

VALDEMIR APARECIDO DE ABREU

**ESTUDO DA AÇÃO DO VENENO BRUTO DE
Micrurus altirostris (COBRA CORAL URUGUAIANA) SOBRE
A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E DA CAPACIDADE DE
NEUTRALIZAÇÃO DO ANTIVENENO COMERCIAL E
DO ANTI-SORO ESPECÍFICO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

VALDEMIR APARECIDO DE ABREU

**ESTUDO DA AÇÃO DO VENENO BRUTO DE
Micrurus altirostris (COBRA CORAL URUGUAIANA) SOBRE
A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E DA CAPACIDADE DE
NEUTRALIZAÇÃO DO ANTIVENENO COMERCIAL E
DO ANTI-SORO ESPECÍFICO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

Ab86e Abreu, Valdemir Aparecido de
Estudo da ação do veneno bruto de *Micrurus altirostris* (cobra uruguaiana) sobre a junção neuromuscular e da capacidade de neutralização do antiveneno comercial e do anti-soro específico /Valdemir Aparecido de Abreu. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Léa Rodrigues Simioni
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antivenenos. 2. Bloqueadores neuromusculares.
3. Neurotransmissores. 4. Neurotoxinas. 5. Nervo frênico. I. Simioni, Léa Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Study of *Micrurus altirostris* (Uruguaiana coral snake) crude venom on neuromuscular junction and the neutralization ability by commercial antivenom and specific antiserum

Keywords: • Antivenins
• Neuromuscular blockade
• Neurotransmitters
• Neurotoxins
• Phrenic-nerve

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

Prof. Dr. Fábio Bucharetti

Prof. Dr. José Carlos Cogo

Data da defesa: 28 - 02 - 2008

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Prof. Dr. Fábio Bucarechi

Prof. Dr. José Carlos Cogo

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

Data: 28/02/2008

Dedicatória

*À Yára,
minha companheira de sempre.
Meu suporte e incentivo.
Sua força de vontade e dedicação em tudo o que faz,
me inspiram e me dão forças para prosseguir.
É nessa força que eu quero continuar vivendo.
Dedico a você esta Tese e
junto com ela o meu amor.*

*À minha mãe,
pelo amor, pela fé e pela bondade.
Você tem sido, para muitos,
o ombro amigo, o abrigo na hora oportuna.
Você,
minha primeira professora,
fez de mim o que sou,
me ensinando a procurar sempre o bom caminho e
a dar o melhor de mim.*

*Às minhas filhas,
genros e
neto,
presentes de Deus em minhas mãos.
A quem tenho procurado ser exemplo, e
de quem tenho recebido muito amor e atenção.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, nosso exemplo de dedicação e desprendimento. Muito obrigado pela oportunidade, pela recepção em seu laboratório; não poupando esforços e ainda disponibilizando todo o seu conhecimento, sabedoria e, principalmente, sua amizade. Seu desprendimento, sensibilidade e exemplo têm nos inspirado e nos tornado melhores do que somos. Espero poder passar adiante, dividindo com outros tudo o que tenho aprendido sob sua orientação.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Domingos Furtado, pelo entusiasmo, simpatia e amizade. Sempre disponível e atenta. Quero agradecer a orientação e a atenção. Obrigado por não somente me “apresentar”, mas também fornecer parte do “fascinante” veneno de *Micrurus altirostris*. Espero poder continuar contando com sua disponibilidade e desprendimento. Obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, por abrir as portas de seu laboratório, pela amizade, pelas aulas, pela orientação e pelo interesse em auxiliar, sempre que solicitado. Tenho aprendido muito com sua experiência.

À Profa. Dra. Julia Prado Franceschi, pelo entusiasmo, carinho e incentivo, sempre que nos encontramos.

À Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo, pela consideração e estímulo, que tanto me auxiliaram.

Ao Prof. Dr. Édson Antunes, pela dedicação e atenção e, também, pelas sugestões e pelos ensinamentos dados durante o curso.

À Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, pela amizade e ensinamentos, desde a minha chegada ao laboratório. Um exemplo a ser seguido. Espero continuar aprendendo com você.

À Profa. Dra. Caroline Ribeiro Borja Oliveira, exemplo de dedicação e humildade. Muito obrigado por sua influência na minha formação. Foi muito gratificante tê-la como colaboradora todos esses anos. Gostaria que essa parceira pudesse continuar ainda por muito tempo.

Ao Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, meu exemplo de zelo, dedicação e disciplina. Sempre me apoiando e estimulando.

À Profa. Dra. Saraguacy Hernandes Oliveira pelo carinho, amizade e atenção, a despeito de todas as suas lutas. Muito obrigado também por suas orações.

Ao Prof. Dr. Alexandre Corrado, pelas “cobranças”, pelo ensino e sugestões dadas em alguns dos experimentos.

Ao biólogo e amigo Gildo Bernardo Leite, exemplo de bondade e desprendimento. Obrigado pela paciência e pela divisão do conhecimento. Obrigado, também, pelo ombro amigo, por toda a ajuda, não apenas pela assistência técnica, mas também por sua disponibilidade. Tenho aprendido muito com você, esses anos todos.

Minha homenagem também ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana. Perdemos o companheirismo e a alegria dele; as aulas e sua visita diária ao laboratório, mas os ensinamentos e o carinho que recebemos, nós vamos guardar para sempre. É, o “Marcão” faz falta!

À “família” do laboratório de Junção Neuromuscular, Charlene, Dimas, Gina, Mário, Priscila Sandro e Thiago. Grato pela convivência agradável durante todos esses anos. Vocês são mais que amigos. Aprendi muito com todos vocês. É muito bom podermos contar com os amigos para críticas, sugestões, revisões e apoio audiovisual, didático, “aleatório”... É, fizemos uma sinfonia a “dezesesseis mãos”. Quero agradecer e pedir que nossa amizade perdure!

Aos amigos Gustavo e Juliana pela disponibilidade e pelo trabalho com a purificação do veneno. À Paula, que colaborou também. Vocês foram incríveis. Companheiros, “a luta continua!” Temos muito trabalho ainda...

À Lourdes, ao Thomaz e ao Delano, pelas palavras de incentivo.

Aos técnicos: José Ilton, pela colaboração; Paulinho do IB, pela liofilização das amostras; Adilson e Toninho pelo auxílio; Marcos e Miguel pelo cuidado com os animais. Sou muito grato a vocês.

A todos os professores que ensinam no departamento de farmacologia, socializando o conhecimento, a minha gratidão.

Aos funcionários do departamento de farmacologia, em especial ao Wanderlei, à Elaine e à Fran, pela atenção e pelo carinho. Sou muito grato.

Minha gratidão, também, a todo o pessoal do apoio didático, científico e computacional, em especial ao Marcos, ao Mário, ao Alex, e à Mercedes, pelo trabalho com as figuras e pôsteres.

Às minhas irmãs Ivone, Vanda e Wanda e ao meu cunhado Fausto. Poderia ter escrito também, amigas e amigo. Pessoas com quem sempre posso contar. Tem um pedaço de vocês aqui também. Sou muito grato pelo carinho e atenção constantes.

À direção do Colégio Adventista de Campinas, pela amizade e pelo apoio. Obrigado também aos colegas, pelo incentivo, pelo carinho e pela amizade.

Ao CNPq, por todo o apoio financeiro, permitindo a execução deste trabalho.

Senhor Deus, agora meu agradecimento a Ti. Não por último, porque sei que És o primeiro, mas agora, por ser especial. Tu és maravilhoso e Deus Forte, paciente e benigno, até para com os que não crêem. Tens sido meu Refúgio e Fortaleza, Socorro bem presente na angústia. Tens me dado paz, mesmo quando os montes se abalam... E eu Te agradeço por isso.

Sou grato pela vida, pelo intelecto implantado no ser humano e ainda, pela possibilidade de nos apossarmos de todo o conhecimento ao nosso alcance.

Como cantou o salmista – “Quando contemplo as maravilhas da Tua criação, que é o homem para que dele Te lembres? E o filho do homem, para que o visites? Fizeste-o pouco menor que os anjos...” Por isso também eu sou grato. Sou grato, ainda, porque me concedestes tantos amigos aqui.

Agora meu pedido – que eu seja um instrumento Teu, a dividir com os outros o que aprendi. A ser atento às necessidades de meus semelhantes e que, ao servir, possa eu cada vez mais estar ao Teu dispor!

*“O que importa é que,
apesar de todos os obstáculos,
sua vida é mais bela e complexa
do que todas as estrelas do céu.
Ela é o maior espetáculo do mundo,
a obra-prima do Criador”*

Augusto Cury

	Pág.
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1- INTRODUÇÃO.....	21
1.1-Venenos ofídicos – caracterização geral.....	22
1.2- Serpentes elapídicas.....	23
1.3- Serpentes do gênero <i>Micrurus</i>.....	25
1.4- A serpente <i>Micrurus altirostris</i>.....	28
1.5- Neutralização do veneno de <i>Micrurus altirostris</i>.....	30
2- OBJETIVOS.....	33
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1- Reagentes.....	36
3.2- Veneno e antiveneno comercial.....	36
3.3- Anti-soro específico.....	36
3.4- Animais.....	37
3.5- Ensaios biológicos.....	37
3.5.1- Preparação isolada músculo biventer cervicis de pintainho.....	37
3.5.2- Preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo.....	38
• Substituição do Ca ²⁺ pelo Sr ²⁺	39
3.5.3- Dose letal média (DL _{50%}) do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> em pintainhos.....	39
3.5.4- Neutralização do veneno.....	39

• <i>in vivo</i>	39
• <i>in vitro</i>	40
3.6- Ensaio bioquímico	40
3.6.1- Determinação da atividade fosfolipásica.....	40
3.6.2- Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa Source 15 RPC.....	41
3.6.3- Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa de alta eficiência....	41
3.6.4- Concentração protéica.....	41
3.7- Análise estatística	42
4- RESULTADOS	43
4.1- Atividade neuromuscular do veneno de <i>Micrurus altirostris</i>	44
4.2- Neutralização da neurotoxicidade pelo antiveneno comercial	53
4.3- Neutralização da neurotoxicidade pelo anti-soro específico produzido em coelhos	57
4.4- Neutralização da letalidade pelo antiveneno comercial e pelo anti-soro produzido em coelhos	58
4.5- Atividade fosfolipásica do veneno	59
4.6- Ensaio cromatográfico	60
5- DISCUSSÃO	64
6- CONCLUSÃO	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8- ANEXOS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ACT	Acetonitrila
ATF	Ácido trifluoroacético
BCp	Músculo biventer cervicis de pintainho
Ca²⁺	Íon Cálcio
Cdt	Crotalus durissus terrificus
CCh	Carbacol
CK	Creatino-quinase
DL	Dose letal
d-TC	d-tubocurarina
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografia de fase reversa de alta definição)
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo Dalton, 1 kDa equivale ao peso molecular de um átomo de hidrogênio
L	Lavagem
NFDc	Nervo frênico-músculo diafragma de camundongo
NTXs	Neurotoxinas
PLA₂	Fosfolipase A ₂
Sr²⁺	Íon Estrôncio

	Pág.
Tabela 1 Respostas por ação da ACh exógena (110 μ M), do CCh (8 μ M) e do KCl (20mM), porcentagem de contratura, em músculo biventer cervicis de pintainho, após 120 minutos de incubação com o veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (0,1 μ g/mL).....	48
Tabela 2 Contraturas produzidas por ação da ACh (110 μ M) e do KCl (20mM) em preparações isoladas músculo biventer cervicis de pintainho após 120 min de incubação com o veneno de <i>Micrurus altirostris</i> , veneno + antiveneno comercial ou veneno + anti-soro específico.....	57
Tabela 3 Neutralização da letalidade causada pelo veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (5DL ₅₀) em pintainhos (DL ₅₀ 0,042mg/kg) e camundongos (DL ₅₀ 0,255mg/kg) após pré-incubação com várias concentrações do antiveneno comercial ou anti-soro específico.....	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Presa de elapídeo (<i>Micrurus corallinus</i>) - fotomicrografia eletrônica de varredura.....	24
Figura 2 Cabeça da serpente <i>Micrurus altirostris</i>	26
Figura 3 <i>Micrurus altirostris</i>	29
Figura 4 Representação gráfica do efeito bloqueador neuromuscular, induzido pelo veneno de <i>Micrurus altirostris</i> em preparações isoladas biventer cervicis de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo.....	44
Figura 5 Registro miográfico da resposta contrátil em preparações biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, a 37°C, mostrando a ação do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> , da ACh exógena e do KCl...	45
Figura 6 Registro miográfico da resposta contrátil em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, a 37°C, mostrando a ação do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> , tempo e concentração-dependente.....	46
Figura 7 Comparação gráfica da sensibilidade das preparações isoladas biventer cervicis de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo (37°C), por ação do veneno de <i>Micrurus altirostris</i>	47
Figura 8 Registro miográfico da resposta contrátil em preparação isolada biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, a 37°C, mostrando a ação bloqueadora do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> , a ausência de respostas à ação da ACh exógena e do CCh e a manutenção da resposta ao KCl.....	48
Figura 9 Cinética da ação do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (0,1µg/mL) em preparações isoladas biventer cervicis de pintainho, sobre as contraturas provocadas pela adição da ACh.....	49

Figura 10	Registro miográfico da resposta contrátil em preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimuação indireta (37°C) e curarizada.....	50
Figura 11	Registro miográfico da resposta contrátil em preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo, submetida simultaneamente a estímulos indiretos e diretos (37°C) e curarizada.....	51
Figura 12	(A) Registro miográfico da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, curarizada sob estimulação elétrica direta, mostrando que o veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (10 µg/mL) não interfere na resposta contrátil. Em (B) registro representativo da resposta contrátil e bloqueio neuromuscular não-dependente de íons Ca ²⁺ , em preparação isolada nervo-frênico diafragma de camundongo, incubada com o veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (10µg/mL) a 37°C...	52
Figura 13	Representação gráfica do efeito bloqueador neuromuscular, induzido pelo veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (1µg/mL) em preparações isoladas biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta, a 22°C.....	53
Figura 14	Registro miográfico representativo da resposta contrátil ao estímulo indireto em preparações biventer cervicis de pintainho. A - bloqueio tempo-dependente produzido pelo veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (1µg/mL). B e C - neutralização, pelo antiveneno comercial, do bloqueio induzido pelo veneno.....	55
Figura 15	Representação gráfica do bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de <i>Micrurus altirostris</i> (1 µg/mL) em preparações isoladas, sob estimulação indireta. Em (A) preparação biventer cervicis de pintainho e em (B) preparação nervo frênico-diafragma de camundongo e da proteção pelo antiveneno comercial e pelo anti-soro específico produzido em coelhos.....	56
Figura 16	Atividade fosfolipásica (PLA ₂) do veneno de <i>Micrurus altirostris</i>	60

Figura 17	Perfil cromatográfico obtido na primeira etapa de fracionamento do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> em coluna Source 15 RPC e registro miográfico (preparação biventer cervicis de pintainho).....	61
Figura 18	Perfil cromatográfico obtido na segunda etapa de fracionamento do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> , em coluna Sephasil Peptide C8 5 µm St 4.6/250, pelo refractionamento do pico IV e registro miográfico (preparação biventer cervicis de pintainho).....	62
Figura 19	Perfil cromatográfico obtido na terceira etapa de fracionamento do veneno de <i>Micrurus altirostris</i> , em coluna Sephasil Peptide C8 5 µm St 4.6/250, pelo refractionamento do pico IV-3 e registro miográfico (preparação biventer cervicis de pintainho).....	63

RESUMO

Neste trabalho, foi estudada a ação do veneno de *Micrurus altirostris* (cobra coral Uruguaiana) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 µg/mL sobre a junção neuromuscular em preparações isoladas de ave (biventer cervicis de pintainho) e de mamífero (nervo frênico-diafragma de camundongo) e também a habilidade do antiveneno comercial produzido pelo Instituto Butantan e do anti-soro específico, produzido em coelhos em neutralizar a neurotoxicidade e a letalidade em pintainhos e camundongos (DL₅₀ 0,042 e 0,255 mg/kg), injetados i.m. e i.p., respectivamente, com misturas de veneno (5 DL₅₀):antiveneno ou anti-soro específico (n=6), na razão de 1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10 e 1:20. Somente a razão de 1:20 do veneno:antiveneno ou anti-soro neutralizou o bloqueio neuromuscular *in vitro* e protegeu pintainhos e camundongos contra 5 DL₅₀ do veneno. O veneno causou um completo bloqueio neuromuscular em ambas as preparações, ligando-se aos receptores colinérgicos sub-sinápticos, de maneira irreversível. Inibiu as contraturas causadas por ação da acetilcolina e do carbacol, sem interferir nas respostas ao KCl. O bloqueio neuromuscular causado pelo veneno não apresentou qualquer alteração na ausência de íons Ca²⁺ ou com a diminuição da temperatura, tampouco foi revertido por ação da neostigmina. A resposta ao estímulo direto não foi afetada na vigência do bloqueio neuromuscular completo, indicando pela perfeita resposta muscular, que a membrana manteve-se íntegra, o que sugere a ausência de uma atividade miotóxica. Os resultados indicaram que o veneno de *Micrurus altirostris* interfere com a neurotransmissão pós-sináptica e que o antiveneno comercial, bem como o anti-soro específico, produzido em coelhos, possuem baixa eficácia em neutralizar a neurotoxicidade e a letalidade deste veneno. A neutralização da ação neurotóxica e também da letalidade do veneno foi obtida apenas quando a proporção de 1:20 (veneno:antiveneno) foi utilizada.

ABSTRACT

In this work, we studied the neuromuscular blockade caused by *Micrurus altirostris* venom (0.1-10 µg/mL) in indirect stimulated chick biventer cervicis and mouse phrenic nerve-diaphragm preparations and the ability of commercial antivenom (Instituto Butantan) and antiserum raised in rabbits to neutralize neurotoxicity and lethality in chicks and mice (LD₅₀ 0.042 and 0.255 mg/kg), injected i.m. and i.p., respectively, with venom (5 LD₅₀):antivenom or antiserum mixtures (n=6) of 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 and 1:20. The venom caused a complete and irreversible neuromuscular blockade in both preparations, binding in the subsynaptics colynergic receptors; inhibited the acetylcholine and carbachol contractures, without interfering on KCl response. The neuromuscular blockade was not Ca²⁺ or temperature-dependent and did not affect the response to direct stimulation. Only a venom:antivenom or antiserum ratio of 1:20 neutralized the neuromuscular blockade in vitro and protected chicks and mice against 5 LD₅₀ of venom. Our results indicated that *Micrurus altirostris* venom interferes with postsynaptic neurotransmission and that commercial antivenom and rabbit antiserum have low efficacy in neutralizing the neurotoxicity and lethality of this venom.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Venenos ofídicos - caracterização geral

Os venenos ofídicos são constituídos por uma mistura heterogênea de substâncias complexas, como as proteínas e de substâncias simples, como o cálcio, o magnésio e o zinco.

As proteínas constituem 90% a 95% do peso seco do veneno, principalmente as enzimas e neurotoxinas (NTXs), que em conjunto são responsáveis pela atividade tóxica dos venenos.

O cálcio atua como cofator de algumas enzimas proteolíticas e fosfolipases A_2 , enquanto o magnésio e o zinco são importantes para a ação das principais metaloproteinases dos venenos (Tu, 1977, 1982; Jia et al., 1996).

Cinco classes de enzimas podem ser encontradas basicamente nos venenos de serpentes: as oxidoredutases, as hidrolases, as glicosidases, as proteases e as lipases, fazendo parte desta última classe as fosfolipases e as acetilcolinesterases, sendo as fosfolipases A_2 as mais estudadas (Mayer et al., 1960; Mebs, 1970, Iwanaga et al., 1976 e Kini, 1997).

As fosfolipases A_2 (PLA_2) são enzimas digestivas produzidas pela glândula de veneno das serpentes e constituem o componente mais letal do veneno. Além da digestão de lipídios, elas também produzem ações farmacológicas, tais como: neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeito anticoagulante, além de atividades - hemolítica, convulsionante, edematogênica e hipotensiva (Kaiser et al., 1990; Kini, 1997).

As neurotoxinas (NTXs) presentes no veneno das serpentes podem interferir na condução axônica do neurônio ou podem agir como inibidoras da transmissão sináptica na região da placa motora da junção neuromuscular.

Na condução axônica, as NTXs podem bloquear canais, alterando o movimento de íons, principalmente íons Na^+ e íons K^+ . Na transmissão sináptica, as NTXs podem também agir, impedindo a liberação do neurotransmissor ou ligando-se aos receptores nicotínicos e, dessa forma, impedindo a ação da acetilcolina (ACh), sobre os receptores nicotínicos da placa motora.

As toxinas que atuam na região terminal do neurônio, impedindo a liberação da acetilcolina na fenda sináptica, são chamadas de toxinas pré-sinápticas. Por outro lado, as toxinas que se ligam aos receptores nicotínicos da região subsináptica da placa motora, semelhantemente ao curare, são chamadas de toxinas pós-sinápticas. Assim, as neurotoxinas podem ser divididas em dois grandes grupos: NTXs pré-sinápticas (β -neurotoxinas) e NTXs pós-sinápticas (α -neurotoxinas) (Tu, 1977; Vital Brazil, 1980).

As NTXs pós-sinápticas são proteínas básicas (pH acima de 9), de baixa massa molecular (7 a 8 kDa) e, ainda, desprovidas de atividade enzimática, sendo também denominadas toxinas curaremiméticas (Karlsson, 1979). Ligam-se com grande seletividade aos receptores nicotínicos da placa terminal, impedindo a sua interação com o neurotransmissor e demais agonistas (Lee, 1970). Os venenos elapídicos contêm tanto as β , quanto as α -neurotoxinas.

1.2- Serpentes elapídicas

A família Elapidae encontra-se amplamente distribuída ao redor do mundo, com aproximadamente 250 espécies (Uetz, 2003), tendo como componentes as najas asiáticas e africanas e as mambas do Continente Africano. Nas Américas, a família Elapidae está representada pelas chamadas cobras corais, a maioria representada pelo gênero *Micrurus*, e pelos gêneros *Micruroides* e *Leptomicrurus* (Campbell e Lamar, 1989). No Brasil, as serpentes corais (gênero *Micrurus*) estão distribuídas por todo o território nacional.

A família Elapidae é composta por serpentes dotadas de um aparelho inoculador do tipo proteróglifo. Neste tipo de dentição, as presas anteriores estão localizadas no maxilar e conectadas com a glândula venenosa, geralmente com canal de veneno não completamente fechado (Figura 1).

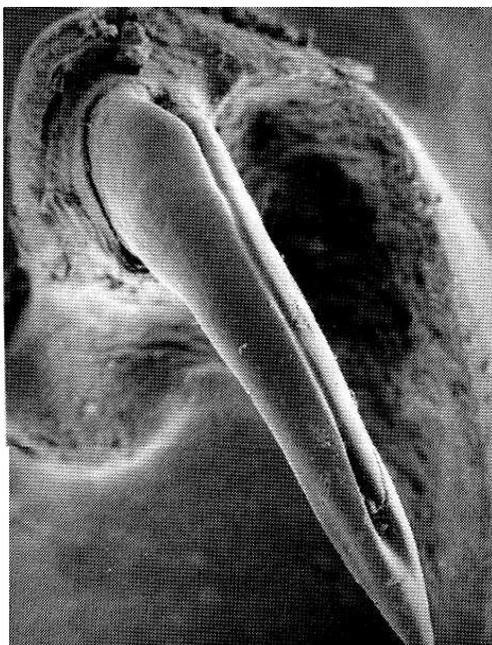


Figura 1- Presa de elapídeo (*Micrurus corallinus*) - fotomicrografia eletrônica de varredura (Instituto de Biofísica - UFRJ).

As peçonhas elapídicas caracterizam-se por apresentar elevada toxicidade, em geral bastante superior à das serpentes da família Viperidae. Causam paralisia flácida, podendo levar a óbito por paralisia respiratória (Russel, 1983; Bolaños, 1984). Os venenos de serpentes do gênero *Micrurus* exercem pequena atividade proteolítica, não provocam hemorragias, tampouco coagulam o plasma sanguíneo, como muitas das peçonhas viperídicas (Vital Brazil, 1980).

As paralisias motora e respiratória são decorrentes da ação inibitória das peçonhas elapídicas sobre a transmissão neuromuscular. A alta toxicidade e o efeito bloqueador neuromuscular dessas peçonhas são devidos às neurotoxinas que se combinam com os receptores colinérgicos da placa terminal, semelhantemente ao curare, sem promover a despolarização da membrana sub-sináptica da fibra muscular. Quando grande número de receptores se acha ocupado pela NTX, a combinação da acetilcolina (ACh) com aqueles ainda livres não é suficiente para provocar uma despolarização localizada (potencial de placa terminal) de intensidade capaz de deflagrar o potencial de ação – a transmissão neuromuscular é então inibida.

A função biológica das NTXs do veneno de serpentes é a de imobilizar a presa em potencial ou possíveis predadores. Elas bloqueiam a neurotransmissão nicotínica no músculo esquelético, causando a paralisação dos mesmos. As NTXs pós-sinápticas estão presentes na peçonha de todas as serpentes elapídicas estudadas até o presente.

As α -neurotoxinas são constituídas por uma única cadeia peptídica interligada por pontes dissulfídicas, formando dois grupos: o primeiro com 61 ou 62 resíduos de 15-16 aminoácidos e 4 pontes dissulfídicas (cobrotoxina de *Naja naja atra* e toxina de *Naja nigricolis*, por exemplo) e o segundo, com 71 a 74 resíduos de 17-18 aminoácidos e 5 pontes dissulfídicas (α -bungarotoxina da peçonha de *Bungarus multicinctus* e toxinas T₃ e T₄ da peçonha de *Naja naja naja*, por exemplo). Em preparações isoladas, a ação das do primeiro grupo (cobrotoxina) é reversível e a ação das do segundo grupo (α -bungarotoxina) é irreversível (Lee et al., 1972).

As drogas anticolinesterásicas, como a neostigmina podem antagonizar o bloqueio neuromuscular causado pelas NTXs pós-sinápticas reversíveis. A peçonha de *Micrurus frontalis* encerra NTXs pós-sinápticas reversíveis, cujo bloqueio pode ser plenamente antagonizado pela neostigmina (Vital Brazil e Vieira, 1996).

1.3- Serpentes do gênero *Micrurus*

As serpentes corais são os principais representantes da família Elapidae nas Américas, sendo *Micrurus* o gênero de maior importância do ponto de vista médico (Warrel et al., 2004). A cauda curta e roliça dá nome ao gênero *Micrurus* (do grego, pequena cauda).

As serpentes desse gênero apresentam a cabeça oval recoberta por grandes placas simétricas e não apresentam fossetas loreais, como os viperídeos. Os olhos são pequenos e pretos, quase sempre localizados em uma faixa preta da cabeça, com pupila elíptica vertical (Figura 2). O corpo é cilíndrico, recoberto de escamas lisas e com anéis de cores vivas e contrastantes – vermelho, amarelo (ou branco) e preto, dispostos em tríades.

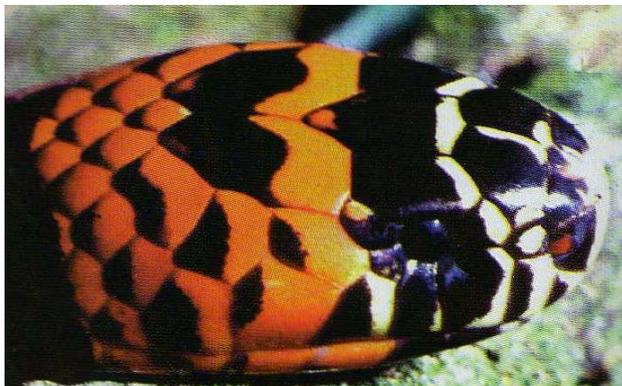


Figura 2- Cabeça da serpente *Micrurus altirostris* (Melgarejo, Niterói, RJ).

Os ossos cranianos são muito fortes, em virtude do hábito de escavação. As serpentes corais possuem hábitos fossoriais ou semifossoriais, vindo eventualmente à superfície para alimentar-se ou para acasalar (Melgarejo, 2003).

Embora o envenenamento por serpentes do gênero *Micrurus* no Brasil seja relativamente raro (0,6%), com um coeficiente de letalidade de 0,36% (Ministério da Saúde, 1998) é geralmente considerado grave, em virtude da alta toxicidade dos venenos.

A baixa incidência de acidentes humanos por serpentes corais pode ser explicada pela pequena abertura da boca (em torno de 30°) e pelo pequeno tamanho das presas inoculadoras (2,5 mm em uma coral de 90 cm). A injeção superficial do veneno pode ser compensada pelo hábito de morder sem soltar, o que aumenta a probabilidade e o tempo de inoculação do veneno. As manifestações clínicas locais costumam ser discretas (Jorge da Silva Jr. e Bucarechi, 2003).

Embora sejam animais de hábitos noturnos e relativamente dóceis, a quase totalidade dos acidentes é provocada pela manipulação das serpentes sem as devidas precauções e técnica, por indivíduos que as tomam pelas falsas corais (serpentes não-peçonhentas) de natureza não agressiva e inofensiva, aliada à sua coloração atrativa (anéis alternados em vermelho, amarelo ou branco e preto) podem induzir ao seu manuseio inadequado (Campbell e Lamar, 2004).

Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* induzem predominantemente efeitos neurológicos, mediados por neurotoxinas pré e pós-sinápticas. O sintoma mais característico é a paralisia de músculos, como os intercostais e o diafragma, que resulta em insuficiência respiratória. O progressivo bloqueio neuromuscular, provocado pelo veneno, provoca dor e parestesia. A ausência de tratamento clínico adequado pode levar à morte.

O início das manifestações de paralisção é muito variável, podendo surgir de minutos a horas após o acidente. Após a mordida, a paralisia tende a progredir e a se agravar na ausência do tratamento adequado. Os músculos extrínsecos dos olhos e os das pálpebras parecem ser os mais sensíveis à ação do veneno, enquanto o diafragma exibe uma maior resistência à ação dos venenos elapídicos.

Manifestações clínicas são relatadas, desde ptose palpebral, oftalmoplegia, dificuldades de acomodação visual, de deglutição e de se manter em posição ereta, até dispnéia, evoluindo por paralisia diafragmática (Fan e França, 1992).

A gravidade dos acidentes provocados por serpentes desse gênero, no entanto, varia dependendo do tamanho do animal, da quantidade do veneno injetado e da idade da vítima (Amuy et al., 1997).

Além dos sintomas neurológicos relevantes, foi demonstrado que os venenos de serpentes do gênero *Micrurus* induzem miotoxicidade em ratos (Gutiérrez et al., 1980) e em camundongos (Gutiérrez et al., 1992; Goularte et al., 1995).

Estudos, utilizando nervo frênico-diafragma isolado de camundongo, demonstraram a indução de modificações eletrofisiológicas e ultraestruturais, que sugerem a presença de fosfolipases A₂ de ação pré-sináptica e de componentes com ação pós-sinápticas (Cruz-Höffling et al., 1983/1984; Goularte et al., 1996).

Apesar do grande número de representantes do gênero *Micrurus*, de sua ampla distribuição geográfica no Continente Americano e da gravidade dos acidentes provocados pelas serpentes corais, poucas espécies têm sido investigadas quanto ao modo de ação de seus venenos (Bolaños e Cerdas, 1980).

Estudos farmacológicos e bioquímicos são escassos, em razão da dificuldade de coleta das serpentes, de sua manutenção em cativeiro e da pequena quantidade de veneno obtida por extração.

Ensaio cromatográficos, mionecróticos e imunoquímicos, entre outros, têm sido realizados na tentativa de esclarecer algumas das ações dos venenos de serpentes do gênero *Micrurus*, bem como determinar possíveis variabilidades intra e interespecíficas (Aird e da Silva, 1991; Jorge da Silva et al., 1991; Alape-Giron et al., 1994; Jorge da Silva et al., 2003).

1.4- A serpente *Micrurus altirostris*

A serpente *Micrurus altirostris* (Figura 3), popularmente conhecida como cobra coral uruguaiana, é a responsável pela grande incidência dos acidentes elapídicos no Rio Grande do Sul.

A revisão taxonômica do complexo *Micrurus frontalis*, elevou *Micrurus altirostris* ao status de espécie plena (antiga subespécie *Micrurus frontalis altirostris*). Essa espécie distribui-se pelo Sul do Brasil, desde o Estado do Paraná até ao Rio Grande do Sul, estendendo-se ao Uruguai e algumas províncias do Norte da Argentina (Jorge da Silva e Sites, 1999).



Figura 3- *Micrurus altirostris* (www.serpentes.ch/bilder/otherpict).

Estudos experimentais com o veneno de *Micrurus altirostris* sugerem que ele também apresenta atividade miotóxica, além de atividades edematogênica, hemolítica e letal, evidenciando sua alta toxicidade. E, ainda, que o antiveneno comercial produzido pelo Instituto Butantan - São Paulo, SP, Brasil, não pode neutralizar a atividade letal (Moraes et al., 2003).

A literatura apresenta poucos estudos sobre a atividade ou o fracionamento do veneno de *Micrurus altirostris*. Tampouco há relatos sobre sua ação na transmissão neuromuscular.

A ação de vários tipos de neurotoxinas é muito específica e, por essa razão, algumas toxinas purificadas são muito úteis para estudos químicos e fisiológicos dos receptores, na junção neuromuscular (Chang, 1979).

O estudo do mecanismo de ação dos venenos torna-se cada vez mais importante, uma vez que muitas neurotoxinas isoladas de venenos de serpentes possuem atividades altamente específicas. Frações neurotóxicas e hemorrágicas já foram isoladas do

veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda*, *Micrurus frontalis* e *Micrurus surinamensis* (Francis et al., 1997; Aird et al., 2003; Dal Belo et al., 2005). O isolamento de novas neurotoxinas, bem como a elucidação de seu mecanismo de ação podem trazer grande contribuição sob o ponto de vista farmacológico.

Tem-se demonstrado, pelo método de cromatografia de fase reversa de alta definição (HPLC), que muitos venenos de serpente do gênero *Micrurus* contêm proteínas com mobilidade similar à α -cobrotoxina, enquanto poucos têm constituintes com mobilidade similar à erabutoxina B e à α -bungarotoxina. *Micrurus frontalis altirostris* (agora ***Micrurus altirostris***), *Micrurus spixii spixii* e *Micrurus surinamensis surinamensis* contêm proteínas similares a todas as três toxinas pós-sinápticas referidas anteriormente (Jorge da Silva et al., 1991).

1.5- Neutralização do veneno de *Micrurus altirostris*

O tratamento específico preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (1998) é a soroterapia que, no caso de acidente causado por veneno de serpentes do gênero *Micrurus*, requer a administração do antiveneno antielapídico, por via endovenosa, o mais precocemente possível.

A utilização de antivenenos tem sido o modo mais eficaz no tratamento de envenenamentos por serpentes corais. O antiveneno antielapídico comercial produzido pelo Instituto Butantan – São Paulo (SP) é elaborado em cavalos com os venenos de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*, porém é utilizado para o tratamento de picadas de serpentes do gênero *Micrurus* spp. em geral, no Brasil.

A maioria dos antivenenos comerciais existentes é de origem equina e a imunização é realizada com venenos de um número limitado de espécies do mesmo gênero ou de gênero diferente para aumentar o espectro de neutralização do antiveneno (Russell, 1988).

A neutralização de venenos de espécies diferentes daquelas utilizadas na produção do antiveneno pode ocorrer em razão da reatividade antigênica cruzada. Alguns venenos podem estar relacionados farmacológica e/ou estruturalmente e por essa razão podem ser neutralizados por antiveneno heterólogo (Ménez, 1985).

O antiveneno elapídico produzido no Brasil é apresentado sob a forma de ampolas, contendo 10 mL de solução injetável de um concentrado de imunoglobulinas específicas purificadas do tipo F(ab')₂. De acordo com os produtores, cada 10 mL de antiveneno é capaz de neutralizar 15 mg do veneno.

O uso do antiveneno elapídico está indicado a todos os pacientes picados por corais verdadeiras com manifestações clínicas de envenenamento, independentemente da intensidade. A dose recomendada, empiricamente, é de 10 ampolas, por via IV, gota a gota, diluído ou não, e, infusão lenta, em 20 a 60 minutos, sob rigorosa supervisão médica e de enfermagem, além de manter o paciente ventilado (Jorge da Silva Jr. e Bucarechi, 2003).

O uso generalizado desse antiveneno comercial baseia-se em estudos que têm demonstrado considerável reatividade imunológica cruzada entre os venenos de serpentes corais sul-americanas. No entanto, há sugestões na literatura, de que a capacidade de neutralização deste antiveneno pode ser aprimorada pela inclusão de um largo espectro de espécies de *Micrurus* no pool de venenos usados no protocolo de imunização (Higashi, 1995).

O antiveneno produzido em cavalos contra o veneno de *Micrurus nigrocinctus*, uma serpente coral encontrada na América Central, apresenta reatividade cruzada com α -neurotoxinas e fosfolipases neurotóxicas de outros venenos elapídicos (Gutiérrez, et al., 1990).

Pesquisas sobre a neutralização dos venenos ofídicos adquiriram alto grau de importância, tanto no que se refere à avaliação da eficácia de antivenenos em estudos clínicos (Dos-Santos et al., 1992; Jorge et al., 1995), como em estudos experimentais (Goularte et al., 1995; Oshima-Franco et al., 1999; 2000 e 2001).

A serpente elapídica *Micrurus altirostris* é a responsável pela maioria das picadas de serpentes corais no Rio Grande do Sul e sua composição difere de outros venenos de *Micrurus*. Embora o antiveneno antielapídico produzido pelo Instituto Butantan apresente reatividade cruzada com os componentes do veneno de *Micrurus altirostris*, esse antiveneno foi ineficaz em neutralizar sua letalidade em camundongos (Moraes et al., 2003).

Em razão da escassez de informação encontrada na literatura sobre o veneno de *Micrurus altirostris*, foi estudada neste trabalho a neurotoxicidade do veneno, visando contribuir para a terapêutica dos acidentes humanos causados por esta serpente, bem como contribuir para a compreensão de fenômenos fisiopatológicos que ocorrem nos envenenamentos por serpentes.

Efetou-se também o fracionamento do veneno, com vistas à identificação da fração neurotóxica e verificou-se a capacidade de neutralização do antiveneno comercial de origem eqüina e do anti-soro produzido em coelhos, no intuito de investigar a possibilidade de incluir o veneno de *Micrurus altirostris* no pool de venenos utilizados para a produção do antiveneno comercial.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Estudar a ação do veneno bruto de *Micrurus altirostris* sobre a junção neuromuscular, bem como a capacidade de neutralização do antiveneno comercial e também do anti-soro específico, produzido em coelhos.

2.2- Objetivos específicos

Estudar a ação do veneno bruto de *Micrurus altirostris* na transmissão neuromuscular em preparações isoladas de ave (biventer cervicis de pintainho) e de mamífero (nervo frênico-músculo diafragma de camundongo).

Avaliar a capacidade de neutralização do veneno, pelo antiveneno comercial produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo (SP), em preparações isoladas e também “*in vivo*”.

Produzir, utilizando coelhos, um anti-soro específico e testar tanto “*in vitro*”, quanto “*in vivo*”.

Estabelecer a dose-letal 50% (DL₅₀) em pintainhos, compará-la com a DL₅₀ de camundongos e utilizá-la no estudo da neutralização do veneno pelo antiveneno comercial e pelo anti-soro específico produzido em coelhos.

Efetuar o fracionamento do veneno e a identificação da fração neurotóxica.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Reagentes

A acetilcolina foi adquirida de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a neostigmina do Laboratório Roche (São Paulo, SP, Brasil) e o halotano comprado de Cristália (Itapira, SP, Brasil). Os sais para as soluções fisiológicas foram obtidos de fornecedores locais.

3.2- Veneno e antiveneno comercial

O veneno de *Micrurus altirostris* foi obtido de espécies adultas de ambos os sexos, por extração manual, coletadas no Sul do Brasil (Estado do Rio Grande do Sul) e cedido pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil) ou adquirido do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica (Porto Alegre, RS, Brasil). O veneno dessecado foi armazenado a -20°C até sua utilização.

O antiveneno comercial (lotes 0302184 e 0307112) também foi obtido no Instituto Butantan e produzido com a imunização de cavalos. A produção do antiveneno foi efetuada utilizando um pool de venenos de *Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus*.

3.3- Anti-soro específico

O anti-soro específico para o veneno de *M. altirostris* foi produzido em coelhos após sucessivas inoculações quinzenais subcutâneas com 250 µg de veneno/kg, por um período de três meses. As injeções incluíram o adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e solução salina. Imediatamente antes de cada injeção do veneno, uma amostra de sangue foi coletada da veia marginal da orelha e deixada à temperatura ambiente para coagular. A seguir, o sangue foi separado por centrifugação e usado para monitorar a formação de anticorpos por gel de imunodifusão (Ouchterlony, 1949). Após a formação de anticorpos, os coelhos foram anestesiados com halotano, o sangue foi coletado e os coelhos foram sacrificados. O soro foi obtido e armazenado como descrito anteriormente.

3.4- Animais

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY-LINE W 36 com peso aproximado de 40g e idade de 4 a 8 dias, fornecidos pela Globo Aves Agrícola Ltda (Campinas, SP), camundongos machos SWISS com peso entre 20 e 35g e idade de 8 semanas, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e coelhos machos adquiridos da Granja de Coelhos Grota Azul (Sílvio Bertinato Cunha ME, Mogi Mirim, SP, Brasil).

Todos os animais foram mantidos em gaiolas, com cama de maravalha, em ambiente com temperatura controlada e ciclos de claro e escuro de aproximadamente 12h, com fornecimento de água clorada e ração industrial *ad libitum*.

Os protocolos experimentais descritos aqui foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/IB/UNICAMP, protocolo nº 809-2) e foram efetuados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

3.5- Ensaios biológicos

3.5.1- Preparação isolada músculo biventer cervicis de pintainho

Os animais foram sacrificados sob anestesia, utilizando-se halotano. A preparação foi isolada e montada de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960). Os músculos foram montados em uma cuba com capacidade para 5 ml, contendo solução de Krebs, com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 25,0 e C₆ H₁₂ O₆ 11,65, em água millique. A solução foi submetida à aeração constante com carbogênio (mistura 95% de O₂ e 5% de CO₂) e os ensaios foram realizados às temperaturas de 22°C e 37°C.

Os músculos foram submetidos a uma tensão de 1,0 g/cm e estimulados por meio de eletrodos bipolares posicionados na região entre o tendão e o músculo, com o objetivo de estabelecer uma estimulação de campo. Estímulos supramaximais (de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração), provenientes de estimulador GRASS S48 foram aplicados ao músculo.

As contrações musculares e as contraturas em resposta à adição de cloreto de potássio (KCl 20 mM), de acetilcolina (ACh 110 μ M) e de carbacol (CCh 8 μ M) foram registradas em fisiógrafo GOULD RS 3400, por meio de um transdutor isométrico LOAD CELL BG-10 GM, durante 120 minutos ou até a ocorrência de bloqueio total da resposta contrátil. O registro das contraturas para KCl e ACh foi realizado com ausência de estimulação elétrica, ao início (antes da adição do veneno) e ao final do ensaio (após 120 min de incubação com o veneno ou após o bloqueio total da resposta contrátil). Em alguns dos experimentos, doses cumulativas de ACh foram utilizadas. Três a cinco banhos foram efetuados sempre após a adição de KCl e de cada dose de ACh ou CCh à cuba.

Após um período de estabilização de 20 minutos, foram adicionadas à cuba concentrações individuais de 0,1; 0,5; 1; 5; e 10 μ g/mL do veneno bruto, para determinação dos efeitos sobre a contração muscular.

3.5.2- Preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo

Os animais foram anestesiados com halotano e sacrificados posteriormente, por secção e exsanguinação dos vasos cervicais. A retirada do nervo frênico-músculo diafragma foi feita pelo método Bülbring (1946), modificado para camundongos.

Após a retirada do diafragma juntamente com o nervo frênico correspondente, o mesmo foi fixado, através dos músculos das costelas, em uma cuba com capacidade para 5 mL, contendo solução nutritiva Tyrode, com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9; e C₆H₁₂O₆ 11,1, em água millique.

A solução foi submetida à aeração constante com carbogênio (mistura 95% de O₂ e 5% de CO₂), e os ensaios foram realizados às temperaturas de 22 °C e 37°C.

O músculo foi submetido a uma tensão constante de 5 g/cm. A preparação foi exposta à estimulação elétrica indireta (estimulador GRASS S48), com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. Alguns experimentos foram realizados, utilizando preparações curarizadas, sob estimulação elétrica direta.

Após um período de estabilização de 20 minutos, foram adicionadas à cuba concentrações individuais de 0,1; 0,5; 1; 5; e 10 µg/mL do veneno bruto, para determinação dos efeitos sobre a contração muscular.

As contrações musculares foram registradas em fisiógrafo GOULD RS 3400, por meio de um transdutor isométrico LOAD CELL BG-10 GM, durante 120 minutos ou até ao bloqueio total da resposta contrátil.

- **Substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+}**

Alguns dos experimentos (concentração do veneno 1 µg/ml) foram realizados, submetendo a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo à estimulação elétrica indireta, a 37°C, em meio nutritivo Tyrode (descrito em 3.5.2) e substituindo o Ca^{2+} (1,8 mM) pelo Sr^{2+} (4 mM) na solução.

3.5.3- Dose letal média ($\text{DL}_{50\%}$) do veneno de *M. altirostris* em pintainhos

A letalidade do veneno de *M. altirostris* foi determinada em pintainhos HY-LINE W36. Foram utilizados grupos com seis pintainhos cada. Diferentes concentrações do veneno (34, 40, 48, 58 e 70 µg/kg) foram injetadas no músculo peitoral com 50 µL de 0,85% NaCl. A dose que matou 50% dos pintainhos em 72 h foi determinada por análise “probit” (Finney, 1971). A DL_{50} do veneno de *M. altirostris* em camundongos (0,255 mg/kg, i.p.) foi determinada por Moraes et al., (2003) e este valor foi utilizado nos experimentos de imunização, descritos a seguir.

3.5.4- Neutralização do veneno

- ***in vivo***

A potência do antiveneno elaborado em cavalos (antiveneno comercial) e do anti-soro produzido em coelhos foi baseada em sua habilidade para neutralizar a letalidade do veneno (Gutiérrez et al., 1990). A neutralização *in vivo* foi testada em camundongos machos SWISS, DL_{50} 0,255 mg/kg, (Moraes et al., 2003) e pintainhos machos HY-LINE

W36 (DL₅₀ 0,042 mg/kg), injetados i.p. and i.m., respectivamente, com 5 DL₅₀ do veneno pré-incubado com várias concentrações do antiveneno ou do anti-soro (n=6 animais/grupo). As razões veneno:antiveneno ou anti-soro usadas em todos os ensaios foram 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 e 1:20 (p/v), e inicialmente baseadas, assumindo-se que 1 mL do antiveneno neutraliza 1,5 mg do veneno de *Micrurus* spp., como descrito na embalagem do antiveneno comercial. A letalidade foi determinada pelo número de animais mortos até 72h da injeção do veneno, pré-incubado com o antiveneno ou com o anti-soro.

- *in vitro*

A neutralização *in vitro* foi testada em preparações isoladas nervo frênico-diafragma de camundongo e biventer cervicis de pintainho com o veneno (1µg/mL) pré-incubado por 30 minutos com várias concentrações do antiveneno ou do anti-soro (n=6). A razão veneno:antiveneno ou anti-soro usada em todos os ensaios foram 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 e 1:20 e inicialmente baseadas, assumindo-se que 1 mL do antiveneno neutraliza 1,5 mg do veneno de *Micrurus* spp., como descrito na embalagem do antiveneno comercial.

3.6- Ensaios bioquímicos

3.6.1- Determinação da atividade fosfolipásica

A determinação da atividade fosfolipásica foi realizada segundo o método descrito por Cho e Kédzy (1991) e Holzer e Mackessy (1996). O substrato foi ácido 4-nitro-3 (octanoiloxi) benzóico. Foram utilizadas amostras do veneno total de *Micrurus altirostris* com uma concentração de 1 µg/mL. As amostras foram incubadas junto com o substrato, tampão de reação (Tris-HCl 0,1 M, Ca²⁺ 0,1 M, pH 8). Uma amostra do veneno total de *Crotalus durrisus terrificus* foi também utilizada como controle positivo. A reação enzimática foi lida a 425 nm à temperatura de 37° C, de dois em dois minutos, durante 30 minutos, em um leitor de placas de 96 poços (Spectramax 340, Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA) com amostras em triplicata.

3.6.2- Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa Source 15 RPC

Foi utilizada uma coluna do tipo Source 15 RPC (0,5 x 5 cm, GE/Amersham Pharmacia Biotech). O veneno de *Micrurus altirostris* (10 µg/mL) foi aplicado à coluna pré-equilibrada com ácido trifluoracético (ATF, 0,1%). O material foi eluído com um gradiente não-linear (0-100%) de acetonitrila (ACT) 90% em ATF 0,1%. Em todos os ensaios, o perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. As frações resultantes foram liofilizadas e testadas em sua atividade biológica.

3.6.3- Cromatografia em HPLC de coluna fase reversa de alta eficiência

Para verificar a pureza dos picos de interesse, eluídos na cromatografia do veneno total em coluna do tipo Sephasil Peptide C8 5 µm St 4.6/250, bem como o grau de hidrofobicidade destas proteínas, utilizou-se o equipamento Akta Purifier (GE/Amersham Pharmacia Biotech). Para esta cromatografia (etapa 2), foi aplicada a fração com maior atividade na junção neuromuscular, resultante da etapa 1 acima, na coluna pré-equilibrada com ATF 0,1%. Utilizou-se um gradiente não-linear de 0 a 100% de solução de acetonitrila 90% em 0,1% de ATF. As amostras monitoradas a 214 e 280 nm e em seguida liofilizadas e testadas em sua atividade biológica. Uma nova cromatografia (etapa 3) da fração mais ativa, obtida na etapa 2, foi efetuada, seguindo-se o mesmo procedimento da etapa 2.

3.6.4- Concentração protéica

As concentrações protéicas, tanto das soluções de veneno total quanto das frações cromatográficas foram determinadas, baseando-se na absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kottron Instruments). Neste caso, uma absorbância de $A_{280\text{nm}}$ de 1,0 (em cubeta de 1 cm) corresponde à concentração de 1,0 mg/mL. A dosagem de proteínas também foi feita utilizando-se o método descrito por Lowry et al. (1951). A amostra com solução de proteína foi diluída oito vezes em volume final de 200 µL e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos com 1 mL de reagente cuproalcalino,

constituído de solução A (carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 N, p/v), solução B1 (sulfato de cobre 1% em H₂O, p/v) e da solução B2 (tartarato de sódio e potássio 2% em H₂O, p/v) na proporção de 100:1:1 v/v, respectivamente. Em seguida foram adicionados 50 µL de reagente de Folin (Merck), deixando-se por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Posteriormente, foi lida absorbância a 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva padrão de soro albumina bovina, com concentrações de 0 a 400 µg/mL.

3.7- Análise estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos \pm erro padrão. A significância foi examinada através do teste ANOVA/MANOVA para medidas repetidas e considerada como sendo $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Atividade neuromuscular do veneno de *Micrurus altirostris*

O veneno de *Micrurus altirostris* produziu bloqueio neuromuscular irreversível, tanto em preparações isoladas de ave, músculo biventer cervicis de pintainho (Figura 4A), quanto em preparações isoladas de mamífero, nervo frênico-diafragma de camundongo (Figura 4B), sob estimulação elétrica indireta, em todas as concentrações testadas em ave e na maioria das concentrações testadas em mamífero, à 37°C.

A potente ação bloqueadora do veneno foi completa e irreversível a partir de baixas concentrações (0,1 µg/mL em pintainhos e 1,0 µg/mL em camundongos). Os registros miográficos demonstraram o bloqueio tempo e concentração-dependente em ambas as preparações (Figuras 5 e 6). Todas as respostas foram significativamente diferentes, comparadas ao controle ($p < 0,05$), no entanto, com relação às maiores concentrações ensaiadas, comparadas entre si (5 e 10 µg/mL), não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

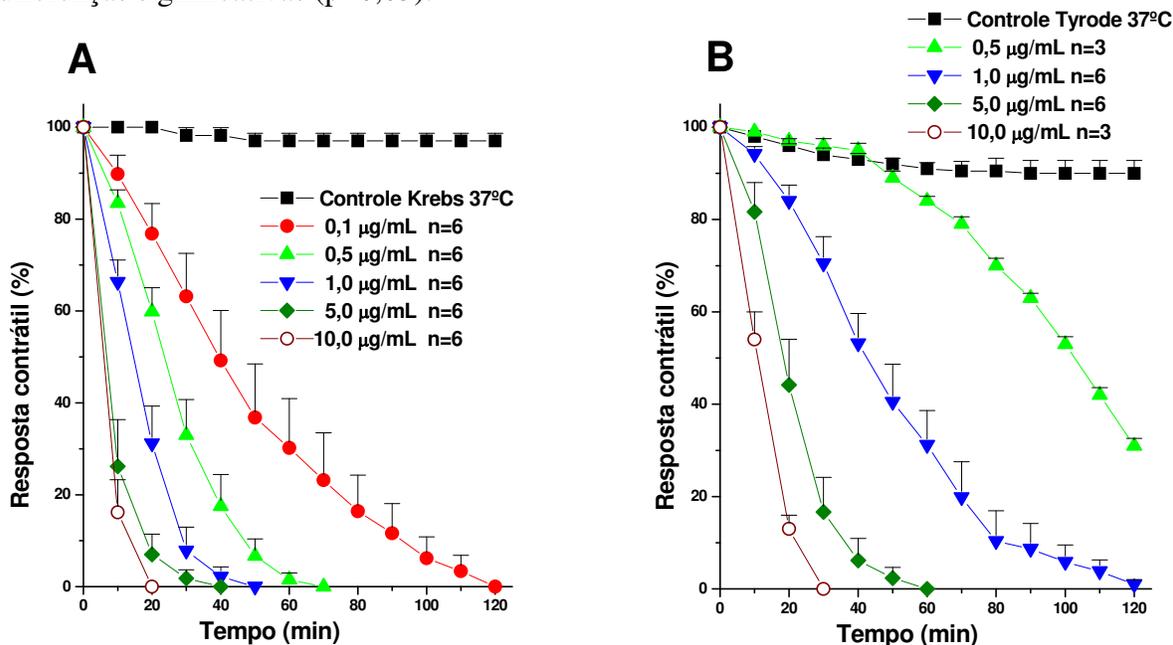


Figura 4- Representação gráfica do efeito bloqueador neuromuscular, induzido pelo veneno de *Micrurus altirostris* em preparações isoladas biventer cervicis de pintainho (A) e nervo frênico-diafragma de camundongo (B), sob estimulação elétrica indireta, a 37°C. Note o bloqueio tempo e concentração-dependente, produzido pelo veneno, comparado aos controles Krebs (A) e Tyrode (B). Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 3 a 6 experimentos ($p < 0,05$).

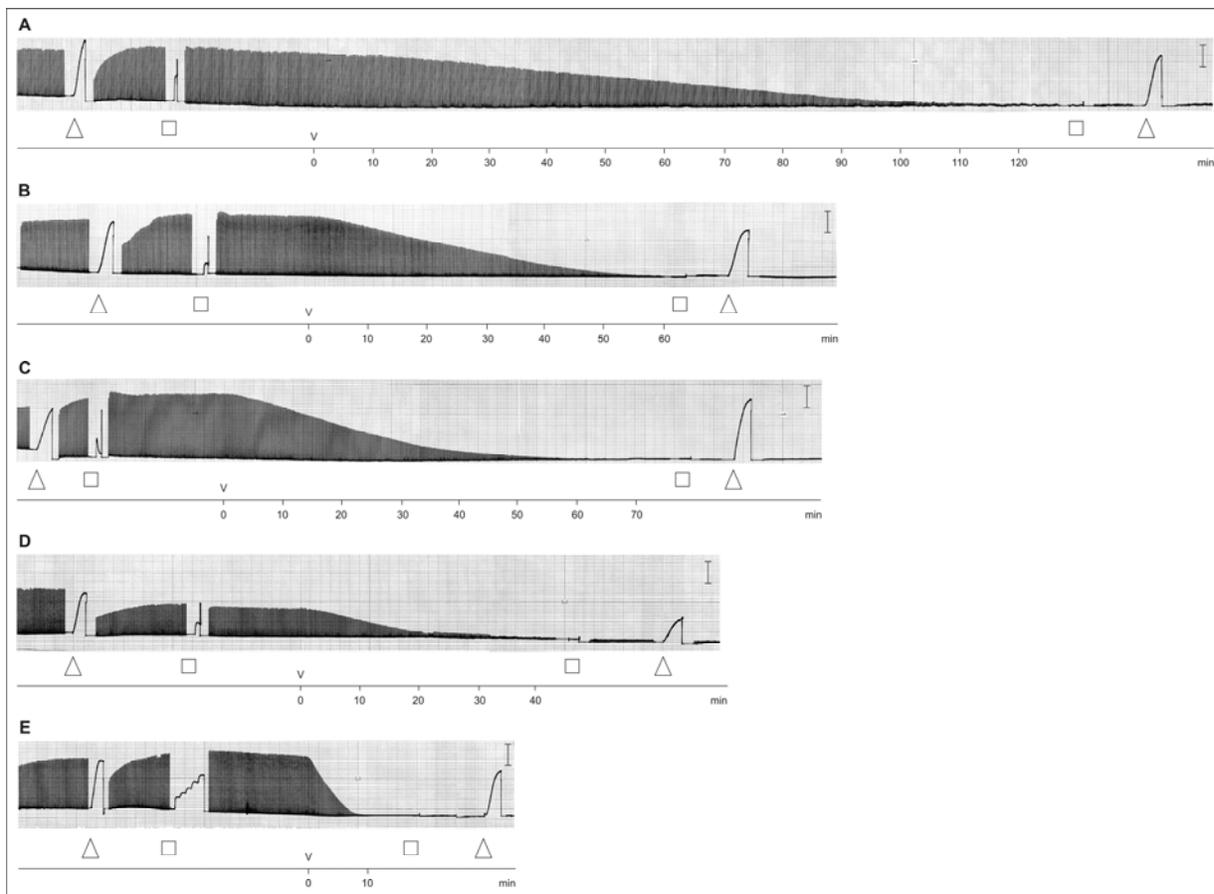


Figura 5- Registro miográfico da resposta contrátil em preparações biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, a 37°C, mostrando a ação tempo e concentração-dependente, do veneno de *Micrurus altirostris*; a ausência de resposta à ação da ACh exógena e a manutenção da resposta ao KCl. Em (A), concentração de 0,1 µg/mL. Em (B), 0,5 µg/mL. Em (C), 1,0 µg/mL. Em (D), 5,0 µg/mL. Em (E), 10,0 µg/mL; neste ensaio foram utilizadas doses cumulativas de ACh (5, 10, 20, 40 e 80 µg/mL). As respostas à ACh (□, 110 µM) e ao KCl (Δ, 20 mM) foram obtidas antes e após a adição do veneno. Os registros mostrados aqui são representativos de 6 experimentos. V - veneno. Barra vertical = 1g de tensão.

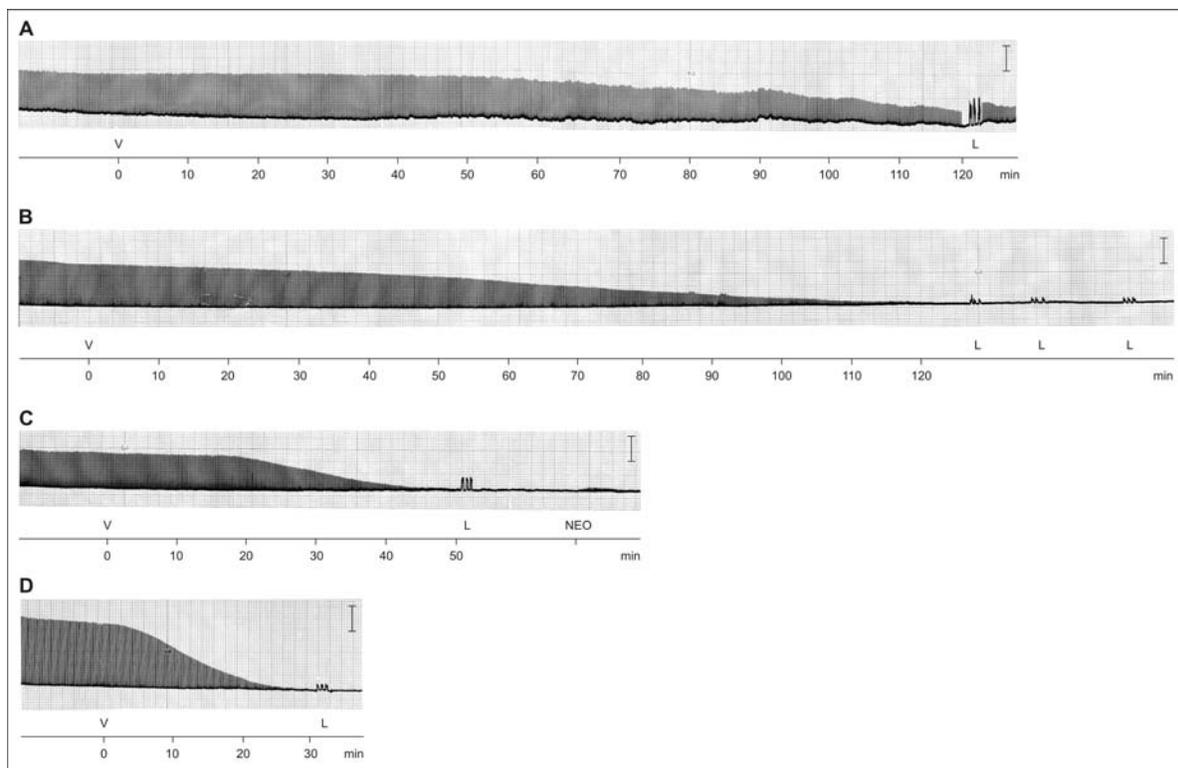


Figura 6- Registro miográfico da resposta contrátil em preparações nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, a 37°C, mostrando a ação do veneno de *Micrurus altirostris*, tempo e concentração-dependente. Em (A), 0,5 µg/mL. Em (B), 1,0 µg/mL; note que não há reversão do bloqueio neuromuscular, mesmo após sucessivas lavagens. Em (C), 5,0 µg/mL; notar a ausência de reversão do bloqueio, após a adição da neostigmina (2,5 µg/mL). Em (D), 10,0 µg/mL. Os registros miográficos são representativos de 3-6 experimentos. V - veneno. L - lavagem. NEO - neostigmina. Barra vertical = 5g de tensão.

Comparadas ambas as preparações isoladas, de ave e de mamífero, a preparação biventer cervicis de pintainho mostrou-se mais sensível à ação do veneno do que a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. O tempo para que ocorresse 50% de bloqueio da resposta contrátil, com a concentração de 1 µg de veneno/mL, foi de 16±2 min (n=6) em pintainhos e 44±6 min (n=6) em camundongos, $p < 0.05$ (Figura 7).

Por outro lado, não houve diferença significativa da sensibilidade, entre as preparações testadas, quando utilizadas as maiores concentrações (5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Figura 7).

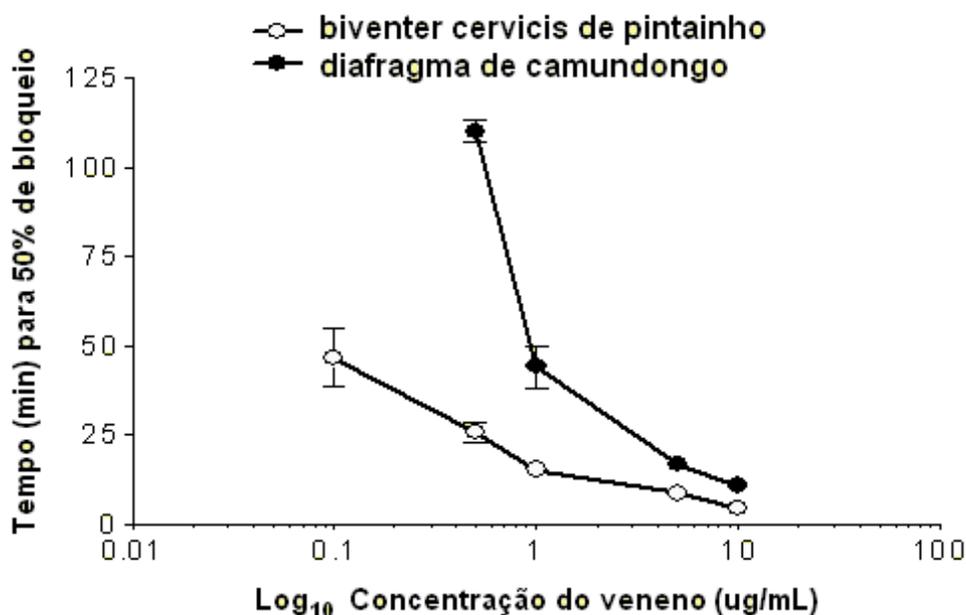


Figura 7- Comparação gráfica da sensibilidade das preparações isoladas biventer cervicis de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo (37°C), por ação do veneno de *Micrurus altirostris*. A preparação de pintainho foi significativamente mais sensível ao efeito bloqueador, do que a preparação de camundongo (até 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0,05$). Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 3-6 experimentos.

Nos ensaios, utilizando preparações isoladas biventer cervicis de pintainho, o veneno de *Micrurus altirostris* bloqueou completamente as contraturas provocadas pela adição da acetilcolina (ACh) exógena (mesmo em doses cumulativas: 5, 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou do carbacol (CCh) em todas as concentrações de veneno testadas, sem contudo afetar as contraturas provocadas pela adição do KCl ao banho (Figuras 5, 8 e Tabela 1).

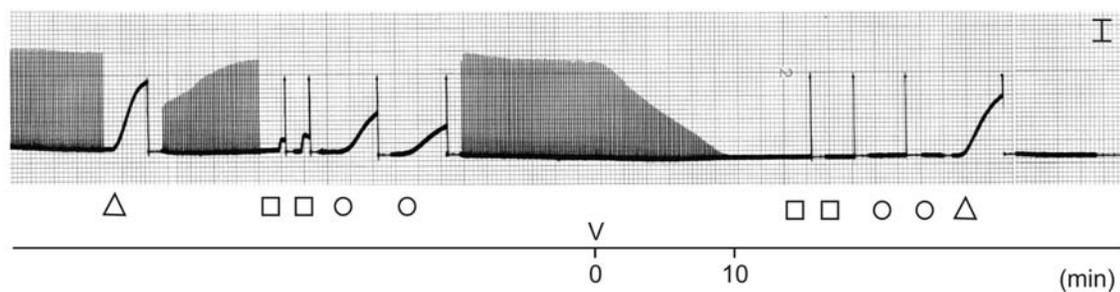


Figura 8- Registro miográfico da resposta contrátil em preparação isolada biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, a 37°C, mostrando a ação bloqueadora do veneno de *Micrurus altirostris* (10µg/mL), a ausência de respostas à ação da ACh exógena e do CCh e a manutenção da resposta ao KCl. As respostas à ACh (□ - 110 µM), ao CCh (○ - 8 µM) e ao KCl (Δ - 20 mM) foram obtidas antes e após a adição do veneno. Os registros mostrados aqui são representativos de 6 experimentos. V – veneno. Barra vertical = 1g de tensão.

Tabela 1- Respostas por ação da ACh exógena (110 µM), do CCh (8 µM) e do KCl (20 mM), porcentagem de contratura, em músculo biventer cervicis de pintainho, após 120 minutos de incubação com o veneno de *Micrurus altirostris* (0,1 µg/mL). Os resultados (média ± E.P.M., n=6) foram expressos como uma porcentagem do valor antes da adição do veneno.

Agonistas	Antes da adição do veneno (%)	Após a adição do veneno (%)
ACh	100	0
CCh	100	0
KCl	100	94 ± 10

Nos experimentos realizados para a determinação da cinética do veneno de *Micrurus altirostris* (0,1 µg/mL) em preparações biventer cervicis de pintainho, o bloqueio das contraturas, provocadas pela acetilcolina exógena, mostrou-se tempo-dependente, ocorrendo de maneira rápida e completa em 15 minutos após a adição do veneno. (Figura 9 e Figura 5A).

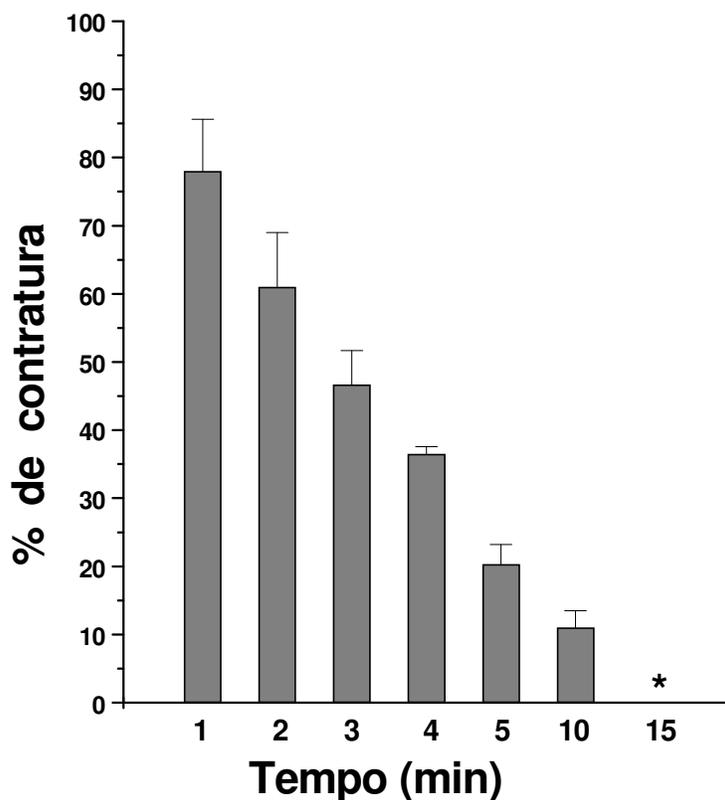


Figura 9- Cinética da ação do veneno de *Micrurus altirostris* (0,1 µg/mL) em preparações isoladas biventer cervicis de pintainho, sobre as contraturas provocadas pela adição da ACh. A extensão do bloqueio dos receptores nicotínicos foi avaliada pela quantificação das contraturas de uma concentração fixa de ACh (110 µM) até a ocorrência do bloqueio total, observada em 15 minutos (*). Os resultados foram expressos como uma porcentagem do controle, anterior à adição do veneno como (100%). As colunas representam a média ± E.P.M. de 3-6 experimentos.

A *d*-tubocurarina bloqueia a resposta contrátil em preparações isoladas de mamífero, nervo frênico-diafragma de camundongo. Esse bloqueio, no entanto, pode ser revertido por ação da neostigmina (Figura 10). O bloqueio neuromuscular, causado pelo veneno de *Micrurus altirostris*, não pôde ser revertido, após sucessivas lavagens (Figura 6B), tampouco pela adição da neostigmina (2,5 µg/mL) ao banho de incubação, em preparações isoladas de mamífero (Figura 6C). Resultado semelhante foi observado em preparações de ave, biventer cervicis de pintainho.

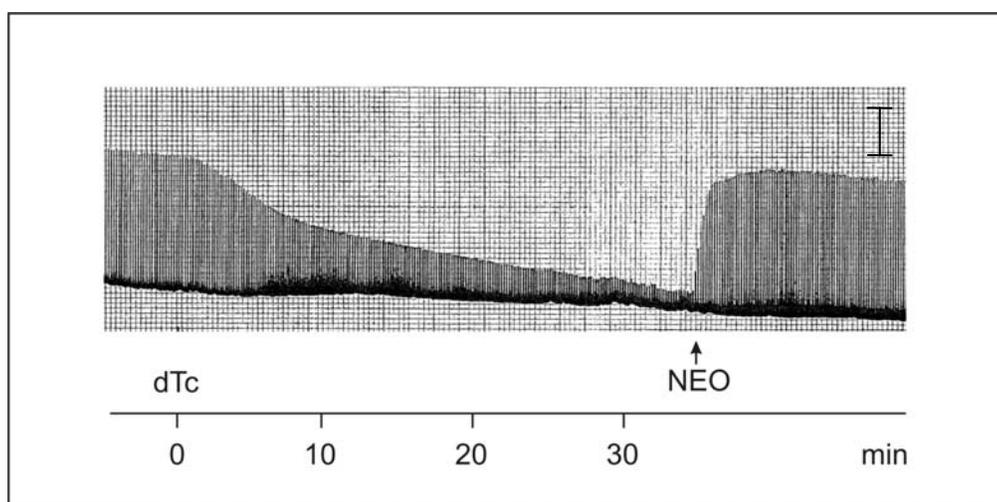


Figura 10- Registro miográfico da resposta contrátil em preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta (37°C) e curarizada. Note a reversão do bloqueio, após a adição de neostigmina (2,5 µg/mL). dTc – *d*-tubocurarina. NEO – neostigmina. Barra vertical = 5g de tensão.

Em preparações isoladas nervo frênico-diafragma de camundongo, submetidas, simultaneamente, a estímulo elétrico indireto e direto e em seguida incubadas com dTc (1µg/mL), observa-se o bloqueio completo da resposta contrátil aos estímulos indiretos. No entanto, obtém-se a reversão total das respostas musculares, após a lavagem da preparação (Figura 11).

Em preparação curarizada nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação direta (37°C) e incubada com o veneno de *Micrurus altirostris* (10 µg/mL), não se observa qualquer alteração visível no registro miográfico das contrações musculares (Figura 12A).

A substituição do íon Ca^{2+} (1.8 mM) pelo íon Sr^{2+} (4 mM) na solução nutritiva de Tyrode (Figura 12B), não determinou qualquer alteração na atividade bloqueadora neuromuscular do veneno (10 µg/mL). Além disso, quando as preparações nervo frênico-diafragma de camundongo e biventer cervicis de pintainho (Figura 13) foram incubadas à temperatura de 22°C, ao invés de 37°C, observou-se a manutenção do efeito bloqueador neuromuscular do veneno.

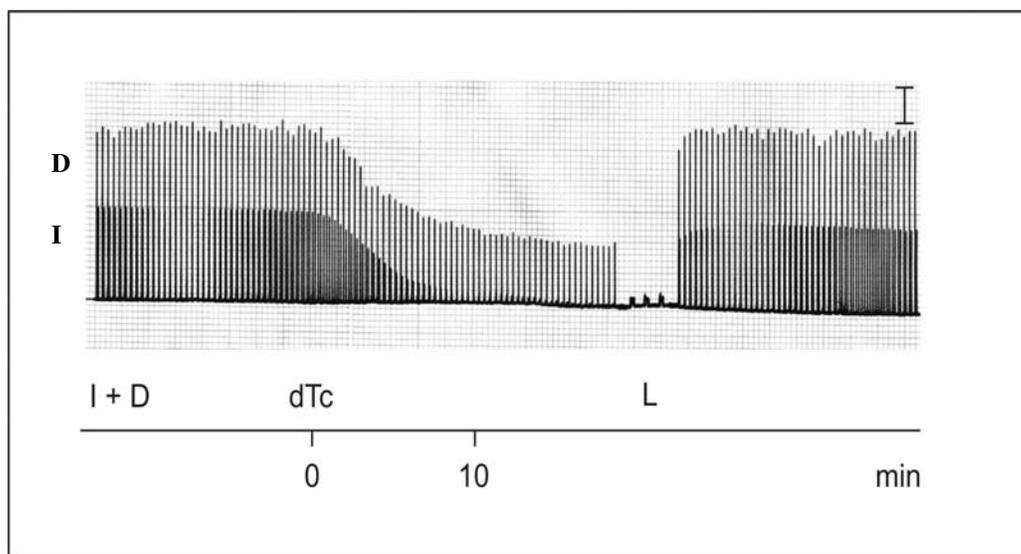


Figura 11- Registro miográfico da resposta contrátil em preparação isolada nervo frênico-diafragma de camundongo, submetida simultaneamente a estímulos indiretos e diretos (37°C) e curarizada. Note a reversão do bloqueio, obtida após a lavagem da preparação. I - estímulos indiretos. D - estímulos diretos. *dTc* - *d*-tubocurarina. L - lavagem. Barra vertical = 5g de tensão.

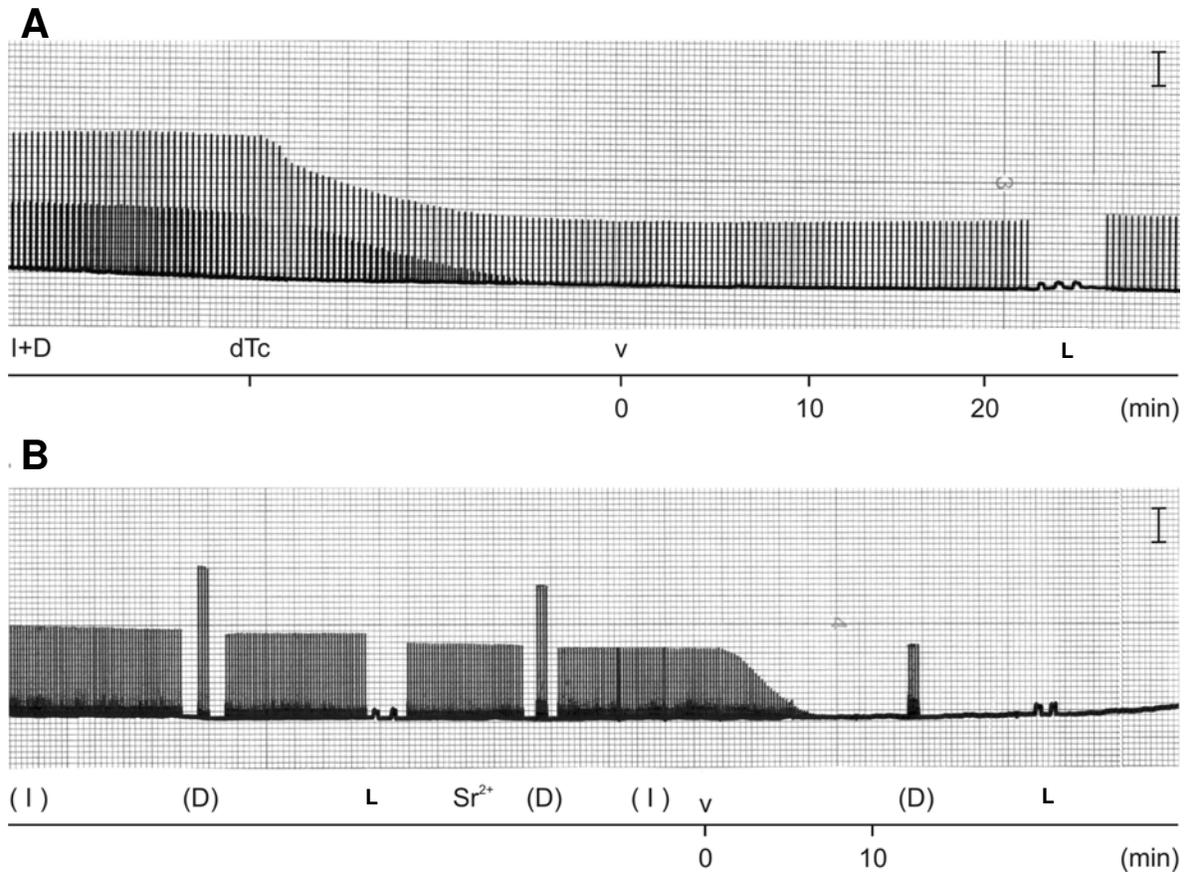


Figura 12- (A) Registro miográfico da preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, curarizada sob estimulação elétrica direta, mostrando que o veneno de *Micrurus altirostris* (10 µg/mL) não interfere na resposta contrátil. Em (B) registro representativo da resposta contrátil e bloqueio neuromuscular não-dependente de íons Ca²⁺, em preparação isolada nervo-frênico diafragma de camundongo, incubada com o veneno de *Micrurus altirostris* (10 µg/mL) à 37°C. Neste experimento, o íon Ca²⁺ (1.8 mM) na solução de Tyrode foi substituído pelo íon Sr²⁺ (4 mM), 20 minutos antes da adição do veneno. Notar a persistência do bloqueio neuromuscular. D- estimulação direta, indicando a integridade da membrana do músculo; I- estimulação indireta; dTc - *d*-tubocurarina, V - veneno, W - lavagens. Barra vertical = 5 g de tensão.

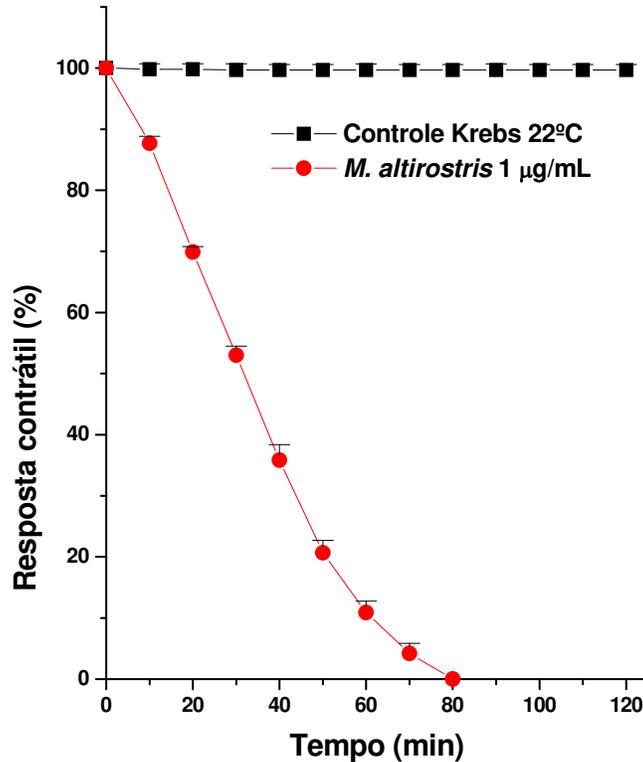


Figura 13- Representação gráfica do efeito bloqueador neuromuscular, induzido pelo veneno de *Micrurus altirostris* (1µg/mL) em preparações isoladas biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta, a 22°C. Note o bloqueio neuromuscular não-dependente da temperatura, produzido pelo veneno, comparado ao controle Krebs. Os pontos representam a média ± E.P.M. de 3 experimentos (p<0,05).

4.2- Neutralização da neurotoxicidade pelo antiveneno comercial

Quando o antiveneno foi pré-incubado com o veneno (1 µg/mL; 30 minutos; 37°C), na proporção indicada pelo fabricante (1 mL do antiveneno neutraliza 1,5 mg do veneno de *Micrurus* spp.), observou-se um bloqueio semelhante ao causado por ação do veneno, sem incubação prévia, mostrado na Figura 14A.

O antiveneno comercial foi incapaz de prevenir o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno em ambas as preparações e, igualmente, de impedir a inibição da contração causada pela ACh nas preparações biventer cervicis de pintainho.

Aumentando-se em dez vezes a proporção do antiveneno, foi possível neutralizar o efeito bloqueador neuromuscular, característico deste veneno. No entanto, esta proporção (10:1) foi ainda insuficiente para inibir a ação do veneno sobre a contratura pela ACh (Figura 14B).

Um aumento de vinte vezes na proporção do antiveneno (20:1), no entanto, determinou $109\pm 2\%$ e $88\pm 3\%$ de proteção contra o bloqueio neuromuscular em preparações de mamífero e de ave, respectivamente (Figura 15) e, também, impediu a ação do veneno sobre a resposta contraturante da ACh (Fig. 14C e Tabela 2), independentemente da pré-incubação da mistura do veneno:antiveneno 30 minutos antes do teste, ou da adição simultânea do veneno:antiveneno ao banho.

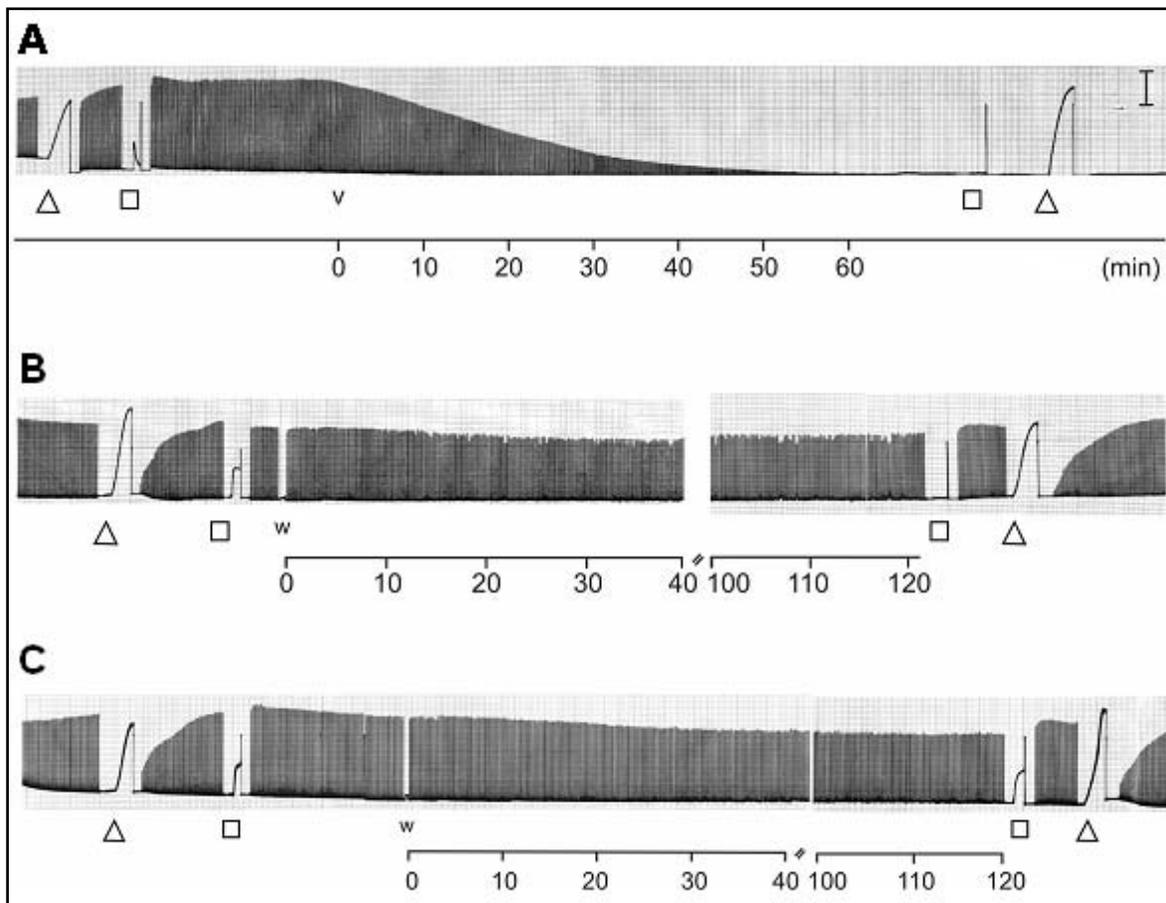


Figura 14- Registro miográfico representativo da resposta contrátil ao estímulo indireto em preparações biventer cervicis de pintainho. **A-** bloqueio tempo-dependente produzido pelo veneno de *Micrurus altirostris* (1 µg/mL). **B e C-** neutralização, pelo antiveneno comercial, do bloqueio induzido pelo veneno. Em **B**, foi efetuado um aumento de 10 vezes na proporção do antiveneno, indicada pelo fabricante (1 mL de antiveneno neutraliza 1,5 mg do veneno de *Micrurus* spp.). Em **C**, uma elevada concentração do antiveneno (aumento de 20 vezes na proporção indicada na ampola pelo fabricante) foi requerida para neutralizar a ação neuromuscular do veneno. As respostas à ACh exógena (□, 110 µM) e ao KCl (Δ, 20 mM) foram obtidas antes e após a adição do veneno ou da mistura veneno:antiveneno. Os registros mostrados aqui são representativos de 6 experimentos. V - veneno. Barra vertical = 1 g.

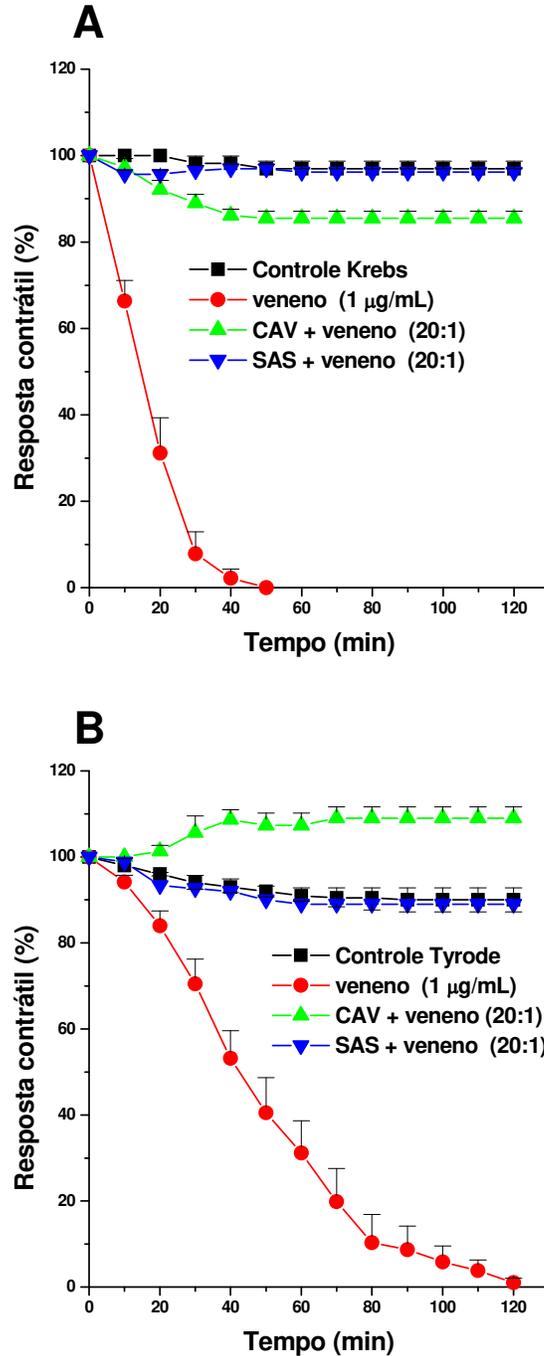


Figura 15- Representação gráfica do bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de *Micrurus altirostris* (1 µg/mL) em preparações isoladas, sob estimulação indireta. Em (A) preparação biventer cervicis de pintainho e em (B) preparação nervo frênico-diafragma de camundongo e da proteção pelo antiveneno comercial (CAV) e pelo anti-soro específico produzido em coelhos (SAS). Os pontos representam a média ± E.P.M.de 6 experimentos.

Tabela 2- Contraturas produzidas por ação da ACh (110 μ M) e do KCl (20 mM) em preparações isoladas músculo biventer cervicis de pintainho após 120 min de incubação com o veneno de *Micrurus altirostris*, veneno + antiveneno comercial (CAV) ou veneno + anti-soro específico (SAS). Os resultados (média \pm E.P.M., n=6) foram expressos como uma porcentagem dos valores medidos antes da adição do veneno.

Agonistas	Antes da adição do veneno (%)	Após a adição do veneno (%)	Após veneno + CAV (1:20) (%)	Após veneno + SAS (1:20) (%)
ACh	100	0	108 \pm 6	52 \pm 3
KCl	100	94 \pm 10	90 \pm 10	100 \pm 5

4.3- Neutralização da neurotoxicidade pelo anti-soro específico produzido em coelhos

Embora os acidentes causados por serpentes do gênero *Micrurus* sejam raros, o efeito neurotóxico, característico dos venenos de serpentes desse gênero, constitui o principal fator responsável pela morte, por parada respiratória, dos indivíduos picados.

Levando-se em conta que o antiveneno comercial produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, não foi completamente eficiente em neutralizar a neurotoxicidade do veneno de *Micrurus altirostris*, um anti-soro específico contra o veneno de *M. altirostris* foi produzido em coelhos.

A imunização em coelhos resultou na produção de um anti-soro específico que, no entanto, quando pré-incubado com o veneno de *Micrurus altirostris* (1 μ g/mL), na mesma proporção indicada para o antiveneno comercial (1:1,5), foi incapaz de neutralizar o bloqueio neuromuscular, em ambas as preparações e, igualmente, não impediu a inibição da contratura pela ACh nas preparações biventer cervicis de pintainho.

Com um aumento de dez vezes na proporção anti-soro: veneno, foi possível neutralizar parcialmente o efeito bloqueador neuromuscular em preparações de ave (52 \pm 6%) e de mamífero (92 \pm 3%). Esta proporção (10:1) foi ainda insuficiente para inibir a ação do veneno sobre a contratura pela ACh.

Um aumento de vinte vezes na proporção do antiveneno (20:1), no entanto, determinou $109\pm 2\%$ e $88\pm 3\%$ de proteção contra o bloqueio neuromuscular em preparações de mamífero e de ave, respectivamente (Figura 15), reduzindo a ação do veneno sobre a contratura provocada por ação da ACh exógena ($53\pm 2\%$, Tabela 2), independentemente da pré-incubação da mistura do veneno:anti-soro 30 minutos antes do teste, ou da adição simultânea do veneno:anti-soro ao banho.

4.4- Neutralização da letalidade pelo antiveneno comercial e pelo anti-soro produzido em coelhos

A dose letal intramuscular ($DL_{50\%}$) do veneno de *Micrurus altirostris*, calculada neste trabalho para pintainhos foi de 0,042 mg/kg. Esse resultado demonstrou ser consideravelmente menor que o resultado da $DL_{50\%}$ intraperitonal para camundongos (0,255 mg/kg). Ambas as doses letais foram utilizadas como parâmetros nos ensaios realizados para avaliação da capacidade neutralizante sobre 5 $DL_{50\%}$, tanto do antiveneno, quanto do anti-soro específico.

Com relação à letalidade (número de animais mortos até 72h da injeção do veneno, pré-incubado com o antiveneno ou com o anti-soro específico), os ensaios demonstraram que o antiveneno comercial, de maneira geral, proveu maior proteção do que o anti-soro específico, produzido em coelhos (Tabela 3).

Entretanto, a proporção do antiveneno:veneno ou anti-soro:veneno que proveu a proteção completa contra 5 $DL_{50\%}$ do veneno, nas duas espécies testadas, foi a de 20:1 (Tabela 3), reafirmando os resultados obtidos para a proteção *in vitro* (Figura 15).

Tabela 3- Neutralização da letalidade causada pelo veneno de *Micrurus altirostris* (5 DL₅₀) em pintainhos (DL₅₀ 0,042 mg/kg) e camundongos (DL₅₀ 0,255 mg/kg) após pré-incubação com várias concentrações do antiveneno comercial ou anti-soro específico (n=6 animais/grupo).

Proporção veneno:antiveneno	Pintainhos		Camundongos	
	mortes após 72 h		Mortes após 72 h	
	Antiveneno comercial	antiveneno específico	Antiveneno Commercial	antiveneno específico
1:1	5/6	6/6	5/6	6/6
1:2,5	6/6	6/6	5/6	6/6
1:5	6/6	6/6	3/6	6/6
1:10	5/6	6/6	2/6	6/6
1:20	0/6	0/6	0/6	0/6

4.5- Atividade fosfolipásica do veneno

O veneno de *Micrurus altirostris* apresentou aproximadamente a metade da atividade fosfolipásica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, utilizada como controle positivo: absorbâncias (A_{425nm}) $0,22767 \pm 0,0318$ e $0,4745 \pm 0,0055$, respectivamente (Figura 16).

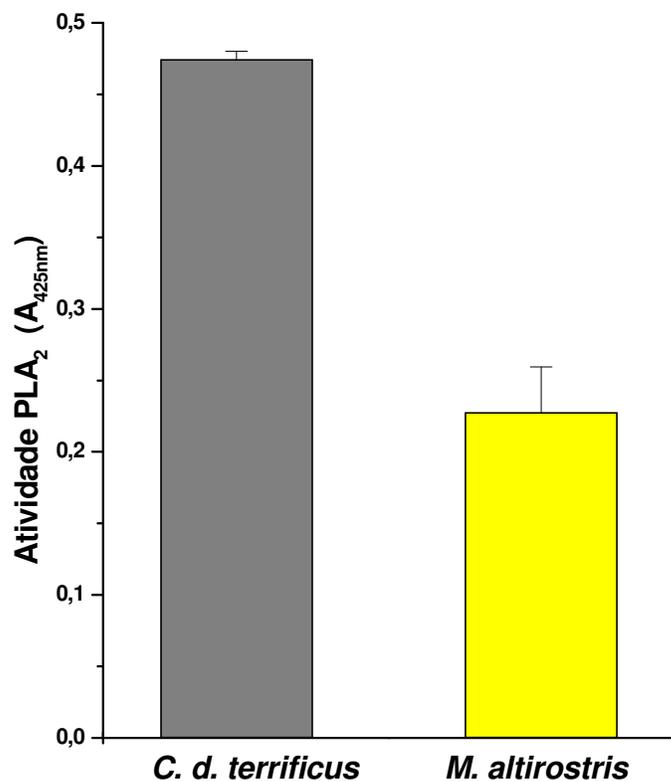


Figura 16- Atividade fosfolipásica (PLA₂) do veneno de *Micrurus altirostris*. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi também utilizado para comparação (controle positivo). O veneno de *M. altirostris* apresentou atividade significativamente menor ($p < 0,05$) que o veneno controle.

4.6- Ensaios cromatográficos

O veneno de *Micrurus altirostris* foi fracionado em três etapas. Na primeira etapa, utilizando a coluna Source 15 RPC, foram obtidos 12 picos, sendo que a atividade farmacológica (bloqueio da resposta contrátil) sobre a junção neuromuscular, em preparações biventer cervicis de pintainho, foi evidenciada nos picos IV, V, VI (Figura 17). O pico IV, no entanto, foi o que apresentou a maior potência bloqueadora neuromuscular.

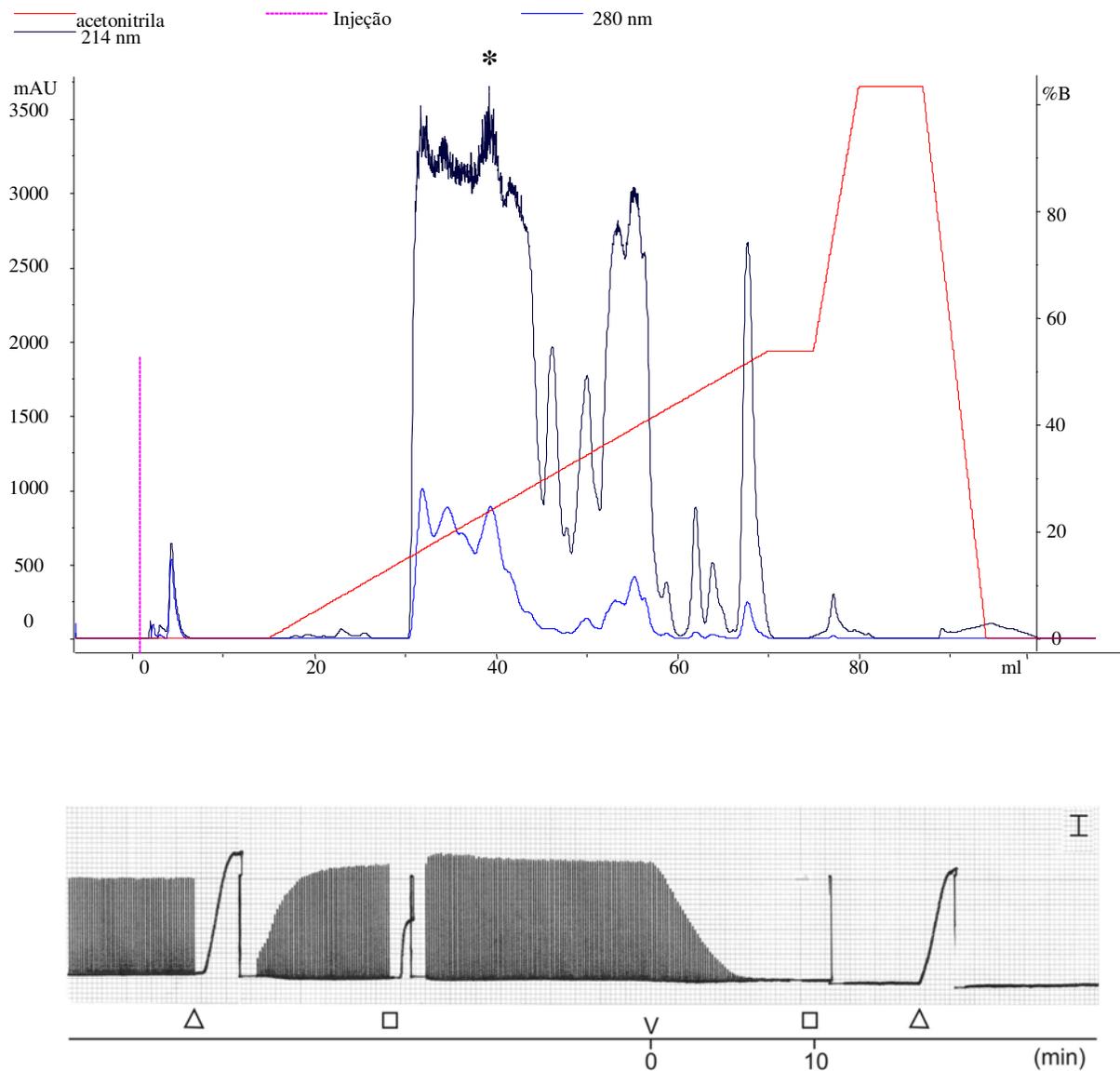


Figura 17- Perfil cromatográfico obtido na primeira etapa de fracionamento do veneno de *Micrurus altirostris* em coluna Source 15 RPC (*Pico IV, utilizado para refractionamento) e registro miográfico (preparação biventer cervicis de pintainho), mostrando a ação bloqueadora da fração.

Na segunda etapa, foi efetuada uma nova cromatografia, utilizando a coluna Sephasil Peptide C8 5 μm St 4.6/250, do pico IV e foram obtidos cinco novos picos, que foram igualmente testados em preparações biventer cervicis de pintainho. A atividade

biológica foi observada nos picos IV.1, IV.2, IV.3 e IV.4 (Figura 18), tendo o pico IV.3, apresentado o menor tempo de bloqueio e, portanto, refracionado na terceira etapa.

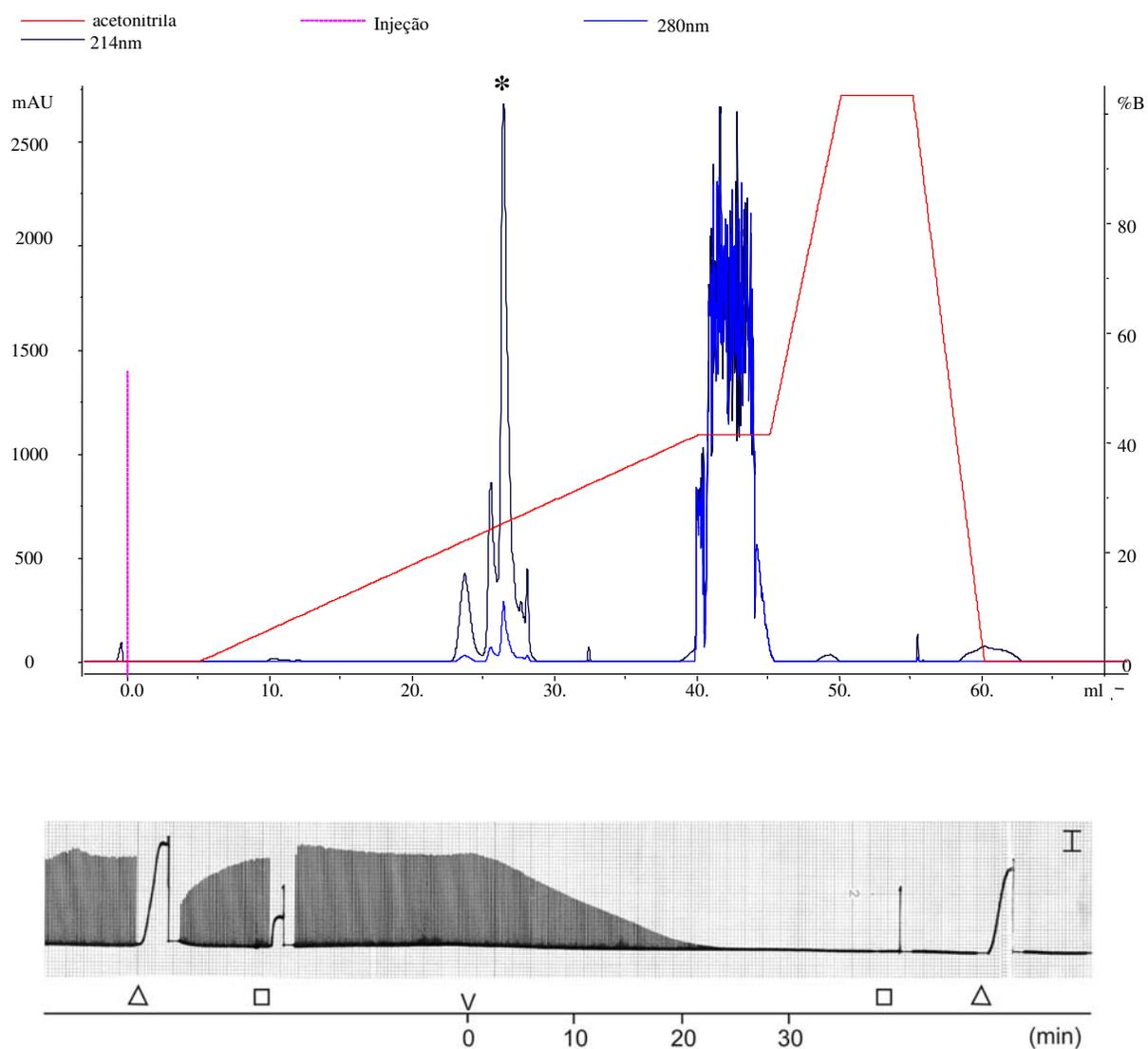


Figura 18- Perfil cromatográfico obtido na segunda etapa de fracionamento do veneno de *Micrurus altirostris*, em coluna Sephasil Peptide C8 5 μm St 4.6/250, pelo refracionamento do pico IV. (*Pico IV-3) e registro miográfico (preparação biventer cervicis de pintainho), mostrando a ação bloqueadora da fração.

Na terceira etapa, utilizando a mesma coluna Sephasil C-8, o pico IV.3 foi então refractionado, evidenciando cinco picos mais evidentes e um aglomerado de picos no final do espectro. O pico IV.3.2 representa a fração ativa na junção neuromuscular (Figura 19).

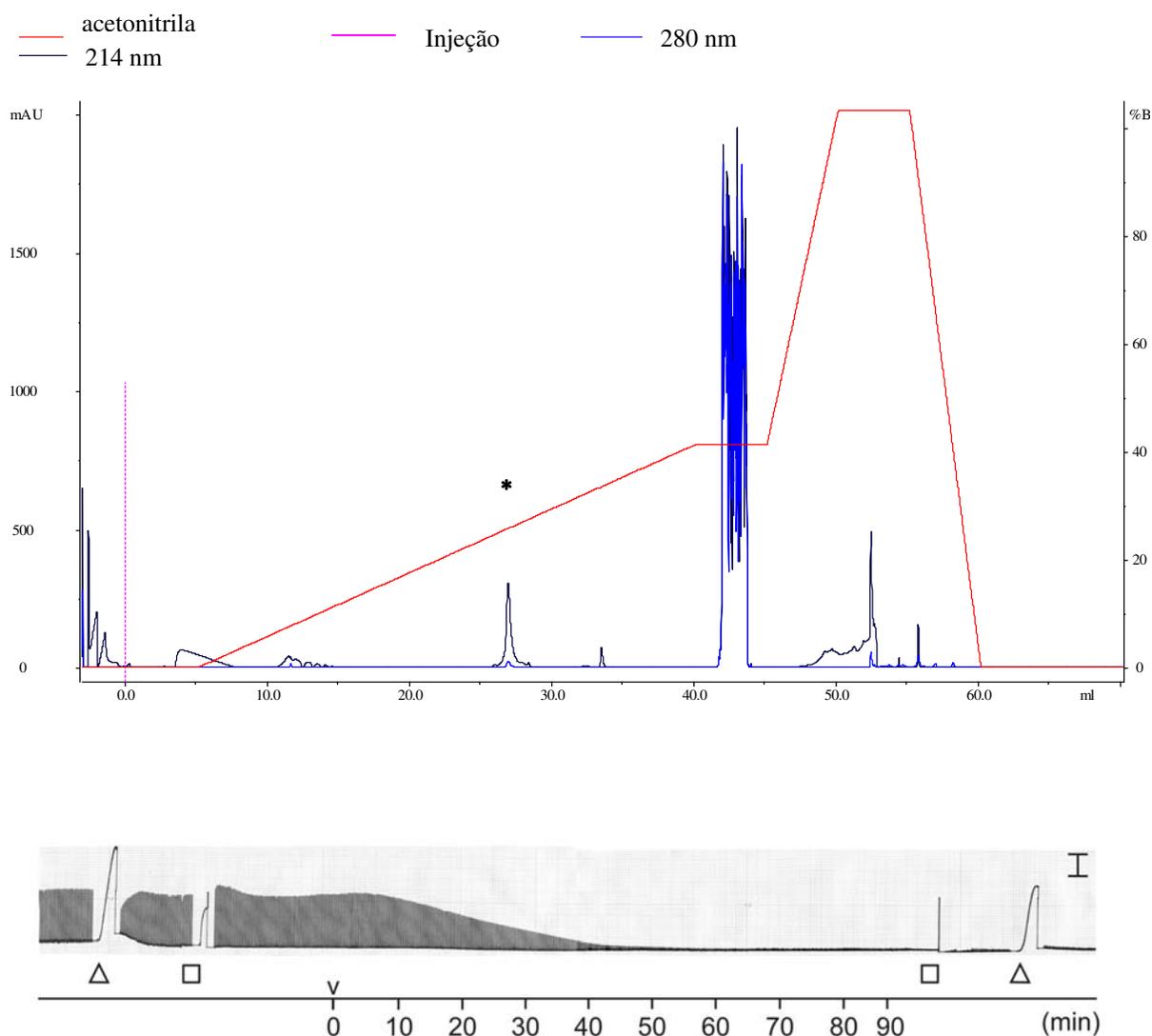


Figura 19- Perfil cromatográfico obtido na terceira etapa de fracionamento do veneno de *Micrurus altirostris*, em coluna Sephasil Peptide C8 5 μ m St 4.6/250, pelo refractionamento do pico IV-3 e registro miográfico (preparação biventer cervicis de pintainho), mostrando a ação bloqueadora da fração.

5- DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes do gênero *Micrurus* são muito conhecidos em razão de sua potente neurotoxicidade, que pode ser mediada por neurotoxinas pré e pós-sinápticas (Vital Brazil, 1965; Goularte et al., 1995 e Serafim et al., 2002).

A inibição neuromuscular, causada pelo veneno de serpentes corais, pode também envolver uma ação miotóxica tardia, como sugerido para o veneno de *Micrurus nigrocinctus* (Goularte et al., 1995). No entanto, esse mecanismo não é o principal agente responsável pelo bloqueio da junção neuromuscular, causado pelo acidente por serpentes corais Sul Americanas como, por exemplo, *M. corallinus* (Vital Brazil e Fontana, 1983; Cruz-Höfling et al., 1983/1984), *M. dumerilii carinicauda* (Serafim et al., 2002), *M. frontalis* (Vital Brazil et al, 1976/1977), *M. lemniscatus* (Vital Brazil, 1965; Cecchini et al., 2005) e *M. spixii* (Vital Brazil et al., 1995).

Nossos resultados indicaram que o veneno de *Micrurus altirostris*, assim como o de outras serpentes corais sul americanas, causou bloqueio neuromuscular irreversível, tempo e concentração-dependente *in vitro*, mesmo após sucessivas lavagens das preparações. Indicaram também que as preparações isoladas de ave (biventer cervicis de pintainho) mostraram-se bem mais sensíveis à ação do veneno, aproximadamente três vezes mais, do que as preparações isoladas de mamífero (nervo frênico-diafragma de camundongo).

O veneno exibiu potente neurotoxicidade, com bloqueio total da transmissão neuromuscular ocorrendo em presença de muito baixas concentrações do veneno de *Micrurus altirostris* (0,1 µg/mL em preparações de pintainho e 1 µg/mL em preparações de camundongo).

A grande potência neurotóxica do veneno, observada em preparações de ave, ficou bastante evidenciada pela alta letalidade em pintainhos (DL₅₀ 0,042 mg/kg, i.m.), quando comparada à letalidade provocada pelo veneno em camundongos (DL₅₀ 0,255 mg/kg, i.p., Moraes et al., 2003). Esse resultado reafirma os dados já referidos, de que as preparações de ave foram mais sensíveis do que as de preparações de mamífero. Este fato tem sido observado também no estudo de venenos de serpentes de outros gêneros (Cogo et al., 1993; Serafim et al., 2002; Damico et al., 2005; Cavalcante et al., 2007).

O veneno de *Micrurus altirostris* apresentou maior potência de letalidade em camundongos, em comparação com a letalidade provocada pelo veneno de outras serpentes do gênero *Micrurus*, com dose letal (DL₅₀) de 0,255 mg/kg, i.p. Os venenos de *M. frontalis* (DL₅₀ 0,965 mg/kg, i.p., Moraes et al., 2003) e de *M. corallinus* (DL₅₀ 0,355 mg/kg, i.p., Higashi et al., 1995) apresentaram menor potência de letalidade, embora Jorge da Silva e Aird (2001) tenham reportado a letalidade do veneno de *M. altirostris* como semelhante a essas outras duas espécies.

O veneno de *Micrurus altirostris* mostrou, ainda, possuir baixa latência, manifestada pela ação bloqueadora, iniciada imediatamente após a adição de diferentes concentrações do veneno à cuba. O bloqueio das respostas a estímulos indiretos e, também, a inibição das contrações provocadas por ação da ACh e do CCh, adicionados ao banho, demonstram uma potente ação predominantemente pós-sináptica desse veneno.

A cinética do bloqueio completo das contrações por ação da ACh, causada pelo veneno (0,1 µg/mL) em até 15 minutos, mostrou que a interação do veneno com os receptores nicotínicos, disponíveis na preparação, foi maximal nesse período de tempo (15 minutos), enquanto que o bloqueio completo das respostas musculares aos estímulos elétricos indiretos evocados, se deu somente após 120 minutos de incubação, confirmando a baixa latência do veneno.

Os venenos de *Micrurus frontalis altirostris* (hoje *Micrurus altirostris*), *M. f. brasiliensis*, *M. f. frontalis*, *Micrurus albicinctus*, *M. corallinus*, *M. fulvius fulvius*, *M. ibibiboca*, *M. lemniscatus ssp.*, *M. randonianus*, *M. spixii spixii*, e *M. surinamensis surinamensis* possuem atividade fosfolipásica e os níveis de atividade enzimática variam grandemente entre eles (Aird e da Silva, 1991).

A ação subsináptica do veneno de *M. altirostris*, quando comparada à ação do veneno de *M. nigrocinctus* (Goularte et al., 1995), mostrou-se ser independente de variações na temperatura do banho de incubação. Assim, o bloqueio neuromuscular provocado pelo veneno em estudo foi observado tanto a 22°C, como a 37°C, evidenciando que a temperatura não é um fator determinante do bloqueio. O bloqueio neuromuscular também se mostrou independente da presença do íon Ca²⁺ (1,8 mM) na solução Tyrode,

uma vez que persistiu mesmo após a sua substituição pelo íon Sr^{2+} (4mM). Essas duas abordagens farmacológicas sugerem que o bloqueio neuromuscular não está diretamente relacionado à atividade enzimática eventualmente presente no veneno total.

Por outro lado, o nível de atividade fosfolipásica (PLA_2) do veneno de *Micrurus altirostris*, em comparação à atividade do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, usado como controle, sugere não haver uma relação direta do nível dessa enzima com a intensidade do bloqueio neuromuscular produzido.

A fração neurotóxica, isolada do veneno bruto de *Micrurus altirostris* neste trabalho, mostrou-se igualmente potente em bloquear completamente a resposta contrátil em preparações neuromusculares isoladas de ave, com atuação nos receptores nicotínicos sub-sinápticos. No entanto, estudos ainda necessitam ser efetuados, a fim de se obter o seqüenciamento e a possível modelagem da fração neurotóxica.

Clinicamente, o tratamento com um inibidor da acetilcolinesterase como a neostigmina pode ser utilizado como medida auxiliar para se tentar reverter o bloqueio neuromuscular causado pelos venenos de *Micrurus*, que, predominantemente, contêm neurotoxinas pós-sinápticas (Vital Brazil e Vieira, 1996; Bucarechi et al., 2006). Entretanto, como também foi reportado para o veneno de *Micrurus nigrocinctus* (Goularte et al., 1995), a neostigmina não foi capaz de reverter o bloqueio neuromuscular *in vitro*, causado pelo veneno de *Micrurus altirostris*.

Os resultados dos experimentos efetuados, mostrando a não reversão da resposta contrátil por ação da neostigmina, sugerem que a toxina, responsável pela inibição dessa resposta, liga-se irreversivelmente aos sítios específicos nos receptores nicotínicos sub-sinápticos.

A inibição da contratatura em resposta ao KCl após a incubação com venenos de serpente é considerada na literatura como sendo um indicador de miotoxicidade (Harvey et al., 1994). A ausência de contratatura (elevação da linha de base no registro miográfico) por ação do veneno, nas preparações biventer cervicis de pintainho e nas preparações nervo frênico-diafragma de camundongo; bem como, a ausência de alterações significativas na

resposta ao KCl, após a adição do veneno, em preparações de pintainho e, ainda, a manutenção da resposta contrátil em preparações curarizadas de camundongo, submetidas a estímulos diretos indicaram que o veneno de *Micrurus altirostris* não apresentou efeito miotóxico evidente, pelo menos nas condições experimentais utilizadas, o que reforça a sugestão de que o bloqueio neuromuscular, causado pelo veneno, se dá devido à ligação deste veneno, ou de um componente do veneno, aos receptores nicotínicos sub-sinápticos.

Embora Moraes et al., (2003) tenham observado alterações morfológicas, após 1 h, em músculos de camundongos, injetados com o veneno de *Micrurus altirostris* (120 µg/kg, i.m.), mionecrose após 3 h e liberação maximal de CK, após 6 h da injeção do veneno, esse efeito miotóxico, no entanto, parece não estar diretamente relacionado ao bloqueio neuromuscular, observado nas condições experimentais deste estudo (0,1 a 10 µg/mL).

Com propriedade, o estudo farmacológico realizado com este veneno, mostrando diferenças específicas no mecanismo de ação, em relação ao veneno de *Micrurus frontalis*, bem como a não reversão do bloqueio pela neostigmina, reforçou a conclusão a que o estudo sistemático chegou: o de classificar *Micrurus frontalis altirostris*, como espécie plena, *Micrurus altirostris*, levando em conta os aspectos morfológicos (Jorge da Silva e Sites, 1999).

O efeito neurotóxico dos venenos de serpentes do gênero *Micrurus* constitui o principal fator responsável pela morte do indivíduo, por parada respiratória nos casos graves. O uso de antiveneno como terapia tem sido o principal suporte no tratamento de envenenamentos por cobra coral (Jorge da Silva Jr. et al., 2003; Bucarety et al., 2006) e pode prevenir a paralisia respiratória, se administrado precocemente (Kitchens e Mierop, 1987; Norris e Dart, 1989; Amuy et al., 1997).

Há ainda uma considerável discussão na literatura, com relação à reatividade cruzada e também à neutralização cruzada dos venenos de *Micrurus*, bem como à necessidade de um antiveneno poliespecífico para o tratamento efetivo dos pacientes intoxicados por uma série de espécies do Gênero *Micrurus* (Cohen e Seligman, 1966; Bolaños et al., 1978; Berger e Bhatti, 1989; Gutiérrez et al., 1990; Raw et al., 1991; Amuy et al., 1997; Prieto da Silva et al., 2001 e de Roodt et al., 2004).

Os venenos de serpentes do Gênero *Micrurus* são bons imunógenos, pois contêm muitas moléculas que promovem reatividade cruzada (Higashi et al., 1995). Por exemplo, o antiveneno para *Micrurus frontalis* neutraliza o efeito letal do veneno de *M. frontalis*, *Micrurus ibibiboca* e *M. spixii*, mas não neutraliza o efeito do veneno de *M. corallinus*. Por outro lado, o antiveneno para *Micrurus corallinus* neutraliza a letalidade do veneno de *M. corallinus*, mas não neutraliza a letalidade dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibibiboca* e *M. spixii* (Higashi et al., 1995).

De forma semelhante, o antiveneno preparado com uma mistura de venenos de *Micrurus nigrocinctus*, *M. mipartitus* e *M. frontalis* não apresentaram efeito neutralizador significativo contra o veneno de *M. surinamensis* (Bolaños et al., 1978).

O antiveneno comercial, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo (SP), contra os venenos de *Micrurus corallinus* e de *M. frontalis* neutraliza o efeito desses dois venenos com potências de 0,56 mg/mL e 0,8 mg/mL, respectivamente (Higashi et al., 1995).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que, tanto o antiveneno comercial elaborado no Instituto Butantan, quanto o anti-soro específico, produzido em coelhos contra o veneno de *Micrurus altirostris* apresentaram baixa eficácia em neutralizar a neurotoxicidade e a letalidade deste veneno, quando utilizadas as concentrações indicadas pelo fabricante do antiveneno comercial.

Estimar a dose apropriada de antiveneno a ser administrada a um paciente é o maior problema no tratamento de envenenamentos por *Micrurus* (Amuy et al., 1997). O resultado do presente trabalho, de que um aumento de 20 vezes na concentração do antiveneno foi requerida para proteger contra o bloqueio neuromuscular e também contra a letalidade do veneno, sugere que doses maiores de antiveneno do que aquelas indicadas na embalagem pelo fabricante podem ser requeridas no tratamento de indivíduos picados por *Micrurus altirostris*. Esse resultado sugere, também, que mais estudos necessitam ser efetuados, com relação às doses indicadas atualmente para o tratamento de pacientes picados por serpentes do gênero *Micrurus*.

A semelhança entre as potências do antiveneno comercial e do anti-soro específico produzido em coelhos indicaram que, em contraste com as sugestões de Bolaños et al. (1978) para o veneno de *M. surinamensis*, haveria pequeno ganho em incluir o veneno de *Micrurus altirostris* no pool de venenos utilizados para imunizar cavalos ou em produzir-se um antiveneno monovalente contra o veneno de *Micrurus altirostris*, uma vez que a neutralização foi possível, modificando-se a concentração do antiveneno comercial utilizado.

Em resumo, o veneno de *Micrurus altirostris* mostrou-se altamente neurotóxico, com bloqueio neuromuscular irreversível e com uma ação predominantemente subsináptica, não se observando uma ação miotóxica ligada ao bloqueio neuromuscular.

A toxina responsável pela inibição da resposta contrátil liga-se fortemente a um sítio específico do receptor nicotínico e a atividade enzimática não está envolvida no bloqueio neuromuscular. Os resultados obtidos sugerem também não haver uma correlação direta entre a atividade catalítica do veneno e sua capacidade bloqueadora neuromuscular.

Com relação à neutralização, apenas a proporção de 20:1 antiveneno: veneno ou anti-soro:veneno proveu proteção contra o bloqueio neuromuscular *in vitro* e a completa proteção conta 5DL₅₀ do veneno em ambas as preparações testadas.

Aparentemente não há ganho em incluir-se o veneno de *Micrurus altirostris* no pool de venenos utilizados para a produção do antiveneno anti-elapídico. Todavia, faz-se necessário um estudo, visando uma melhor adequação da concentração do antiveneno utilizado em acidentes causados por essa serpente.

6- CONCLUSÃO

O veneno de *Micrurus altirostris* produziu um bloqueio neuromuscular sub-sináptico irreversível, em preparações isoladas de ave (biventer cervicis de pintainho) e de mamífero (nervo frênico-diafragma de camundongo). Esse bloqueio foi neutralizado efetivamente apenas por uma alta proporção do antiveneno comercial e também do anti-soro específico, produzido em coelhos na razão de 20:1, que igualmente neutralizou a letalidade em pintainhos e camundongos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aird SD, da Silva NJ. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B* 1991; 99(2):287-294.

Aird SD, da Silva NJ, Griffin PR. Primary structure of a short postsynaptic neurotoxin from the venom of *Micrurus surinamensis surinamensis*. Abstracts of IV Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, 1992:53. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V, eds. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003:99-107.

Alape-Girón A, Gustafsson B, Lomonte B, Thelestam M, Gutiérrez JM. Immunochemical characterization of *Micrurus nigrocinctus* venom with monoclonal and polyclonal antibodies. *Toxicon* 1994; 32:695-712.

Amuy E, Alapé-Girón A, Lomonte B, Thelestam M, Gutiérrez JM. Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomation by coral snakes (*Micrurus* species). *Toxicon* 1997; 35:1605-1616.

Berger BJ, Bhatti AR. Snake venoms components and their cross-reactivity: A review. *Biochem Cell Biol* 1989; 67:597-601.

Bolaños R. *Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamerica*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica, 1984.

Bolaños R, Cerdas L. Produccion y control de sueros antiofídicos lem Costa Rica. *Bol San Panam* 1980; 88(33):189-96.

Bolaños R, Cerdas L, Abalos JW. Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp): report on a multivalent antivenin for the Americas. *Bull Pan-Am Health Org* 1978; 12:23-27.

Bucarechi F, Hyslop S, Vieira RJ, Toledo AS, Madureira PR, de Capitani EM. Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, state of São Paulo, southeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2006; 48:141-145.

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

Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of Latin America. NY Cornell University Press: Ithaca, 1989:425.

Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of the western hemisphere. Cornell University Press: Ithaca, 2004; 42:171-178.

Cavalcante WLG, Hernandez-Oliveira S, Leite GB, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L. Effects of *Bothrops marajoensis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2007; 13(1): 423.

Cecchini AL, Marcussi S, Silveira LB, Borja-Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, Amara S, Stabeli RG, Giglio JR, Arantes EC, Soares AM. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (coral) snake venoms. Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol 2005; 140:125-134.

Chang CC. The action of snake venom on the nerve and muscle. In Lee, CY. Snake venoms. Berlin: Springer 1979:309-76.

Cho W, Késdy FJ. Chormogenic substrates and assay of phospholipases A₂. Methods Enzimol 1991; 197:75-79.

Cogo JC, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Rodrigues-Simioni L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. Toxicon 1993; 10:1237-47.

Cohen P, Seligmann Jr EB. Immunologic studies of coral snake venoms. Mem Inst Butantan 1966; 33:339-347.

Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L, Vital Brazil O. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. Mem Inst Butantan 1983/1984; 47/48:95-105.

Dal Belo CA, Leite GB, Toyama MH, Marangoni S, Corrado AP, Fontana MD, Southan A, Rowan EG, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A₂ from *Micrurus dumerilii* carinicauda venom. Toxicon 2005; 46:735-750.

Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, Cruz-Höfling MA, Novello JC. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon* 2005; 46(2): 222-29.

De Roodt AR, Paniagua-Solis JF, Dolab JA, Estévez-Ramírez J, Ramos-Cerrillo B, Litwin S, Dokmetjian JC, Alagón A. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central and South American *Micrurus* envenomations. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004; 42:171-178.

Dos-Santos MC, Gonçalves LR, Fortes-Dias CL, Cury Y, Gutiérrez JM, Furtado, MF. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev Inst Med Trop* 1992; 34:77-83.

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

Finney PJ. *Probit analysis*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

Francis BR, da Silva NJ, Seebart C, Casais e Silva LL, Schmidt JJ, Kaiser II. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A₂ and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon* 1997; 35(8):1193-203.

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

Goularte FC, Cogo JC, Cruz-Höfling MA, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon* 1995; 33:679-689.

Goularte FC, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Electrophysiological and ultrastructural effects of *Micrurus nigrocinctus* venom on the neuromuscular junction. *Toxicon* 1996; 34:315-316.

Gutiérrez JM, Chaves F, Rojas E, Bolaños R. Efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* en ratón blanco. *Toxicon* 1980; 18:633-39.

Gutiérrez JM, Rojas G, Lomonte B, Gené JA, Chaves F. La evaluación de la capacidad neutralizante de los antivenenos em América. San Juan, Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, 1990.

Gutiérrez JM, Rojas G, da Silva Junior N, Nunes J, Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon* 1992; 30(10):1299-302.

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

Higashi HG, Guidolin R, Caricati CP, Fernandes I, Marcelino JR, Morais JF, Yamagushi IK, Stephano MA, Dias-da-Silva W, Takehara HA. Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28:767-771.

Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 1996; 34(10):1149-55.

Iwanaga S, Ohshima G, Suzek L. Proteinase from the venom of *Agkistrodon*. In Lorand L. *Methods in Enzimology*. NY Academic Press, 1976.

Jia LG, Shimokova KI, Bjamson JB, Fox JW. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* 1996; 34:1269-76.

Jorge da Silva Jr. N, Sites WJ. Revision of the *Micrurus frontalis* Complex (Serpentes: Elapidae). *Herpetological Monographs* 1999:142-149.

Jorge da Silva Jr. N, Aird SD. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001; 128:425-456.

Jorge da Silva Jr. N, Bucarechi F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V, eds. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003:99-107.

Jorge da Silva Jr. N, Griffin PR, Aird SD. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B* 1991; 100(1):117-126.

Jorge da Silva Jr. N, Aird SD, Silva-Haad J. Comparative lethality of *Micrurus* venoms. Abstracts of IV Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, 1992:53. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V, eds. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003:99-107.

Jorge MT, Cardoso JLC, Castro SCB, Ribeiro LA, França FOS, De Almeida ME, Kamiguti AS, Santo-Martins IS, Santoro ML, Mancau JEC, Sbrogio ML, Theakston RDG, Warrel DA. A randomised blinded comparison of two doses of antivenom in the treatment of Bothrops envenoming in São Paulo, Brasil. *Trans R Soc Trop Méd Hyg* 1995; 89:111-114.

Kaiser II, Gutiérrez JM, Plummer D, Aird SD, Odell GV. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys* 1990; 278:319-25.

Karlsson E. Chemistry of protein toxins in snake venom. In: Lee CY. *Handbook of experimental pharmacology*. NY Springer, Berlin Heidelberg 1979:159-212.

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

Kitchens CS, Van Mierop LHS. Envenomation by the eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*). *JAMA* 1987; 258:1615-1618.

Lee CY. Elapide neurotoxins and their mode of action. *Clin Toxicol* 1970; 3: 457-72.

Lee CY, Chang CC, Chen YM. Reversibility of neuromuscular blockade by neurotoxins from Elapidae and Sea snake venoms. *J Formosan Med Ass* 1972; 71:344-50.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.

Mayer F, Kiffman P, Linker A. Hialuronidase. In: Bouer, PD, Lardy H, Myrback K. *The enzymes*. London: Academic Press, 1960.

Mebs DA. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int J Biochem Biophys* 1970; 1:335-42.

Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V, eds. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003:33-61.

Ménez A. Molecular immunology of snake toxins. *Pharmac Ther* 1985; 30:91-113.

Ministério da Saúde do Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 1998.

Moraes FV, Sousa-e-Silva MV, Barbaro KC, Leitão MA, Furtado MF. Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon* 2003; 41:71-79.

Norris LM, Dart RC. Apparent coral snake envenomation in a patient without visible fang marks. *Am J Emerg Med* 1989; 7:402-405.

Oshima-Franco Y, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. *Toxicon* 1999; 37:1341-1357.

Oshima-Franco Y, Hyslop S, Cintra ACO, Giglio JR, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothriostasin-I. *Muscle Nerve* 2000; 23:1832-1839.

Oshima-Franco Y, Leite GB, Silva GH, Cardoso DF, Hyslop S, Giglio JR, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralization of the pharmacological effects of bothrostoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. *Toxicon* 2001; 39:1477-1485.

Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1949; 26:507-515.

Prieto da Silva ARB, Yamagushi IK, Morais JF, Higashi HG, Raw I, Ho PL, Oliveira JS. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous snake venoms. *Toxicon* 2001; 39: 949-953.

Raw I, Guidolin R, Higashi H, Kelen EMA. Antivenins in Brazil: Preparation. In: Tu AT, ed. *Handbook of natural toxins*. Vol. 5. New York: Marcel Dekker, 1991:557-581.

Russell FE. *Snake venom poisoning*. New York: Scholium, 1983.

Russel FE. Snake venom immunology: historical and practical considerations. *J Toxicol - Toxin Rev* 1988; 7:1-82.

Serafim FG, Reali MR, Cruz-Höfling MA, Fontana MD. Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon* 2002; 40:167-174.

Tu AT. Venoms of Crotalidae (Crotalids pit viper). In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. NY John Wiley & Sons, 1977:211.

Tu AT. Chemistry of rattlesnake venoms. In: *Rattlesnake venoms, their actions and treatment*. NY Marcel Defkker 1982.

Uetz P. The EMBL reptile database, 2002. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V, eds. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003:99-107.

Vital Brazil O. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. *O Hospital* 1965; 68:183-224.

Vital Brazil O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev Ass Med Brasil* 1980; 28:212-18.

Vital Brazil O, Fontana MD. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Mem Inst Butantan* 1983; 47/48:13-26.

Vital Brazil O, Vieira RJ. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1996; 38:61-67.

Vital Brazil O, Fontana MD, Pellegrini Filho A. Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. Mem Inst Butantan 1976/77; 40/41:221-240.

Vital Brazil O, Fontana MD, Heluany NF, Laure CJ. Mode of action of the coral snake *Micrurus spixii* venom at the neuromuscular junction. *J. Nat. Toxins* 1995; 4:19-33.

Warrell, DA. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, eds Campbell, JA & Lamar, WW. Ithaca: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press 2004; 2:709-761.

8- ANEXOS



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 809-2, sobre "AÇÃO DO VENENO BRUTO DE MICRURUS ALTIRISTRIS, FRAÇÕES E ANTIVENENO, SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR, EMPREPARAÇÕES ISOLADAS DE AVE E DE MAMÍFERO" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Valdemir Aparecido de Abreu está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de maio de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 809-2, entitled "THE ACTION OF MICRURUS ALTIROSTRIS CRUDE VENOM, FRACTIONS AND ANTI-SERA ON NEUROMUSCULAR JUNCTION", 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 May 4, 2005.

Campinas, 04 de maio de 2005.

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

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits



immediate access to the latest key research articles

Authors: Valdemir Aparecido de Abreu ^a; Gildo Bernardo Leite ^a; Caroline Borja Oliveira ^a; Stephen Hyslop ^a; Maria de Fátima Domingos Furtado ^b; Léa Rodrigues Simioni ^a

Affiliations: ^a Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Departamento de Farmacologia, Campinas, Brazil
^b Instituto Butantan, Laboratório de Herpetologia, São Paulo, Brazil

DOI: 10.1080/15563650701647405

Publication Frequency: 10 issues per year

Published in:  Clinical Toxicology

First Published on: 27 March 2008

Subject: Clinical Toxicology;

Formats available: HTML (English) : PDF (English)

Previously published as: Journal of Toxicology: Clinical Toxicology (0731-3810) until 2005

Abstract

In this work, we studied the neuromuscular blockade caused by *Micrurus altirostris* venom (0.1-10 µg/mL) in indirect stimulated chick biventer cervicis and mouse phrenic nerve-diaphragm preparations and the ability of commercial antivenom (Instituto Butantan) and antiserum raised in rabbits to neutralize neurotoxicity and lethality in chicks and mice (LD₅₀ 0.042 and 0.255 mg/kg), injected i.m. and i.p., respectively, with venom (5 LD₅₀):antivenom or antiserum mixtures (n = 6) of 1:1-1:2.5-1:5-1:10-1:20. The venom caused a complete and irreversible neuromuscular blockade in both preparations, inhibited the acetylcholine and carbachol contractures, without interfering on KCl response. The neuromuscular blockade was not Ca²⁺ or temperature-dependent and did not affect the response to direct stimulation. Only a venom:antivenom or antiserum ratio of 1:20 neutralized the neuromuscular blockade in vitro and protected chicks and mice against 5 LD₅₀ of venom. Our results indicated that *Micrurus altirostris* venom interferes with postsynaptic neurotransmission and that commercial antivenom and rabbit antiserum have low efficacy in neutralizing the neurotoxicity and lethality of this venom.

Keywords: Antivenom; Blockade; Neurotransmission; Neutralization; Postsynaptic neurotoxin