figura 9 – Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt 5º mês, na dose de 1,0 µg/ml, sobre a preparação *m. biventer cervicis* de pintainho sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro-padrão.

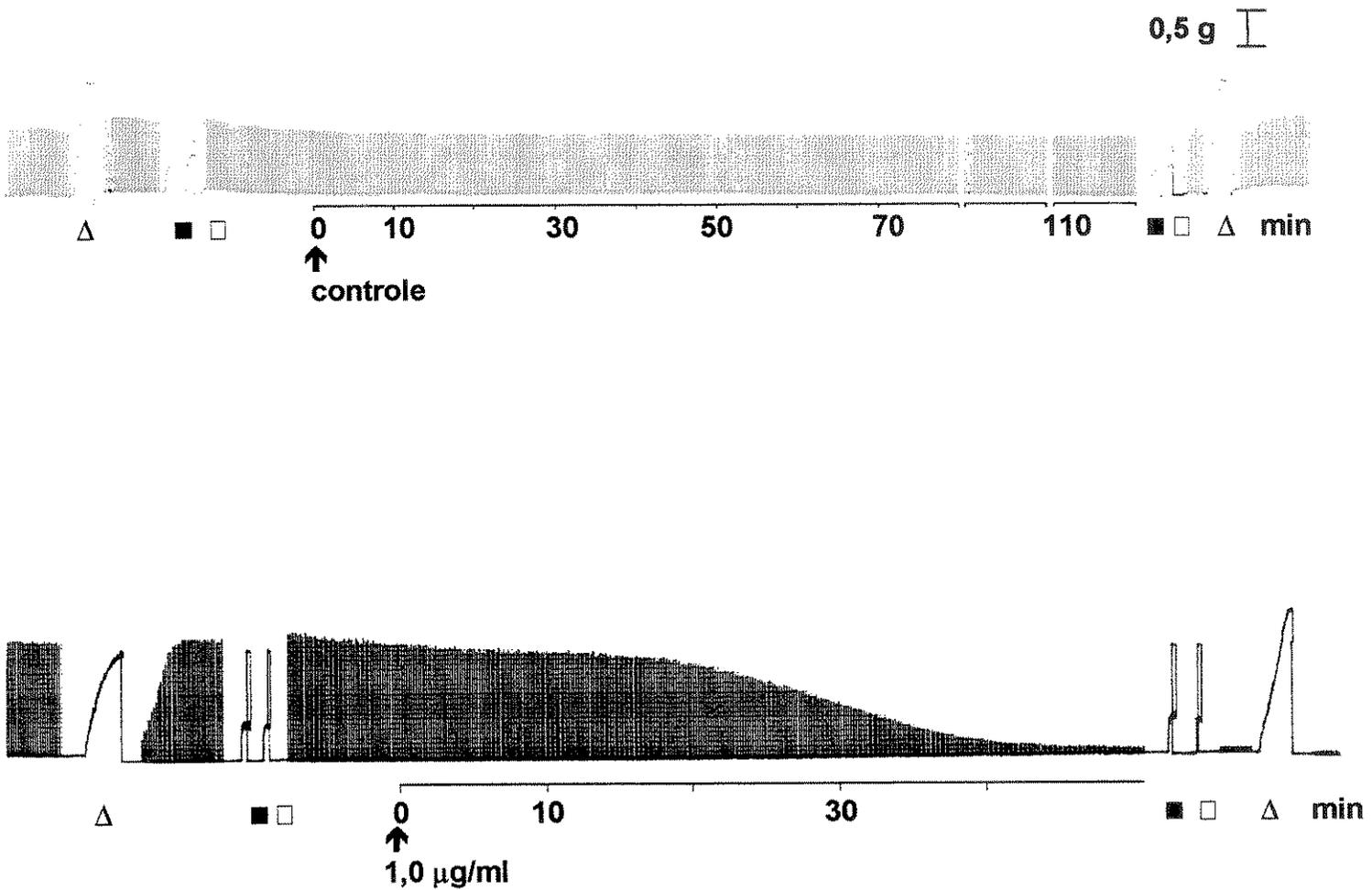


Figura 10 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt 5º mês, na respectiva dose indicada, em preparações *m. biventer cervicis* de pintainho.

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 µM; □ ACh 110 µM; ↑ Adição do veneno; 0,5 g $\bar{\text{I}}$ tensão

4.6 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) 6º mês

Foi ensaiada a dose de 1,0 µg/ml, conforme Figura 11. A ação do veneno de Cdt na JNM promoveu o bloqueio completo e irreversível da contração muscular em resposta ao estímulo elétrico indireto.

O tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 50% (T50%) foi de $28,6 \pm 1,6$ min e o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 90% (T90%) foi de $46,9 \pm 3,0$ min.

A partir da curva dose-efeito eleita, pode-se observar uma possível ação pré-sináptica do veneno de Cdt, pois na vigência de bloqueio neuromuscular total, a preparação respondeu à adição exógena de ACh e potássio com contratura (Figura 12).

A representação gráfica do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh é mostrado na página 74 (Figura 17).

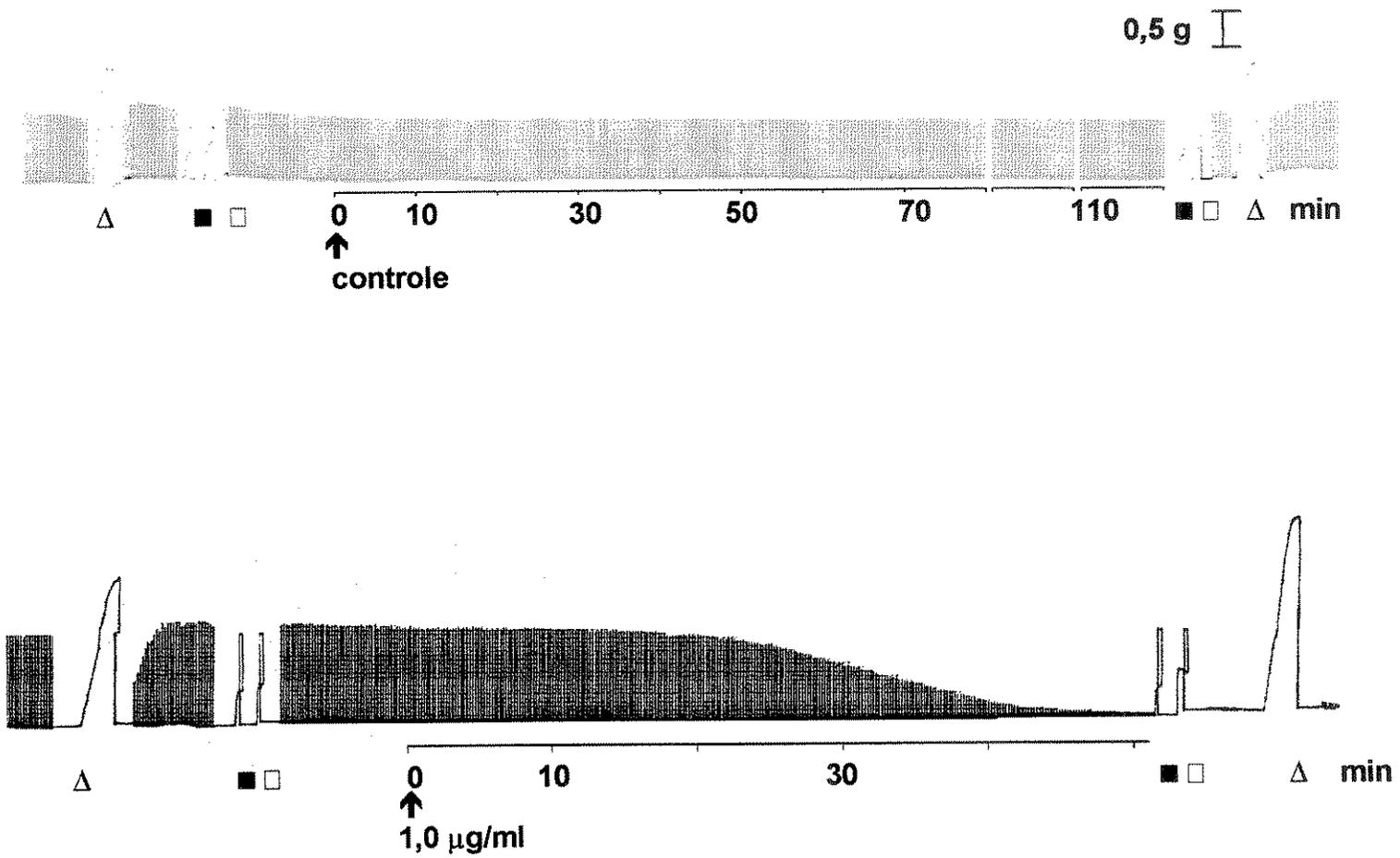


Figura 12 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt 6º mês, na respectiva dose indicada, em preparações *m. biventer cervicis* de pintainho.

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 µM; □ ACh 110 µM; ↑ Adição do veneno; 0,5 g $\bar{\text{I}}$ tensão

4.7 *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) 7º mês

Foi ensaiada a dose de 1,0 µg/ml, conforme Figura 13. A ação do veneno de Cdt na JNM promoveu o bloqueio completo e irreversível da contração muscular em resposta ao estímulo elétrico indireto.

O tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 50% (T50%) foi de $30,3 \pm 0,8$ min e o tempo necessário para se obter um bloqueio neuromuscular de 90% (T90%) foi de $43,7 \pm 2,0$ min.

A partir da curva dose-efeito eleita, pode-se observar uma possível ação pré-sináptica do veneno de Cdt, pois na vigência de bloqueio neuromuscular total, a preparação respondeu à adição exógena de ACh e potássio com contratura (Figura 14).

O registro do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh é mostrado na Figura 17.

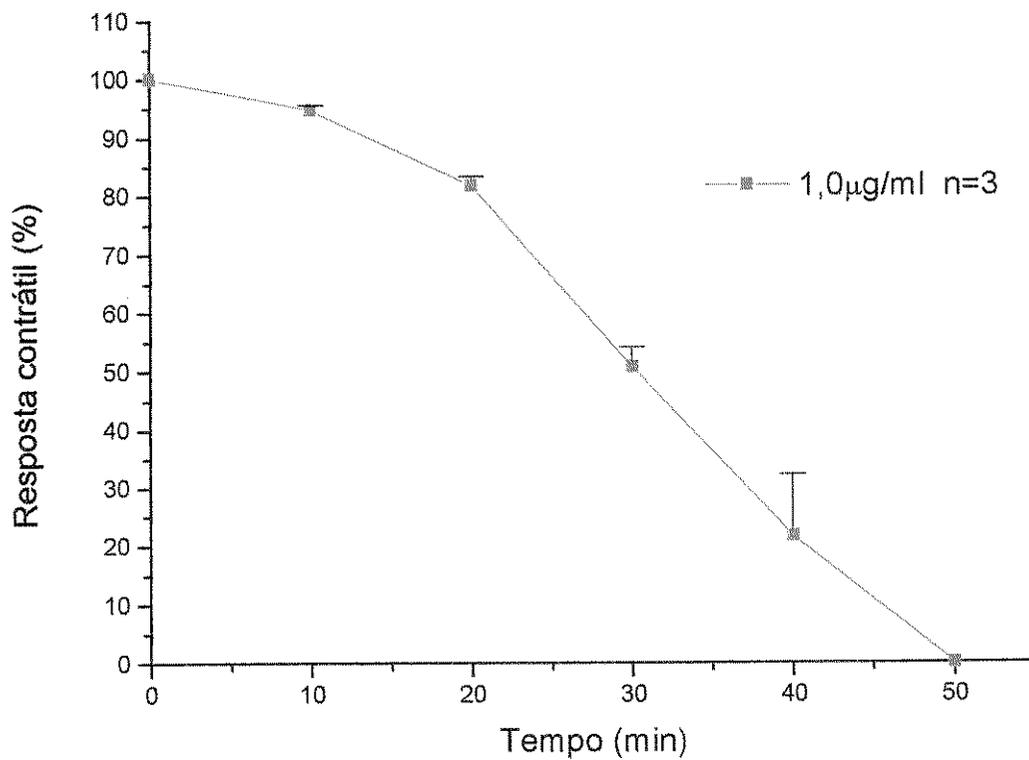


Figura 13 – Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt 7º mês, na dose de 1,0 µg/ml, sobre a preparação *m. biventer cervicis* de pintainho sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro-padrão

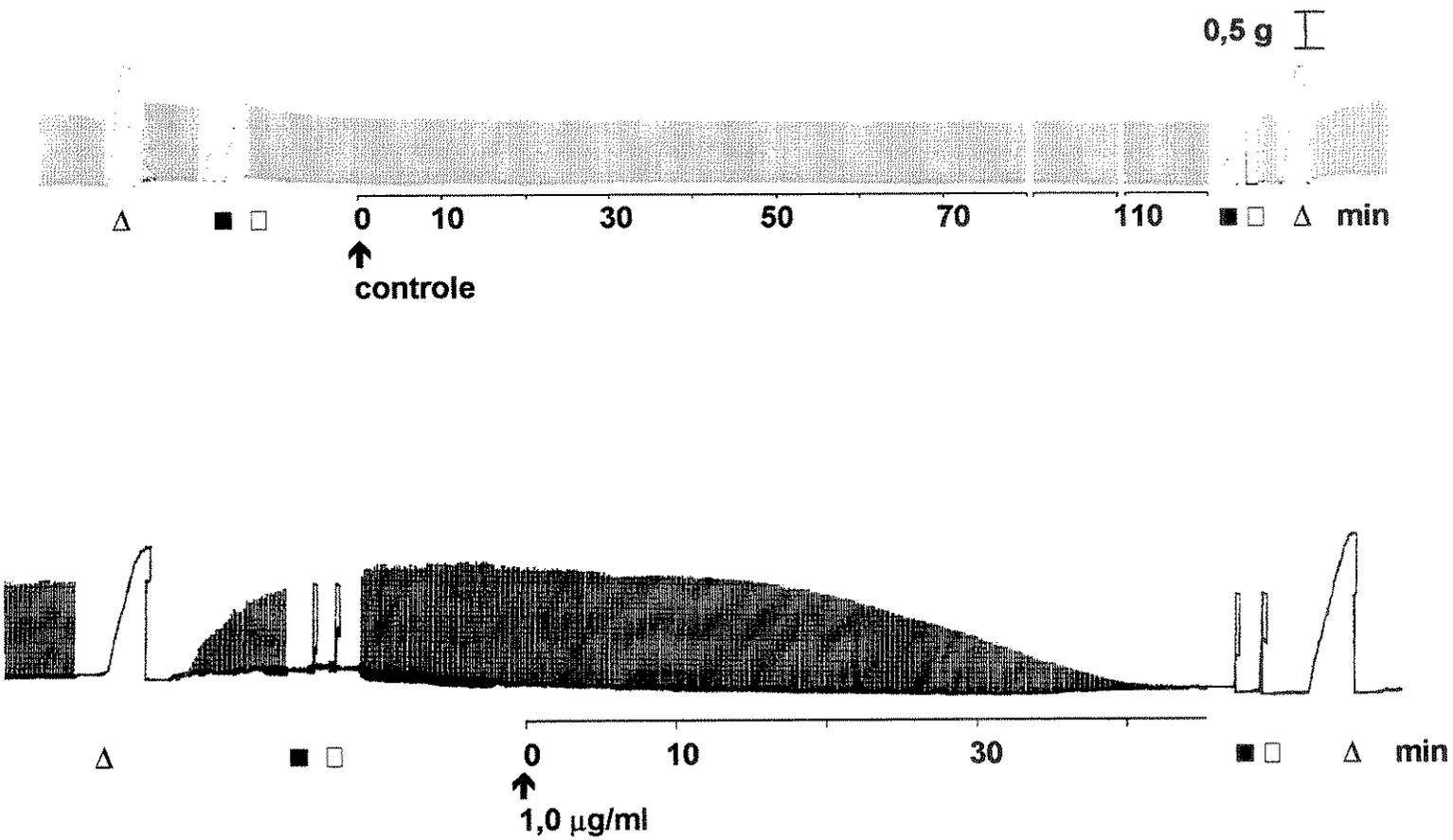


Figura 14 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt 7º mês, na respectiva dose indicada.

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 µM; □ ACh 110 µM; ↑ Adição do veneno; 0,5 g $\bar{\text{I}}$ tensão

4.8 Estudo comparativo dos resultados obtidos

A 37° C, todos os venenos de *Crotalus durissus terrificus* estudados, provenientes do Vale do Paraíba/ SP, produziram bloqueio neuromuscular irreversível, em preparações m. *biventer cervicis* de pintainho.

Na concentração de 1 µg/ml, todos os venenos promoveram bloqueio neuromuscular irreversível da resposta contrátil, em tempo inferior a 120 min, e afetaram as respostas contraturantes à ACh (55 e 110 µM) e ao KCl (20,0 mM).

A Figura 15 mostra a curva dose-resposta do veneno de Cdt em todos os tempos de vida, na concentração de 1 µg/ml, em que se pode verificar uma maior potência bloqueadora neuromuscular dos venenos de Cdt mais jovens em relação ao veneno de Cdt adulta.

A Figura 16 mostra os registros de contração muscular da preparação *biventer cervicis* de pintainho sob o efeito do veneno de Cdt em todos os tempos de vida, na concentração de 1 µg/ml.

A Figura 17 mostra o registro do efeito de Cdt (1µg/ml), em todos os tempos de vida, sobre as respostas contraturantes do KCl (20,0 mM) e ACh (50 e 110 µM).

A Figura 18 mostra o registro do tempo necessário para a obtenção de 50% de bloqueio neuromuscular (T50%), na concentração de 1 µg/ml, de todos os venenos estudados.

A Figura 19 mostra o registro do tempo necessário para a obtenção de 90% de bloqueio neuromuscular (T90%), na concentração de 1 µg/ml, de todos os venenos estudados.

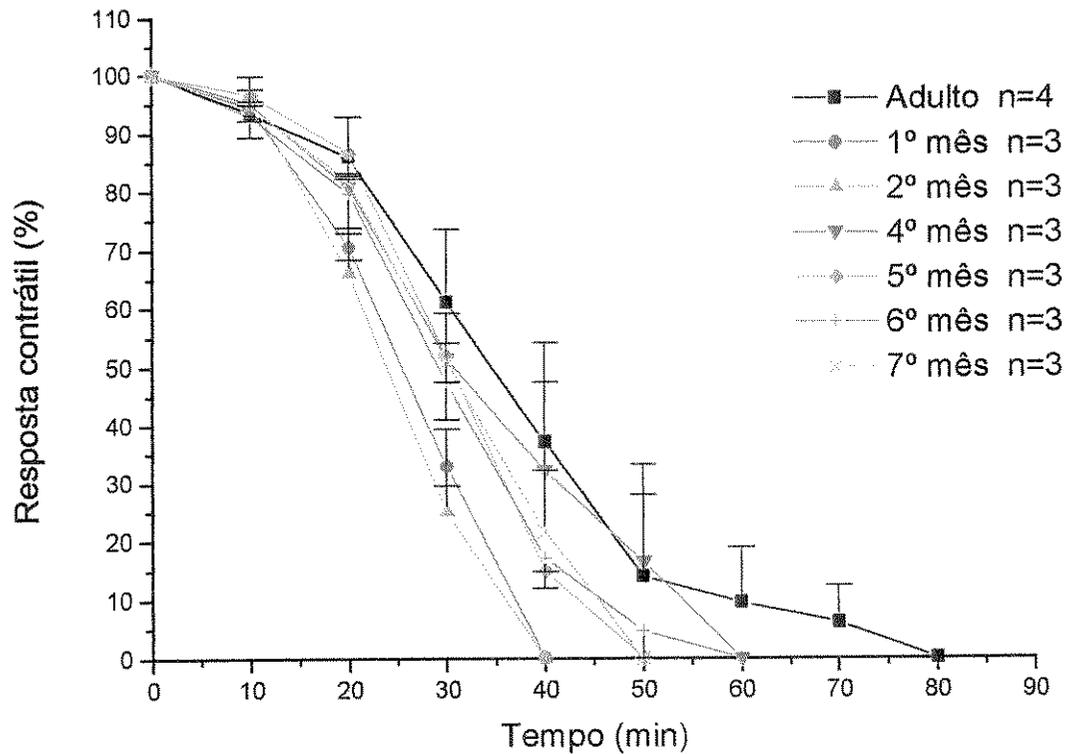
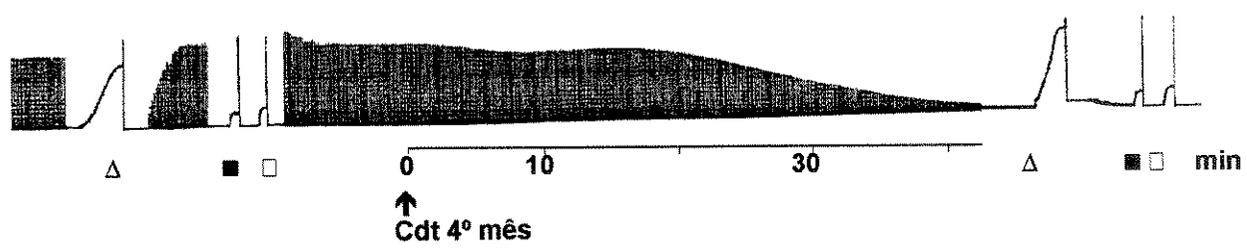
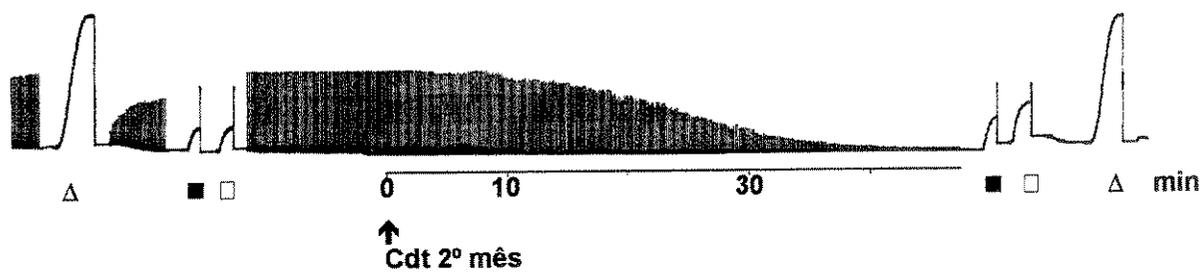
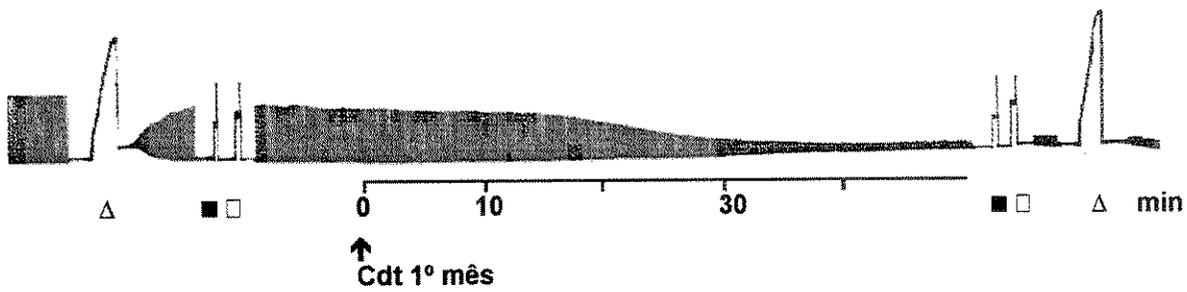
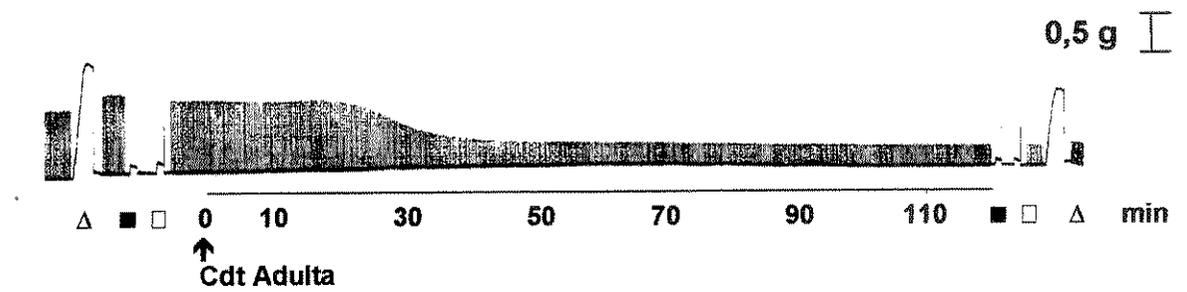


Figura 15 – Representação gráfica do efeito do veneno de Cdt em todos os tempos de extração, na dose de $1,0 \mu\text{g/ml}$, sobre a preparação *m. biventer cervicis* de pintainho sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro-padrão



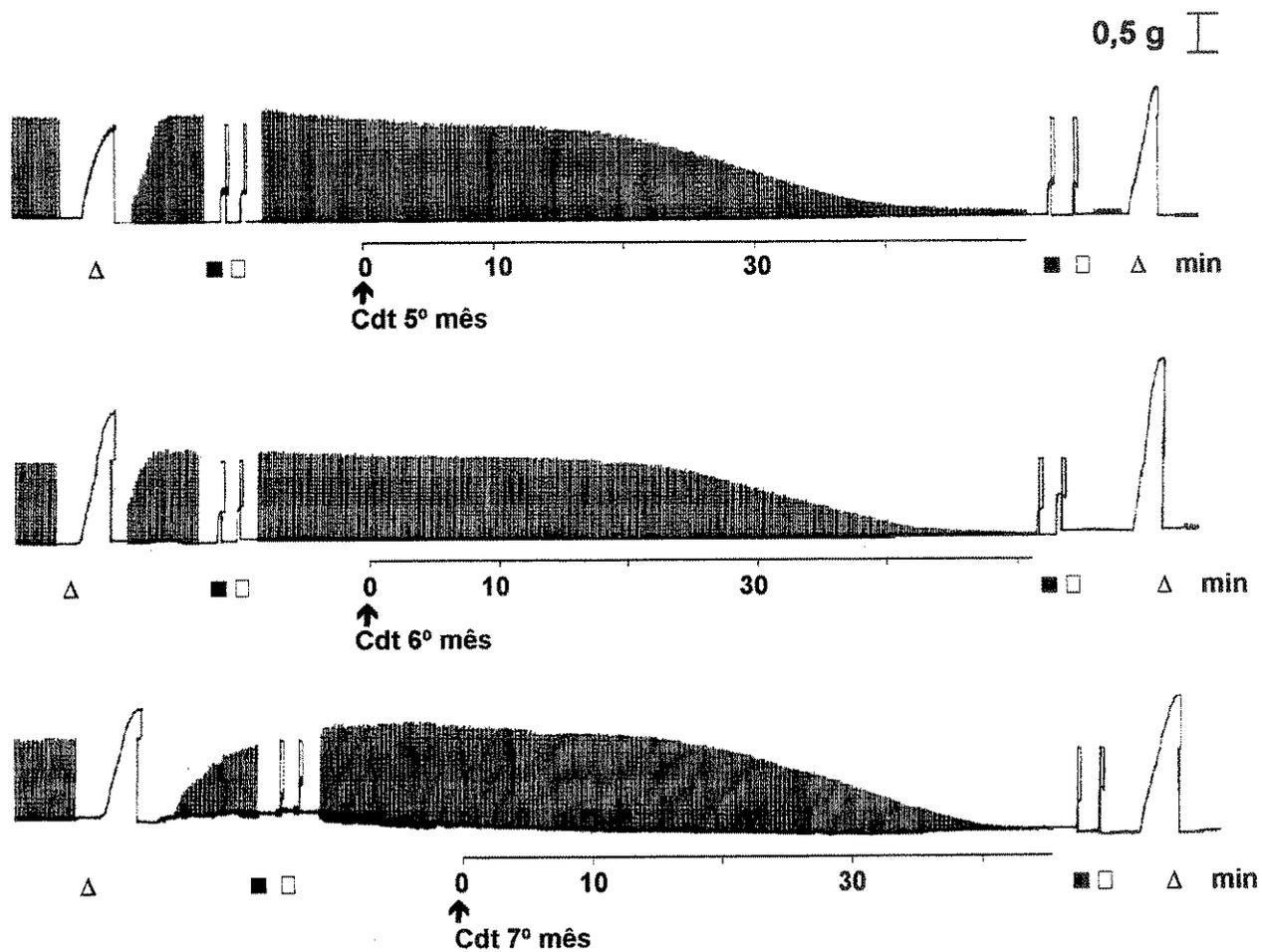


Figura 16 – Registros miográficos correspondentes à ação do veneno de Cdt Adulta e do 1º ao 7º mês, respectivamente, na dose de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Δ KCl 20,0 mM; ■ ACh 55 μM ; □ ACh 110 μM ; ↑ Adição do veneno; 0,5 g $\bar{\text{I}}$ tensão

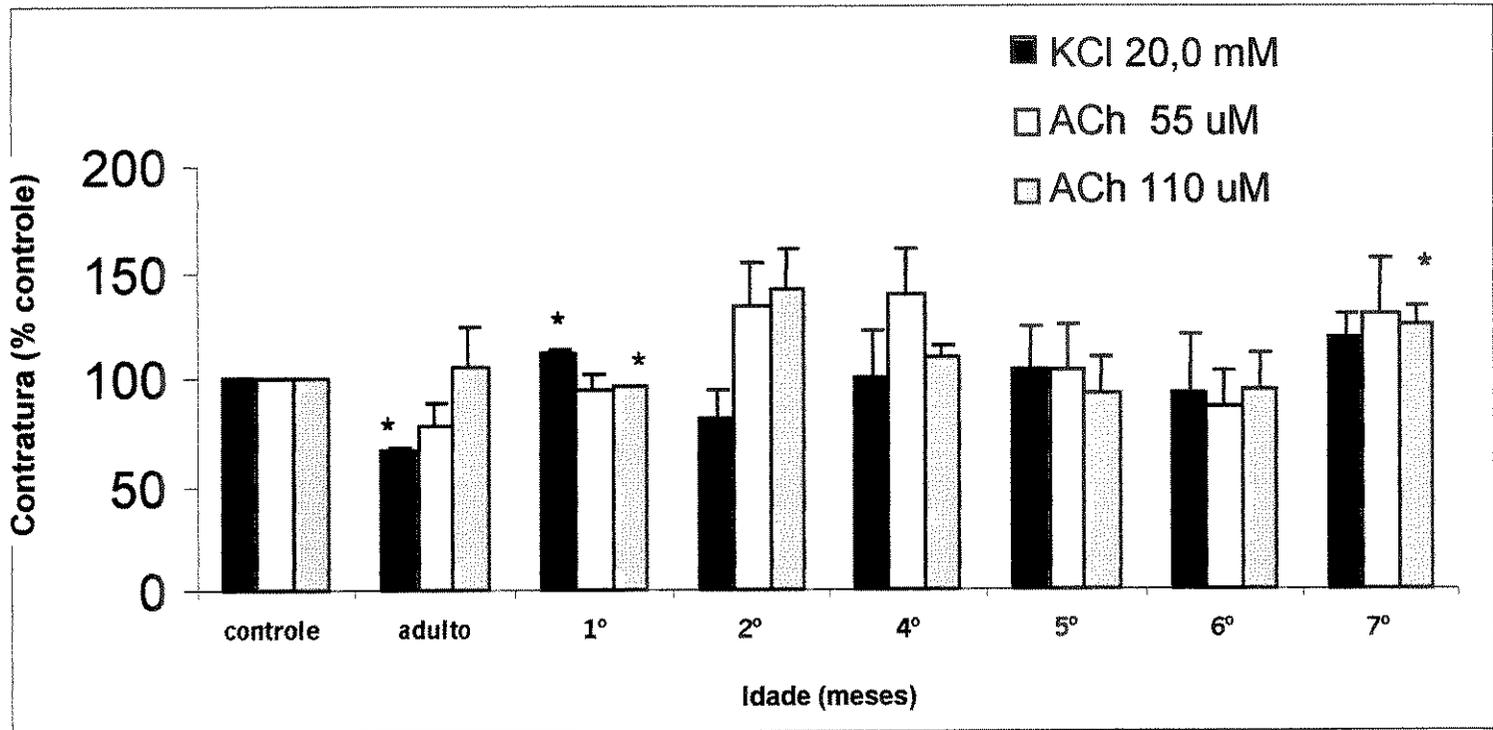


Figura 17- Registro do efeito de Cdt sobre as respostas contraturantes ao KCl e ACh, em todos os tempos de vida.

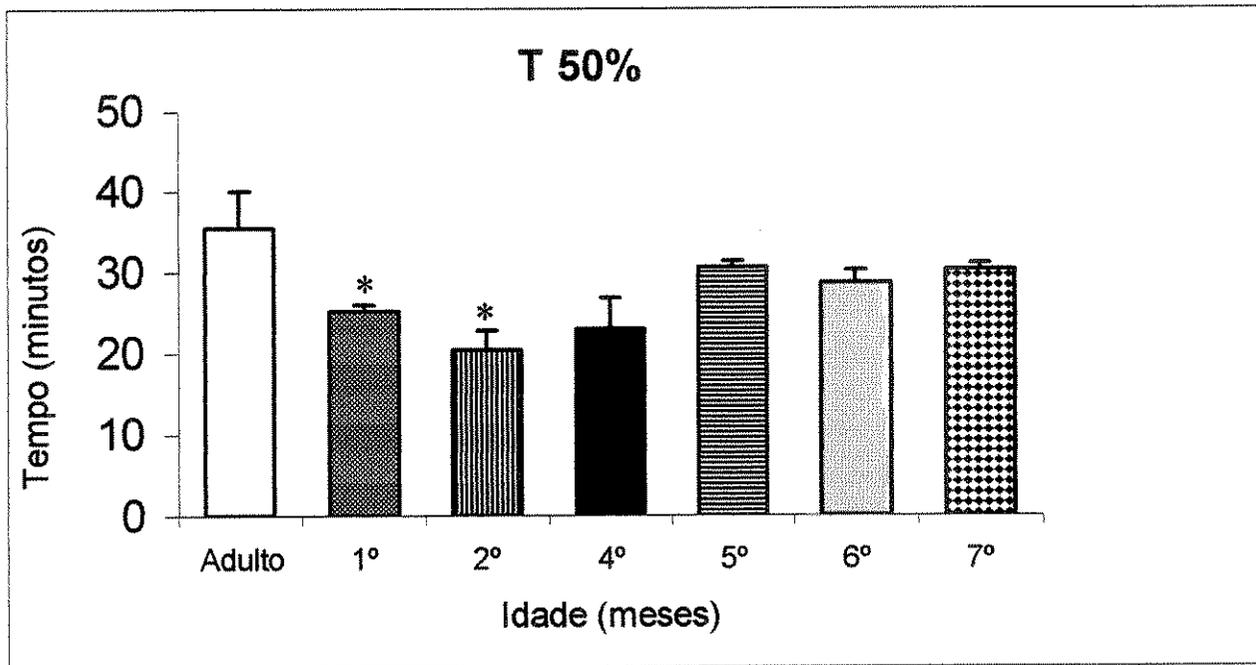


Figura 18- Registro do T50% de todos os venenos estudados. Os histogramas representam, comparativamente, com o veneno de serpente adulta, o tempo necessário para a obtenção de 50% de bloqueio neuromuscular (T50%), na concentração de 1 µg/ml, dos venenos de serpentes jovens do 1º ao 7º mês de vida.

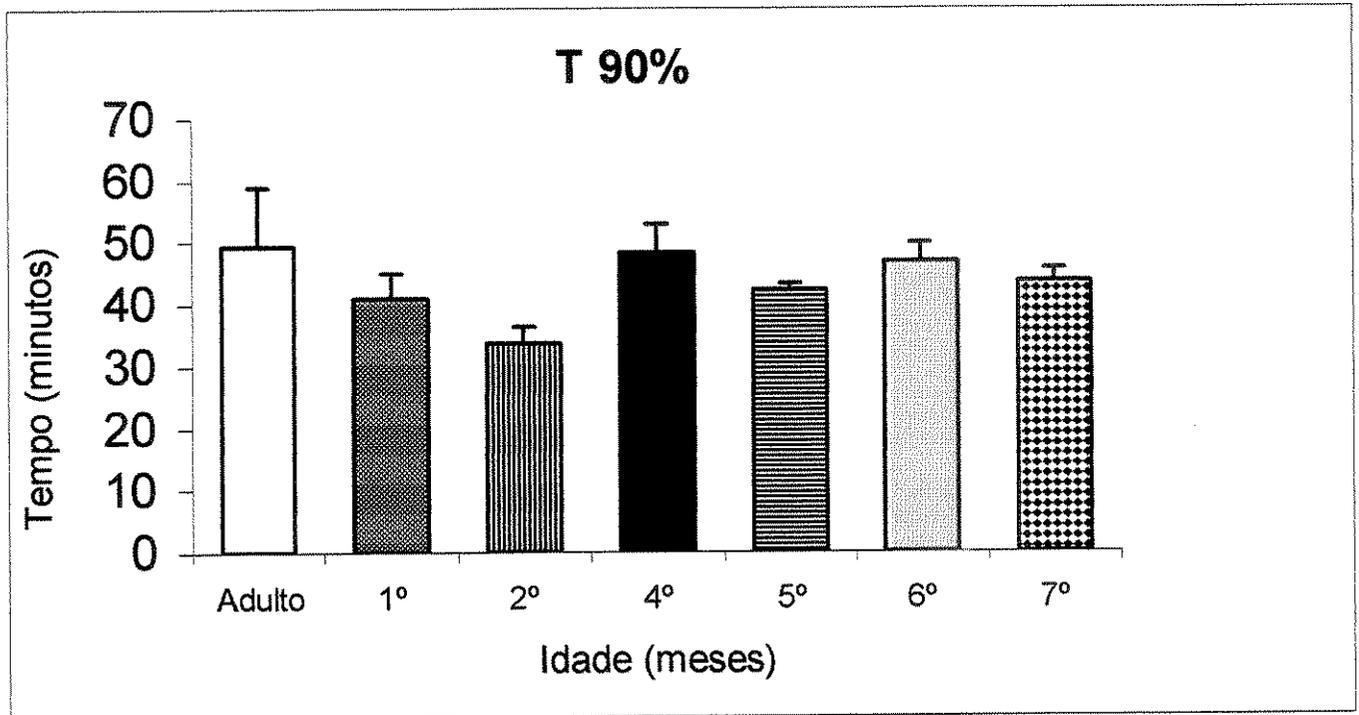


Figura 19- Registro do T90% de todos os venenos estudados. Os histogramas representam comparativamente, com o veneno de serpente adulta, o tempo necessário para a obtenção de 90% de bloqueio neuromuscular (T90%), na concentração de 1 µg/ml, dos venenos de serpentes jovens do 1° ao 7° mês de vida.

4.9 Cromatografia de Exclusão Molecular em HPLC

A Figura 20 mostra a variação dos principais constituintes do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, nos diferentes tempos de extração (1º mês (T1), 2º mês (T2), 4º mês (T3), 5º mês (T4), 6º mês (T5) e 7º mês (T6)).

A Figura mostra um aumento gradativo da concentração de crotoxina, em função da idade, ocorrendo a máxima concentração no 7º mês (T6).

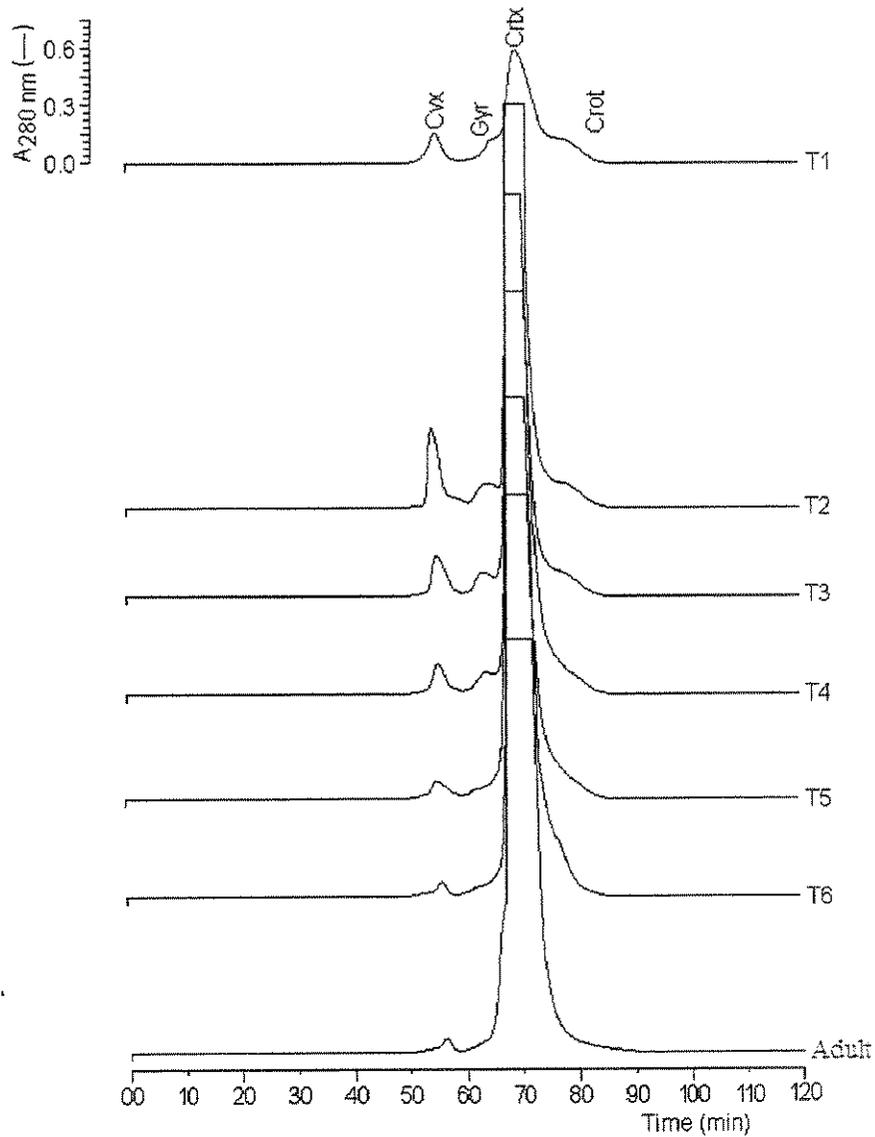


Figura 20- Perfil de eluição do veneno total de Cdt em HPLC em Exclusão Molecular, nos diferentes meses de extração. Convulxina (Cvx), Giroxina (Gyr), Crotoxina (Crtx) e Crotamina (Crot)

4.10 Eletroforese em SDS-PAGE

A Figura 21 mostra o padrão eletroforético do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, do Vale do Paraíba/ SP, do 1º (T1), 2º (T2), 4º (T3), 5º (T4), 6º (T5), 7º (T6) mês de vida e da serpente adulta.

A Figura mostra a ocorrência de alterações significativas dos venenos nos diferentes tempos de extração : convulxina (Cvx), giroxina (Gyr), crotamina (Crot), com o aumento progressivo da Fosfolipase A₂ (PLA₂) e dos componentes que compõem a crotoxina (CrTx).

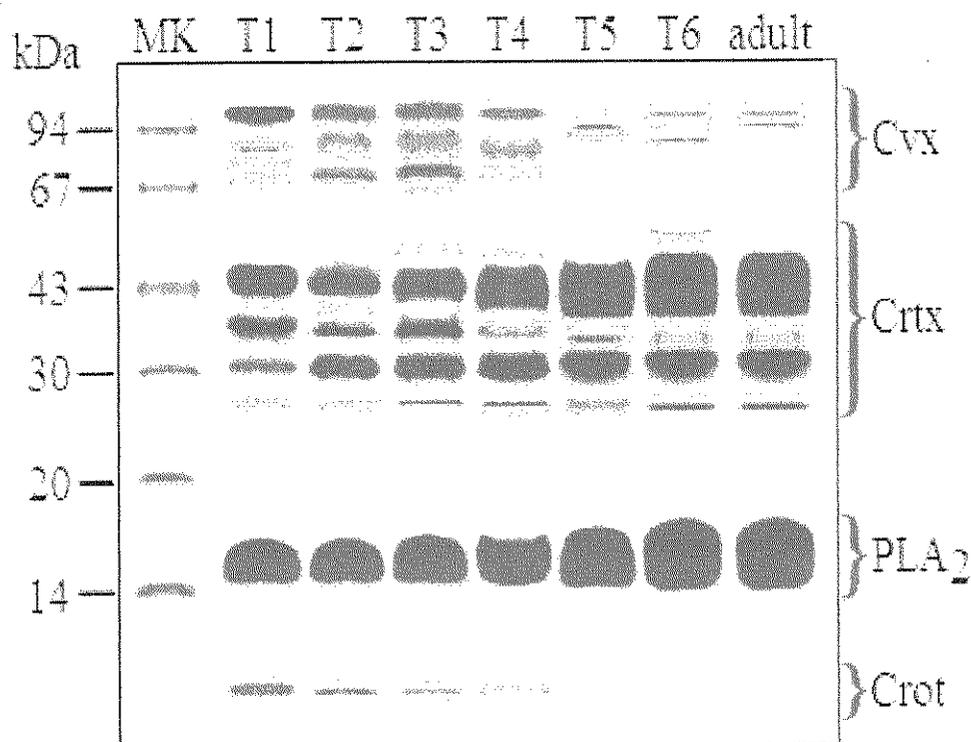


Figura 21- Padrão eletroforético do veneno de Cdt do Vale do Paraíba /SP. Nota-se a ocorrência de alterações significativas dos venenos nos diferentes meses de extração, onde: MK (marcadores), T1(1º mês), T2 (2º mês), T3 (4º mês), T4 (5º mês),T5 (6º mês), T6 (7º mês) e adult (serpente adulta). Os marcadores utilizados foram : fosforilase b (94 KDa), BSA (67 KDa), ovoalbumina (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina de soja (20 KDa) e α - lactoalbumina (14 KDa).

4.11 Atividade fosfolipásica A_2 e proteolítica do complexo crotoxinico.

A Figura 22 mostra a atividade fosfolipásica A_2 e proteolítica do complexo crotoxinico, do veneno de Cdt do Vale do Paraíba/SP, do 1º, 2º, 4º, 5º, 6º, 7º mês de vida e da serpente adulta.

Nos primeiros meses de vida, o veneno de Cdt exibe uma maior atividade proteolítica e menor atividade fosfolipásica, quando comparada com o veneno de Cdt adulta.

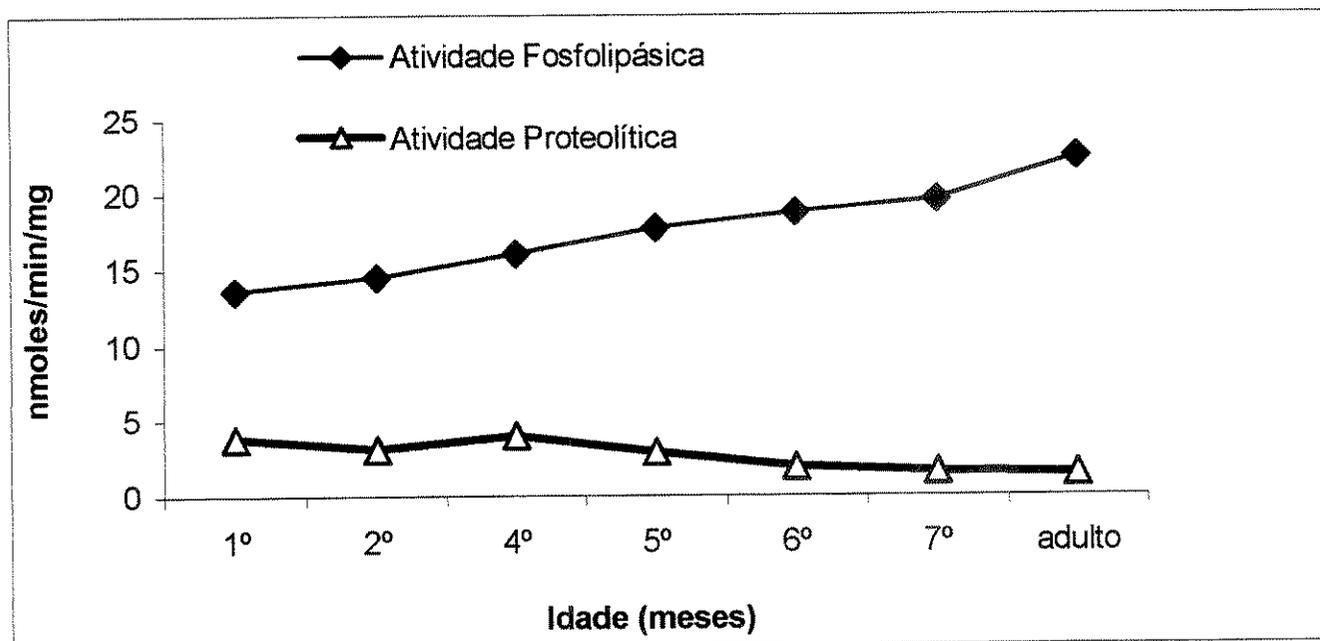


Figura 22- Registro do perfil da atividade fosfolipásica A_2 e proteolítica do complexo crotoníco, nos diferentes meses de extração.

4.12 Tabela de composição do veneno de Cdt, do Vale do Paraíba/SP.

A Tabela 1 mostra a composição do veneno de Cdt nos diferentes de vida. As concentrações de convulxina, giroxina e crotamina, presentes no veneno de Cdt do 1º mês, diminuem temporalmente, até o 7º mês, enquanto que a concentração de crotoxina aumenta em função da idade, assemelhando-se à concentração de CrTx no veneno adulto, a partir do 5º mês de extração. Observa-se que as concentrações de PLA₂ e das isoformas de crotapotina modificam-se em função da idade da serpente.

		Composição do Veneno de Cdt						
		1°	2°	4°	5°	6°	7°	Adulto
HPLC	Convulxina	12,45%	11,85%	9,75%	5,12%	4,30%	3,40%	3,35%
	Giroxina	<2%	<2%	<1%	>1%	>1%	>1%	>1%
	Crotamina	<3%	<1%	<1%	>1%	>1%	>1%	>1%
	Crotoxina	76,45%	79,52%	81,75%	91%	91,80%	92,40%	92,90%
HPLC	PLA2	58,56%	58,12%	56,75%	65,40%	64,70%	65,80%	66,72%
	Crtp isoforma 1	10,30%	10,96%	6,45%	15,30%	10,60%	12,7%	14,42%
	Crtp isoforma 2	8,85%	12,32%	10,23%	10,30%	14,40%	12,3%	11,56%
fase reversa	Crtp isoforma 3	>2%	>2%	5,12%	>2,0%	>1,0%	>1,0%	>1%
	PLA2 *	13,63	14,51	16,05	17,75	18,8	19,62	22,45
	p-Nitroanilide *	3,75	3,02	3,96	2,82	1,86	1,56	1,45
	1/Tc segundos	0,046	0,052	0,055	0,047	0,042	0,038	0,033

Tabela 1 – Tabela de composição do veneno de Cdt.

VENENO	DL 50 mg/kg
<i>Crotalus durissus terrificus</i> Adulta	152,95 (133,89 – 174,72)
<i>Crotalus durissus terrificus</i> 2º mês	144,20 (125,9 – 165,00)

Tabela 2 - Valores da DL 50 dos venenos de Cdt adultas e juvenis do 2º mês, com seus limites de confiança ao nível de 95%, determinadas em camundongo pela via endovenosa. Os venenos não exibiram diferença significativa, quanto a sua capacidade de determinar a morte dos animais.

5. DISCUSSÃO

O estudo das variações ontogenéticas nos venenos de serpentes possui importância tanto do ponto de vista da ciência básica como no campo clínico (LOMONTE et al., 1983).

Estudos comparativos prévios nos quais foram avaliados venenos de serpentes adultas, juvenis e recém-nascidas da mesma espécie, têm demonstrado a existência de diferenças significativas em algumas de suas propriedades, tais como: letalidade, atividade enzimática, padrões eletroforéticos, efeitos locais, etc (MINTON, 1967; FIERO et al., 1972; BONILLA et al, 1973; REID e THEAKSTON, 1978; GUTIERREZ et al., 1980; MEIER e FREIVOGEL, 1980; GLENN e STRAIGHT, 1985).

Diferenças clínicas têm sido relatadas em envenenamentos humanos causados por *Bothrops jararaca* jovens e adultas (ROSENFELD et al., 1959; KAMIGUTI et al., 1986; RIBEIRO e JORGE, 1989) e *Bothrops moojeni* (KOUYOUMDJAIN e POLIZELLI, 1989).

FURTADO et al., 1991, quando compararam nove venenos de serpentes botrópicas fêmeas e seus filhotes, encontraram diferenças bem definidas entre os venenos das serpentes fêmeas e de seus filhotes, e que estes achados estão de acordo com outros trabalhos sobre venenos viperídeos que sugerem que as mudanças na composição dos venenos poderiam ser idade-dependentes (MINTON, 1967; FIERO et al, 1972; BONILLA et al., 1973; REID e THEAKSTON, 1978; GUTIERREZ et al., 1980; MEIER e FREIVOGEL, 1980; GLENN e STRAIGHT, 1985).

Em outro estudo de LOMONTE et al., 1983, sobre cascavéis adultas (*C.d.durissus*) provenientes do noroeste da Costa Rica e serpentes recém-

nascidas de *Crotalus durissus durissus* com menos de um mês de idade, estas foram comparadas quanto algumas de suas propriedades, tais como letalidade, atividade proteolítica, padrões eletroforéticos, entre outros. Foi verificado que o veneno das serpentes recém-nascidas são várias vezes mais letais que o das serpentes adultas. As serpentes adultas exibiram uma maior atividade proteolítica, utilizando caseína como substrato. Verificaram algumas alterações nos padrões eletroforéticos dos venenos estudados.

Através dos estudos de HARVEY (1994), foi possível determinar que a preparação biológica adequada para a avaliação dos efeitos neurotóxicos dos venenos de *Crotalus durissus terrificus* adultas e juvenis, a serem comparados neste trabalho, seria o m. *biventer cervicis* de pintainho.

Nesse estudo, obteve-se uma maior atividade bloqueadora neuromuscular nos venenos de Cdt juvenis, principalmente quando testados os venenos referentes ao 1º e 2º meses de vida da serpente ($p < 0,05$), em relação às demais extrações e ao veneno de Cdt adulta, em preparações m. *biventer cervicis* de pintainho. Pode-se afirmar que ao menos *in vitro*, os venenos de serpentes juvenis do 1º e 2º meses exibam maior potência, quando comparados com serpentes adultas.

A partir da Cromatografia de exclusão molecular em HPLC, em que cada veneno foi purificado e que ao final de cada corrida, o cromatograma foi analisado em um integrador de frações Waters 470, o que possibilita a quantificação dos picos em porcentagem de amostra, pode-se observar que:

- 1) Ocorre variabilidade de todas as frações presentes nos venenos: Convulxina, Giroxina, Crotamina e Crotoxina, em função da idade da serpente.
- 2) A porcentagem de Convulxina é substancialmente maior nos dois primeiros meses, principalmente se comparada com a da serpente adulta.
- 3) A porcentagem de Crotoxina é nitidamente menor nos dois primeiros meses, principalmente se comparada com a da serpente adulta.
- 4) As porcentagens de Giroxina e Crotamina, embora apresentem variabilidade ao longo dos meses, não foram nitidamente quantificadas por esta metodologia. Decorre desta informação que o veneno de Cdt do Vale do Paraíba/SP, poderia ser classificado como crotamino-negativo.

A partir da Cromatografia em HPLC de fase reversa, a crotoxina proveniente de cada mês de extração foi purificada, utilizando-se de um gradiente linear com acetonitrila de 66% sendo as frações monitoradas a 280nm; foi possível observar que:

- 1) A isoforma de PLA₂ se apresenta em menores porcentagens nos primeiros meses de vida das serpentes, aumentando gradualmente até a serpente adulta.

2) Existem três isoformas de crotapotina nestes venenos e, ao menos de forma aparente, as isoformas 1 e 2 parecem contribuir de forma mais significativa para a formação do complexo crotoxinico.

3) Como a formação do complexo crotoxinico pode ocorrer de forma inespecífica, ou seja, qualquer isoforma de crotapotina presente pode se associar à isoforma de PLA₂ para a formação do referido complexo, pode-se afirmar que ao longo dos meses, poderemos ter diferentes isoformas de crotoxina presentes no veneno total das serpentes em desenvolvimento.

Sabe-se que a crotoxina, principal componente do veneno de Cdt, é a maior responsável pela neurotoxicidade do veneno da cascavel (VITAL BRAZIL, 1972a). É uma β-neurotoxina, que consiste de uma associação não covalente de duas subunidades: uma PLA₂ (CB) e uma subunidade (CA) não enzimática (FAURE, et al., 1994).

A toxicidade tem sido relatada diminuída de acordo com o desenvolvimento ontogenético em *Crotalinae* (MINTON, 1967; FIERO et al., 1972; BONILLA et al., 1973; THEAKSTON e REID, 1978; GUTIERREZ et al., 1980; MEIER e FREIVOGEL, 1980; LOMONTE et al., 1983; GLENN e STRAIGHT, 1985).

Diferentes isoformas de crotoxina têm sido identificadas, múltiplas variantes destas subunidades formam diferentes complexos crotoxinicos que podem ser subdivididos em duas classes: (1) alta toxicidade com baixa atividade enzimática e (2) moderada toxicidade com alta atividade fosfolipase A₂. Estas duas classes de crotoxina, classe 1 e classe 2, diferem na potência do bloqueio neuromuscular (FAURE et al., 1993).

O fato de que o veneno de uma serpente individual contenha todas as isoformas da subunidade (CA) não enzimática, presentes no veneno coletado de numerosas serpentes indica que diferentes eventos pós translacionais são responsáveis pela micro-heterogenicidade que ocorre nestes animais. A multiplicidade e a diversidade das isoformas de crotoxina resultam de modificações pós-translacionais ocorridas no precursor e da expressão de diferentes RNA mensageiros, presentes em cada serpente (FAURE et al., 1994).

FAURE et al., 1993, demonstrou que as isoformas mais tóxicas de crotoxina bloquearam a transmissão neuromuscular em preparações músculo *biventer cervicis* de pintainho mais eficientemente do que as isoformas menos tóxicas. Estas diferenças se correlacionam com a estabilidade do complexo crotoxínico: isoformas menos tóxicas são menos estáveis e se dissociam rapidamente ; já as isoformas mais tóxicas são mais estáveis e se dissociam mais lentamente.

Pode-se aventar duas hipóteses para a explicação dos resultados obtidos neste trabalho:

1A) O veneno de Cdt exibiria nos primeiros meses de vida um veneno mais potente, e isto seria devido a presença de isoformas mais ativas, ao menos, nos venenos do 1º e 2º meses, à similaridade dos resultados evidenciados por FAURE et al., 1993, na mesma preparação biológica utilizada neste trabalho.

1B) As serpentes possuiriam um mecanismo, geneticamente pré-determinado, idade-dependente, que regularia a produção de seu veneno, sendo caracterizado nos meses iniciais pela produção de isoformas de crotoxina da classe 1 (mais ativas) e, provavelmente, a partir do 4º mês de vida, pela produção

de isoformas de crotoxina da classe 2 (menos ativas); o que seria compensado pelo aumento de veneno produzido pela serpente.

2) O veneno de Cdt juvenil do 1º e 2º meses teria uma maior atividade neurotóxica em função de uma ação sinérgica entre os vários componentes que compõem o VT (Convulxina, Giroxina, Crotamina e Crotoxina), porém, de posse das informações contidas nos resultados, não se saberia sugerir, por qual mecanismo poderia estar ocorrendo uma ação sinérgica. A convulxina, presente em grande porcentagem nos dois primeiros meses, provavelmente não atuaria de forma a potencializar a crotoxina, pois se trata de uma toxina de alta massa molecular que se comporta como uma proteína homogênea (PRADO-FRANCESCHI, 1970 ; VITAL-BRAZIL, 1972b) e que atua em plaquetas, induzindo agregação, liberação de ATP e formação de Tromboxanas (Tx_s) (VARGAFTIG et al., 1980). Pode-se associar a porcentagem aumentada de convulxina com a atividade coagulante aumentada nos meses iniciais, e seu decréscimo até atingir a serpente adulta com respectivo decréscimo da atividade coagulante do veneno total.

Várias hipóteses têm sido atribuídas a fim de explicar a variação na potência nos venenos de serpentes durante seu crescimento e desenvolvimento:

Serpentes jovens poderiam compensar sua baixa produção de veneno aumentando sua toxicidade; esta variação poderia ser devida à sua adaptação para matar e digerir diferentes espécies de presas (GANS, 1961; THOMAS e POUGH, 1979) ou poderia ser devido a mudanças em sua dieta (MACKESSY, 1988).

A dieta das cascavéis é conhecida, mas não com grande soma de detalhes (GLOYD, 1933).

Examinando o estômago de 176 cascavéis adultas e 26 cascavéis jovens, todas provenientes do Estado de São Paulo, SALOMÃO et al (1995), verificaram que apenas roedores fazem parte da sua dieta e *Cavia aperea*, *Rattus norvegicus* e *Mus sp.* foram identificadas, concluindo que não foram observadas variações ontogenéticas com respeito à dieta de cascavéis adultas e jovens. De posse destas informações, os autores sugerem não haver variação ontogenética no veneno de cascavéis.

Neste trabalho, pode-se observar que ocorre a variação ontogenética do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, provenientes do Vale do Paraíba, ao se constatar as modificações farmacológicas e bioquímicas no veneno das serpentes do 1º mês ao 7º mês de vida.

CONCLUSÃO

- As preparações neuromusculares utilizadas comportaram-se de modo convergente, quanto a sua sensibilidade aos venenos utilizados neste trabalho, permitindo a avaliação comparativa dos efeitos neurotóxicos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* adulta e juvenil, sobre a junção neuromuscular.
- A 37°C todos os venenos de Cdt estudados, provenientes do Vale do Paraíba/SP, produziram bloqueio neuromuscular irreversível em preparações m. *biventer cervicis* de pintainho, em tempo inferior a 120 min, e modificaram significativamente as respostas contraturantes à ACh (55 e 110 μ M) e ao KCl (20,0 mM).
- Os venenos de Cdt juvenis, referentes ao 1º e 2º mês de vida, mostraram uma maior atividade bloqueadora neuromuscular ($p < 0,05$) quando comparados com o veneno de Cdt adulta, na concentração de 1,0 μ g/ml.

- A variação na potência dos venenos de Cdt juvenis observada, em comparação com a potência do veneno de Cdt adulta, nos leva a sugerir que, nos dois primeiros meses de vida, as serpentes de Cdt produzam isoformas mais tóxicas de crotoxina.

- A partir dos dados farmacológicos e bioquímicos obtidos, podemos afirmar que ocorre variação ontogenética no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, provenientes do Vale do Paraíba/SP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R.J. – Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon** , 26: 953-60, 1988.

AMARAL, C.F.S.; RESENDE, N.A.; SILVA, A.O. et al. – Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev Inst Med Trop** , 28(4): 220-7, 1986.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. - Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon** , 25: 1163-68, 1987.

BARRAVIERA, B. – Estudo clínico dos Acidentes ofídicos. Revisão – **JBM** , 65. nº (4): 1993.

BARRIO, A. – Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol Lat Am** 11: 224, 1961.

BARRIO, A; VITAL-BRAZIL, O. – Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* (Laur.) poisons. **Acta Physiol Latinoamericana** 1: 291-308, 1951.

BON, C.; CHANGEAUX, J-P.; JENG, T-W.; FRAENKEL-CONRAT, H. – Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur J Biochem** 99: 471-81, 1979.

BONILLA, C.A.; FAITH, M.R.; MINTON, S.A. – L-amino acid oxidase, phosphodiesterase, total protein and other properties of juvenile timber rattlesnake (*Crotalus h. horridus*) venom of different stages of growth. **Toxicon** ,11: 301- 3, 1973.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J.; BON, C.; MENEZ, A. – Analysis of cDNAs encoding two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rats snake venom: phospholipase A₂ – like precursor. **Biochem Biophys Acta** 1088: 401- 8, 1991.

BRASIL . MINISTÉRIO DA SAÚDE. – **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. Brasília, DF, 1986. 49p.

BRASIL . MINISTÉRIO DA SAÚDE. – **Ofidismo. Análise Epidemiológica**. Brasília, DF, 1991.

BRASIL . Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Manual de vigilância Epidemiológica – **Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento**, São Paulo, SP, 1993.

BRASIL . MINISTÉRIO DA SAÚDE. – Fundação Nacional da Saúde – **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF, 1997.

BRASIL . MINISTÉRIO DA SAÚDE. – Fundação Nacional da Saúde – **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF, 1998.

BREITHAUPT, H. – Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A and its complex with crotafotin. **Naunyn – Schmiedeberg's Arch Pharmac** , 292: 271- 8, 1976.

CHANG, C.C. – Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. **Proc Natn Sci Council, R.O.C. B9**: 126- 42, 1985.

CHO, W. e KÉZDY, F.J. –Chromogenic substrate and assay of phospholipase A₂. In: **Method in Enzimology** Academic Press. 197: 75- 9, 1991.

DELOT, E.; BON, C. – Model for the interaction of crotoxin, a Phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry** , 32: 10708- 13, 1993.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; VUILHORGNE, M.; BON, C.-
The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus*
durissus terrificus. **Eur J Biochem** ; 223(1): 161- 4, 1994.

FAURE, G.; HARVEY, A.L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADVANYI, F.;
BON, C. – Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the plays
a major role in its pharmacological action. **Eur J Biochem** ; 214(2): 491- 6,
1993.

FIERO, M.K.; SEIFERT, M.W.; WEAVER, T.J.; BONILLA, C.A. –
Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus v.*
viridis) venoms. **Toxicon** , 10, 81- 2, 1972.

FURTADO, M.F.; MARUYAMA , M.; KAMIGUTI, A.S.; ANTONIO, L.C. -
Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female
snakes and their offspring. **Toxicon**, 29(2):219-26, 1991.

GANS, C. – The feeding mechanism of snake and its possible evolution.
Am Zool 1: 217-53, 1961.

GINSBORG, B.L .; WARRINER, J. – The isolated chick *biventer-cervicis*
nerve-muscle preparation. **Brit J Pharmacol** , 15: 410, 1960.

GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C. – Venom properties of the rattlesnakes (*Crotalus*) inhabiting the Baja California region of Mexico. **Toxicon** , 23, 769- 75, 1985.

GLOYD, H.K. – An unusual feeding record for the prairie rattlesnake. **Copeia** , (2): 98, 1933.

GONÇALVES, J.M. – Purification and properties of crotamine. In: Venoms. (BUCKLEY, E.E. PORGES, N. Eds). Washington: **Am Assoc Adv Sci** , 44: 261- 73, 1956.

GONÇALVES, J.M.; VIEIRA, L.G. – Estudos sobre veneno de serpentes brasileiras – I. Análise electroforética. **Ann Acad Bras Cien** 22: 141- 9, 1950.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R. – Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. **Ver Biol Trop** 28, 341- 6, 1980.

HARVEY, A.L.; BAFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS, J.B. – Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. **Toxicon** 32(3), 257- 65, 1994.

HAWGOOD, B.J.; SMITH, I.C.; STRONG, P.N. – Early induction by crotoxin of biphasic frequency giant miniature endplate potentials in frog muscle. **Br J Pharmacol** 94: 765-72, 1988.

HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. – Biological role of the two components of crotoxin. **Proc Natl Acad Sci USA** 68: 1560- 63, 1971.

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. – A Micro-biuret method for estimating proteins. **Anal Biochem** 121: 401- 10, 1964.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. – Acidentes por animais peçonhentos. In: Amato Neto, V. e Baldy, J.L.S. – **Doenças transmissíveis**. São Paulo, Sarvier, p. 133- 41, 1989.

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

KAMIGUTI, A.S.; SILVA, M.V.; CARDOSO, J.L.C. – Desfibrinação do sangue no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. **Ver Soc Bras Med Trop** 19, (suppl.): 28, 1986.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. – A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, 27: 613- 35, 1989.

KOUYOUMDJIAN, J.A.; POLIZELLI, C. – Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. **Ver Ins Med Trop São Paulo** 31: 84-90, 1989.

LAEMMLI, U.K. – Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature** 227, 680- 5, 1970.

LANDUCCI, E.C.T.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A.C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A.P.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. – Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon** , 32: 217- 26, 1995.

LEE, C.Y.; HO, C.L. – The pharmacology of phospholipases A₂ isolated from snake venoms with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In: YOSHIDA, H., HAGIHARA, Y., EBASHI, S. Ed. **Advances in Pharmacology and therapeutics**. Oxford: Pergamon Press, 1982.p 37- 52. v. 4

LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. – Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. **Toxicon** , 21, 379- 84, 1983.

MACIN, A.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, C.M.; ADRIÃO-ESCARSO, S.H.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. – The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipase A₂. **Biochem Mol Int**, 42(6): 1171- 7, 1997.

MACKESSY, S.P. – Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C.v.oreganus*. **Copeia**, 92-101, 1988.

MEIER, J.; FREYVOGEL, T.A. – Comparative studies on venoms of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*), carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricollis*) snakes at different ages. **Toxicon** , 18: 661- 2, 1980.

MINTON, S.A. – Observations on toxicity and antigenic make-up of venoms from juvenile snakes. In: Russel, F.E.; Saunders, R.R.(Ed) **Animal Toxins**, Oxford: Pergemon Press, 1967. pp. 211- 22

NEW, R.R.; THEAKSTON, R.D.; ZUMBUEHL, O.; IDDON, D.; FRIEND, J. – Liposomal immunization against snake venom. **Toxicon** , 23(2):215-9. 1985

OWNBY, C.L.; AIRD, S.D.; KAISER, I.I. - Physiological and immunological properties of small myotoxins from the venom of the midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*). **Toxicon** , 26(3):319- 23, 1988

PRADO-FRANCESCHI, J. – **Estudo sobre a convulxina**. Campinas, 1970

RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. – Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz J Med Biol Res** 19: 333- 8, 1986.

REID, H.A.; THEAKSTON, R.D.G. – Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snakes age. **Am J Trop Med Hyg** 27: 1053, 1978.

REID, H.A.; THEAKSTON, R.D.G. – The management of snake bite. **Bull. WHO** , 61: 885- 95, 1983.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. – Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Ver Hosp Clin Fac Med S. Paulo**, 44, 143- 5, 1989.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. – Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Ver Inst Med trop São Paulo**, 32(6): 436- 42, 1990.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; HAWGOOD, B. J.; SMITH, I. C. – Properties of the early phases of crotoxin poison neuromuscular junctions. **Toxicon** , 28: 1479- 89, 1990.

ROSENFELD, G. – Acidentes por animais peçonhentos. In: Veronesi, R. – **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8, ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991 p. 951- 62

ROSENFELD, G. – Animais peçonhentos e tóxicos do Brasil. In: Lacaz, C.S.; Baruzzi, R.G.; Siqueira Jr. W. – **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Edusp 1972, p. 430- 75

ROSENFELD, G. – Symptomatology, pathology and treatment of snakebites in South America . In: (BUCHERL, W., BUCKKEY, E.E.; DEULOFEU, V. eds.) **Venomous Animals and their venoms**. Vol. 2. **Academic Press**, New York, 345-395, 1971.

ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G.; KELEN, E.M.A. – Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Mems Inst Butantan** 29, 143- 63, 1959.

RUBSAMEN, K.; BREIHAUPT, H; HABERMANN, E. – Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn – Schmiedeberg's Arch Pharmac** 270: 274- 88, 1971.

RYDEN, L.; GABEL, D.; EAKER, D. – A model of tree-dimensional structure of snake venom neurotoxins based on chemical evidence. **Int. J Peptide Protein Res** 5: 261, 1973.

SALOMÃO, M.G.; SANTOS, S.M.A.; PUORTO, G. – Activity Pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): Feeding, Reproduction and Snakebite. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**. 30 (2): 101-6, 1995.

SAZIMA, I. – Um estudo de biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. **Mem Inst Butantan** , 50(3): 83- 9, 1988.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. –Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. **Anal Biochem** 166(2): 368- 79, 1987.

SLOTTA, K.H.; FRAENKEL-CONRAT, H. – Schlangengifte, III: Mitteilung Reinigung und Krystallization des klapperschlangengiffes. **Ber Dtch Chem Ges** 71: 1076-81, 1938.

SOERENSEN, B. – **Animais peçonhentos**. Atheneu, 1990. 138p.

STRONG, P.N. – Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: relationship between biochemical and electrophysiological approaches to the mechanism of toxin action. In: DOWDALL, M.J. & HAWTHORNE, J.N., (Ed) **The Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function**. Chichester: Ellis Horwood, 1987. p. 534- 49

THEAKSTON, R.D.G. – New techniques in antivenom production and active immunization against snake venoms. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** , 83: 433- 5, 1989.

THOMAS, R.G.; POUGH, F.H. – The effect of rattlesnake venoms on digestion of prey. **Toxicon** 17, 221- 8, 1979.

VARGAFTIG, B.B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CHIGNARD, M.; LEFORT, J.; MARLAS, G. – Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Eur J Pharmacol** , 68: 451, 1980.

VITAL BRAZIL, O. – Neurotoxins from the South American rattlesnake venoms. **J Formosan Med Assoc** , 71: 394, 1972a.

VITAL BRAZIL, O. – Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem Inst Butantan** 33: 981- 92, 1966.

VITAL BRAZIL, O. – Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev Assoc Med Brasil** 26: 212- 8, 1980.

VITAL BRAZIL, O. – Venoms : their inhibitory action on neuromuscular transmission. **Int Encycl Pharmacol Ther** 14: 145- 67, 1972b.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; HELUANY, N.F. – Mode of action of crotoxin at the guinea-pig neuromuscular junction. **Toxicon** (Suppl nº 1): 17, 1979.

WEIL, C.S. –Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD50 or ED 50) and instructions for their use. **Biometrics** 249 – 63, 1953.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva, **WHO Publication** nº 58, 1981.

YANG, C.C. – Chemistry and evolution of toxins in snake venoms. **Toxicon** Jan;12(1):1-43. Review. 1974.