

SANDRO ROSTELATO FERREIRA

**A INFLUÊNCIA DA HEPARINA EM
BAIXA CONCENTRAÇÃO SOBRE A MIOTOXICIDADE
DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* E BOTHROPSTOXINA-I**

CAMPINAS

2007

SANDRO ROSTELATO FERREIRA

**A INFLUÊNCIA DA HEPARINA EM
BAIXA CONCENTRAÇÃO SOBRE A MIOTOXICIDADE
DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* E BOTHROPSTOXINA-I**

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

ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. LÉA RODRIGUES SIMIONI

CO-ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. YOKO OSHIMA FRANCO

CAMPINAS

2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F413i Ferreira, Sandro Rostelato
A influência da heparina em baixa concentração sobre a miotoxicidade do veneno de *Bothrops jararacussu* e bothrotoxina - I/ Sandro Rostelato Ferreira. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Léa Rodrigues Simioni, Yoko Oshima Franco
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bothrops. 2. Venenos de Serpentes. 3. Heparina. 4. Veneno.
5. Mordeduras de Cobra. 6. Agentes Neurotóxicos. 7. Junção
Neuromuscular. 8. Antivenenos. I. Simioni, Léa Rodrigues.
II. Franco, Yoko Oshima. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: The influence of heparin at a low concentration against the myotoxicity of *Bothrops jararacussu* and bothrotoxina-I

Keywords: • Bothrops
• Snake Venoms
• Heparin
• Venoms
• Snake Bites
• Neurotoxic agents
• Neuromuscular junction
• Antivenom

Titulação: Mestrado em Farmacologia

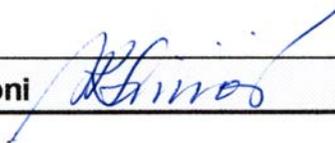
**Banca examinadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Profa. Dra. Márcia Gallacci
Prof. Dr. Fábio Bucarechi**

Data da defesa: 27-07-2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

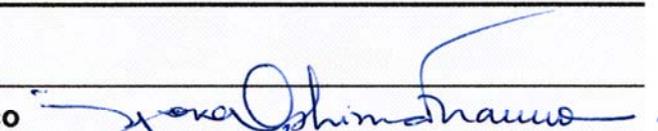


Co-orientador:

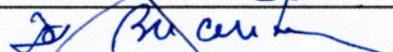
Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Membros:

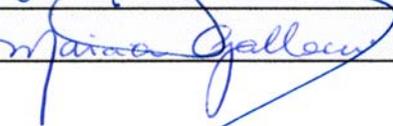
Profa. Dra. Yoko Oshima Franco



Prof. Dr. Fábio Bucarechi



Profa. Dra. Márcia Gallacci



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

Data: 27/07/2007

A Deus,
minha fonte de sabedoria.
Agradeço pelo presente da vida e
oportunidade de aprendizado.

A meus pais,
Osmar e Nair,
pelo privilégio de tê-los como meus pais e
por acreditarem na minha capacidade.

Pelo imenso amor,
carinho e
apoio
que me dispensaram durante esses anos.
Obrigado pelo exemplo de vida.

A meu irmão
Samuel,
pelo carinho,
companheirismo e
privilégio de
tê-lo como meu irmão.

Ao amigo
Rômulo,
irmão caçula que Deus me presenteou.
Quanto aprendo com você.
Obrigado pelo carinho,
amizade,
companheirismo e
por dividir os momentos difíceis da vida.

Agradeço...

Aos docentes

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, com o imenso carinho com que tem me aberto as portas do laboratório e tem me acrescentado a cada dia um pouco mais de sabedoria e vontade de crescer através do conhecimento e da ciência. Muito obrigado pela oportunidade e exemplo de vida.

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, pelo voto de confiança em mim depositado. Você tem me ensinado a procurar sempre os bons caminhos e por eles caminhar com muita garra e vontade de vencer. Agradeço muito a Deus por tê-la como minha orientadora e amiga, pelas oportunidades que tive ao seu lado e pelo imenso aprendizado de vida. Minha eterna gratidão.

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling pela valiosa contribuição na histologia e auxílio científico. Obrigado pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana (*in memorian*), pelo grande privilégio que tive de conviver com sua sabedoria e profissionalismo, por tão pouco tempo.

Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela rica contribuição científica e correções de inglês.

Profa. Dra. Caroline Ribeiro de Borja Oliveira, pela contribuição em conhecimento científico e pessoal.

Prof. Dr. Edson Antunes, pela atenção e excelente coordenação do curso.

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, apesar do pequeno convívio, agradeço pelo apoio e bons conselhos que sempre tem dispensado.

Prof. Dr. Fábio Bucarechi, pela atenção e rica contribuição dispensada ao trabalho.

Prof. Dr. Cléber Evandro Teixeira (*in memorian*), pela disposição que teve em participar da banca de qualificação e ter enriquecido esse trabalho com suas sugestões.

Aos amigos

Gildo, pela imensa ajuda e apoio que tem dispensado em todos os momentos durante a execução desse trabalho. Sem a sua ajuda esse trabalho não teria chegado ao fim. Muito obrigado.

Dimas, grande amigo e companheiro, muito dedicado ao trabalho e às amizades. Obrigado por tudo.

Lílian, grande companheira, você tem contribuído de forma grandiosa neste trabalho.

Amiga Profa. Dra. Saraguacy Hernandez Oliveira e Silva, admiro sua coragem e determinação. Você consegue transformar momentos de tristeza em alegria. Você é demais!

Valdemir, grande amigo e companheiro, sempre pronto para oferecer um auxílio e dividir seus conhecimentos. Foi uma ótima convivência e aprendizado. Deus o abençoe sempre!

Priscila, muito esforçada e grande companheira. Muitos foram os momentos que dividimos juntos, tanto alegres quanto menos alegres. Obrigado pela boa convivência, amizade e por partilhar seus conhecimentos.

Mário, apesar da sua correria, tivemos bons momentos no decorrer do nosso curso que sempre serão lembrados. Valeu, corintiano!

Charlene e Gina, que bela dupla. A Charlene, sempre tão meiga e atenciosa, a Gina, apesar das dificuldades com o português, tem se saído bem como uma brasileira. Vocês são muito dedicadas à pesquisa. Muito obrigado pela contagem “cega” da histologia e pela boa amizade de vocês.

Mariana Cintra, pela amizade, pelo apoio e auxílio nos momentos que precisei. Boa sorte nessa nova etapa.

Caroline Barcelos, pela boa convivência e amizade, e aos demais que passaram pelo laboratório, Walter e Aracélio, agradeço a convivência, foi muito agradável.

Marta Leonardo, pela atenção e contribuição na parte prática em histologia, e as demais amigas: Thalita, Karina, Catarina e Gabriela, pela alegria e bom companheirismo no laboratório. Vocês são especiais!

Aos funcionários da secretaria, Elaine, Fran, Aline e Wanderlei que sempre estão prontos para auxiliar os alunos.

Aos colegas do biotério, sr. Miguel e Marcos, pelo companheirismo e por cuidarem tão bem dos nossos animais e aos técnicos, Toninho, Zé Ilton, Aginaldo e Adilson, o meu muito obrigado.

Avó Margarida, avô Cristino e tia Rosa pela atenção e dedicação durante esses anos. Agradeço a torcida e que Deus os ilumine cada vez mais!

Guacira & família pelo carinho que sempre tiveram comigo. Que Deus os abençoe sempre. Nunca me esquecerei de vocês.

À estatística (Andréia Ferreira Semolini) e à Comissão de Apoio Didático (profa. Maria José pela correção ortográfica), Científico e Computacional e Informática da FCM da Unicamp, pelos serviços prestados. Obrigado a todos.

À UNICAMP e FAEP, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

*“O princípio da sabedoria é:
adquire a sabedoria;
sim,
contudo o que possuis,
adquire o entendimento”.*

Prov. 4:7

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	19
1.1- <i>Bothrops jararacussu</i>	20
1.2- Bothropstoxina-I	21
1.3- Heparina	23
2- OBJETIVOS	27
3- MATERIAL E MÉTODOS	29
4- RESULTADOS	35
5- DISCUSSÃO	48
6- CONCLUSÃO	54
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8- ANEXO	63
Protocolo 792-1	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AVB	Antiveneno botrópico comercial
CK	Creatinoquinase
Bjssu	Veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-I	Bothropstoxina-I
Hep	Heparina
mg	Miligrama (s)
µg	Micrograma (s)
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
µL	Microlitro (s)
µM	Micromolar
NFD	Nervo Frênico-Diafragma
NPE	Nervo ciático poplíteo externo
PLA₂	Fosfolipase A ₂
UI	Unidade internacional
U/L	Unidade por litro

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Índice de alterações morfológicas na preparação NFD.....	41

		<i>Pág.</i>
Figura 1	Estrutura química da heparina. Molécula composta de glicosamina sulfatada e ácido idurônico sulfatado.....	23
Figura 2	Delineamento dos protocolos experimentais.....	34
Figura 3	Curvas da resposta contrátil de controles em preparações NFD de camundongos (estímulo indireto). As preparações foram expostas à solução de Tyrode, heparina e antiveneno botrópico.....	36
Figura 4	Curvas da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo (estímulo indireto) a 37° C (0,1 Hz; 2 ms). As preparações foram expostas a misturas de veneno com heparina e antiveneno botrópico.....	37
Figura 5	Curvas da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo sob estímulo indireto (0,1 Hz; 2 ms). As preparações foram expostas a misturas da BthTX-I com heparina e antiveneno botrópico.....	38
Figura 6	Fotos representativas de cortes de músculo diafragma de camundongo sob estimulação elétrica do nervo frênico durante 120 min.....	40
Figura 7	Curva da resposta contrátil em preparação NFD sob estimulação indireta, tratada com protamina e sua ação neutralizante sobre o complexo veneno: heparina.....	42
Figura 8	Registro da resposta contrátil da preparação NFD de camundongo com a adição de heparina em diferentes tempos.....	43
Figura 9	Efeitos do tratamento de neutralização da atividade enzimática de creatinoquinase (CK) com heparina e AVB.....	44
Figura 10	Representação gráfica da resposta contrátil da preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE) sob estímulo indireto.....	46
Figura 11	Aspecto morfológico da preparação NPE de rato.....	47

RESUMO

O veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) e sua miotoxina bothropstoxina-I (BthTX-I), induzem neurotoxicidade e miotoxicidade. Como o tratamento com o antiveneno é pouco eficaz contra a miotoxicidade, muitos estudos têm sido realizados utilizando substâncias que neutralizem a atividade miotóxica induzida pelo veneno, entre elas, a heparina. Os objetivos deste trabalho foram: 1) verificar o efeito da heparina sobre a miotoxicidade induzida pelo veneno e toxina, utilizando-se uma baixa concentração de heparina, porém capaz de impedir o bloqueio neuromuscular e, 2) esclarecer o papel protetor da heparina contra Bjssu. Controles foram realizados com antiveneno botrópico (AVB) comercial ou solução nutritiva de Tyrode ou salina. Para avaliar a neurotoxicidade empregou-se técnica miográfica convencional em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (*in vitro*) e nervo ciático poplíteo externo-tibial anterior de ratos (*in vivo*); para avaliar a miotoxicidade *in vitro* empregou-se a técnica histológica (microscopia óptica) e *in vivo* a dosagem bioquímica da creatinoquinase (CK); para avaliar o papel protetor da heparina empregou-se a protamina, um antagonista farmacológico. Os resultados obtidos *in vitro* mostraram que a resposta contrátil de $12 \pm 2\%$ (n=6) frente à incubação com Bjssu (40 $\mu\text{g/mL}$) por 120 min foi aumentada para $79,6 \pm 5,9\%$ (n=6) quando pré-incubado com heparina (5 UI/mL) e $68,3 \pm 6,2\%$ (n=6) quando pré-incubado com AVB (120 $\mu\text{L/mL}$); na mesma situação a BthTX-I (2,9 μM) passou de $5 \pm 1,3\%$ (n=8) para $78,8 \pm 6,8\%$ (n=8) com heparina e $62,3 \pm 6,1\%$ (n=6) com AVB. A média da quantificação do dano morfológico (leitura de três diferentes observadores) mostrou que o veneno provocou lesões de 27% e a toxina de 40%, que passaram para níveis de 5% e 9%, respectivamente, quando tratadas com heparina e 11% e 3% quando com AVB. Os pré-tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle Tyrode. Os resultados *in vivo* (em ratos) mostraram que as mesmas concentrações de veneno e toxina utilizadas nos ensaios *in vitro* não provocaram alterações na resposta contrátil; contudo, quando injetados no músculo gastrocnêmio de camundongos, apresentaram níveis plasmáticos de CK (U/L) de: 1454 ± 185 (Bjssu, n=6) diminuindo ($P < 0,05$) para 236 ± 40 (com heparina, n=6) e 47 ± 5 (com AVB, n=6); 1531 ± 166 (BthTX-I, n=5) diminuindo ($P < 0,05$) para 900 ± 149 (com heparina, n=5) e 935 ± 135 (com AVB, n=5). A adição de protamina (0,8 UI/mL) aos 15 minutos de incubação da mistura heparina + veneno causou o bloqueio neuromuscular característico do veneno em

preparações *in vitro*. Conclui-se que a heparina é mais eficaz (mas pode ser totalmente bloqueada pela protamina) que o AVB quanto a sua capacidade de impedir a neurotoxicidade *in vitro* causada por Bjsu e BthTX-I, e que nas mesmas concentrações a heparina demonstrou nenhuma neurotoxicidade *in vivo* (ratos) e que ela é tão eficiente quanto o AVB na miotoxicidade *in vitro*, mas menos eficaz *in vivo* em relação ao veneno bruto.

Palavras-chave: veneno de *Bothrops jararacussu*, bothropstoxina-I, heparina e antiveneno botrópico comercial.

ABSTRACT

Bothrops jararacussu venom (Bjssu) and its myotoxin bothropstoxin-I (BthTX-I) induce neurotoxicity and myotoxicity. Since the treatment with the antivenom is weakly efficient against the myotoxicity, many reports concentrate on studies utilizing substances that neutralize the myotoxicity activity induced by the venom, including heparin. The objectives of this work were: 1) to examine the effect of heparin on the myotoxicity induced by venom and toxin, using a low heparin concentration, capable to prevent the neuromuscular blockade and, 2) to examine the protective role of heparin against Bjssu. Control experiments were performed with commercial bothropic antivenom (CBA), Tyrode solution or saline. To examine the neurotoxicity, a conventional myographic technique was used in studies with mouse phrenic nerve-diaphragm preparations (*in vitro*) and rat popliteal external nerve/muscle anterior tibialis (*in vivo*). Histological technique (light microscopy) and biochemical measurement of creatine kinase (CK) were used to examine the myotoxicity *in vitro* e *in vivo*, respectively. Protamine (a pharmaceutical antagonist) was used to evaluate the protective role of heparin. The results *in vitro* showed that the twitch-tension of $12 \pm 2\%$ in the presence of Bjssu ($40 \mu\text{g/mL}$; $n=6$) after 120 min was increased to $79.6 \pm 5.9\%$ when preincubated with heparin (5 UI/ml ; $n=6$) and $68.3 \pm 6.2\%$ when preincubated with CBA ($120 \mu\text{L/mL}$; $n=6$). Similarly, the BthTX-I ($2.9 \mu\text{M}$) - induced responses amounted to $5 \pm 1.3\%$ ($n=8$) and $78.8 \pm 6.8\%$ with heparin ($n=8$) and $62.3 \pm 6.1\%$ with CBA ($n=6$). The quantification of morphological changes showed that the venom induced a damage of 27% and the toxin of 40%, which were reduced to 5% and 9%, when treated with heparin and 11% and 3% with CBA, respectively. The pre-treatment did not cause significant differences compared to Tyrode solution. The results *in vivo* showed that the same concentrations of venom and toxin utilized in *in vitro* assays did not induce alteration in twitch-tension. However, when injected in mouse gastrocnemius muscle, plasma levels of CK (U/l) of 1454 ± 185 (in the presence of Bjssu, $n=6$) were decreased to 236 ± 40 (heparin, $n=6$) and 47 ± 5 (CBA, $n=6$). Similarly, a value of 1531 ± 166 in the presence of BthTX-I ($n=5$) was decreased to 900 ± 149 (heparin, $n=5$) and 935 ± 135 (CBA, $n=5$). The addition of protamine (0.8 UI/ml) at 15 min incubation of the mixture heparin+venom, induced a neuromuscular blockade similar to the venom in *in vitro* preparations. We conclude that heparin is more efficient (although totally antagonized by protamine) than CBA with

respect to the *in vitro* neurotoxicity induced by Bjsu and BthTX-I, which did not cause myotoxicity *in vivo* (rats). Heparin is as efficient as CBA in myotoxicity *in vitro*, but less efficient *in vivo* compared to the crude venom.

Keywords: *Bothrops jararacussu* venom, bothropstoxin-I, heparin and commercial bothropic antivenom.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Bothrops jararacussu*

São numerosas as espécies de *Bothrops* existentes em todo território nacional (Hoge e Romano, 1972), sendo estas espécies responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (São Paulo, 2001).

Bothrops jararacussu, que significa ‘jararaca grande’ no idioma nativo indígena, é uma serpente venenosa que alcança quase dois metros de comprimento, encontrada no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina. Essas serpentes habitam, preferencialmente, os ambientes úmidos, como mata e áreas cultivadas; locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferias de grandes cidades (Brasil, 1991). A picada é seguida de dor e edema local, de intensidade variável, que aparecem precocemente e são de caráter progressivo. O edema nos membros, quando intenso, pode estender-se de modo a atingir vários seguimentos corpóreos, mas raramente atinge o tronco (São Paulo, 2001).

O veneno botrópico possui as seguintes atividades:

- **Proteolítica:** é desencadeada devido à presença de enzimas proteolíticas que causam danos no tecido local tais como edema e necrose (Brazil, 1911; Sanches et al., 1992).
- **Hemorrágica:** devido a fatores hemorrágicos (hemorraginas) que são as principais responsáveis pelas hemorragias ocorridas nos acidentes botrópicos (Vital Brazil, 1982¹);
- **Coagulante:** devido a várias proteases que agem em diferentes estágios da cascata de coagulação sangüínea (Iwanaga e Suzuki, 1979). Grande parte dos venenos botrópicos age de forma isolada ou simultaneamente sobre o fibrinogênio, protrombina e fator X, resultando em alterações na coagulação sangüínea. O tempo de coagulação do sangue total, nesses casos, pode estar prolongado e o sangue parcialmente coagulável ou incoagulável (Nahas et al., 1979).

¹Vital Brazil *apud* Corbett, C.E. Farmacodinâmica. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982; p.1044-74.

Os casos de morte por envenenamento botrópicos são raros, ocorrendo em 0,3-0,5% dos casos, geralmente poucos dias após a picada (Ribeiro e Jorge, 1997). As principais causas de morte têm sido relacionadas à insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória aguda, hemorragia, choque e sepse (Amaral et al., 1986; Ribeiro et al., 1998).

1.2- Bothropstoxina-I

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foi fracionado por Rodrigues-Simioni et al. (1983), obtendo-se deste procedimento como pico de maior massa, o “pool IV”, com atividades bloqueadora neuromuscular e miotóxica; este pool era equivalente a 30% do conteúdo protéico do veneno total. Esta subfração ativa (“pool IV”), constituída por dois polipetídeos básicos, com peso molecular aproximadamente de 13.000, apresentava atividade hemolítica indireta na presença de íons Ca^{2+} , baixa atividade PLA_2 sobre lecitina de ovo e nenhuma atividade proteolítica. O “pool IV” mostrou-se ainda responsável pela ação bloqueadora do potencial de ação composto de nervo e músculo e das respostas musculares, tanto a estímulos elétricos diretos, como indiretos. Os autores sugeriram, então, que a fração possuía uma ação em membrana semelhante à das cardiotoxinas, toxinas presentes nos venenos de algumas serpentes da família *Elapidae*.

O veneno de *Bjssu* foi também purificado por Homsí-Brandeburgo et al. (1988), combinando filtração em gel Sephadex G-75 com cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25. A fração isolada $S_{III}SP_V$, correspondente à fração purificada relatada por Rodrigues-Simioni et al. (1983) – “pool IV” – foi denominada bothropstoxina-I (BthTX-I) (Homsí-Brandeburgo et al. 1988). Ao contrário do veneno bruto, que, além de miotóxico também afetava artérias e veias intramusculares podendo levar à trombose, a BthTX-I foi considerada especificamente miotóxica. Com baixa atividade fosfolipásica sobre lecitina de ovo, a fração $S_{III}SP_{IV}$, denominada bothropstoxina-II (BthTX-II) também exibia ação miotóxica (Gutiérrez et al., 1991), cuja seqüência de aminoácidos foi posteriormente identificada (Pereira et al., 1998) e caracterizada como sendo uma Asp-49 PLA_2 ,

Em preparações neuromusculares de camundongos e aves a BthTX-I causava contratura, bloqueio das contrações musculares, despolarização e bloqueio do potencial de ação composto do músculo (Heluany et al., 1992). Os autores verificaram que a atividade bloqueadora da junção neuromuscular não envolvia a participação do receptor nicotínico, nem a ativação do canal de Na⁺ e sugeriram a ação da toxina sobre os sítios de ligação de Ca²⁺ na membrana (sarcolema).

Cintra et al. (1993) ao descreverem completamente a seqüência de aminoácidos da BthTX-I, toxina que representa 15% das proteínas do veneno total, evidenciaram que esta era uma fosfolipase A₂ (Lys 49) homóloga às outras PLA₂, constituída por uma única cadeia polipeptídica, com 121 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 13.720 e 7 pontes dissulfeto.

Melo et al. (1993) investigaram o antagonismo dos efeitos miotóxicos do veneno de Bjsu e da BthTX por poliânions (heparina, dextran sulfato e condroitina sulfato). A miotoxicidade foi estudada em camundongos *in vivo* e *in vitro*, pela determinação enzimática de creatinoquinase (CK) liberada, proteína presente nas linhas M de células musculares intactas. Observaram que poliânions formavam complexos ácido-básicos com as miotoxinas básicas presentes em venenos botrópicos, neutralizando, desta forma, sua miotoxicidade.

A habilidade da suramina em antagonizar as atividades miotóxica e paralisante da BthTX-I foi avaliada na junção neuromuscular de camundongo *in vitro*. O antagonismo observado foi atribuído à formação de um complexo ácido-base inativo entre compostos poliônicos e a BthTX-I (De Oliveira et al., 2003).

Utilizando técnicas eletrofisiológicas e um bloqueador pré-sináptico, manganês (Mn²⁺), Oshima-Franco et al. (2004) observaram o aparecimento de potenciais de placa terminal em miniaturas gigante sem alteração do potencial de membrana, apresentando aumento do conteúdo quântico, sugerindo então, uma ação pré-sináptica para a BthTX-I.

Recentemente, Magro et al. (2005) determinaram a estrutura cristal de uma PLA₂ ácida isolada do veneno de Bjsu (BthA-I) quimicamente modificada com brometo de p-bromofenacil (BPB). Os autores sugeriram que a abolição das atividades farmacológicas pelo ligante pode estar relacionada com a mudança estrutural oligomérica.

Murakami et al. (2007) demonstraram, através de experimentos *in vivo*, que o polietilenoglicol (PEG) inibiu mais de 90% dos efeitos miotóxicos da BthTX-I, e a suramina inibiu 60% desses efeitos, sendo considerada uma inibição parcial. Com esses resultados, eles sugeriram a aplicação clínica de ambos no tratamento por acidentes viperídeos.

1.3- Heparina

A heparina foi descoberta acidentalmente, em 1916, por um estudante de medicina, Jay McLean que investigava extratos de tecidos do coração e fígado, buscando substâncias tromboplásticas. Nessas investigações foi encontrado um extrato de tecido hepático, capaz de retardar a coagulação do plasma. A substância responsável por aquele efeito, posteriormente, foi denominada heparina (MacLean, 1959).

O termo heparina (Fig.1) refere-se a uma família de mucopolissacarídeos com cadeias de tamanho variável, tendo o seu peso molecular entre 3.000 a 40.000 daltons. É uma glicosaminoglicana altamente sulfatada com ação anticoagulante que é produzida e armazenada exclusivamente nos grânulos secretores dos mastócitos. E encontrada ao redor de vasos, em órgãos e tecidos ricos nessas células (pulmões, músculos, fígado, sangue). Ao ser liberada pelos grânulos secretores, a heparina é rapidamente fagocitada e destruída por macrófagos. Sob condições normais, a heparina não é detectada no plasma.

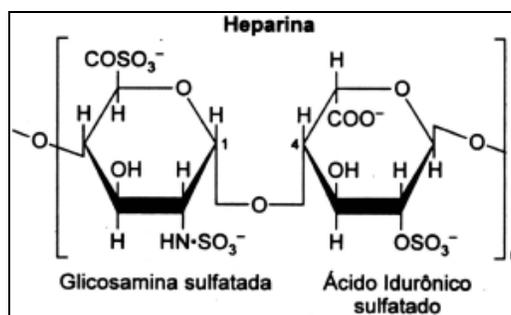


Figura 1- Estrutura química da heparina. Molécula composta de glicosamina sulfatada e ácido idurônico sulfatado.

A heparina não é absorvida pelo trato gastrointestinal, logo sua única via de administração é a parenteral. Sua farmacocinética é complicada, estando condicionada a muitas variáveis, sua meia-vida é dose-dependente. O aumento da dose aumenta desproporcionalmente a duração e intensidade da ação anticoagulante. Isso exige um manejo cuidadoso desta droga e uma monitorização de sua ação. O teste mais utilizado para monitorização e ajuste de tratamento anticoagulante da heparina é o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa).

Resumidamente, o mecanismo de ação da heparina é potencializar a ação da antitrombina III e assim inativar a trombina; prevenir a conversão de fibrinogênio à fibrina e estimular a liberação de lipoproteína lipase, que hidrolisa triglicérides a glicerol e ácidos graxos livres (Leikin e Pauloucek, 1996-97).

Através de uma reação de despolimerização química, obteve-se a heparina de baixo peso molecular (HBPM), tendo seu peso molecular entre 5.000 e 15.000. As HBPM, que têm um comprimento insuficiente para catalisar a inibição da trombina, produzem um efeito anticoagulante, principalmente pela inibição do fator Xá pela antitrombina. Suas vantagens em relação as heparinas não fracionadas são várias, produzindo efeitos mais previsíveis, refletindo sua melhor biodisponibilidade, maior meia vida e seu clearance dose-independente.

Em casos de hemorragias causadas por heparina, que pode colocar em risco a vida do paciente, pode ser revertido rapidamente através da infusão intravenosa de sulfato de protamina. A protamina é um complexo protéico com cargas elétricas positivas. São proteínas básicas, de baixo peso molecular, isoladas do esperma de peixes, especialmente o salmão. É preparada sob a forma de sulfato, que combina ionicamente com heparina para formar um complexo estável, desprovido de atividade anticoagulante. Livre na circulação, não combinada à heparina, exerce um pequeno efeito anticoagulante, independente do efeito da heparina (Chargaff e Olson, 1937).

A utilização de heparina como fator terapêutico nos distúrbios da coagulação provocados por picadas de serpentes é antiga (Ahuya, Veeraraghavan, Menon, 1946) e é muito utilizada em acidentes causados pela serpente africana *Echis carinatus*

(Warrel, Pope, Prentice, 1976; Teng, Ma, Ouyang, 1985; Schaeffer et al., 1986; Seignot et al., 1992). Recentemente foi demonstrado que a heparina pode ser eficaz contra a miotoxicidade de alguns venenos botrópicos (Melo e Suarez-Kurtz, 1988a; Melo e Suarez-Kurtz 1988b; Melo e Ownby, 1999). A heparina e outras glicosaminoglicanas, devido ao seu caráter ácido, formam complexos com miotoxinas fosfolipásicas isoladas de venenos de *B. jararacussu* (Melo et al., 1993) e *B. asper* (Lomonte et al., 1994a; Lomonte et al., 1994b), que possuem caráter básico, neutralizando suas atividades tóxicas quando pré-incubadas *in vitro*.

Rodrigues et al. (2004) estudaram a habilidade da heparina em prevenir o efeito neurotóxico da BthTX-I, que foi investigada por meio da técnica miográfica convencional em duas preparações isoladas: nervo frênico-diafragma de camundongos e biventer cervicis de pintainhos. Observaram que o efeito facilitador dessa substância previamente relatado por Oshima-Franco et al. (2001), apresentou uma resposta ‘tudo ou nada’ em ambas as preparações. A heparina preveniu de modo significativo o bloqueio neuromuscular induzido pela BthTX-I em ambas as preparações.

Gallacci et al. (2006) investigaram a habilidade de uma toxina recombinante (rBthTX-I) em *Escherichia coli*, previamente clonada, e caracterizaram sua atividade biológica em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo. Observaram que a toxina clonada induziu ao bloqueio das respostas musculares indiretas e diretas e promoveu lesão celular mais potente que a bothroptoxina-I nativa. A heparina foi capaz de prevenir os efeitos paralisantes e miotóxicos induzidos pelas toxinas, nativa e recombinante.

Boechat et al. (2001) mostraram que a heparina, em determinada dose, diminui a eficácia do antisoro botrópico na neutralização das atividades hemorrágica e edematogênica do veneno de *B. atrox*. Contudo, a heparina foi capaz de neutralizar a atividade edematogênica do veneno de *B. erythromelas* e aumentar a eficácia do antisoro botrópico e, quando associados heparina e antisoro, mostraram-se mais eficazes na neutralização da atividade letal induzida por este veneno.

O efeito da heparina e do antiveneno polivalente foi estudado em camundongos por Calil-Elias et al. (2002) sobre o dano muscular esquelético produzido pelo veneno de Bjssu. Eles verificaram que a heparina diminuía a atividade proteolítica do veneno,

mas não afetava a atividade fosfolipásica. Entretanto, o antiveneno polivalente antagonizou ambas as atividades. Já a heparina associada ao antiveneno polivalente demonstrou atividade antimiotóxica de acordo com os níveis de CK plasmático observados.

Em trabalho recente, Oshima-Franco et al. (2001) demonstraram que a heparina foi capaz de impedir a atividade neurotóxica induzida pela BthTX-I *in vitro*, mas não foi suficiente para impedir a miotoxicidade, possivelmente pela concentração de heparina utilizada. Com base nesses dados, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito sobre a miotoxicidade induzida por ambos, Bjssu e BthTX-I, ao se utilizar uma baixa concentração de heparina, porém capaz de impedir o bloqueio neuromuscular de Bjssu e BthTX-I.

2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) verificar se a concentração mínima de heparina capaz de prevenir o bloqueio neuromuscular induzido por B_jssu e B_{th}TX-I, é possível de proteger contra a mionecrose, em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo e nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato.
- 2) verificar o papel protetor da heparina contra B_jssu.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

Bjssu, cedido pelo Instituto Butantan. BthTX-I, gentilmente cedida pela profa. Dra. Adélia C. O. Cintra, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP). Heparina - Liquemine® (25000 UI/mL), lote B1019, adquirida do Laboratório Roche; antiveneno botrópico comercial (FUNED – lote 030611-12) gentilmente cedido pelo ERSA do município de Piracicaba; Protamina 1000 ® adquirada do Laboratório Roche (lote 701811 151) e para medida da atividade enzimática, kit de CK-NAC BIOCLIN (Quibasa Química Básica Ltda – lote 099).

3.2- Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando de 25 a 30 g, e ratos machos da linhagem Wistar, pesando de 300 a 400 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp. 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 horas sem luz). O projeto foi submetido e aprovado sob o protocolo nº 792-1 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp.

3.3- Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (NFD)

Camundongos foram anestesiados por via inalatória com halotano e posteriormente exsanguinados. Após a dissecação para a retirada dos hemidiafragmas esquerdo e direito e isolamento dos nervos frênicos correspondentes (Bülbring, 1946), as preparações foram fixadas em cubas com capacidade de 5 mL e banhadas em solução nutritiva de Tyrode com abastecimento de carbogênio (mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂; pH 7,5) e mantidos à temperatura constante (37°C). O músculo diafragma é mantido, por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina que se mantém em contato com a superfície da solução nutritiva. O transdutor isométrico (BG-50 gramas) ficou acoplado a um fisiógrafo (Gould RS 3400). A

preparação, então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico (estimulador Grass S48), usando-se estímulos supraximais e frequência de 0,1 Hz com duração de 0,2 ms. Após o registro em condições-controle e a verificação do perfeito estado da preparação, foram realizados os seguintes protocolos: em todos os experimentos foram utilizadas concentrações de 40 µg/mL do veneno total de Bjssu e 2,9 µM de BthTX-I, por apresentarem bloqueio neuromuscular de 50% similar aos resultados obtidos em estudos anteriores. A escolha destas doses foi através de experimentos realizados anteriormente.

Realizaram-se experimentos-controles com solução nutritiva de Tyrode, heparina e antiveneno botrópico.

3.3.1- Neutralização da atividade bloqueadora neuromuscular induzida pelo veneno de Bjssu e BthTX-I

Em todos os experimentos, as concentrações empregadas de Bjssu:heparina, BthTX-I:heparina foram 40:1, enquanto Bjssu:AVB, BthTX-I:AVB foram 1:3.

Misturas veneno-heparina, veneno-AVB, toxina-heparina e toxina-AVB foram pré-incubados a 37° C, por 30 minutos e, posteriormente adicionados à preparação, para determinar a capacidade neutralizante da heparina e do antiveneno botrópico. A escolha desta proporção foi baseada em ensaios preliminares com o antiveneno, que se mostrou efetiva em conter o efeito bloqueador induzido pelo veneno e pela toxina.

3.3.2- Neutralização do efeito protetor de heparina por protamina

Foram utilizadas as mesmas concentrações da mistura veneno:heparina que demonstra proteção por parte da heparina contra a ação do veneno, que foram pré-incubados por 30 min a 37° C. Após 15 min de incubação, adicionou-se protamina 4 µL/mL (0,8 UI/mL), equivalente a uma proporção heparina:protamina de 1:4.

3.3.3- Adição de heparina e antiveneno em diferentes tempos

Foram utilizadas as mesmas concentrações de Bjsu (40 µg/mL), heparina (5 UI/mL) e antiveneno (120 µL/mL), que foram adicionados em diferentes tempos durante os 120 minutos do experimento. No primeiro protocolo, foi realizado um pré-tratamento com heparina ou antiveneno, por 15 minutos e, em seguida adicionado o veneno. No segundo protocolo, foi a adição de heparina após 50% de bloqueio da resposta contrátil induzido pelo veneno, e, no terceiro e último protocolo, a adição de heparina “plus” (mistura de heparina e antiveneno), junto com o veneno.

3.4- Atividade miotóxica

Um novo grupo de animais foi utilizado para analisar o CK plasmático. Foram injetados as mesmas concentrações de veneno, toxina, veneno:heparina, toxina:heparina, veneno:antiveneno e toxina:antiveneno, no músculo gastrocnêmio de camundongos. Após duas horas da injeção, coletaram-se amostras de sangue em capilares heparinizados, que foram centrifugados. A atividade do CK plasmático foi analisada através do método enzimático de creatinoquinase, utilizando-se o kit de CK-NAC BIOCLIN (Quibasa Química Básica Ltda - lote 099).

Os resultados de CK foram expressos em U/L. Uma unidade de CK corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 25°C.

3.5- Preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE)

Ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal) e submetidos à cirurgia. Após a dissecação e secção do tendão do músculo tibial anterior e do nervo ciático-poplíteo externo foi realizada a trepanação da tíbia para a fixação do membro a uma base de cortiça. O tendão do músculo ficou conectado a um transdutor isométrico (BF 50 gramas) e este ao fisiógrafo (Gould 3400). O coto distal do nervo ciático-poplíteo externo foi estimulado (estimulador Grass 48), utilizando-se estímulos

supraximais de 0,2 ms de duração e frequência de 0,5 Hz. Após o registro em condições-controle e a verificação do perfeito estado da preparação, foram injetadas, no músculo tibial da coxa esquerda do animal, as mesmas proporções da concentração de veneno, toxina e suas neutralizações utilizadas *in vitro*. Ao final destes períodos, as preparações foram fixadas em solução de Bouin e reservadas para o processamento histológico.

3.6- Análise Morfológica

Ao final dos experimentos, após a exposição a diversos tratamentos, por 120 minutos, as preparações de NFD de camundongo e NPE de rato, foram retiradas e fixadas em solução Bouin, por 24 horas. Para este procedimento foi utilizado n=3 para cada protocolo e a fixação foi seguida pela desidratação e inclusão em historesina. A confecção das lâminas histológicas foi seguida pela obtenção de secções de 2 µm de cada experimento, através do micrótomo, em seguida, montadas e coradas com hematoxilina:eosina (H.E.) para observação em microscópio óptico. Após análise quantitativa do material histológico (análise obtida por três 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- Análise estatística

Cada experimento foi repetido de três a oito vezes e os resultados foram expressos pela média ± erro padrão. Para análise estatística foram usados os testes ANOVA, para medidas repetidas, e Tukey, para comparação múltipla entre os grupos e o valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

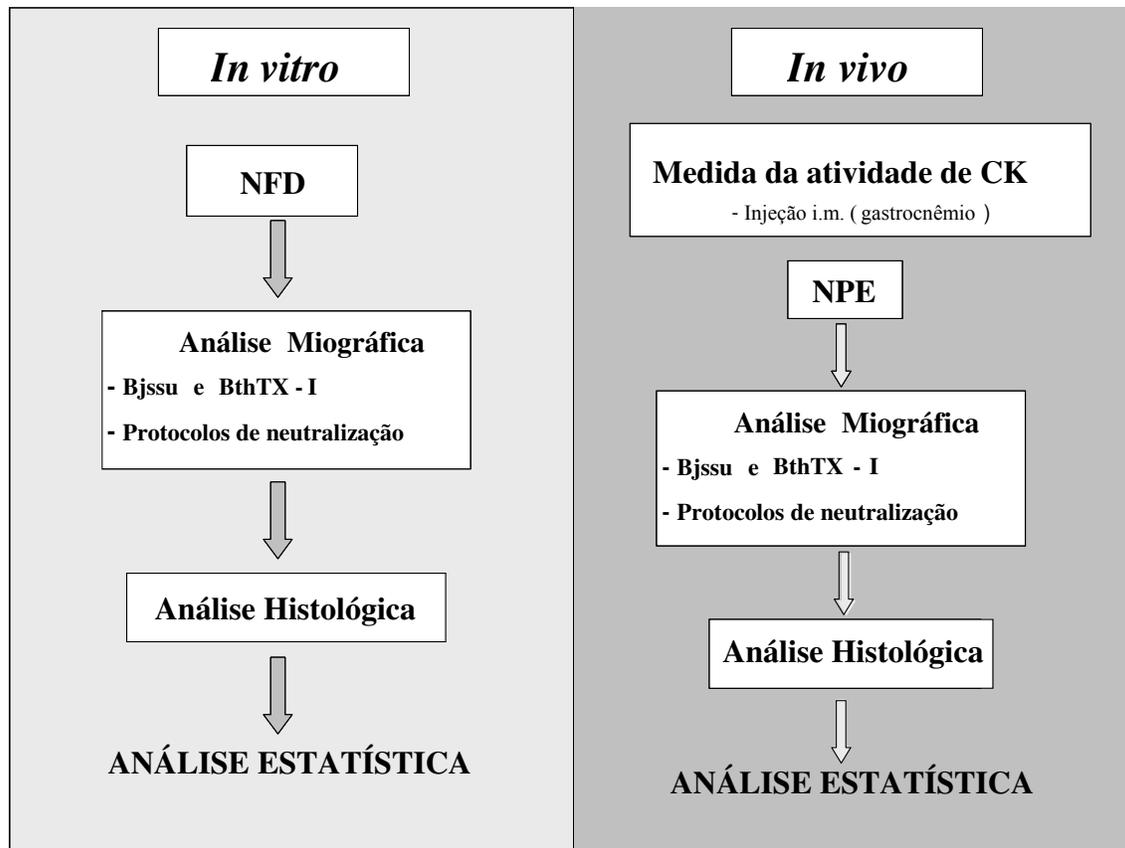


Figura 2- Delineamento dos protocolos experimentais.

4- RESULTADOS

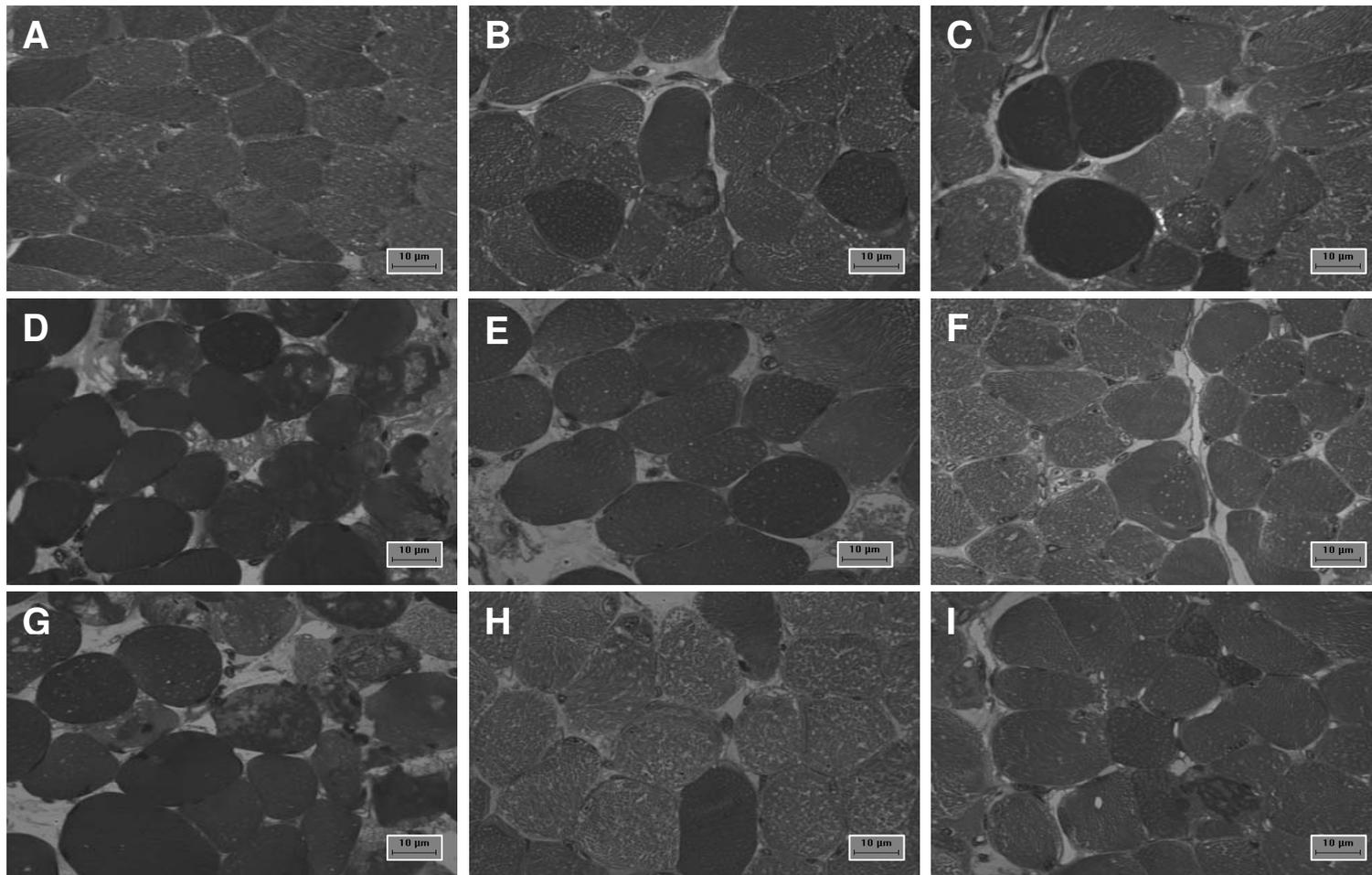


Figura 6- Fotos representativas de cortes de músculo diafragma de camundongo sob estimulação elétrica do nervo frênico durante 120min. (A) Controle Tyrode, (B) Heparina 5UI/mL, (C) Antiveneno botrópico comercial 120µL/mL, (D) Bjssu 40µg/mL e (G) BthTX-I 2,9µM. Protocolos de neutralização (E) Bjssu:heparina, (F) Bjssu:antiveneno, (H) BthTX-I:heparina e (I) BthTX-I:antiveneno. Note a proteção da heparina e antiveneno contra a miotoxicidade induzida pelo veneno de Bjssu e pela BthTX-I

4.1- Atividade neuromuscular de preparações nervo frênico diafragma de camundongos (NFD) submetidas aos controles

A Fig. 3 mostra o controle Tyrode, bem como as preparações tratadas com a heparina e antiveneno. Note que as preparações tratadas com antiveneno comercial 120 μ L/mL, exibiram efeito facilitador (aumento da amplitude da resposta contrátil), significativamente diferente do controle Tyrode ($P < 0,05$).

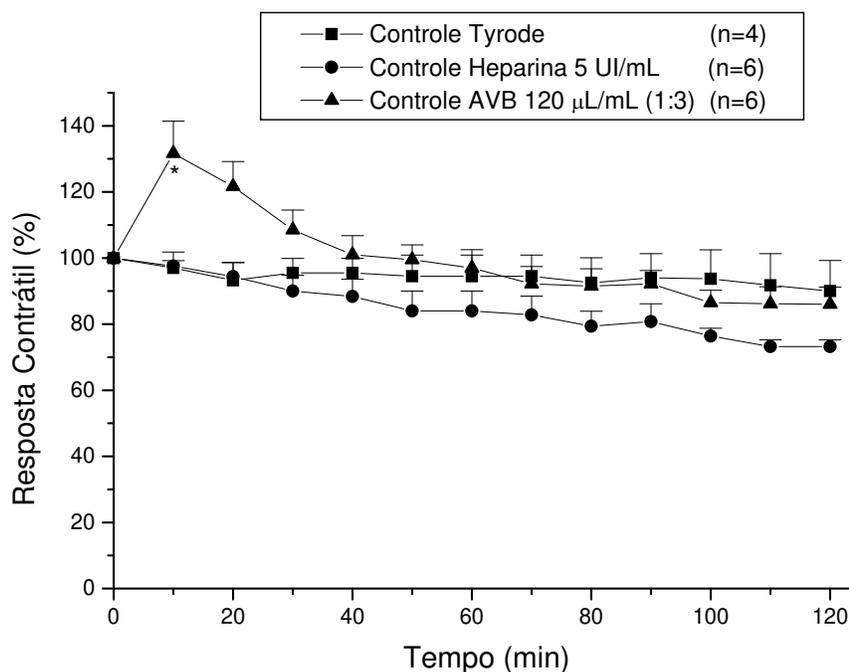


Figura 3- Curvas da resposta contrátil de controles em preparações NFD de camundongos (estímulo indireto). As preparações foram expostas à solução de Tyrode, heparina e antiveneno botrópico. $*P < 0,05$, comparado com o controle Tyrode. Os pontos representam a média \pm o erro-padrão do número de experimentos indicado nos parênteses.

4.1.2- Neutralização do efeito bloqueador neuromuscular de Bjssu pela heparina e antiveneno botrópico

O veneno de Bjssu (40 μ g/mL) produziu 50% de bloqueio neuromuscular em um intervalo de tempo de $41,5 \pm 2,6$ min (n=6), ideal para se estudar a capacidade neutralizante da heparina e do antiveneno.

Os ensaios de neutralização mostraram que o efeito neurotóxico induzido pelo veneno foi claro e significativamente antagonizado pelo tratamento com a heparina (5UI/mL) e pelo antiveneno botrópico (120 μ L/mL-1:3) (Fig. 4). A mistura veneno:heparina e veneno:antiveneno produziu uma proteção ao final de 120 min de experimento em: $79,6 \pm 5,9$ min (n=6) e $68,3 \pm 6,2$ min (n=6), respectivamente.

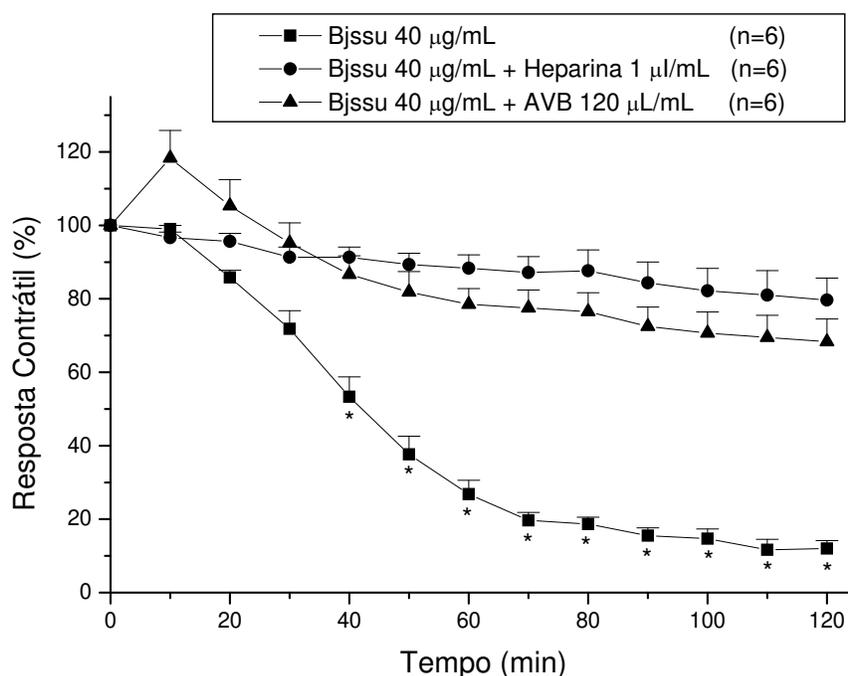


Figura 4- Curvas da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo (estímulo indireto) a 37° C (0,1Hz; 2ms). As preparações foram expostas a misturas de veneno com heparina e antiveneno botrópico. Note a neutralização da ação neuromuscular observado após o tratamento com a heparina e antiveneno. Os pontos representam a média \pm o erro-padrão do número de experimentos indicados nos parênteses, sendo $*P < 0,05$, em relação aos controles Tyrode, heparina e antiveneno.

4.1.3- Neutralização dos efeitos neurotóxicos induzidos pela BthTX-I por heparina e antiveneno botrópico

A BthTX-I (2,9 μ M) produziu 50% de bloqueio neuromuscular em um intervalo de tempo de $21,4 \pm 2,1$ min (n=8), um nível de bloqueio ideal para se estudar a capacidade neutralizante da heparina e do antiveneno.

Os ensaios de neutralização mostraram que o efeito neurotóxico induzido pela toxina foi clara e significativamente antagonizado pelo tratamento com a heparina (5UI/mL) ou antiveneno botrópico (120 μ L/mL - 1:3) (Fig. 5). A mistura toxina:heparina e toxina:antiveneno produziu uma proteção ao final de 120min de experimento de: $78,8 \pm 6,8$ min (n=8) e $62,3 \pm 6,1$ min (n=6), respectivamente.

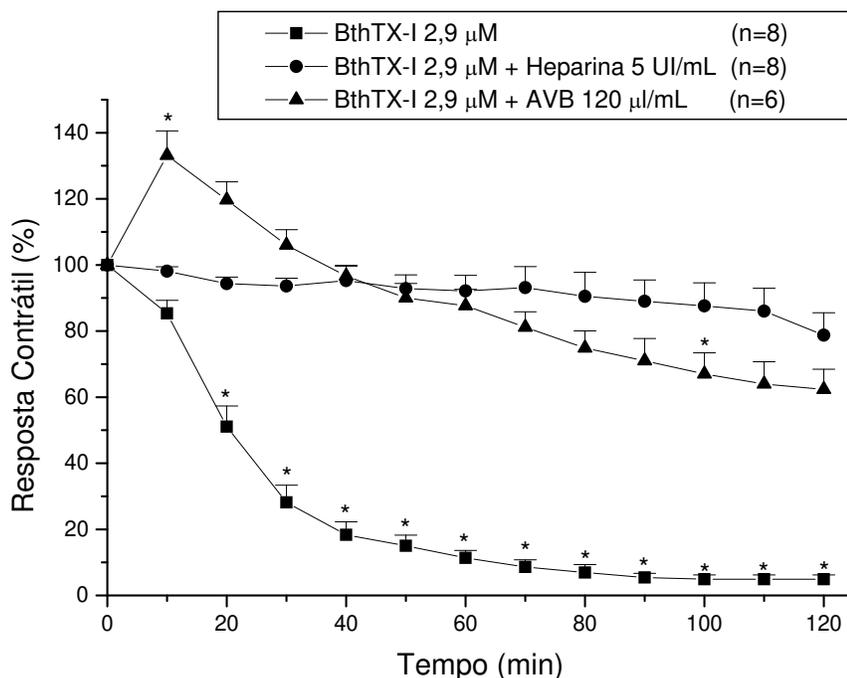


Figura 5- Curvas da resposta contrátil em preparações NFD de camundongo sob estímulo indireto (0,1Hz; 2 ms). As preparações foram expostas a misturas da BthTX-I com heparina e antiveneno botrópico. Note a neutralização da ação neuromuscular da toxina obtida após com a heparina e o antiveneno. Os pontos representam a média \pm o erro-padrão do número de experimentos indicados nos parênteses, sendo $*P < 0,05$, em relação aos controles Tyrode, heparina e antiveneno.

4.1.4- Análise morfológica de músculos diafragma de camundongo incubados com veneno de Bjsu e BthTX-I e suas neutralizações

A Fig. 6 mostra secções transversais da preparação NFD após 120min de incubação sob estimulação elétrica indireta. A preparação controle incubada somente com a solução de Tyrode mostrou poucas fibras alteradas, enquanto a maioria manteve aparência normal (Fig. 6A). Seguindo o tratamento com heparina e antiveneno, algumas fibras musculares mantiveram aparência normal, como o controle com solução de Tyrode, apenas com a presença de algumas células edemaciadas (Fig. 6B e C). Não houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle Tyrode. O veneno de Bjsu e a BthTX-I produziram lesões nas fibras musculares com mionecrose, escurecimento e desintegração parcial (Fig. 6D e G), apresentando diferença significativa em relação aos controles ($*P<0,05$). Para os ensaios de neutralização, utilizando heparina e AVB, ambos mostraram proteção contra a miotoxicidade induzida pelo veneno e toxina. Neste caso, a porcentagem de fibras com lesões não tiveram diferença significativa em relação aos controles Tyrode, heparina e AVB. Os índices das alterações morfológicas estão representados na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre a proteção oferecida pela heparina e antiveneno ($P<0,05$).

Tabela 1- Índice de alterações morfológicas na preparação NFD

Protocolos	Alterações (%)
Tyrode	8
Heparina	7
AVB	7
Bjssu	27*
BthTX-I	40*
Bjssu:Hep	5**
Bjssu:AVB	11**
BthTX-I:Hep	9**
BthTX-I:AVB	3**

(*Apresentam diferença significativa em relação ao controle Tyrode);

(**Apresentam diferença significativa em relação ao veneno ou toxina)

4.2- Neutralização do efeito protetor de heparina por protamina

A Fig. 7 mostra a neutralização do complexo veneno:heparina pela protamina. Quando se adicionou protamina 4 μ L/mL (0,8UI) ao banho, ela mostrou-se eficiente em anular a formação do complexo veneno:heparina e de exibir ao bloqueio da resposta contrátil provocado pelo veneno de Bjssu, tendo exibido 50% de bloqueio em 49,5 \pm 2,8min, o que representou um valor próximo ao do bloqueio observado pelo veneno na ausência de heparina (41,5 \pm 2,6min).

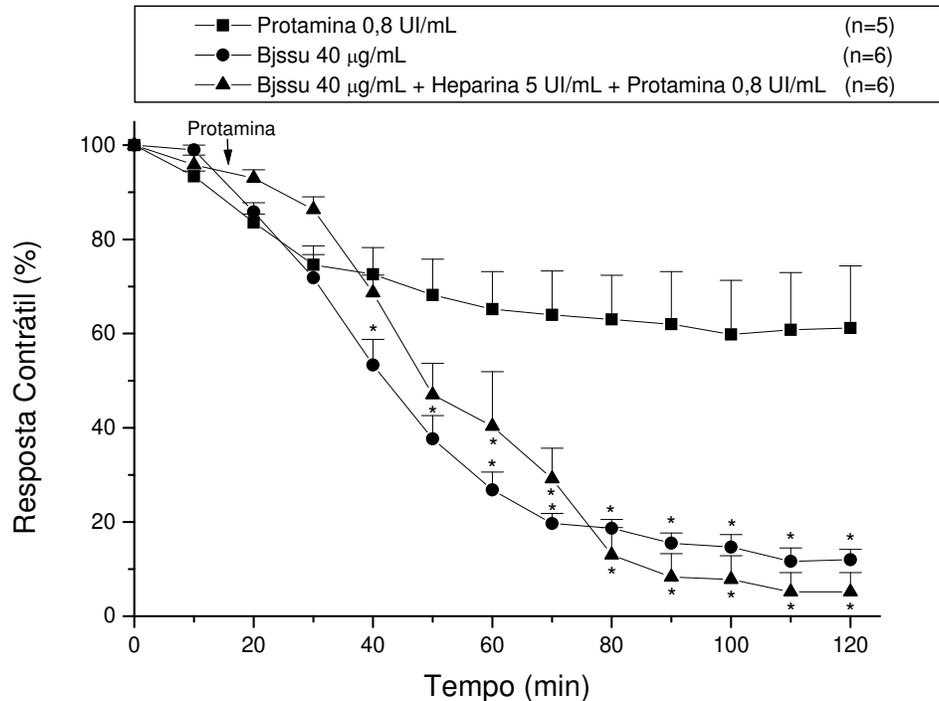


Figura 7- Curva da resposta contrátil em preparação NFD sob estimulação indireta, tratada com protamina e sua ação neutralizante sobre o complexo veneno:heparina. Note que o veneno de Bjssu, supostamente livre no banho, induziu o seu característico bloqueio da resposta contrátil, resultado similar ao veneno sozinho. Os pontos representam a média \pm erro-padrão do número de experimentos indicados nos parênteses.

4.3- Resposta contrátil de preparação NFD de camundongo tratado com veneno de Bjssu e adição de heparina e/ou antiveneno em diferentes tempos

O pré-tratamento com heparina ou antiveneno, por 15 minutos antes da adição do veneno, como mostra a Fig. 8A e B, resultou ao final de 120 minutos de experimento, numa resposta contrátil de $92 \pm 1,9\%$ (n=3) e $81 \pm 6\%$ (n=3), respectivamente. No segundo modelo, a adição de heparina após 50% de bloqueio induzido pelo veneno (Fig. 8C), obteve-se uma resposta neuromuscular de $40 \pm 6\%$ (n=4). Para heparina “plus” (Fig. 8D), manteve-se uma resposta contrátil de 84 ± 10 (n=3), contra a ação do veneno.

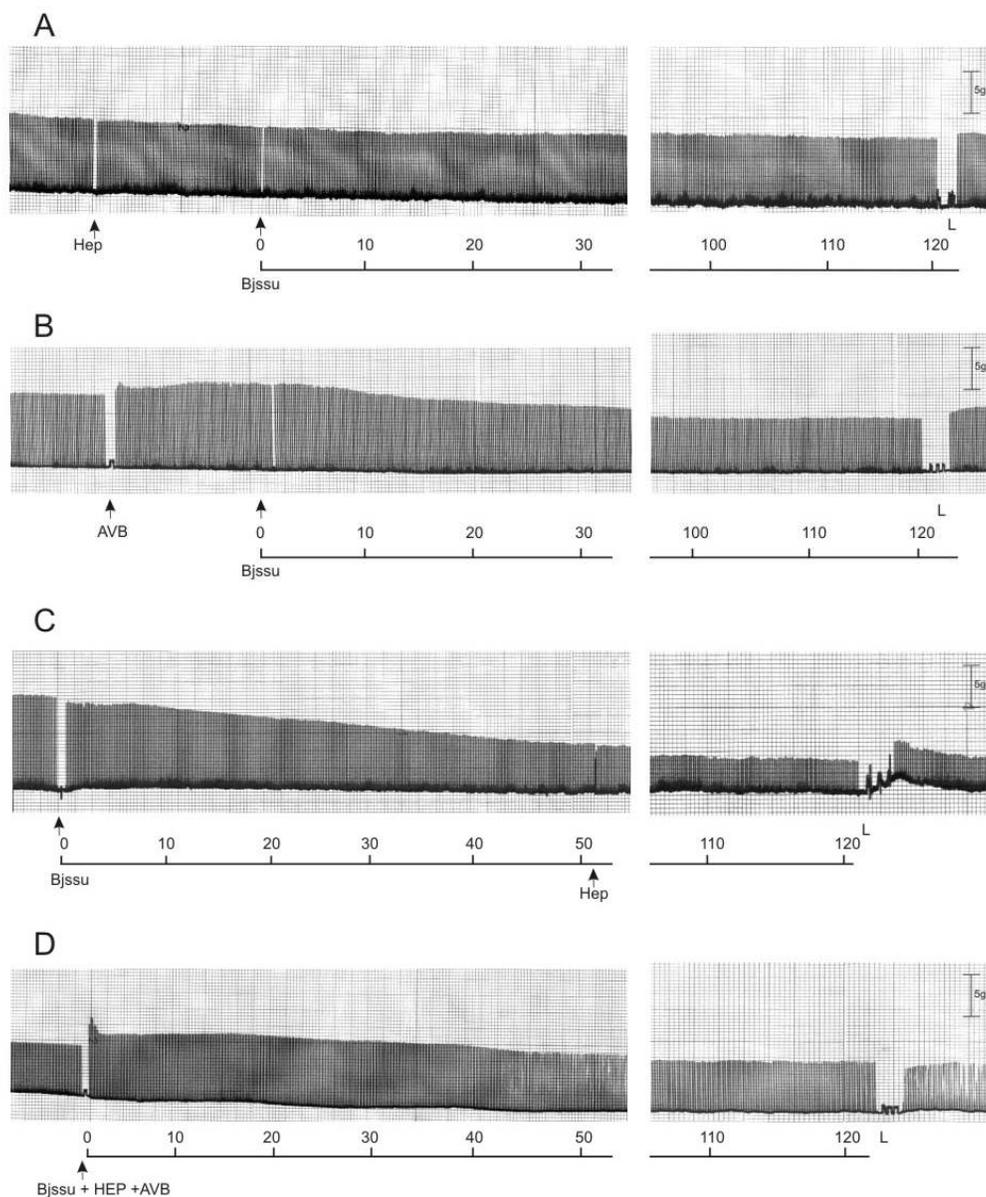


Figura 8- Registro da resposta contrátil da preparação NFD de camundongo com a adição de heparina em diferentes tempos. (A) Pré-tratamento com heparina (5UI/mL) por 15' antes da adição do veneno (40 μ g/mL) (B) Pré-tratamento com AVB (120 μ L/mL) por 15' e adição do veneno (C) Adição do veneno e após 50% de bloqueio foi adicionado heparina (D) Adição da mistura Bjssu:HEP:AVB incubados por 120min. Note que em A, B e D a heparina mostrou efeito protetor contra a ação de Bjssu similar ao antiveneno. Contudo, em D, quando a ação tóxica de Bjssu é deflagrada e heparina é adicionada tardiamente, sua eficácia é diminuída.

4.4- Atividade miotóxica

A Fig. 9 representa os resultados da atividade miotóxica medida através da dosagem de creatinoquinase (CK) após duas horas da injeção intramuscular. Houve liberação do CK plasmático (U/L) em resposta a injeção de Bjssu e de BthTX-I em 1454 ± 185 (n=6) e 1531 ± 166 (n=5), respectivamente. Os animais que receberam as misturas veneno:heparina e veneno:AVB, apresentaram uma diminuição significativa da liberação de CK plasmático, sendo 236 ± 40 (n=6) e 47 ± 5 (n=6), respectivamente. Nos protocolos de neutralização com a toxina, tanto a heparina como o antiveneno mostraram proteção parcial significativa, sendo 900 ± 149 (n=5) e 935 ± 135 (n=5), respectivamente.

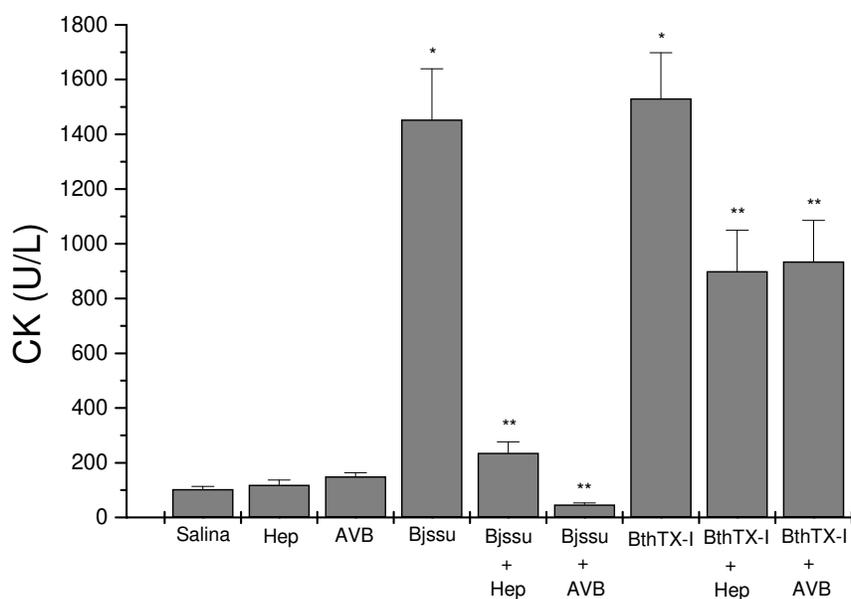


Figura 9- Efeitos do tratamento de neutralização da atividade enzimática de creatinoquinase (CK) com heparina e AVB. A atividade da enzima creatinoquinase foi medida após duas horas da injeção do veneno e da toxina. (*apresentam diferença significativa em relação ao controle salina; **apresentam diferença significativa em relação ao veneno e toxina). Os valores estão representados pela média \pm erro padrão dos experimentos (n=5) (* $P < 0,05$).

4.5- Resposta da atividade neuromuscular de preparações NPE submetida ao tratamento com veneno, toxina e suas neutralizações

A Fig. 10A mostra os controles salina e heparina, que mantêm uma estabilidade nas respostas contráteis na preparação NPE de rato. Foram utilizados os mesmos protocolos do estudo *in vitro*. A Fig. 10B mostra as preparações que receberam tratamento de Bjsu (40µg/mL) e BthTX-I (2,9µM) e os protocolos de neutralização com heparina (40:1). Os animais que receberam a injeção de Bjsu e BthTX-I apresentaram uma diminuição significativa da resposta contrátil a partir de 80min e 10min, respectivamente, permanecendo até o final do experimento, 120min. Quanto à BthTX-I, mostrou-se significativa devido a uma contratatura induzida pela toxina, retornando a uma resposta contrátil similar ao controle salina. Nos protocolos de neutralização, a heparina foi suficiente para neutralizar a diminuição da resposta contrátil do veneno após os 30min, o qual permaneceu até o final do experimento. Nos protocolos com BthTX-I, a heparina induziu proteção nos primeiros 30min, e após esse período houve um retorno da resposta contrátil similar ao controle-salina.

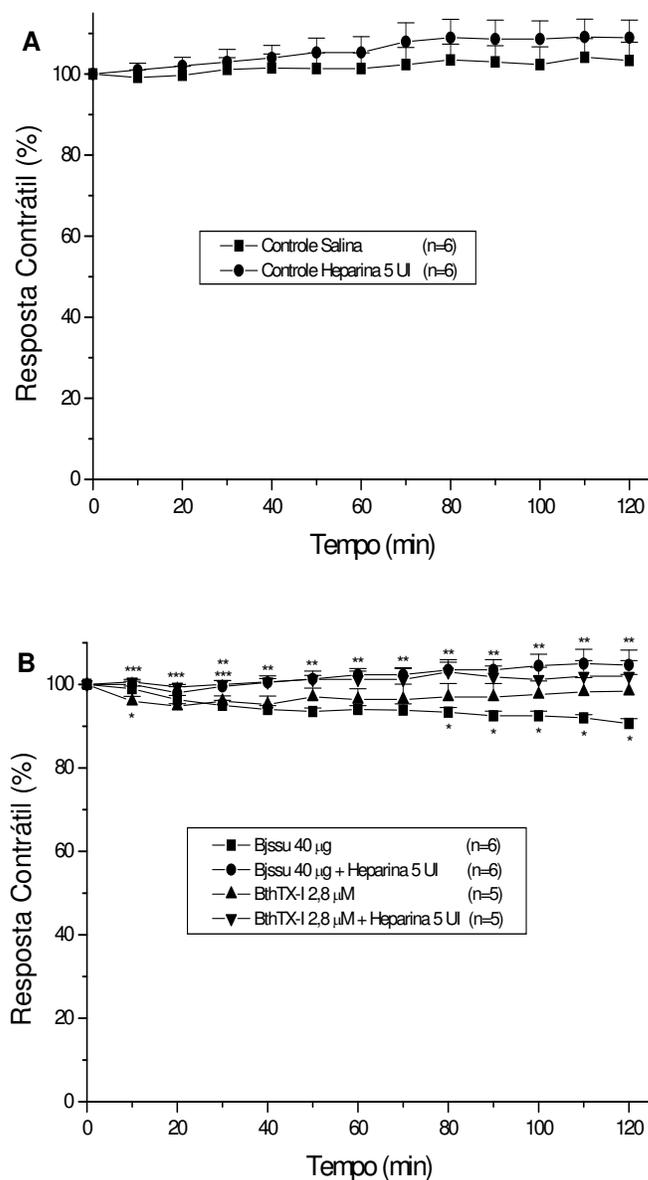


Figura 10- Representação gráfica da resposta contrátil da preparação nervo ciático poplíteo externo-músculo tibial anterior de rato (NPE) sob estímulo indireto. (A) Resposta contrátil dos controles-salina e heparina, em preparações NPE sob estímulo indireto. (B) Ação neuromuscular do veneno de Bjssu, BthTX-I e seus respectivos tratamentos com heparina. Os pontos representam a média \pm erro padrão do número de experimentos indicado nos parênteses (* $P < 0,05$ comparado com o controle salina, **diferença significativa com o veneno, ***diferença significativa com a toxina).

4.6- Análise morfológica do músculo tibial de rato tratado com veneno de Bjssu, BthTX-I e os tratamentos com heparina

A Fig. 11 mostra o histograma de secções transversais da preparação NPE de rato após 120 min de incubação sob estimulação elétrica indireta. A concentração de 40 μ g de Bjssu e 2,9 μ M de BthTX-I, induziram uma lesão no músculo tibial em 12,5 % e 8 %, respectivamente. Nos protocolos de neutralização, a mistura de Bjssu:heparina não apresentou alterações características induzidas pelo veneno, e a mistura de BthTX-I:heparina apresentou 3 % de alterações no músculo tibial, sendo diferente significativamente quando comparado à toxina ($P<0,05$).

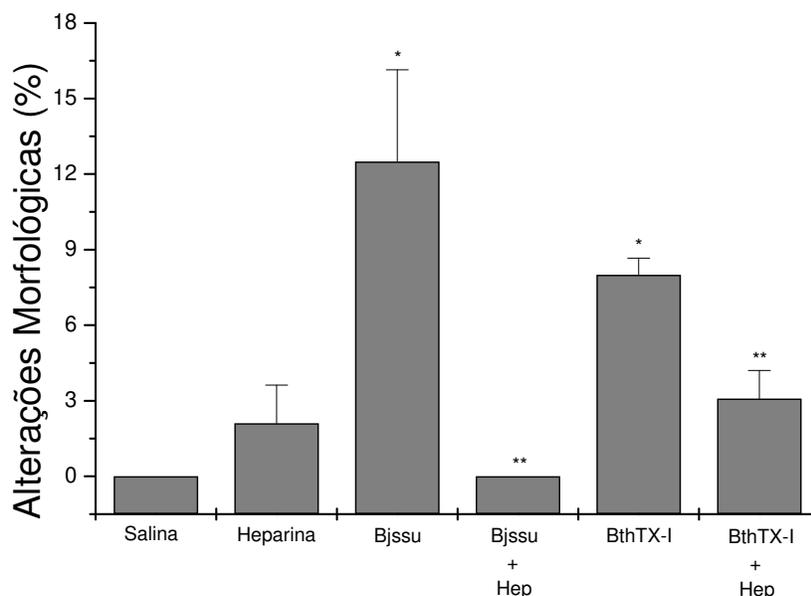


Figura 11- Aspecto morfológico da preparação NPE de rato, sob estimulação elétrica indireta e após 120min de incubação com os controles-salina e heparina (1 μ L), Bjssu 40 μ g e sua neutralização Bjssu:heparina (40:1), BthTX-I 2,9 μ M e sua neutralização BthTX-I:heparina. Note que a heparina ofereceu proteção ao músculo quando pré-incubado juntamente com o veneno e toxina (* $P<0,05$ comparado com o controle-salina, **diferença significativa com o veneno e toxina).

5- DISCUSSÃO

Envenenamentos causados por *B. jararacussu* freqüentemente produzem efeitos local e sistêmico (Milani Junior et al., 1997). Estes efeitos são induzidos por uma variedade de componentes do veneno, tais como fosfolipases A_2 miotóxicas e metaloproteinases, entre outros (Gutiérrez e Rucavado, 2000). O veneno de *B. jararacussu* não é um potente bloqueador neuromuscular *in vivo*, é menos ativo *in vitro* que as peçonhas verdadeiramente neurotóxicas, contendo α e β neurotoxinas clássicas, que provocam bloqueio neuromuscular com concentrações menores que $5\mu\text{g/mL}$ (Rodrigues et al., 2004). No entanto, causa importante bloqueio neuromuscular em preparações isoladas de camundongo (Heluany et al., 1992). Estes efeitos são reproduzidos pela BthTX-I, que compõe aproximadamente 15% do veneno total (Homs-Brandeburgo et al., 1988). A BthTX-I reproduz os efeitos neurotóxicos e miotóxicos do veneno em preparações NFD de camundongo, indicando que esta toxina contribui substancialmente para estes efeitos do veneno (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Homs-Brandeburgo et al., 1988; Oshima-Franco et al., 2000).

Neste estudo, investigou-se a habilidade da heparina em baixa concentração ($1\mu\text{L/mL}$) e do antiveneno botrópico comercial (proporção veneno:antiveneno de 1:3), contra os efeitos neurotóxicos e miotóxicos do veneno de Bjsu e da sua principal miotoxina, a BthTX-I, em preparações neuromusculares.

O antiveneno botrópico é produzido a partir de uma mistura de sete espécies de venenos do gênero *Bothrops*: *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* (Dos-Santos et al., 1992). O antiveneno neutralizou tanto o bloqueio neuromuscular, como a mionecrose causados pelo veneno e toxina, evidenciando a ligação de anticorpo ao mesmo sítio responsável pelas atividades neurotóxicas e miotóxicas. Neste trabalho, a adição de antiveneno ($120\mu\text{L/mL}$) produziu um efeito facilitatório corroborando com os achados de Oshima-Franco et al. (2001). Tal efeito não foi afetado por incubações e misturas veneno:antiveneno ou toxina:antiveneno, a 37°C por 30min, demonstrando ser um fenômeno exclusivo do antiveneno que envolve a sua produção, pela presença de substâncias termoestáveis ou excesso de proteína não específica (Oshima-Franco et al., 2001).

Quanto ao efeito protetor da heparina, uma glicosaminoglicana sulfatada, o complexo que se forma é do tipo ácido-básico, pela natureza ácida da heparina com a básica de miotoxinas de venenos botrópicos (Melo e Suarez-Kurtz, 1988a; Melo e Suarez-Kurtz, 1988b; Melo et al., 1993; Lomonte et al., 1994a; Lomonte et al., 1994b). Devido a sua natureza polianiónica, a heparina pode se ligar a sítios catiónicos de muitas moléculas, por exemplo, as proteínas da matriz extracelular (fibronectina, laminina, vitronectina) (Lane e Adams, 1993; Lomonte et al., 1994a; Lomonte et al., 1994b; Melo e Suarez-Kurtz, 1988a; Melo e Suarez-Kurtz, 1988b). A heparina pode interagir com PLA₂ presente em muitos venenos de serpentes, afetando (Diccianni et al., 1990) ou não (Condreas e De Vries, 1964), a atividade enzimática dessas proteínas.

Resultados obtidos por Bugs, Bortoleto-Bugs e Cornélio (2005) mostraram que a heparina se liga a algum resíduo básico na superfície da proteína. A atração eletrostática entre cargas positivas das proteínas e cargas negativas da heparina levaria à formação de um complexo heparina-proteína.

Lomonte et al. (1994b; Lomonte et al., 2003), mostraram que a heparina se liga à região C-terminal de diversas PLA₂ Lys 49 e Gallacci et al. (2006), sugeriram que a região C-terminal estivesse envolvida em ambas atividades, miotóxicas e paralisante de BthTX-I.

Uma associação de heparina com antiveneno polivalente foi estudada no tratamento do envenenamento por venenos botrópicos (Boechat et al., 2001) especificamente contra a atividade edematogênica do veneno de *B. erythromelas*. Além da associação de heparina com antiveneno polivalente, Melo et al. (1993), descreveram a necessidade da pré-incubação da heparina com o veneno para a formação do complexo ácido-básico, no entanto, resultados opostos demonstraram não haver tal necessidade. Nos diferentes protocolos a seguir, foi realizado pré-tratamento por 15 minutos com heparina ou antiveneno e em seguida adicionado o veneno. Em outro protocolo, foi testada a adição de heparina após 50% de bloqueio induzido pelo veneno sozinho, e quando foi realizada uma associação de heparina com o antiveneno botrópico, os resultados mostraram que a adição de heparina foi eficiente na formação do complexo veneno:heparina, mesmo quando foram usadas diferentes tempos de incubação.

Da análise histológica, estes resultados mostraram que a heparina, mesmo em baixa concentração, e o antiveneno, foram eficazes em proteger a preparação contra a miotoxicidade induzida por Bjssu e BthTX-I, evidenciando mais uma vez a capacidade antimiotóxica da baixa concentração de heparina.

Baseado nesses dados, as atividades neurotóxicas e miotóxicas induzidas pelo veneno e toxina, resultam das suas capacidades de alterar a integridade da membrana celular. Um influxo de cálcio seguido da desestabilização da membrana poderia ser responsável por uma variedade de mecanismos degenerativos das células tais como hipercontração dos miofilamentos, alteração mitocondrial, e a ativação de proteases cálcio-dependentes e fosfolipases, que amplificam o processo de dano muscular (Gutiérrez e Ownby, 2003). Gallacci et al. (2006) sugerem que a despolarização da célula muscular, uma consequência do rompimento da membrana, poderia conduzir à paralisia do músculo.

Como descrito em literatura, a heparina forma complexo ácido-básico com as proteínas do veneno, inibindo a sua atividade neurotóxica. Desse modo, foi testado o efeito da adição de protamina no banho contendo a mistura Bjssu:heparina após 15 minutos da adição da mesma. A protamina é o antídoto específico para a neutralização do efeito anticoagulante da heparina. Possui natureza policatiônica e é fortemente alcalina (Ando, Yamasaki e Suzuki, 1973), capaz de formar complexo inativo com a heparina, inibindo então, a sua atividade anticoagulante (Majerus et al., 1991). Com base nesses dados, pode-se sugerir que a formação do complexo entre as proteínas do veneno de Bjssu e heparina é reversível, uma vez que a protamina antagonizou a sua atividade.

As medidas da atividade enzimática de creatinoquinase mostraram que o veneno e a toxina induziram uma lesão com aumento da atividade de CK plasmático. Sabe-se que o aumento da atividade de CK no plasma induzido pelo veneno de Bjssu tem seus valores máximos em duas horas após a injeção do veneno e uma diminuição progressiva nas 22 horas seguintes, quando retorna aos níveis basais (Melo e Suarez-Kurtz, 1988b). A creatinoquinase é a enzima que apresenta maior concentração no tecido muscular, e apresenta alta frequência de alterações (Plebani, 2001) em diversas disfunções musculares. Os dados mostram que a heparina e o antiveneno foram mais eficazes em

oferecer proteção contra Bjsu, e uma proteção parcial contra a BthTX-I. O modo de ação das PLA₂ Lys-49 e Asp-49 no músculo ocorrem por vias diferentes, mas no geral podem causar lise rápido do sarcolema (membrana plasmática) e um rápido estado de mionecrose (Fletcher et al., 1996), portanto, outros constituintes no veneno podem agir indiretamente.

Nos resultados obtidos no estudo da ação do veneno de Bjsu (40µg), utilizando a preparação neuromuscular de nervo ciático poplíteo-externo e músculo tibial anterior de rato (*in vivo*), pequenas alterações foram observadas e mostraram-se significativas em determinados tempos, diferentemente das preparações *in vitro*, que induzem bloqueio total da resposta neuromuscular ao final de 120min quando essas concentrações de veneno e toxina são utilizadas. Essas diferenças são consideradas como decorrentes de modelos experimentais diferentes. Na preparação *in vivo*, pode haver uma reação do organismo do animal que tem condições de usar mecanismos de defesa para neutralizar agressões ao seu organismo, enquanto no modelo *in vitro*, a interação se dá apenas entre o veneno e o músculo isolado.

A análise morfológica deste estudo (*in vivo*), o veneno de Bjsu (40µg) e a BthTX-I (2,9µM) causaram alterações morfológicas que não afetaram a função neuromuscular. Quando o veneno e toxina foram incubadas com heparina (5UI) essas alterações histológicas não foram observadas, mostrando a sua eficiência da heparina em formar o complexo ácido-básico e neutralizar as ações do veneno e da toxina. Sugere-se que neutralização por heparina utilizando concentrações maiores do que 40µg devam ser testadas.

Venenos botrópicos contêm numerosos componentes que poderiam afetar potencialmente as respostas neuromusculares, incluindo (metalo) proteinases (Gutiérrez e Rucavado, 2000) e miotoxina (Gutiérrez e Lomonte, 1995). Proteinases formam uma grande e diversa família de enzimas. Estas e também as glicosaminoglicanas pertencem a dois grupos de macromoléculas, que incluem lipídios e ácidos nucleicos. Metaloproteinases degradam os componentes da matriz extracelular e prejudicam a regeneração do músculo esquelético afetado. Grande número de proteínas no tecido animal ocorre imobilizado no espaço extracelular, na superfície celular ou na matriz extracelular. Algumas são ancoradas através de interações com outras proteínas.

Portanto, pesquisa recente implica aumento de proteoglicanas com estruturas de andaime, designado para acomodar proteínas por ligações não covalentes na superfície da cadeia de glicosaminoglicanas (Tersariol et al., 2002).

Heparan sulfato e heparina são particularmente importantes entre as glicosaminoglicanas em suas habilidades de se ligar a um grande número de proteínas diferentes. Heparina participa de um papel complexo na matriz extracelular, regulando uma ampla variedade de processos biológicos, incluindo hemostasia, inflamação, angiogênese, adesão celular, entre outros (Conrad, 1998). Portanto, nos modelos experimentais estudados, a heparina juntamente com a matriz extracelular mostram-se capazes de proteger as células de danos provenientes de *Bjssu* e *BthTX-I*, oferecendo uma proteção similar a do antiveneno.

Oshima-Franco et al. (2001) mostraram que a heparina foi ineficiente em neutralizar a atividade miotóxica da *BthTX-I*, questionando se tal divergência não seria devido à alta concentração de heparina utilizada, até porque ela foi eficiente quanto à resposta neuromuscular. Nossos achados corroboram com tal citação, uma vez que a mínima concentração de heparina testada foi suficiente para atingir a neutralização contra a miotoxicidade, oferecendo ainda proteção na resposta contrátil.

Em resumo, este trabalho mostra que a heparina, uma glicosaminoglicana, quando utilizada em baixa concentração, mostra-se de neutralizar os efeitos neurotóxicos e miotóxicos induzidos pelo veneno total de *Bothrops jararacussu* e *bothropstoxina-I*.

6- CONCLUSÃO

- As preparações neuromusculares *in vitro* e *in vivo* comportam-se de modo divergente, apresentando respostas biológicas diferentes uma da outra.
- A heparina, em baixa concentração, é eficaz em proteger não somente contra a neurotoxicidade, mas também contra a miotoxicidade induzida pelo veneno bruto de Bjsu e de sua principal miotoxina.
- A protamina é eficaz em antagonizar a ação da heparina, impedindo a formação do complexo veneno:heparina.

Em relação à eficiência de heparina e AVB, conclui-se que:

- A heparina é mais eficaz que o AVB quanto à neurotoxicidade *in vitro* causada por Bjsu e BthTX-I, e que nas mesmas concentrações demonstraram nenhuma neurotoxicidade *in vivo* (ratos).
- O AVB é tão eficiente quanto a heparina na miotoxicidade *in vitro*, mas menos eficaz *in vivo* em relação ao veneno bruto.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahuja, M. L.; Veerarahavan, N.; Menon, I. G. R. Action of heparin on the venom of *Echis carinatus*. Nature 1946; 158: 878.

Amaral, C. F.; Rezende, N. A.; Silva, O. A.; Ribeiro, M. M.; Magalhães, R. A.; Reis, R. J. et al. Acute kidney failure secondary to ophidian bothropic and crotalid accidents. Analysis of 63 cases. Rev Inst Med Trop São Paulo 1986; 28:220-227.

Ando, T.; Yamasaki, M.; Suzuki, L.- Protamine. In Kleinzeller, A.; Springer, G. F.; Wittnan, H. G.: Molecular, biochemistry and biophysics. Springer-Verlag 1973; Berlin.

Boechat, A. L.; Paiva, C. S.; França, F. O.; Dos-Santos, M. C. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. Rev Inst Med Trop São Paulo 2001; 43:7-14.

Brasil. Ministério da Saúde. Ofidismo: Análise epidemiológica. Brasília, D.F., 1991; p.1-49.

Brazil, V. La défense contre l' ophidisme. 2^a ed. São Paulo: Pocaí & Weiss, 1911; p.48.

Bugs, M. R.; Bortoleto-Bugs, R. K.; Cornélio, M. L. The interaction between heparin and Lys49 phospholipase A₂ reveals the natural binding of heparin on the enzyme. Int J Biol Macromol 2005; 37:21-27.

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

Calil-Elias, S.; Martinez, A. M. B.; Melo, P. A. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. Histol Histopathol 2002; 17:463-470.

Chargaff, E.; Olson, K. B. Studies on the chemistry of blood coagulation. J Biol Chem 1937; 38:122-153.

Cintra, A. C. O.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Giglio, J. R. Bothropstoxin-I: aminoacid sequence and function. J Prot Chem 1993; 12:57-64.

Condreas, E.; De Vries, A. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venoms. *Biochim Biophys Acta* 1964; 84:60-73.

Conrad, H. E. Heparin-binding proteins. Inc: Academic Press, San Diego, 1998.

Corbett, C. E. *Farmacodinâmica*. 6° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982; p.1044-74.

De Oliveira, M.; Cavalcante, W. L. G.; Arruda, E. Z.; Melo, P. A.; Dal-Pai Silva, M., Gallacci, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. *Toxicon* 2003; 42:373-379.

Diccianni, M. B.; Mistry, M. J.; Hug, K.; Harmony, J. A. K. Inhibition of phospholipase A₂ by heparin. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1046:242-248.

Dos-Santos, M. C.; Gonçalves, L. R.; Fortes-Dias, C. L.; Cury, Y.; Gutiérrez, J. M.; Furtado, M. de F. The efficacy of the bothropic-crotalic antivenom in the neutralization of the main *Bothrops jararacussu* venom activities. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992; 34:77-83.

Fletcher, J. E.; Hubert, M.; Wieland, S. J.; Gong, Q. H.; Jiang, M. S. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon* 1996; 34:1301-1311.

Gallacci, M.; Oliveira, M.; Dal Pai-Silva, M.; Cavalcante, W. L. G.; Spencer, P. J. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 57:239-245.

Gutiérrez, J. M.; Núñez, J.; Díaz, C.; Cintra, A. C.; Homsí-Brandeburgo, M. I.; Giglio, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp Mol Pathol* 1991; 55:217-229.

Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S.; Wen, F. H.; Malaque, C. M. S.; Haddad, V. Jr. (Eds). *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, São Paulo: Sarvier 1995; p.310-323.

Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995; 33:1405-1424.

Gutiérrez, J. M.; Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000; 82:841-845.

Gutiérrez, J. M.; Ownby, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipase A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003; 42:915-931.

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

Hoge, A. R.; Romano, S. A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem Inst Butantan* 1972; 36:109-208.

Homsí-Brandeburgo, M. I.; Queiroz, L. S.; Santo Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Giglio, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization of biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988; 26:615-627.

Iwanaga, S.; Suzuki, T. Enzymes in snake venom. In: (ed) Lee, Chen-Yuan. *Snake Venoms*. Berlin: Springer-Verlag, 1979; p.61-158 (*Handbook of Experimental Pharmacology*, 52).

Lane, D. A.; Adams, L. Non-anticoagulant uses of heparin. *New Engl J Med* 1993; 329:129-130.

Leikin, J. B.; Paloucek, F. P.- In: (Gans, J. A. e Kerschler, R. D. eds.) *Poisoning & Toxicology Handbook*. Lexi-Comp., Inc (Hudson Cleveland), American Pharmaceutical Association, 2nd edition, 1996-97.

Lomonte, B.; Moreno, E.; Tarkowski, A.; Hanson, L. A.; Maccarana, M. Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *J Biol Chem* 1994a; 269:29867-29873.

Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Bagge, U.; Hanson, L.A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/ heparin sulfate family. *Biochem Pharmacol* 1994b; 47:1509-1518.

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.

Magro, A. J.; Takeda, A. A. S.; Soares, A. M.; Fontes, M. R. M. Structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2005; 61:1670-1677.

Majerus PW, Broze Jr GJ, Miletich JP, Tollefsen DM 1991. Drogas anticoagulantes, trombolíticas e antiplaquetárias. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (Eds), *Goodman e Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 8ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 874-886.

McLean, J.- The discovery of heparin. *Circulation* 1959; 19:75-78.

Melo, P. A.; Suarez-Kurtz, G. Release of creatine kinase from skeletal muscles by *Bothrops jararacussu* venoms: heparin potentiation of inhibition by antivenin. *Braz J Med Biol Res* 1988a; 21:545-548.

Melo, P. A.; Suarez-Kurtz, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscles by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon* 1988b; 26:87-95.

Melo, P. A.; Homsí-Brandeburgo, M. L.; Giglio, J. R.; Suarez-Kurtz, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon* 1993; 31:285-291.

Melo, P. A.; Ownby, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. *Toxicon* 1999; 37:199-215.

Milani Junior, R.; Jorge, M. T.; De Campos, F. P.; Martins, F. P. Bousso, A.; Cardoso, J. L.; et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. Q J Med 1997; 90:323-334.

Murakami, M. T.; Viçoti, M. M.; Abrego, J. R. B.; Lourenzoni, M. R.; Cintra, A. C. O.; Arruda, E. Z.; et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues, Toxicon 2007; 49:378-387.

Nahas, L.; Kamiguti, A. S.; Barros, M. A. R. Thrombin-line and factor X-activator components of *Bothrops* venom. Thromb Haemost 1979; 41:314-328.

Oshima-Franco, Y.; Hyslop, S.; Cintra, A. C. O.; Giglio, J. R.; Cruz-Höfling, M. A.; Rodrigues-Simioni, L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. Muscle & Nerve 2000; 23:1832-1839.

Oshima-Franco, Y.; Leite, G. B.; Silva, G. H.; Cardoso, D. F.; Hyslop, S.; Giglio, J. R.; 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.

Oshima-Franco, Y.; Leite, G. B.; Dal Belo, C. A.; Hyslop, S.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A. C. O.; et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004; 95:175-182.

Pereira, M. F.; Novello, J. C.; Cintra, A. C.; Giglio, J. R.; Landucci, E. T.; Oliveira, B.; Marangoni, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) venom with low phospholipase A₂ activity. J Protein Chem 1998; 17:381-386.

Plebani, M.- Enzymes and muscle diseases. Reumatismo 2001;53:158-165.

Ribeiro, L. A.; Jorge, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30:475-480.

Ribeiro, L. A.; Albuquerque, M. J.; Pires de Campos, V. A. F.; Katz, G.; Takaoka, N. Y.; Lebrão, M. L.; et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Rev Ass Med Brasil* 1998; 44:312-318.

Rodrigues, L.; Cunha, D. B.; Borja-Oliveira, C. R.; Cintra, A. C. O.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y.; et al. Ação da heparina contra a atividade neurotóxica da miotoxina Bothropstoxina-I. *Saúde Rev* 2004; 6:19-29.

Rodrigues-Simioni, L.; Borgese, N.; Ceccarelli, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* 1983; 10:475-489.

Sanches, E. F.; Freitas, T. V.; Ferreira-Alves, D. L.; Velarde, D. T.; Diniz, M. R.; Cordeiro, M. N.; et al. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 1992; 30:95-103.

São Paulo. Manual de Vigilância Epidemiológica. Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento. Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. 2001.

Schaeffer, R. C.; Briston, C.; Chilton, S. M.; Carlson, R. W. Disseminated intravascular coagulation following *Echis carinatus* venom in dogs: effects of a synthetic thrombin inhibitor. *J Lab Clin Med* 1986; 107:488-497.

Seignot, P.; Ducourau, J. P.; Ducrot, P.; Angel, G.; Roussel, L.; Aubert, M. Fatal poisoning caused by African viper's bite (*Echis carinatus*). *Ann Fr Anesth Reanim* 1992; 11:105-110.

Teng, C. M.; Ma, Y. H.; Ouyang, C. H. Action mechanism of the platelet aggregation inducer and inhibitor from *Echis carinatus* snake venom. *Biochim Biophys Acta* 1985; 841:8-14.

Tersariol, I. L. S.; Pimenta, D. C.; Chagas, J. R.; Almeida, P. C. Proteinase activity regulation by glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:135-144.

Warrel, D. A.; Pope, H. M.; Prentice, C. R. Disseminated intravascular coagulation caused by the carpet viper (*Echis carinatus*): trial of heparin. *Br J Haematol* 1976; 33:335-342.

8- ANEXO

Protocolo 792-1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 792-1, sobre "A INFLUÊNCIA DA HEPARINA NOS EFEITOS IN VIVO E IN VITRO DO VENENO DE BOTHROPS JARARACUSSU E BOTHROPSTOXINA-L" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Sandro Rostelato Ferreira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 09 de março de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 792-1, entitled "THE INFLUENCE OF HEPARIN ON THE IN VIVO AND IN VITRO EFFECTS OF BOTHROPS JARARACUSSU VENOM AND BOTHROPSTOXIN-L ", 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 March 9, 2005.

Campinas, 09 de março de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP - 13 081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788-6359
FAX 55 19 32893124