

DELKIA SEABRA DE MORAES

ESTUDO DOS EFEITOS DO VENENO DA SERPENTE

Bothrops alcatraz

EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES *in vitro*

CAMPINAS/SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ESTUDO DOS EFEITOS DO VENENO DA SERPENTE

***Bothrops alcatraz* EM PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES**

in vitro

DELKIA SEABRA DE MORAES

Dissertação de Mestrado apresentada
à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade de
Campinas – UNICAMP para obtenção
de título de Mestre em Farmacologia.
Sob orientação da Profa. Dra. Léa
Rodrigues Simioni.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M791e Moraes, Delkia Seabra de, 1978-
Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothrops alcatraz* em preparações neuromusculares *in vitro*. /
Delkia Seabra de Moraes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

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

1. Bloqueio Neuromuscular. 2. Receptores
Nicotínicos. 3. Junção Neuromuscular. 4.
Neutralização. 5. Venenos de Serpentes. I. Simioni,
Léa Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Neuromuscular activity of *Bothrops alcatraz* snake venom in chick biventer cervicis preparations

Palavras-chave em inglês:

Neuromuscular Blockade

Nicotinic Receptors

Neuromuscular Junction

Neutralization

Snake Venom

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Léa Rodrigues Simioni [Orientador]

Angélica De Fátima de Assunção Braga

José Carlos Cogo

Data da defesa: 19-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

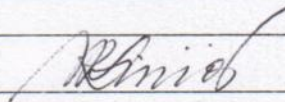
Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Delkia Seabra de Moraes

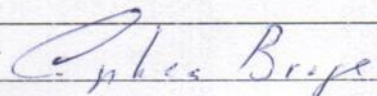
Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Léa Rodrigues Simioni



Professor (a) Doutor (a) Angelica De Fatima de Assuncao Braga



Professor (a) Doutor (a) José Carlos Cogo



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/08/2011

DEDICATÓRIA

A ti Senhor que me deste a vida.

A meus pais, Edgar e Annadir

Pelo carinho, incentivo, respeito e compreensão. Por me ajudarem a crescer com seus conselhos e exemplos. Acima de tudo, por ensinar-me a acreditar que há um Deus vivo, soberano que nos ama como somos.

Aos meus irmãos, Kelli e Edgar Júnior

Pelo companheirismo.

Aos amigos, Valney e Luceli

Por estarem sempre ao meu lado.

Ao amigo Sandro,

Pela cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada,

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni pela oportunidade, orientação, incentivo e paciência. Ao Prof. Dr. Valdemir Aparecido de Abreu pela orientação e companheirismo. Prof. Dr. Stephen Hyslop, por sempre estar com as portas abertas, pronto a compartilhar seu conhecimento. Biólogo Gildo B. Leite, por dividir pacientemente seu conhecimento, seu ombro e por me transmitir paz. Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling por disponibilizar seu laboratório de histologia e a Marta pela ajuda nos experimentos de histologia. Prof. Dr. Edson Antunes, pela atenção e informações precisas. Profa. Dra. Albetiza A. Lobo, pelos ensinamentos e estímulo. Profa. Dra. Maria de Fátima D. Furtado e Profa. Dra. Silvia R. Travaglia Cardoso, pela atenção e cessão do veneno. Profa. Dra. Thalita Rocha, por compartilhar seus conhecimentos e pelas imagens histológicas. Profa. Dra. Lourdes Dias, por dividir seu conhecimento científico e de vida. Amigos do laboratório que ficaram e se foram: Sandro, Thomás, Rafael, Rita, Priscila, Thiago, Charlene, Georgina, Mário e Dimas pelo companheirismo e excelente convívio. Amigos do departamento: Raquel, Ígor, Rafael, Norma, Mariana I e Mariana II, André, Priscila, Lineu e Lorenzo pela cumplicidade. Técnicos José Ilton e Miguel por todo auxílio. Professores que ensinam no departamento de farmacologia e aos Funcionários da pós-graduação.



RESUMO

Bothrops alcatraz é uma serpente do Arquipélago de Alcatrazes no litoral norte do estado de São Paulo, Brasil, recentemente descrita. Neste trabalho foram analisados os efeitos neuromusculares do veneno de *B. alcatraz* em preparações isoladas de biventer cervicis de pintainho (BC) e nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD), sob estimulação elétrica indireta (0.1 Hz; 0.2 ms). Em preparações BC, o veneno causou bloqueio neuromuscular completo e irreversível nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/ml em 90 ± 2 , 80 ± 1 e 50 ± 1 min, respectivamente (n = 6-9). Nestas mesmas concentrações, as respostas contraturantes evocadas pela adição exógena de ACh (110 mM) foram 27 ± 10 , 8 ± 4 e 0%, respectivamente, e do KCl (20 mM) em 45 ± 11 , 24 ± 6 e $39 \pm 7\%$, respectivamente. O veneno de *B. alcatraz* mostrou-se pouco ativo na preparação NFD de camundongo, pois mesmo ensaiado na concentração de 100 µg/ml (n=4) causou apenas $30 \pm 4\%$ de bloqueio neuromuscular após 120 min de incubação. Em preparações BC previamente curarizadas (d-Tc, 10 µg/ml), seguida pela adição do veneno (10 µg/ml), por 120 min de incubação, observou-se o retorno da resposta contrátil em $81 \pm 7\%$ (n= 4), após sucessivas lavagens. O veneno de *B. alcatraz* exibiu baixa atividade fosfolipásica quando comparado ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* (A_{425nm} $0,06 \pm 0,02$ vs $0,2 \pm 0,03$; n = 4). A análise morfológica *in vitro* da preparação BC, mostrou, em ambas as concentrações de veneno analisadas (10 e 100 µg/ml), dano musculares, sendo $18,1 \pm 1,5\%$ e $24,7 \pm 6,6\%$ (n= 5), respectivamente, quando comparadas ao controle ($7,9 \pm 2,4\%$). Paralelamente também foi observado um aumento significativo na medida da

liberação de CK, de 1441 ± 173 (10 $\mu\text{g/ml}$) e 1797 ± 343 (100 $\mu\text{g/ml}$) vs 282 ± 27 U/L da preparação controle, aos 120 min. O estudo sobre a neutralização do veneno pelo antiveneno botrópico comercial, mostrou que foram necessárias altas concentrações do antiveneno (15 vezes mais que o recomendado pelo fabricante) para neutralizar a ação do veneno de *B. alcatraz* (10 $\mu\text{g/ml}$). Conclui-se que o veneno de *B. alcatraz* promove bloqueio neuromuscular total e irreversível em preparações de ave, por atuar inicialmente nos receptores colinérgicos e por causar efeito miotóxico tardio; todos estes efeitos foram neutralizados pelo antiveneno botrópico comercial dependendo da concentração de veneno utilizada.



ABSTRACT

Bothrops alcatraz is a recently described pitviper from the Alcatrazes Archipelago off the northern coast of São Paulo state, Brazil. The neuromuscular effects of *B. alcatraz* venom were examined in chick isolated biventer cervicis preparations. In indirectly stimulated preparations, venom (10, 50 and 100 µg/ml, n=6-9) caused progressive, irreversible neuromuscular blockade that was complete in 90 ± 2 , 80 ± 1 and 50 ± 1 min (mean $\pm$ SEM), respectively. Venom (10 and 100 µg/ml) also inhibited contractures to exogenous ACh (110 µM) (by 73% and 100%, respectively), but only partially inhibited contractures to KCl (20 mM) (by 55% and 61%, respectively). These same venom concentrations increased the proportion of damaged fibers from $7.9 \pm 2.4\%$ (saline control) to $18.1 \pm 1.5\%$ and $24.7 \pm 6.6\%$, respectively ($p < 0.05$) and increase in the activity of CK release (1441 ± 173 and 1797 ± 343 vs 282 ± 27 U/L respectively). *Bothrops alcatraz* venom had low PLA₂ activity compared to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom (A_{425nm} 0.06 ± 0.02 vs 0.2 ± 0.03 ; n=4). Pretreating the preparations with d-tubocurarine (10 µg/ml) prevented the neuromuscular blockade. Commercial bothropic antiserum effectively neutralized the neuromuscular action of *B. alcatraz* venom. In conclusion, *B. alcatraz* venom causes neuromuscular blockade by interfering with cholinergic receptors but is only mildly myotoxic. Commercial antivenom neutralizes the neuromuscular blockade.

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
ACh	Acetilcolina
<i>B. alcatraz</i>	<i>Bothrops alcatraz</i>
BC	Biventer cervicis
CK	Creatino quinase
<i>C.d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
d-Tc	d-tubocurarina
KCl	Cloreto de potássio
L	Lavagem
NFD	Nervo frênico-diafragma de camundongo
NTXs	Neurotoxinas
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
V	Veneno

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação das alterações morfológicas observadas nas preparações de BC nas concentrações de 10 e 100 µg/mL de veneno de <i>B. alcatraz</i> após completo bloqueio neuromuscular.....	48
-----------------	---	-----------

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Porcentagem de acidentes botrópicos por regiões no Brasil em 2010.....	21
Figura 2- Arquipélago de Alcatrazes.....	25
Figura 3- Ilha de Alcatraz.....	26
Figura 4- <i>Bothrops alcatraz</i>	27
Figura 5- Curvas da resposta contrátil na preparação nervo frênico diafragma de camundongo (estímulo elétrico indireto), incubada com o veneno da <i>B. alcatraz</i> a 37 °C.....	39
Figura 6- Curvas da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho incubada com o veneno da <i>B. alcatraz</i> (5, 10, 50 e 100 µg/mL) sob estímulo elétrico indireto a 37°C.....	41
Figura 7- Registro miográfico da resposta contrátil em preparações biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, a 37°C, com o veneno de <i>B. alcatraz</i> (controle, 10 e 100 µg/mL).....	42
Figura 8- Efeito da contratura da ACh e KCl a 37 °C.....	44

Figura 9- Registro miográfico da resposta contrátil em preparações biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, a 37°C, com o veneno de <i>B. alcatraz</i> (10 µg/mL), após a curarização (10 µg/mL d-Tc) da preparação.....	45
Figura 10- Fotomicrografias de cortes transversais (2 µm) de preparações BC de pintainho após 120 min de estimulação elétrica indireta. As preparações foram mantidas em solução nutritiva Krebs ou tratadas com 10 µg/mL e 100 µg/mL de veneno bruto de <i>B. alcatraz</i>	47
Figura 11- Atividade enzimática de creatinoquinase na preparação biventer cervicis de pintainho após 0,30,60 e 120 minutos de incubação com o veneno da <i>B. alcatraz</i> (10 e 100 µg/mL).....	50
Figura 12- Medida da atividade fosfolipásica (PLA ₂) do veneno da serpente <i>B. alcatraz</i>	51
Figura 13- Curvas da resposta contrátil em preparação de biventer cervicis de pintainho (estímulo indireto) a 37 °C, após exposição da preparação com a mistura do veneno da serpente <i>B. alcatraz</i> (10 e 100 µg/mL) com o antiveneno botrópico (30 e 300 µL, respectivamente).....	53

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- Aspectos epidemiológicos.....	21
1.2- Gênero <i>Bothrops</i>	21
1.3- <i>Bothrops alcatraz</i>	24
2- OBJETIVOS.....	29
2.1- Objetivo geral.....	30
2.2- Objetivos específicos.....	30
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1- Veneno.....	32
3.2- Antiveneno comercial.....	32
3.3- Animais.....	32

3.4- Reagentes.....	32
3.5- Técnica miográfica.....	33
3.5.1- Preparação músculo biventer cervicis (BC) de pintainho.....	33
3.5.2- Preparação nervo-frênico diafragma de camundongo.....	34
3.6- Análise morfológica.....	35
3.7- Ensaios bioquímicos.....	36
3.7.1- Determinação da enzima creatinoquinase.....	36
3.7.2- Determinação da atividade fosfolipásica.....	36
3.8- Neutralização do veneno <i>in vitro</i>.....	37
3.9- Análise estatística.....	37
4- RESULTADOS.....	38
4.1- Atividade do veneno na junção neuromuscular.....	39
4.1.2. Efeito do veneno da serpente <i>B. alcatraz</i> sobre a junção neuromuscular em preparação nervo frênico-diafragma de	

camundongo.....	39
4.1.3- Efeito do veneno de <i>B. alcatraz</i> sobre a junção neuromuscular a 37 °C em preparação biventer cervicis de pintainho.....	39
4.1.4. Resposta da preparação biventer cervicis de pintainho à ACh e ao KCl, à temperatura de 37°C.....	43
4.1.5. Efeito do veneno de <i>B. alcatraz</i> sobre a junção neuromuscular em cervicis de pintainho após curarização.....	44
4.2. Análise morfológica de músculos biventer cervicis de pintainho incubados com veneno de <i>B. alcatraz</i>.....	46
4.3- Determinação da atividade da enzima creatinoquinase.....	49
4.3.1- <i>In vitro</i> – Preparações de biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica.....	49
4.4- Atividade Fosfolipásica do veneno da serpente <i>B. alcatraz</i>.....	50
4.5- Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do veneno da <i>B. alcatraz</i> pelo antiveneno botrópico.....	52
5- DISCUSSÃO.....	54

6- CONCLUSÃO.....	62
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8- ANEXOS.....	75
Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética.....	76

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Epidemiológicos

O gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes para a Saúde Pública. As notificações de 2010 indicam a ocorrência de aproximadamente 25.190 casos de acidentes por envenenamento botrópico (Figura 1) num total de 29.635 envolvendo outros gêneros, em todas as regiões do país (Brasil, 2011).

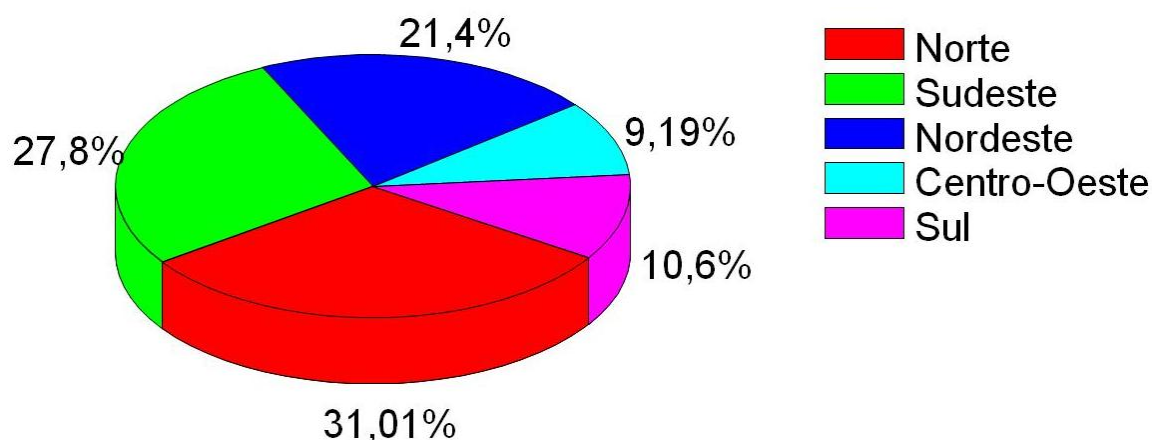


Figura 1. Porcentagem de acidentes botrópicos por regiões no Brasil em 2010

1.2. Gênero *Bothrops*

As serpentes do gênero *Bothrops*, compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas em todo território nacional. As espécies mais conhecidas são: *B. atrox* (norte); *B. erythromelas* (nordeste); *B. neuwiedi* (todo território nacional, exceto

norte); *B. jararaca* (sul e sudeste); *B. jararacussu* (cerrado da região central e florestas tropicais do sudeste) e *B. alternatus* (sul) de acordo com a Fundação Nacional de Saúde (1998).

As características das serpentes variam dependendo da espécie e da região onde vivem, porém de forma geral, possuem cauda lisa, sem chocalho.

São conhecidas popularmente como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca do rabo branco, malha de sapo, patrona, surucucurana, combóia e caigaca. São encontradas em zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais onde são encontrados facilmente roedores, como paióis e celeiros. Possuem predominantemente hábitos noturnos ou crepusculares (Cupo *et al*, 1990 e Brasil, 1998).

Os acidentes bothrópicos caracterizam-se por apresentarem dor intensa, edema acentuado e progressivo no local da picada, hemorragia (Mandelbaum, Assakura e Reichl, 1984), necrose (Gutiérrez *et al*, 1989) e alterações do sistema de coagulação (Rosenfeld, 1971; Hofmann e Bom, 1987). As principais causas de óbito estão relacionadas à insuficiência renal aguda, sangramento em órgãos vitais e choque (Amaral *et al*, 1986; Kouyoumdjian *et al*, 1991). Estes efeitos resultam da ação de enzimas e toxinas (Gutiérrez e Lomonte, 1995) presentes neste veneno exercendo diferentes atividades, como:

- Ação proteolítica devido à presença de proteases, fosfolipases e hialuronidases que promovem edema e necrose no tecido local (Fan e França, 1992).

- Ação hemorrágica pela atuação das hemorraginas promovendo lesões no endotélio vascular provocando hemorragias (Vital Brazil, 1982)

- Ação coagulante pela ativação do fator X e da protrombina, estimulando a formação de trombina e, conseqüentemente, a formação de fibrina, ou atuando diretamente sobre o fibrinogênio (Nahas *et al.*, 1979).

- Ação neurotóxica devido à presença de neurotoxinas que agem sobre a junção neuromuscular promovendo, de acordo com relatos clínicos, hipotonia muscular, paralisia flácida dos músculos da face, pescoço, tronco, laringe, faringe, respiratórios e músculos dos membros. Essas neurotoxinas são divididas em pré-sinápticas (β) e pós-sinápticas (α):

As neurotoxinas pré-sinápticas atuam nas terminações nervosas motoras, inibindo ou facilitando a liberação do neurotransmissor (acetilcolina) pelos impulsos nervosos.

As neurotoxinas pós-sinápticas ligam-se aos receptores colinérgicos da placa terminal impedindo a fixação da acetilcolina (Vital Brasil, 1982).

Embora neurotoxicidade não seja uma característica do envenenamento botrópico, estudos em preparações de aves e mamíferos mostraram que os venenos de *B. jararacussu* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983;

Heluany et al., 1992), *B. moojeni* (Rodrigues-Simioni et al., 1990), *B. leucurus* (Prianti et al., 2003), *B. pirajai* (Costa et al., 1999), *B. erythromelas* e *B. jararaca* (Zamunér, et al., 2004), *B. lanceolatus* (Lôbo-Araújo et al., 2002), *B. neuwiedi pauloensis* (Borja-Oliveira et al., 2003) e *B. insularis* (Cogo et al., 1993, 1998) podem também exibir ação bloqueadora da junção neuromuscular.

1.3. *Bothrops alcatraz*

Dentre todas as espécies deste gênero, algumas são pouco comuns, restritas a uma área geográfica bem limitada, por isso são raras. A jararaca ilhoa, *Bothrops alcatraz*, é uma destas espécies, muito abundante em seu ambiente, porém, se restringe apenas à Ilha de Alcatraz, situada no litoral norte de São Paulo a 35 km da costa (Ângelo, 1989 e Mercadante e Moura, 2005).

Esta ilha faz parte de um Arquipélago, conhecido como Arquipélago de Alcatrazes (Figura 2), constituído por ilhas e ilhotas, sendo a principal a Ilha de Alcatraz por possuir a maior formação, chegando sua elevação a 266 metros de altitude (Luederwaldt e Fonseca, 1923).



Figura 2. Arquipélago de Alcatrazes (www.panoramio.com/user/78212)

Na porção inferior sua vegetação predominante é a arbórea e nas partes mais altas encontram-se capoeiras e herbácea. A ilha de costa (Figura 3) é formada por costões rochosos e não há praia (Luederwaldt e Fonseca, 1923).

O Arquipélago abriga o maior ninhal de aves marinhas do sudeste brasileiro, sendo também o local onde mamíferos marinhos encontram refúgio e se alimentam. Foram identificadas 150 espécies de peixes e estão presentes as cinco espécies de tartarugas marinhas ocorrentes no Brasil (Mercadante e Moura, 2005). Nesta ilha não há mamíferos, com exceção de morcegos (Luederwaldt e Fonseca, 1923; Marques *et al.*, 2002).



Figura 3. Ilha de Alcatraz, pertencente ao Arquipélago de Alcatrazes

Fonte: (<http://www.flickr.com/photos/22714886@N03/2692986257/>)

A espécie insular *B. alcatraz* (Figura 4) é uma serpente pequena, comparada ao tamanho médio da *Bothrops jararaca*, Referência Nacional (Furtado, *et al.*, 1991), seu tamanho varia de 36-46 cm nos machos e 36-50 cm nas fêmeas. Difere-se ainda, por apresentar coloração mais escura, menor tamanho dos adultos, cauda mais curta, cabeça mais longa, escamas cefálicas anteriores arredondadas sem ou com fracas quilhas, menor número de escamas infralabiais (geralmente 10/10), menor número de escamas ventrais e subcaudais (Marques *et al.*, 2002).

Também o veneno do exemplar adulto apresenta características próprias, com predominância de ação sobre o sistema hemostático (Furtado, 2005), semelhante ao veneno de serpentes juvenis do gênero *Bothrops* (Furtado, *et al.*, 1991).



Figura 4. *Bothrops alcatraz* (Foto: Otávio Marques)

A dieta da serpente *Bothrops alcatraz* está baseada em animais ectotérmicos como lacraias e anfíbios (Marques *et al.*, 2002), similar à dieta de serpentes juvenis de *Bothrops*, pois nesta ilha não ocorre pequenos roedores, principal fonte de alimentação deste gênero (Amaral, 1925; Duarte *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2002) .

Também devido ao seu pequeno porte, não é possível alimentar-se das aves que ocupam a ilha, devido ao tamanho avantajado dos filhotes de aves que ali nidificam (Martins *et al.*, 2001).

O tamanho reduzido dos indivíduos adultos de *B. alcatraz*, pode ser devido ao baixo valor nutritivo e pequeno porte de suas presas, e provavelmente também sua fecundidade seja menor (Marques *et al.*, 2002). O período de nascimento ocorre entre janeiro e maio (Almeida-Santos e Salomão, 2001). Os filhotes criados em cativeiro apresentaram na idade adulta, o dobro do tamanho dos pais.

Em 2006, o World Health Organization (WHO) publicou as doenças negligenciadas (NTDs – Neglected Tropical Diseases) que afligem 1 bilhão de pessoas, principalmente a população pobre que vive em regiões tropicais e subtropicais. Em nosso país são citadas as doenças de Chagas, leishmaniose e acidentes causados por envenenamento com animais. Em abril de 2009, acidentes com serpentes foram incluídas na lista das NTDs (Caramori e Barraviera, 2011).

O gênero *Bothrops* possui importância clínica e epidemiológica em todo o país. A serpente *B. alcatraz* é uma nova espécie deste gênero, e por ser uma serpente insular, apresentou dieta adaptativa ao ambiente, características morfológicas e composição do veneno diferentes da *B. jararaca* usada como referência. Este trabalho abordará conhecer o modo de ação deste veneno.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do veneno total da serpente *Bothrops alcatraz* na transmissão neuromuscular.

2.2. Objetivos específicos

Estudar:

- Atividade neurotóxica *in vitro* em preparações neuromusculares de ave (biventer cervicis de pintainho) e de mamífero (nervo frênico músculo diafragma do camundongo) a 37°C.
- Atividade miotóxica através de análise histológica e da determinação da liberação da enzima creatinoquinase (CK) em preparações neuromusculares de ave (biventer cervicis de pintainho).
- Atividade fosfolipásica em preparações neuromusculares de ave (biventer cervicis de pintainho).
- A ação neutralizante do antiveneno botrópico em preparações neuromusculares de ave (biventer cervicis de pintainho).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Veneno

O veneno da serpente *Bothrops alcatraz*, foi cedido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

3.2. Antiveneno comercial

O antiveneno comercial (lotes 9806053 e 0212143) também foi obtido no Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil). O antiveneno botrópico é produzido a partir de uma mistura de venenos do gênero *Bothrops*: *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (Raw et al., 1991).

3.3. Animais

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4-10 dias de idade), adquiridos da Granja Globo Aves Agrícolas Ltda. Camundongos machos da linhagem SWISS, com peso entre 18-22 g, CEMIB/UNICAMP.

Os animais foram mantidos em gaiolas, no biotério do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP), ambos mantidos em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz), recebendo água e ração *ad libitum*.

3.4. Reagentes

Foi usado o kit de CK-NAC (Bioclin/Quibasa, Brasil) e Historesina (Leika NuBloch/Heidelberg, Alemanha). O cloridrato de acetilcolina foi adquirido de

Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), d-tubocurarina e o isoflurano da Abbott (Ingeniero Allan, Provincia de Buenos Aires, Argentina).

3.5. Técnica miográfica

3.5.1. Preparação músculo biventer cervicis (BC) de pintainho.

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição (mM/L): NaCl 118,7; KCl 4,7; CaCl_2 1,8; NaHCO_3 25; MgSO_4 1,17; KH_2PO_4 1,17 e glicose 11,65. A solução foi areada de modo constante com carbogênio (mistura 95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantida a 37°C.

A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares na altura entre o tendão e o músculo (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais de até 9 V de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms, e em preparações previamente curarizadas (dTc 10 $\mu\text{g/mL}$) com pulsos supramaximais (20 V; 0,1 Hz; 2 ms) provenientes de estimulador (Grass S48).

As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta à adição de ACh (110 μM) e KCl (20 mM) foram registradas em fisiógrafo (Gould RS 3400), por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. Os registro das contraturas para KCl e ACh foram realizados

na ausência de estimulação elétrica, no início, (antes da adição do veneno) e no final do experimento (após 120 min de incubação com a toxina). Três a cinco lavagens foram efetuadas sempre após a adição de KCl e de ACh.

Após 15 min de estabilização, foram realizados os seguintes tratamentos: solução nutritiva Krebs e adição do veneno de *B. alcatraz* nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 µg/mL.

Os experimentos controle foram realizados com solução nutritiva de Krebs a 37 °C durante 120 minutos.

3.5.2. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongo

Os camundongos foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e posteriormente sacrificados por secção e sangria dos vasos cervicais. O músculo diafragma foi removido cirurgicamente juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico, como descrito por Bülbring (1946); as preparações foram colocadas em cubas contendo 5 mL de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte composição (mM/L): NaCl 118,7; KCl 4,7; CaCl₂ 1,88; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 25 e glicose 11,65.

A temperatura foi mantida a 37 °C e com aeração de carbogênio (mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂; pH 7,5). O músculo diafragma foi mantido, por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina. A preparação, então, foi estimulada

indiretamente, através do nervo frênico, (estimulador Grass S 48 S48; 3 V; 0,1 Hz; 0,2 ms).

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos, foi realizado através de transdutor isométrico (BG-10 GM) acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400). Após a estabilização da preparação foram adicionados 100 µg/mL do veneno de *B. alcatraz*.

Os experimentos controle foram realizados com solução nutritiva de Tyrode a 37 °C durante 120 minutos.

3.6. Análise morfológica

Ao final dos experimentos, após a exposição aos diversos tratamentos, por 120 minutos, as preparações do biventer cervicis de pintainho, foram retiradas e fixadas em solução Bouin, por 24 horas. Após esse período os músculos foram lavados com água e amônia e colocados em álcool a 70%. A fixação seguiu o procedimento de desidratação (80, 90 e 100%) e inclusão em historesina Leika (Nubloch/Heidelberg, Alemanha).

A confecção das lâminas histológicas foi seguida pela obtenção de secções de 2 e 3 µm de cada experimento, através do micrótomo Leika RM 2035, em seguida, montadas em lâminas e coradas com uma mistura de azul de toluidina 0,5% (Vetec, São Paulo) e bórax 5% (Quimesp, São Paulo), para observação em microscópio óptico.

Após análise quantitativa do material histológico (análise obtida por 2 diferentes leitores), foi processada a documentação dos resultados obtidos, através do microscópio Olympus BX51, com a utilização do programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.) para a captura de imagens.

3.7. Ensaio bioquímicos

3.7.1. Determinação da enzima creatinoquinase (CK)

O procedimento foi realizado em preparação de biventer cervicis de pintainho incubados com o veneno de *B. alcatraz* (10 e 100 µg/mL) ou solução nutritiva de krebs (controle), para posterior determinação da atividade enzimática. Alíquotas de 50 µL foram retiradas do banho nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos, com reposição de igual volume de solução nutritiva de Krebs. As alíquotas foram mantidas a 4 °C até o momento da dosagem da atividade enzimática então analisadas utilizando-se um Kit comercial CK-NAC Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda – lote 0107), conforme orientação do fabricante. Os resultados sobre a liberação de CK foram expressos em U/L. Uma unidade de CK corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 37 °C.

3.7.2. Determinação da atividade fosfolipásica

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e Holzer e Mackessy (1996), modificado por Ponce-Soto *et al.* (2002). A mistura padrão continha 200 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100mM, pH 8,0), 20 µL de substrato (ácido 4-

nitro-3 (octanoiloxi) benzóico), 20 µL de água deionizada e 20 µL de amostra, em um volume final de 260 µL. A reação enzimática foi monitorada a 425 nm à temperatura de 37°C, de dois em dois minutos, durante 30 minutos, em um leitor de 96 poços (Spectramax 340, Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA) com amostras em triplicata.

3.8. Neutralização do veneno *in vitro*

A neutralização *in vitro* foi testada em preparações isoladas de biverter cervicis de pintainho com o veneno (10 e 100 µg/mL) pré-incubado por 30 minutos com várias concentrações do antiveneno ou do anti-soro (n=4-6).

A razão veneno:antiveneno ou anti-soro usada nos ensaios foram 1:3, 1:10 e 1:20. Baseando-se que 1 mL do antiveneno neutraliza 5 mg do veneno botrópico, como descrito na embalagem do antiveneno comercial utilizado.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos $\pm$ erro padrão. A significância foi obtida através do teste *t*-Student, ANOVA e Tukey estabelecendo-se o nível de significância em $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS

4.1- Atividade do veneno na junção neuromuscular

4.1.2. – Efeito do veneno da serpente *B. alcatraz* sobre a junção neuromuscular em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD) sob estimulação elétrica indireta.

O veneno de *B. alcatraz* mostrou atividade não significativa em preparação neuromuscular isolada de camundongo. Assim, o veneno na concentração de 100 µg/mL produziu somente 30±5% de bloqueio sobre a resposta contrátil em preparação NFD aos 120 minutos de experimento quando comparado ao controle (Fig. 5). Note que somente próximo dos 80 min, o nível de bloqueio torna-se diferente do controle.

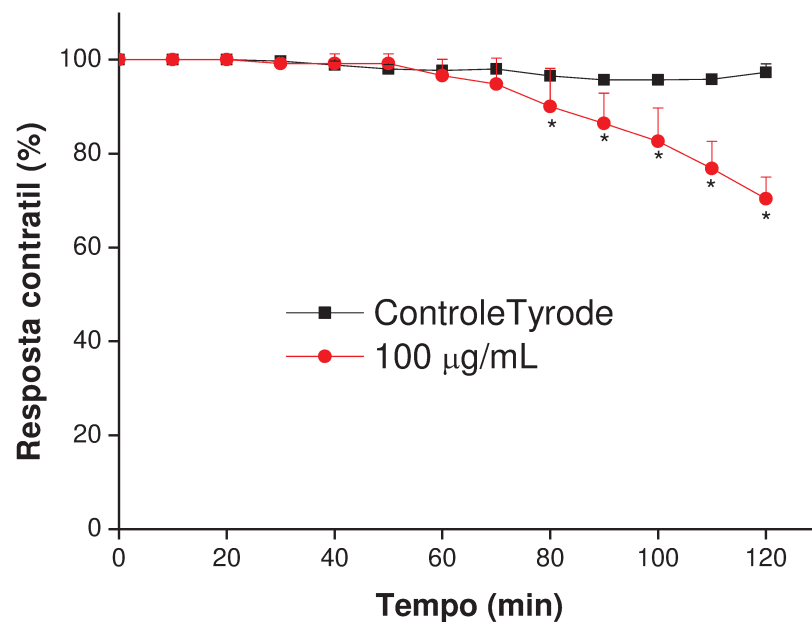


Figura 5- Gráfico da resposta contrátil na preparação nervo frênico diafragma de camundongo (estímulo elétrico indireto), incubada com o veneno de *B. alcatraz* (100 µg/mL). Os pontos representam a média ± erro padrão da média (n= 6) *p<0,05.

4.1.3- Efeito do veneno de *B. alcatraz* sobre a junção neuromuscular a 37°C em preparação biventer cervicis de pintainho.

O veneno de *B. alcatraz* (10, 50 e 100 µg/mL) produziu bloqueio neuromuscular completo e irreversível em preparação biventer cervicis de pintainho, após estímulo elétrico indireto. Causou 50% de bloqueio em 41±4, 38±4 e 20±3 min, respectivamente e 100% de bloqueio aos 90±2, 80±1 e 50±1 min, respectivamente.

As concentrações de 10 e 50 µg/mL mostraram similar potência entre os tempos necessários para causar 50% de bloqueio (41±4 e 38±4 min, respectivamente). Com 5 µg/mL não foi observado o bloqueio neuromuscular (Fig.6).

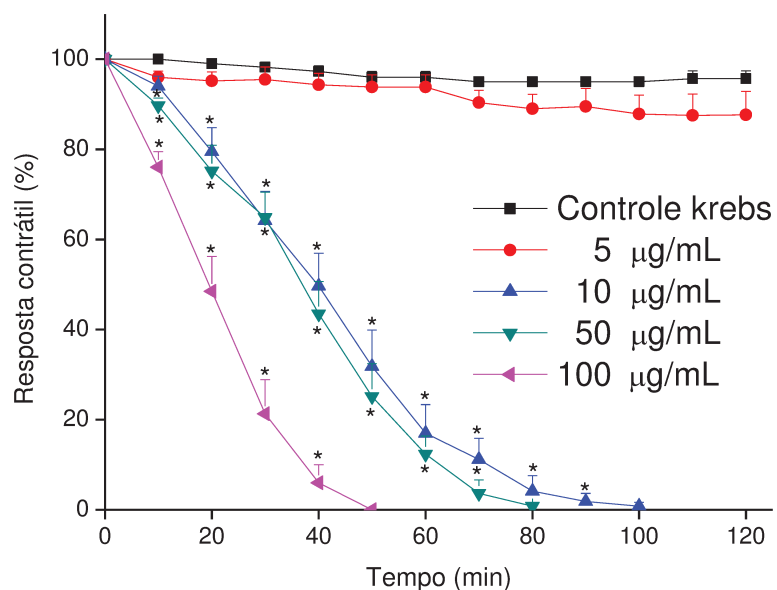


Figura 6– Gráfico da resposta contrátil em bívter cervicis de pintainho (BC), a 37°C, incubada com veneno de *B. alcatraz* (5, 10, 50 e 100 µg/mL), sob estímulo elétrico indireto, comparado ao controle (Krebs). Os pontos representam a média ± erro padrão da média, *p<0,05 (n= 6-10).

Em seguida podem ser visualizados os registros miográficos da força de contração muscular em bívter cervicis de pintainho (BC) com o veneno de *B. alcatraz* nas concentrações de 10 e 100 µg/mL comparados ao controle (Krebs), além de mostrar a resposta contraturante da ACh e do KCl (Fig.7).

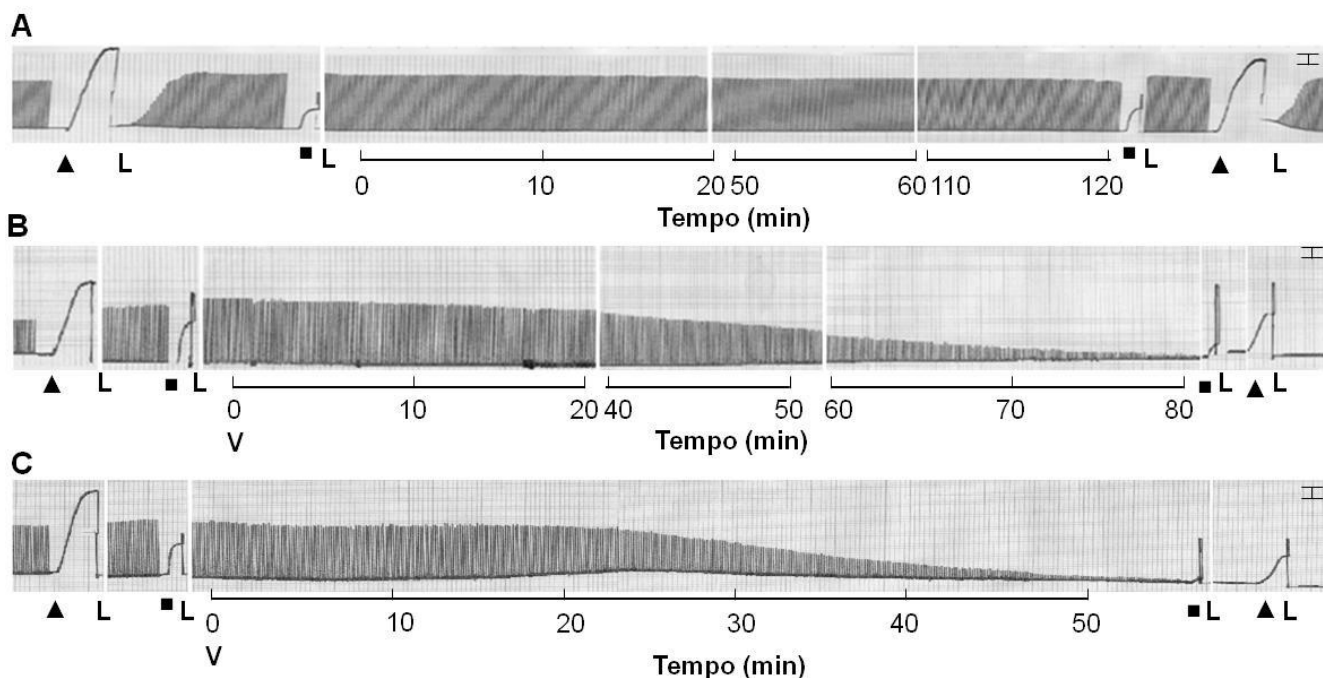


Figura 7- Registro miográfico da força de contração muscular em biventer cervicis de pintainho, sob estímulo indireto, a 37°C, com o veneno de *B. alcatraz* (10 e 100 µg/mL). (A) Krebs (controle); (B) Bloqueio total e irreversível da resposta contrátil com o veneno de *B. alcatraz* (10 µg/mL) e redução da resposta contraturante após adição da ACh (■, 110 µM) para 27±10% e após adição do KCl (▲, 20 mM) 45±11%. (C) Com 100 µg/mL do veneno, há o bloqueio total e irreversível da resposta contrátil (60 min), sendo também observada a inibição total da resposta contraturante após a adição exógena de ACh (■, 110 µM), e redução da resposta contraturante para 39±7% após a adição do KCl (▲, 20 mM). V-veneno; L=lavagem; Barra vertical=1g de tensão (n=6-10).

4.1.4. Resposta da preparação biventer cervicis de pintainho à ACh e ao KCl, à temperatura de 37°C.

A incubação com o veneno (10, 50 e 100 µg/ml) reduziu significativamente a resposta contraturante após adição da ACh (110 µM), de modo concentração-dependente, sendo observado apenas 27±10, 8±4 e 0% de resposta, respectivamente.

Enquanto para o KCl (20 mM), houve 45±11, 24±6 e 39±7%, respectivamente, de retorno da resposta contraturante ao final dos experimentos (Fig. 8). A contratura produzida pelo KCl (20 mM), apesar de mostrar-se alterada, não foi dependente da concentração. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações de 10 e 100 µg/mL (45±11 e 39±7%, respectivamente) (Fig.8).

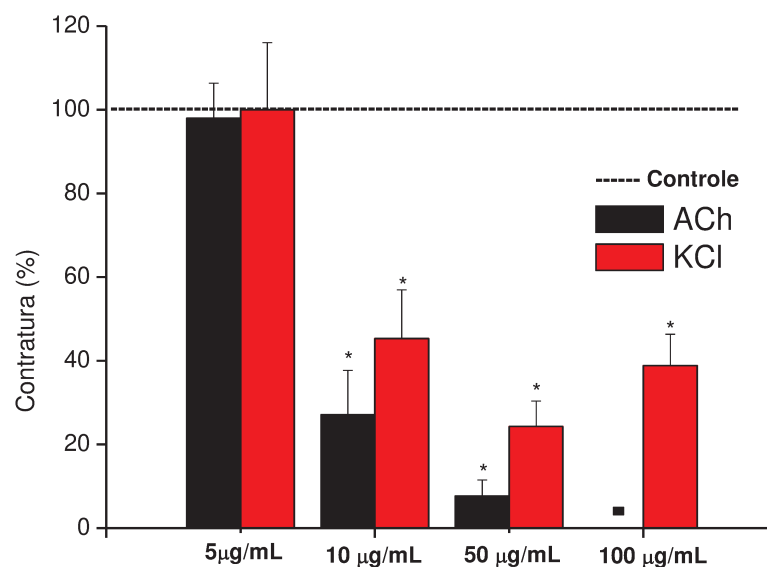


Figura 8- Contratura da ACh (110 μ M) e do KCl (20 mM) em biventer cervicis de pintainho (BC) com o veneno de *B. alcatraz*, nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 μ g/mL, a 37°C. O símbolo ■ indica o bloqueio total da resposta a ACh. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média (n=6), *p<0,05, comparado ao controle Krebs.

4.1.5. Efeito do veneno de *B. alcatraz* sobre preparação curarizada de biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica indireta.

Em preparações pré-tratadas com d-Tc (10 μ g/ml) seguido pela incubação com o veneno (10 μ g/ml) durante 120 min, estimulada indiretamente, observou-se após subseqüentes lavagens o retorno da resposta contrátil em

81±7% (Fig. 9B), o que não é visto quando a preparação não está curarizada (Fig. 7B).

Mas a restauração da resposta contraturante após adição da ACh foi apenas de 7±4% dos valores pré d-Tc (Fig. 9B). Em preparações quando somente a d-Tc está presente, as lavagens restauram completamente a resposta contraturante a ACh exógena (Fig. 9A).

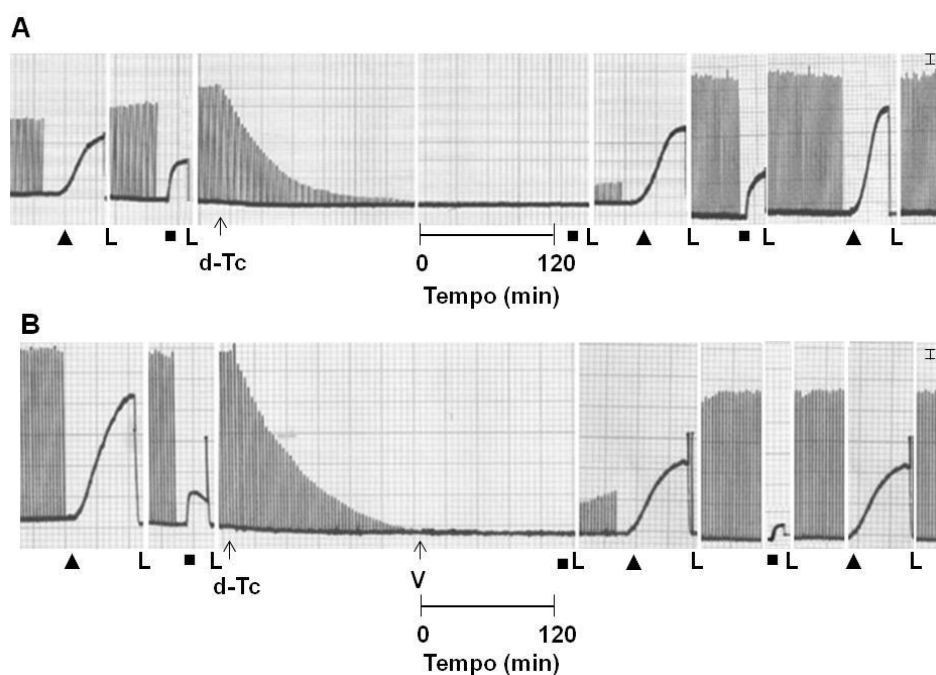


Figura 9- Resposta contrátil após adição do veneno bruto da serpente *B. alcatraz* (10 µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho pré-exposta à d-tubocurarina (d-Tc; 10 µg/mL). A preparação foi incubada somente com d-Tc (A) e com o veneno de *B. alcatraz*, após o bloqueio neuromuscular induzido pela d-Tc (B). Observe as contraturas após adição exógena de ACh (110 µM) e KCl (20 mM) obtidas antes e após a incubação com d-Tc ou d-Tc e o veneno de *B.alcatraz*.

Importante notar ainda, o retorno da resposta contrátil. Os registros mostrados são representativos de 4 experimentos. L=lavagens. Barra=1g

4.2. - Análise morfológica de músculos biventer cervicis de pintainho incubados com veneno de *B. alcatraz*

O controle foi feito através da incubação do músculo com a solução de Krebs, apresentando morfologia com diâmetro regular das fibras musculares (Fig. 10A). Ambas as concentrações analisadas (10 e 100 µg/ml) causaram danos as fibras musculares, envolvendo células hipercontraídas e lesões delta (10 µg/mL; Fig. 10B) e formação de edema, visto como aumento da célula (100 µg/mL; Fig. 10C).

A porcentagem de danos nas fibras musculares nas preparações tratadas com veneno foram $18.1 \pm 1.5\%$ (10 µg/ml) e $24.7 \pm 6.6\%$ (100 µg/ml) comparado a $7.9 \pm 2.4\%$ em preparação controle (Tabela 1).

As alterações morfológicas não foram muito diferentes entre as concentrações (Fig. 10B e 10C).

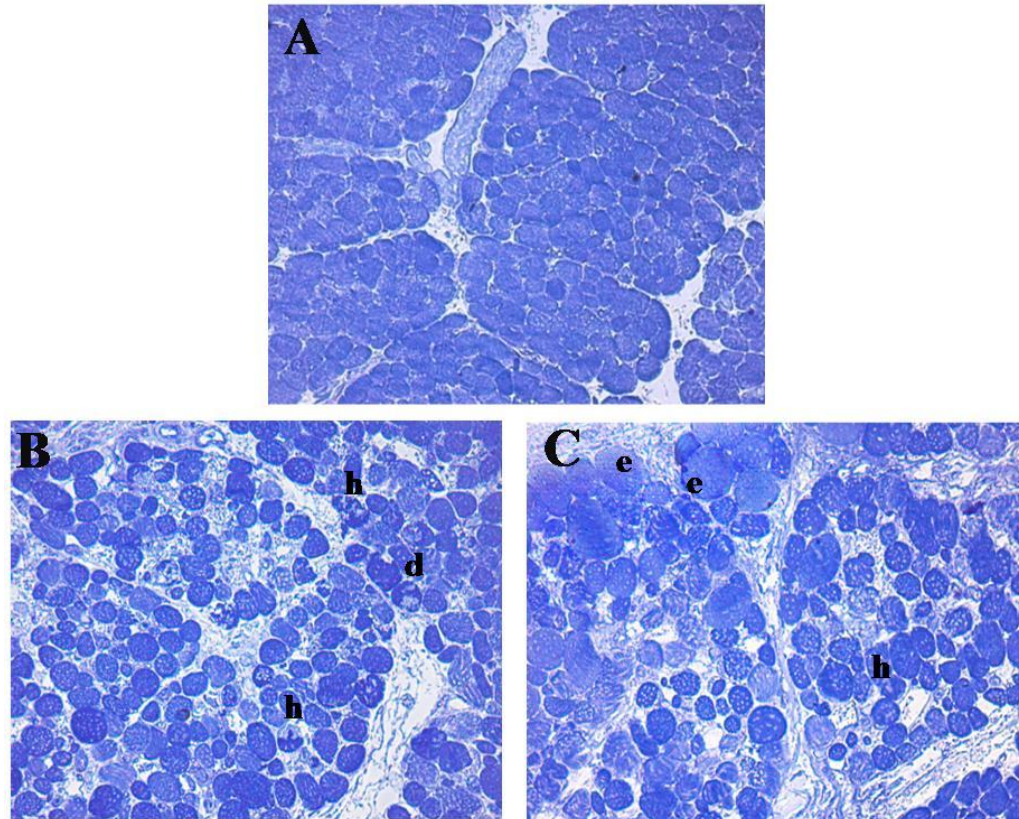


Figura 10: Fotomicrografias de cortes transversais (2 μm) de preparações BC de pintainho após 120 min de estimulação elétrica indireta. As preparações foram mantidas em solução nutritiva Krebs (A), ou tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ (B) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (C) de veneno bruto de *B. alcatraz*. Alterações morfológicas, tais como: hipercontração de miofibrilas (h), fibras edemaciadas (e) e células delta (d), foram evidenciadas nas preparações tratadas. Barra 10 μm .

Índices das alterações morfológicas após incubação com o veneno, comparado ao controle Krebs.

Veneno de <i>B. alcatraz</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Alterações morfológicas (%)
Controle Krebs	$7,9 \pm 2,4$
10	$18,1 \pm 1,5^*$
100	$24,7 \pm 6,6^*$

Tabela 1- Comparação das alterações morfológicas observadas em preparação biventer cervicis de pintainho, após 120 min de exposição ao veneno de *B. alcatraz* (10 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos, * $p < 0,05$ comparado ao controle Krebs.

4.3 - Determinação da atividade da enzima creatinoquinase.

4.3.1- *In vitro* – Preparações de biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica e incubadas com veneno bruto nas concentrações de 10 e 100 µg/mL.

A Figura 11 mostra um gráfico representativo da atividade da enzima creatinoquinase (CK) medida através das amostras coletadas do banho em diferentes intervalos de tempo (0, 30, 60, 120 minutos).

A adição do veneno da *B. alcatraz* nas concentrações de 10 e 100 µg/mL causou um aumento significativo na liberação de CK.

No entanto não houve diferença significativa entre os valores de liberação de CK medidos quando comparados entre as concentrações de 10 e 100 µg/mL, ou seja, a razão usada entre as doses não foi suficiente para determinar uma proporcionalidade entre a concentração utilizada e o efeito observado.

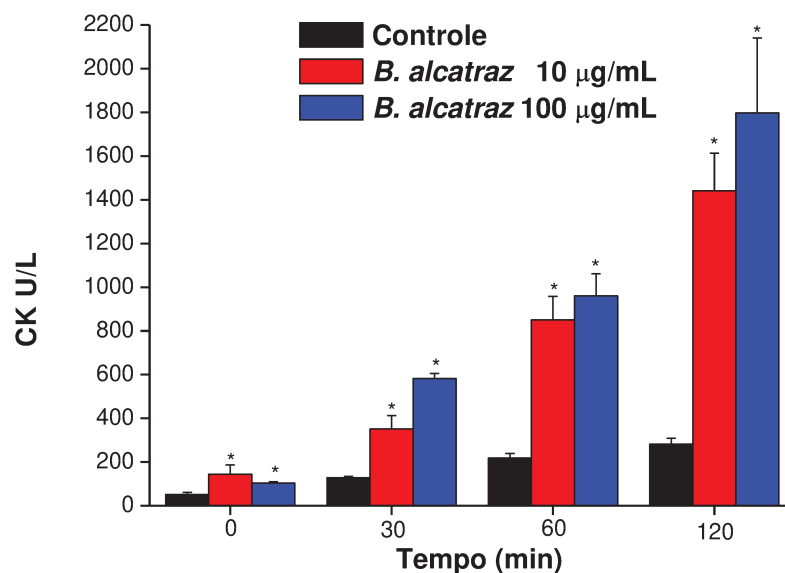


Figura 11- Medida da liberação de creatinoquinase (CK) na preparação biventer cervicis de pintainho após 0, 30, 60 e 120 minutos de incubação com o veneno da *B. alcatraz* (10 e 100 µg/mL). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média, * $p < 0,05$ de 8 experimentos.

4.4- Atividade Fosfolipásica do veneno da serpente *B. alcatraz*.

Os resultados obtidos expressam o máximo de atividade fosfolipásica em 30 minutos de experimento à temperatura de 37°C. O veneno de Cdt foi utilizado apenas como controle positivo.

O veneno da *B. alcatraz* apresentou nos mesmos parâmetros experimentais, baixa atividade fosfolipásica em comparação com o veneno de

Crotalus durissus terrificus, utilizado como controle positivo: absorbâncias ($A_{425\text{nm}}$) $0,19\pm0,03$ e $0,06\pm0,02$; respectivamente, (Figura 12).

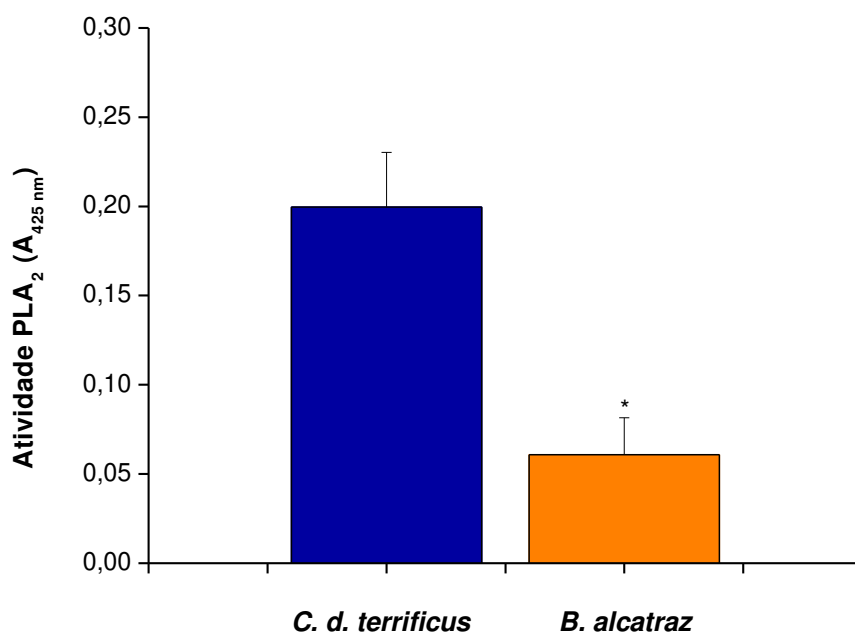


Figura 12- Medida da atividade fosfolipásica (PLA₂) do veneno da serpente *B. alcatraz* comparado aos valores de absorbância da atividade fosfolipásica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) – controle positivo; * $p<0,05$, a 37°C.

4.5- Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular do veneno da *B. alcatraz* pelo antiveneno botrópico comercial

A pre-incubação do veneno de *B. alcatraz* (10 and 100 µg/ml) com o antiveneno botrópico commercial (AVB) na proporção do antiveneno-veneno foi de 1:5 (1 ml do antiveneno:5 mg do veneno) seguindo a recomendação do fabricante, no entanto, não houve neutralização do bloqueio neuromuscular. Porém, quando o veneno (10 µg/mL) foi pré-incubado com 30 µl de antiveneno, o bloqueio foi atenuado em $81\pm4\%$.

Em contraste, quando 100 µg/mL foi pré incubado com 300 µl de antiveneno (mesma proporção antiveneno:veneno usado para 10 µg/mL de veneno) houve somente proteção parcial, com o tempo de 50% e 100% de bloqueio, aumentou de 20 ± 3 para 45 ± 3 min e de 50 ± 1 para 80 ± 3 min, respectivamente (Fig. 13).

Maiores quantidades de antiveneno (≥ 1 ml) foram testadas, porém observou-se efeito deletério sobre a preparação (dados não mostrados).

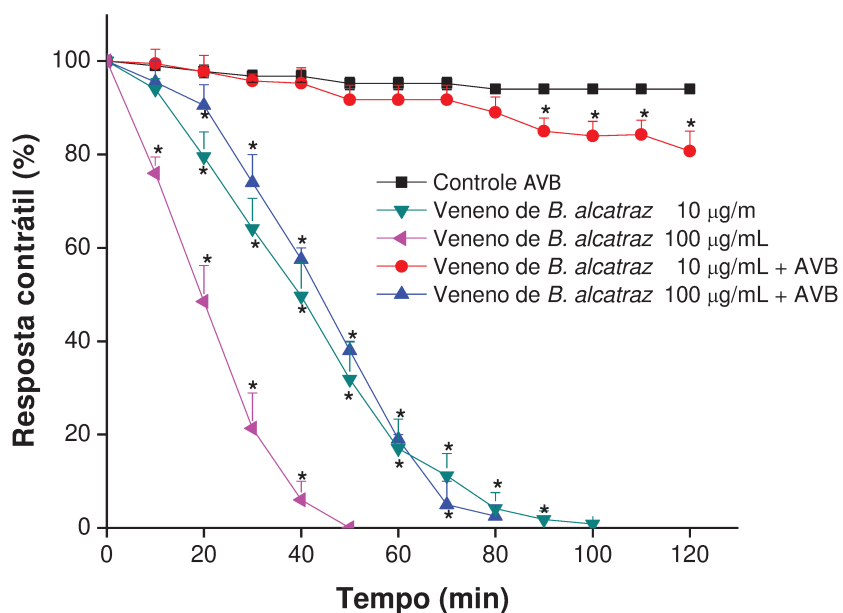


Figura 13- Curvas da resposta contrátil em preparação de biventer cervicis de pintainho (estímulo indireto) a 37°C. As preparações foram expostas a mistura do veneno (10 e 100 µg/mL) com o antiveneno botrópico (30 µL de soro) e somente com o veneno. Note a inibição do bloqueio neuromuscular com 10 µg/mL do veneno de *B. alcatraz* após o tratamento com o antiveneno. Com 100 µg/mL foi parcialmente neutralizado. Os pontos representam a média ± erro padrão da média de 4-6 experimentos.

5 – DISCUSSÃO

O veneno de serpentes do gênero *Bothrops* é conhecido por produzir hemorragia, edema e mionecrose no local da inoculação do veneno (Gutiérrez e Lomonte, 2003), além de mostrar atividade neuromuscular *in vitro* em várias espécies de serpentes deste gênero: *B. jararacussu* (Rodrigues-Simioni et al., 1983, Heluany et al., 1992), *B. moojeni* (Rodrigues-Simioni et al., 1990), *B. insularis* (Cogo et al., 1993, 1998; Rodrigues-Simioni et al., 2004), *B. pirajai* (Costa et al., 1999), *B. lanceolatus* (Lôbo-Araújo et al., 2002), *B. leucurus* (Prianti et al., 2003), *B. neuwiedi pauloensis* (Borja-Oliveira et al., 2003, Rodrigues-Simioni et al., 2004, Durigon, et al., 2005), *B. erythromelas* (Zamunér, et al., 2004), *B. neuwiedi goyazensis*, *B. neuwiedi paranaensis* e *B. neuwiedi diporus* (Abreu et al., 2007).

Como mostrado neste trabalho, o veneno de *B. alcatraz* causou bloqueio neuromuscular total e irreversível em preparações biventer cervicis de pintainho, semelhante a outros venenos botrópicos (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Cogo et al., 1993; Lôbo-Araújo et al., 2002; Borja-Oliveira et al., 2003; Prianti et al., 2003; Durigon et al., 2005; Abreu et al., 2007).

A preparação de ave, geralmente é mais sensível à ação dos venenos botrópicos do que a preparação de mamífero (Cogo et al., 1993; Lôbo-Araújo et al., 2002; Borja-Oliveira et al., 2003; Prianti et al., 2003). Harvey et al., (1994) consideram a preparação de biventer cervicis de pintainho um importante instrumento para estimar a neurotoxicidade de venenos de serpentes, pois as fibras musculares de pintainho apresentam inervação múltipla. O músculo biventer possui áreas quimiossensíveis ao longo de toda a fibra muscular e, por esse

motivo, respondem com contratura à agonistas colinérgicos, como a ACh, e à substâncias despolarizantes, como o KCl, adicionados ao banho.

As fibras musculares do hemidiafragma de camundongo são predominantemente de inervação focal, isto é, cada ramificação do axônio motor inerva uma única fibra. Assim, a área quimiossensível se restringe à região da placa motora. Como cada fibra muscular apresenta uma única região de placa, a adição de ACh ao banho não provoca nenhuma resposta contraturante, como ocorre com a preparação biventer cervicis de pintainho (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

Sendo assim, a preparação isolada biventer cervicis de pintainho mostrou-se mais sensível à ação do veneno da serpente *B. alcatraz*, pois causou bloqueio neuromuscular total, além de ser possível observar as contraturas após adição do KCl e da ACh, que não são possíveis de serem observadas usando preparação nervo frênico-diafragma. Porém, a preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo, não foi significativamente sensível a ação deste veneno, como observado por Furtado et al (2005) que observaram baixa toxicidade em ratos.

Em relação a esta baixa potência do veneno em preparação de mamíferos, pode ser devido a ausência de roedores na Ilha de Alcatraz (Marques et al, 2002). Como ocorre com a serpente ilhoa *B. insularis*, que devido à ausência de mamíferos, tornou-se fortemente dependente para sua alimentação, das aves migratórias que frequentavam a ilha, fato também ao qual se atribui sua

predominância arborícola e o desenvolvimento de um veneno mais potente capaz de paralisar a presa (Amaral, 1925; Marques et al, 2002).

Um dos principais alvos de venenos de serpente é o sistema nervoso somático, e em particular a junção neuromuscular, uma vez que a inibição da neurotransmissão neste sítio resulta em paralisia dos músculos respiratórios, e frequentemente causa a morte (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

Neurotoxinas de venenos de serpentes podem causar paralisia muscular, atuando pré-juncionalmente ao impedir a liberação de ACh ou pós-juncionalmente ao bloquear os receptores nicotínicos (Vital Brasil, 1982). Neurotoxinas pré-sinápticas inibem a resposta contrátil, sem afetar a resposta aos agonistas colinérgicos (Cogo et al., 1998; Rodrigues-Simioni et al, 2004; Borja-Oliviera et al., 2007; Ponce-Soto et al., 2009; Rodrigues-Simioni et al., 2011). Por outro lado, as neurotoxinas pós-sinápticas bloqueiam a resposta a esses agonistas (Vital Brasil, 1982).

Bothrops alcatraz é uma das três espécies de *Bothrops* ilhoas que a atividade neuromuscular tem sido estudada, as outras são *B. insularis* (Cogo et al., 1983, 1998; Rodrigues-Simioni et al., 2004) e *B. lanceolatus* (Lôbo de Araújo et al., 2002). Com todos esses venenos, a preparação biventer cervicis de pintainho foi mais sensível do que a preparação de mamífero, em presença dos venenos dessas espécies ilhoas. Dentre estas espécies, o veneno de *B. insularis* foi o mais potente, produzindo 50% de bloqueio em 30 ± 2 min com 10 µg/mL de veneno, comparado a 41 ± 4 min nesta mesma concentração do veneno de *B. alcatraz*

(Cogo et al., 1983, 1998). Já para a serpente *B. lanceolatus*, este bloqueio ocorreu em ~48 min, porém foi necessário uma concentração 10 dez vezes maior (100 µg/ml) de veneno (Lôbo de Araújo et al., 2002).

Em termos de resposta a agonistas exógenos, o veneno de *B. insularis* potencializou a resposta contraturante a adição de ACh sem afetar a resposta ao KCl, atribuindo ao veneno de *B. insularis* provavelmente uma ação pré-sináptica (Cogo et al., 1998; Rodrigues-Simioni et al., 2004). O veneno de *B. lanceolatus* bloqueou a resposta a ACh (Lôbo de Araújo et al., 2002), similar a ação do veneno de *B. alcatraz* que também inibiu totalmente a resposta contraturante após à adição do neurotransmissor colinérgico. Porém, o veneno de *B. lanceolatus* não afetou a resposta contraturante após adição do KCl, enquanto houve bloqueio parcial desta resposta após tratamento com o veneno de *B. alcatraz*.

Levando-se em conta as diferentes respostas neuromusculares à atividade do veneno destas três espécies ilhoas, torna-se imprevisível a influência do isolamento geográfico sobre esta atividade do veneno.

Claude Bernard (1850) descreveu a localização da ação paralítica da d-tubocurarine na junção entre o nervo e o músculo. A d-tubocurarine liga-se de modo reversível aos receptores colinérgicos nicotínicos na membrana pós-juncional, bloqueando competitivamente a ação do neurotransmissor, acetilcolina (Goodman et al., 1990).

Como observado nos resultados (fig. 9), após a curarização da preparação BC, o veneno foi adicionado e subseqüentes lavagens, restaurou a

resposta contrátil que é irreversível quando apenas o veneno é utilizado na incubação (fig. 7), demonstrando a ação protetora da d-tubocurarina sobre os receptores nicotínicos ao impedir a interação com o veneno, sugerindo uma ação pós-sináptica do veneno de *B. alcatraz*.

Ao mesmo tempo, observa-se ainda o bloqueio da resposta contraturante ao neurotransmissor ACh, adicionado ao banho. Esse bloqueio pode ser explicado pela existência de duas populações de receptores nicotínicos em preparação BC (Chang et al., 1977, Hodgson e Wickramaratna, 2002), sendo uma população extrajuncional que responde bem à ACh exógena, mas que é rapidamente bloqueada pelas neurotoxinas dos venenos e outra população de receptores nicotínicos localizados na placa motora, que responde à estimulação nervosa, porém são menos sensíveis ao rápido bloqueio por essas neurotoxinas, possivelmente devido à dificuldade para a toxina se difundir na fenda sináptica. Existem relatos com a ação de outras neurotoxinas que discriminam entre estas duas populações de receptores (Chang et al., 1973, Chang and Su, 1975).

A miotoxicidade pode ser avaliada pela inibição parcial ou total da resposta contraturante do músculo esquelético à adição do KCl (Barfaraz e Harvey, 1994), pela elevação da linha de base nos registros miográficos (Heluany et al., 1992), pela liberação da enzima creatinoquinase (Ownby et al., 1982) e também, pela análise morfológica (Mebs e Ownby, 1990).

A redução observada em aproximadamente 60% nas respostas ao KCl, associada à significativa liberação da creatinoquinase (CK), enzima encontrada

nos filamentos de miosina (Suarez-Kurt, 1983) e a análise morfológica indicam que o veneno de *B.alcatraz* também é miotóxico. Ainda que tardiamente, essa lesão muscular poderia ter contribuído para o bloqueio neuromuscular geral, mesmo que os danos às fibras musculares, não tenham sido expressivos, quando comparados às alterações provocadas por outros venenos ou toxinas botrópicas (Oshima-Franco et al., 2000, 2001; Gutiérrez et al., 1989; Moura-Da-Silva et al., 1991).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são proteinases de baixo peso molecular, que hidrolisam fosfolipídios de membrana e liberam o ácido araquidônico, originando importantes segundos mensageiros fisiológicos e mediadores de processos inflamatórios (Kini, 2003; Kini e Evans, 1989), e estão frequentemente presentes como componentes tóxicos no veneno de serpentes (Kini, 1997).

Nos venenos botrópicos são encontrados diferentes níveis de atividade fosfolipásica (Lomonte et al., 2003), desde edema e inflamação (Teixeira et al., 2003), necrose muscular (Gutiérrez and Ownby, 2003) até letalidade e bloqueio neuromuscular *in vitro* (Gallaci and Cavalcante, 2010). Em contraste com outros venenos botrópicos, tais como *B. jararacussu* e *B. moojeni* (Moura-Da-Silva et al., 1991), o veneno de *B. alcatraz* apresentou baixa atividade fosfolipásica. Entretanto, miotoxinas PLA₂ ainda não foram isoladas a partir deste veneno, não ficando claro até que ponto a atividade PLA₂ contribui para o bloqueio neuromuscular observado neste trabalho.

A soroterapia é o tratamento mais eficaz no acidente botrópico. O soro

antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan é obtido através da imunização de cavalos com um pool de venenos de algumas serpentes do gênero *Bothrops*: *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* (Raw et al., 1991), eficiente em neutralizar a ação do veneno de várias espécies do gênero (Bogarín et al., 2000).

O soro antibotrópico neutralizou o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno de *B. alcatraz* (10 µg/mL) somente quando usado uma proporção 3 vezes maior do que o recomendado pelo fabricante. Este resultado foi corroborado com os achados de Furtado (2005) que relatou que o antiveneno foi ineficiente em neutralizar a atividade hemorrágica e letal do veneno de *B. alcatraz* em relação à sua eficácia contra veneno de *B. jararaca* (incluído no conjunto de veneno utilizado no protocolo de imunização).

A neutralização limitada (somente com a concentração de 10 µg/mL) observada em preparações isoladas BC incubadas com 100 µg/mL de veneno de *B. alcatraz*, provavelmente reflete um inadequado título de anticorpos específicos no soro, que se liguem aos componentes encontrados neste veneno.

6 – CONCLUSÃO

O veneno da serpente *B. alcatraz* causou bloqueio neuromuscular total e irreversível em preparações isoladas de ave, provavelmente através de uma ação pós-sináptica ao interagir com os receptores nicotínicos juntamente com os danos as fibras musculares. Este bloqueio neuromuscular foi neutralizado pelo antiveneno botrópico comercial em graus variados, dependendo da concentração do veneno.

7- REFERÊNCIAS

Abreu VA, Dal Belo CA, Hernandez-Oliveira SS, Borja-Oliveira CR, Hyslop S, Furtado MF, Rodrigues-Simioni L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2007; 148:142-149.

Almeida-Santos SM e Salomão MG. Reproductive strategies in tropical pitvipers, genus *Bothrops* (Serpentes: *Viperidae: Crotalinae*). In press. In G. Schuett, M. Höggren, and H. W. Greene (Eds.), Biology of the Vipers. Eagle Mountain Publishing. Eagle Mountain, Utah, U.S.A., 2001.

Amaral A. A general consideration of snake poisoning and observation on neotropical pitvipers. Contr. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med. 1925; 2:54-55.

Amaral CF, De Rezende NA, Da Silva OA, Ribeiro MM, Magalhães RA, Dos Reis RJ. Acute kidney failure secondary to ophidian bothropic and crotalid accidents. Analysis of 63 cases. Rev Inst Med Trop São Paulo 1986; 28(4): 220-7.

Ângelo S. Ilhas do Litoral Paulista. Secretaria do Meio Ambiente. Série Documentos ISSN 0103-264X. 49 p. São Paulo-SP, 1989.

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

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação nacional da Saúde, 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica, 2011.

Bogarín G, Morais JF, Yamaguchi LK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, Guidolin R, Rojas G, Higshi HG, Gutiérrez JM. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 2000; 38:1429-1441.

Borja-Oliveira CR, Durigon AM, Vallin ACC, Toyama MH, Souccar C, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003; 36:617-624.

Borja-Oliveira CR, Kassab BH, Soares AM, Toyama MH, Giglio JR, Marangoni S. Purification and n-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂ neuwieditoxin-I and neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca pintada) venom. *J Venom Anim. Toxins incl Trop Dis* 2007; 13(1): 103-121.

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

Camargo TM, Roodt AR, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrhocryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms. *Journal of venom research.* 2011; 2: 24-00.

Caramori CA, Barraviera B. Universities and neglected diseases – it is not enough to have knowledge, it must be applied. The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases (JVATtd) 2011; 17: 1-3.

Chang CC, Chen TF, Chuang ST. *N,O*-di and *N,N,O*-tri[³H]acetyl α -bungarotoxins as specific labeling agents of cholinergic receptors. Br. J. Pharmacol. 1973; 47:147-160.

Chang CC, Su MJ. Further evidence that extrinsic acetylcholine acts preferentially on extrajunctional receptors in the chick biventer cervicis muscles. Eur. J. Pharmacol. 1975; 33:337-344.

Chang CC, Su MJ, Hsien Tung L. Appearance of new acetylcholine receptors on the baby chick biventer cervicis and denervated rat diaphragm muscles after blockade with α -bungarotoxin. J. Physiol. 1977; 268:449-465.

Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse na chick nerve-muscle preparation. Toxicon 1993; 31:1237-1247.

Cogo JC, Prado-Franceschi J, Giglio JR, Corrado AP, Cruz-Höfling MA, Donato JL, Leite JB, Rodrigues-Simioni L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ Toxicon 1998; 36:1323-1332.

Costa PD, Toyama MH, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L, Cruz-Höfling MA. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. Toxicon 1999; 37:1143-1153.

Cupo P, Azevedo MM, Hering SE. Acidentes Ofídicos: Análise de 102 casos. Livro de Resumos do XXI Congresso da Soc Bras Med Trop 1990; 23-24.

Duarte MR, Puerto G & Franco FL. A biological survey of the pitvipers *Bothrops insularis* (serpentes, Viperidae): an endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. Studies on Neotropical Fauna and Environment 1995; 30: 1-13.

Durigon AM, Borja-Oliveira CR, Dal Belo CA, Oshima-Franco Y, Cogo JC, Lapa AJ, Souccar C, Rodrigues-Simioni L. Neuromuscular activity of *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom in mouse nerve-muscle preparations. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2005; 11: 22-33.

Fan HW, França FOS. Acidente elapídico. In: Schvartsman S, ed. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. São Paulo: Sarvier 1992; 167-790.

Furtado MFD, Maruyama M, Kamiguti AS & Antonio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon 1991; 29: 219-226.

Furtado MFD. Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, an endemic species of pitviper from Brazil. Comparative Biochemistry and Physiology 2005;141: 117-123.

Gallacci M, Cavalcante WLG. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. Toxicon 2010; 55:1-11.

Gilman AG. Pharmacological basis of therapeutics. Pergamon Press, Inc., Maxwell House, Fairview Park, Elmsford, New York 10523, U.S.A. 8^a ed. 1990; 9:170.

Ginsborg BL, Warriner JN. The isolated chick *biventer cervicis* nerve muscle preparation. Br. J. Pharmacol. 1960; 15:410-411.

Gutiérrez JM, Chavez F, Gené JA, Lomonte B, Camacho Z, Schosinsky K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. Toxicon 1989; 27(7): 735-45.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 1995; 33(11):1405-24.

Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 2003; 42:915-931.

Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, Harris J B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. Toxicon 1994; 32(3): 257-265.

Heluany NF, Homsí-Brandeburgo ML, Giglio JR, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom on mouse and chick muscle preparations. Toxicon 1992; 30:1203-1210.

Hodson WC, Wickramaratna JC. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2002; 29:807-814.

Hofmann H, Bon C. Blood coagulation induced by venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor activators. Biochemistry 1987; 26(3): 780-7.

Kini RM. Venom phospholipases enzymes. Chichester: John Willey & Sons 1997; 269-282

Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. Toxicon 2003; 42:827-840.

Kouyoumdjian JA, Polizelli C, Lobo SM, Guimarães SM. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991; 85(4): 552.

Lôbo de Araújo A, Donato JL, Leite GB, Prado-Franceschi J, Fontana MD, Bom C, Rodrigues-Simioni L. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. Toxicon 2002; 40:1283-1289.

Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon 2003; 42:885-901.

Luederwaldt H e Fonseca JPA. Ilha dos Alcatrazes. Rev. Mus. Paulista 1923; 13: 441-512.

Mafrá A. www.panoramio.com/user/78212, Acesso em: 26/07/2010.

Mandelbaun FR, Assakura MT, Reichl AP. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops newiedi* (jararaca pintada). Toxicon 1984, 22(2): 193-206.

Marques OAV, Martins M & Sazima I. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary Biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). Herpetologica 2002; 58 (3): 303-312.

Martins M, Marques OAV & Sazima I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In press. In G Schuett, M Höggren and HW Greene (Eds.) Biology of the Vipers. Eagle Mountain Publishing. Eagle Mountain, Utah, U.S.A, 2001.

Mebis D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their Biochemical and Biological activities. Pharmac. Ther 1990; 48: 223-236.

Mercadante AO, Moura LFHA. Serpente Ilhoas: em Alcatrazes e Queimada Grande = Islands serpentes: in Alcatrazes and Queimada Grande. São Paulo: Magma Editora Cultural, 2005.

Moraes, G. Alcatrazes. <http://www.flickr.com/photos/22714886@N03/2692986257/>, Acesso em: 26/07/2010.

Moura-Da-Silva AM, Desmond H, Laing G, Theakston RDG. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. Toxicon 1991; 29:713-723.

Nahas L, Kamiguti AS, Barros MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb Haemost* 1979; 41(2): 314-28.

Ownby CL, Gutiérrez JM, Colberg TR, George OV. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from *Prairie rattlesnake* (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 1982; 20 (5): 887-885.

Oshima-Franco Y, Hyslop S, Cintra ACO, Giglio JR, Cruz-Höfling, Rodrigues-Simioni. Neutralizing capacity of commercial Bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and Bothropstoxin-I. *Muscle & Nerve* 2000; 23 (12): 1832-1839.

Oshima-Franco Y, Leite GH, Silva GH, Cardoso DF, Hyslop S, Giglio JR, et al. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from bothrops jararacussu (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. *Toxicon* 2001; 39:1477-1485.

Prianti ACGJr, Ribeiro W, Lopes-Martins RAB, Lira-Da-Silva RM, Prado-Franceschi J, Rodrigues-Simioni L, Cruz-Höfling MA, Leite GB, Hyslop S, Cogo JC. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon* 2003; 41: 595-603.

Ponce-Soto, LA, Barros JC, Marangoni S, Hernandez S, Dal Belo CA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2009; 150:291-297.

Raw I, Guidolin R. Antivenins in Brazil: preparation. In. Tu AT, editor. Reptile venoms and toxins: Handbook of natural toxins 1991; 5:557- 581.

Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience 1983, 10(2): 475-89.

Rodrigues-Simioni L, Cogo JC, Assakura MT, Mandelbaun FR. Muscular blocking activity of *Bothrops moojeni* venom and its active fractions. Mem. Inst. Butantan 1990; 52:77-78.

Rodrigues-Simioni L, Zamunér SR, Cogo JC, Borja-Oliveira CR, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, Corrado AP.. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). Toxicon 2004; 43: 633-638.

Rodrigues-Simioni L, Floriano RS, Rostelato-Ferreira S, Sousa NC, Marangoni S, Ponce-Soto LA, Carregari VC, Hyslop S. Presynaptic action of *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom *in vitro*. Toxicon 2011; 58:140-145.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bite in South America. In: Bücherl W, Buckley EE. Venomous animals and their venoms. New York: Academic Press 1971; 345-84.

Schendel M. <http://es.treknature.com/gallery/photo14879.htm>, Acesso em: 26/07/2010

Suarez-Kurtz G. Enzyme release from skeletal muscle. Braz J Med Biol Res 1983; 16 (4): 283-290.

Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. Toxicon 2003; 42:947-962.

Vital Brasil O. Peçonhas. In: CORBETT, C. E., ed. - Farmacodinâmica. 6. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982; 1044-1074.

World Health Organization - Progress in the characterization of venoms and standardization of anti-venoms. Geneva, WHO, 1981. (Offset Publication, n.58).

Zamunér SR, Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venom and their neutralization by commercial antivenom. Toxicon 2004; 44:259-271.

8 – ANEXO



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2214-1, sobre "Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothrops alcatraz* em preparações neuromusculares *in vitro*", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Delkia Seabra de Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 09 de agosto de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2214-1, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 9, 2010.

Campinas, 09 de agosto de 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva