

STELLA REGINA ZAMUNÉR

**“CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DE
ANTIVENENO COMERCIAL SOBRE AS
ATIVIDADES NEUROTÓXICA E
MIOTÓXICA DE VENENOS BOTRÓPICOS”**

UNICAMP
Campinas

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, na Área de Farmacologia da Bióloga Stella
Regina Zamunér.

Campinas, 27 de junho de 1997


Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni
- Orientadora -

Z15c

31157/BC

Stella Regina Zamunér

**“CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DE
ANTIVENENO COMERCIAL SOBRE AS
ATIVIDADES NEUROTÓXICA E MIOTÓXICA DE
VENENOS BOTRÓPICOS”**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Farmacologia.

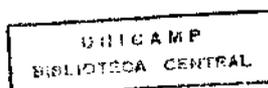
Orientador: **Prof^ª. Dra. Léa Rodrigues-Simioni.**

Co-orientador: **Prof^ª. Dra. Maria Alice Cruz-Höfling.**

UNICAMP

Campinas

1997



1308827

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	Z15c
V.	Ex.
N.º 001	31157
DATA	28.11.97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/07/97
N.º CPD	

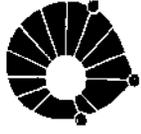
CM-00099204-4

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

Z15c Zamunér, Stella Regina
 "Capacidade neutralizante de antiveneno comercial sobre as atividades
 neurotóxica e miotóxica de venenos botrópicos" / Stella Regina
 Zamunér. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientadores : Léa Rodrigues-Simioni e Maria Alice Cruz - Höfling
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

I. Junção Neuromuscular. 2. Veneno. 3. Antiveneno. I. Léa
 Rodrigues - Simioni. II. Maria Alice Cruz - Höfling. III.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
 IV. Título.



UNICAMP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador

Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Membros:

1. Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

2. Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado

3. Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

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

Data: 27/06/97

Este trabalho é dedicado aos meus
pais, Dulce e Fernando,
à minha avó Luiza,
por estarem sempre ao meu lado com
amor, compreensão e constante apoio.

Agradecimentos:

À Dra. Léa Rodrigues Simioni pela orientação, amizade, paciência e incentivo durante esses anos de trabalho.

A Dra. Maria Alice Cruz-Höfling pela amizade, valiosa colaboração e orientação durante a etapa de estudo morfológico.

Ao Dr. José Carlos Cogo, por apresentar-me ao círculo da pesquisa.

Aos colegas que me propiciaram uma convivência diária agradável e, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese: Yoko, Cristina, Ana Sílvia, Mônica, Caroline, Patrícia, André, Márcia, Ivani e Maura.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite, meu sincero agradecimento pela amizade, disponibilidade de tempo, paciência e horas gratificantes que passamos no laboratório.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP que, de alguma maneira, ajudaram em minha formação.

Ao Dr. Stephen Hyslop, pela ajuda nas traduções e versão de textos para o inglês.

Aos serviços administrativos de Gislaíne E. Alípio, Solange Basso e Maria Rita de Lima.

À Antonia Furio Cardelli pelo incentivo e apoio.

Ao Cesar Alberto Pekim pelo estímulo, sempre constante, e suporte nos momentos difíceis.

A CAPES pela concessão da Bolsa de Estudo.

Aos funcionários do Departamento de Histologia, pelo apoio técnico e ensinamentos na confecção dos preparados histológicos.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	v
RESUMO	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Acidentes ofídicos.....	2
1.2 Classificação das serpentes.....	3
1.3 Diversidade bioquímica e atividade em venenos ofídicos.....	3
1.3.1 Atividade neurotóxica e miotóxica.....	6
1.4 O gênero <i>Bothrops</i> : componentes do veneno e quadro clínico dos acidentados.....	12
1.5 O gênero <i>Crotalus</i> : componentes do veneno e quadro clínico dos acidentados.....	14
1.6 Soroterapia.....	16
1.7 Objetivos.....	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Animais.....	20
2.2 Peçonhas.....	20
2.3 Solução nutritiva.....	20
2.4 Estudo <i>in vivo</i>	21
2.4.1 Determinação da dose letal 50% (DL ₅₀).....	21
2 Estudo <i>in vitro</i>	21

2.5.1	Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	21
2.5.2	Resposta à acetilcolina (ACh) e potássio (KCl).....	23
2.5.3	Antagonismo pelo soro antibotrópico.....	24
2.5.4	Antagonismo pelo soro anticrotálico.....	24
2.5.5	Dosagem de creatino quinase.....	25
2.5.6	Estudo morfológico das alterações induzidas pelas peçonhas	26
2.6	Análise estatística.....	26
3	RESULTADOS	27
3.1	Toxicidade.....	28
3.2	Estudo miográfico.....	29
3.2.1	Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	29
3.2.1.1	Estimulação indireta.....	29
3.2.1.2	Resposta ao efeito contraturante da acetilcolina e do potássio.....	33
3.2.1.3	Antagonismo pelo antiveneno comercial.....	35
	- <i>Bothrops jararaca</i>	35
	- <i>Bothrops jararacussu</i>	37
	- <i>Bothrops moojeni</i>	39
	- <i>Bothrops erythromelas</i>	41
	- <i>Bothrops neuwiedi</i>	43
	- <i>Crotalus durissus terrificus</i>	49
3.3	Estudo da liberação de creatino quinase.....	51

3.3.1 Antagonismo pelo antiveneno comercial.....	52
3.4 Estudo morfológico das alterações causadas pelas peçonhas.....	54
- Controle.....	54
- <i>Bothrops jararaca</i>	56
- <i>Bothrops jararacussu</i>	58
- <i>Bothrops moojeni</i>	60
- <i>Bothrops erythromelas</i>	62
- <i>Bothrops neuwiedi</i>	64
- <i>Crotalus durissus terrificus</i>	67
4 DISCUSSÃO.....	69
5 CONCLUSÕES.....	79
6 SUMMARY.....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AV	Antiveneno
CDT	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CK	Creatino quinase
DL	Dose letal
ERY	<i>Bothrops erythromelas</i>
Fig	Figura
i.m.	intramuscular
JRA	<i>Bothrops jararaca</i>
JSU	<i>Bothrops jararacussu</i>
KCl	Cloreto de potássio
NEU	<i>Bothrops neuwiedi</i>
MOO	<i>Bothrops moojeni</i>
NTX	Neurotoxinas
PLA₂	Fosfolipase A ₂
SAB	Soro antibotrópico
SAC	Soro anticrotálico
Tab	Tabela

LISTA DE TABELAS

Tab.	Pág.	Título
1	28	Valores da DL ₅₀ , de venenos botrópicos, e seus limites de confiança de 95%.
2	32	Bloqueio de 50% da resposta contrátil da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, incubado com veneno bruto.

LISTA DE FIGURAS

Fig.	Pág.	Título
1	22	Esquema mostrando a localização do músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.
2	30	Resposta contrátil à estimulação elétrica indireta, em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho (pulsos supra maximais de 0,2 mseg e 0,1 Hz).
3	31	Capacidade dos diferentes venenos estudados em induzir bloqueio neuromuscular, em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho.
4	34	Efeito dos venenos estudados sobre as respostas à ACh e KCl da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho.
5	35	Efeito do veneno de <i>B. jararaca</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).
6	36	Efeito do veneno de <i>B. jararaca</i> sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho e sua neutralização.
7	37	Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).
8	38	Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho e sua neutralização.
9	39	Efeito do veneno de <i>B. moojeni</i> , sobre o perfil miográfico, da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).
10	40	Efeito do veneno de <i>B. moojeni</i> sobre a resposta contrátil da preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho e sua neutralização.

-
- 11 41 Efeito do veneno de *B. erythromelas*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).
- 12 42 Efeito do veneno de *B. erythromelas* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização.
- 13 44 Efeito do veneno de *B. neuwiedi* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização.
- 14 45 Efeito do veneno de *B. neuwiedi* (20 µg/ml), em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).
- 15 46 Efeito do veneno de *B. neuwiedi* (200 µg/ml), em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).
- 16 48 Efeito da temperatura sobre o bloqueio da resposta contrátil à estimulação elétrica indireta pelo veneno de *B. neuwiedi*, na preparação *biventer cervicis* (0,2 mseg e 0,1 Hz).
- 17 49 Efeito do veneno de *C.d. terrificus*, sob o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação elétrica indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz).
- 18 50 Efeito do veneno de *C. d. terrificus* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização.
- 19 51 Liberação de CK induzida pelos venenos estudados.
- 20 53 Efeito neutralizante do antiveneno comercial sobre a liberação de CK induzida pelas peçonhas estudadas, após 120 min de incubação.
- 21 55 Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução de Krebs.
- 22 57 Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. jararaca* (200 µg/ml).
- 23 59 Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado

durante 120 minutos com o veneno de *B. jararacussu* (200 µg/ml).

- 24 61 Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. moojeni* (200 µg/ml).
- 25 63 Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. erythromelas* (200 µg/ml).
- 26 66 Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. neuwiedi* (200 µg/ml).
- 27 68 Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *C. d. terrificus* (10 µg/ml).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças interespecíficas sobre as atividades neurotóxicas (toxicidade e estudo miográfico) e miotóxicas (estudo morfológico e dosagem de CK) dos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. erythromelas*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* assim como sua neutralização, tendo o veneno de *C. d. terrificus* como controle positivo. Para isso foi utilizada a preparação *biventer cervicis* de pintainho. Nossos dados mostraram que há grande diferença quanto à toxicidade dos venenos estudados, não havendo uma relação direta entre a atividade bloqueadora neuromuscular, *in vitro*, e os valores da DL_{50} . O veneno de *B. neuwiedi* foi o único que apresentou atividade neurotóxica pré-sináptica, apesar disto acontecer somente em baixas doses (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$), pois quando a dose era de 200 $\mu\text{g/ml}$, seu perfil igualou-se ao dos outros venenos botrópicos estudados. A temperatura de incubação foi um importante fator para o efeito bloqueador e miotóxico deste veneno, sugerindo que uma fosfolipase A_2 (PLA_2) estaria envolvida neste processo. O antiveneno botrópico comercial neutralizou de maneira diferenciada os efeitos neuromusculares dos venenos botrópicos analisados, todavia foi incapaz de neutralizar os efeitos neuromusculares de *B. neuwiedi*, enquanto que o antiveneno crotálico mostrou alguma proteção sobre o mesmo efeito para a dose utilizada, sugerindo uma reatividade antigênica cruzada. Todos os venenos estudados induziram liberação de CK significativamente diferente do controle. Os venenos de *B. neuwiedi* e *B. jararacussu* foram os que exibiram maior nível de liberação desta enzima. O antiveneno botrópico comercial foi eficiente em neutralizar a liberação de CK, induzida pelos venenos estudados, exceto para o veneno de *B. jararacussu*. Todos os venenos examinados produziram alterações mionecróticas caracterizadas por: fibras musculares fragmentadas, presença de 'lesões delta', desarranjo e hipercontração das miofibrilas, fibras edematosas e (ou) hialinas e grande espaço entre as fibras, sendo que os venenos de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* foram os que apresentaram maior grau de destruição da fibra muscular. O antiveneno botrópico comercial foi eficiente em proteger contra a atividade miotóxica, exceto para o veneno de *B. jararacussu*.

A utilização do antiveneno foi um importante instrumento, para observarmos as diferenças interespecíficas dos venenos botrópicos.

1-Introdução

1.1 ACIDENTES OFÍDICOS

Os acidentes ofídicos têm reconhecida importância médica, em virtude do grande número de pessoas atingidas e pela própria gravidade que encerram, pois apresentam índices significantes de morbidade e mortalidade em muitos países. Um fator importante que propicia os acidentes ofídicos é a profissão. Nos países onde existem muitas serpentes, como nos trópicos, trabalhadores rurais, e construtores de estrada apresentam uma incidência particularmente alta de acidentes com serpentes.

A incidência e o número de mortes por picada de serpente, no mundo todo, são desconhecidos. Em 1954, SWAROOP & GRAB estimaram uma mortalidade anual de 30.000 a 40.000 pessoas. Assumindo-se que o índice de mortalidade seja de, no mínimo, 15 %, o número anual de picadas estaria em torno de 300.000. No entanto, RUSSELL (1983), estimou que este número estaria em torno de 1 milhão.

Segundo WARRELL (1995), as seqüelas devido a acidentes por picadas de serpentes incluem deformações que tornam o indivíduo inápto para o trabalho, infecções crônicas e cegueira. Os acidentes que não causam reação no local da picada, podem ser responsáveis por mortes não atribuídas às mesmas, mas por eventuais estimativas sub-apreciadas dos acidentes ofídicos.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES.

Cerca de 15% das, aproximadamente, 2500 - 3000 espécies de serpentes conhecidas são venenosas e podem ser taxonomicamente divididas em cinco famílias: Viperidae, Crotalidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (MENGDEN, 1983; MEHRTENS, 1987; CAMPBELL & LAMAR, 1989). Destas, as famílias Elapidae, Crotalidae e Colubridae são encontradas no Brasil. O único gênero da família Elapidae no Brasil é o *Micrurus*, cujas espécies são vulgarmente conhecidas como corais. Os gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops* são os representantes da família Crotalidae. Da família Colubridae, podemos citar o gênero *Philodryas olfersii*.

1.3 DIVERSIDADE BIOQUÍMICA E ATIVIDADE DOS VENENOS OFÍDICOS

O veneno das serpentes é produzido por um par de glândulas exócrinas especializadas, situadas na boca, sendo representada por uma complexa mistura de moléculas de natureza química diversa (JIMÉNEZ-PORRAS, 1970; TU, 1977). Através de técnicas bioquímicas de fracionamento, cerca de 70 peptídeos podem ser detectados em um único veneno (PERKINS, PARKER, TOMER, 1993). Uma melhor caracterização dos componentes dos venenos, inclui proteínas (com ou sem ação enzimática) e peptídeos, com ampla variação de ações farmacológicas

e tóxicas. Historicamente, os venenos têm sido classificados de acordo com a atividade farmacológica predominante, como neurotóxicos, hemorrágicos, coagulantes, além de outras.

Durante a evolução dos venenos, as primeiras substâncias ativas provavelmente foram enzimas proteolíticas (KARDONG, 1979) que auxiliam na digestão, fazendo com que a alimentação fosse um processo mais fácil e seguro (KOCHVA, 1987). A presença de enzimas em venenos de serpentes, como proteases, peptidases, fosfatases, esterases e lecitinases concordam com esta sugestão, pois muitas destas enzimas são também encontradas em 'sucos digestivos' de outras espécies animais (CASAIS-E-SILVA, 1995).

As diversificadas ações dos venenos de serpentes podem ser atribuídas a componentes ou toxinas específicas, embora seja possível que diferentes toxinas possam agir sinergicamente na indução de um efeito, assim como uma mesma toxina pode ter mais de uma ação (JIMÉNEZ-PORRAS, 1968, 1970; KINI & IWANAGA, 1986).

GLOYD (1940) sugeriu que os requisitos necessários para a especialização do veneno ocorrem independentemente das variações morfológicas, e muitas vezes apresentam evolução paralela em função das características relacionadas com alimentação e utilização de habitat. O

conhecimento dessas variações intraespecíficas pode fornecer subsídios para a terapêutica mais eficaz dos acidentes; auxiliar em estudos bioquímicos sendo utilizadas como ferramentas farmacológicas para pesquisas, além de auxiliar na caracterização filogenética a nível de espécies e subespécies (CHIPPAUX , WILLIAMS, WHITE, 1991).

A variação na composição química e das atividades biológicas dos venenos pode ocorrer entre famílias, gêneros, espécies e subespécies (CHIPPAUX *et al.*, 1991).

Diversos autores tem demonstrado diferenças entre venenos de espécies nas famílias Viperidae e Elapidae. FURTADO, COLLETO, DA SILVA (1991), caracterizaram as atividades biológicas de sete espécies do gênero *Bothrops* observando variação tanto na atividade letal, quanto nas atividades biológicas. Uma das observações foi a ausência de atividade coagulante (tipo trombina), típica dos venenos botrópicos, no veneno de *B. erythromelas*. ASSAKURA, FURTADO, MANDELBAUM (1992) também avaliaram as diferenças bioquímicas e fisiopatológicas dos venenos de serpentes do grupo *atrox* (*Bothrops*) observando variações no perfil eletroforético e nas atividades biológicas, que poderá auxiliar no estudo das relações filogenéticas destas espécies.

1.3.1 ATIVIDADES NEUROTÓXICA E MIOTÓXICA

Os efeitos neurotóxicos (hipotonia muscular, paralisia flácida de músculos da face, pescoço, membros, tronco, laringe, faringe e respiração) produzidos pelas peçonhas ofídicas são devidos à ação na junção neuromuscular de constituintes denominados 'neurotoxinas' (NTX). Essas NTXs são divididas em dois grupos completamente distintos: NTXs pós-sinápticas e NTXs pré-sinápticas. As NTXs pós-sinápticas ligam-se aos receptores colinérgicos da placa terminal sem promoverem a sua despolarização e impedindo que esta seja desencadeada pela acetilcolina. As NTXs pré-sinápticas atuam nas terminações nervosas motoras, inibindo ou facilitando a liberação do neurotransmissor (acetilcolina) pelos impulsos nervosos (VITAL BRAZIL, 1982).

A ação das toxinas sobre o nervo e músculo pode ser diferenciada por uma das quatro categorias relacionadas:

(1)- **Ação neurotóxica pós-sináptica** - Também chamadas α -toxinas, englobam toxinas que se ligam aos receptores pós-sinápticos colinérgicos, na junção neuromuscular, e dessa maneira, impedem uma interação entre a acetilcolina liberada do terminal nervoso motor, e o receptor nicotínico presente na região sub-sináptica, determinando o bloqueio neuromuscular. Este bloqueio não está relacionado com a despolarização da placa motora ou com a redução da

excitabilidade da membrana da fibra muscular (CHANG & LEE, 1963). São proteínas básicas de pequeno peso molecular (entre 7.000 e 8.000 daltons), desprovidas de atividade enzimática (VITAL BRAZIL, 1980).

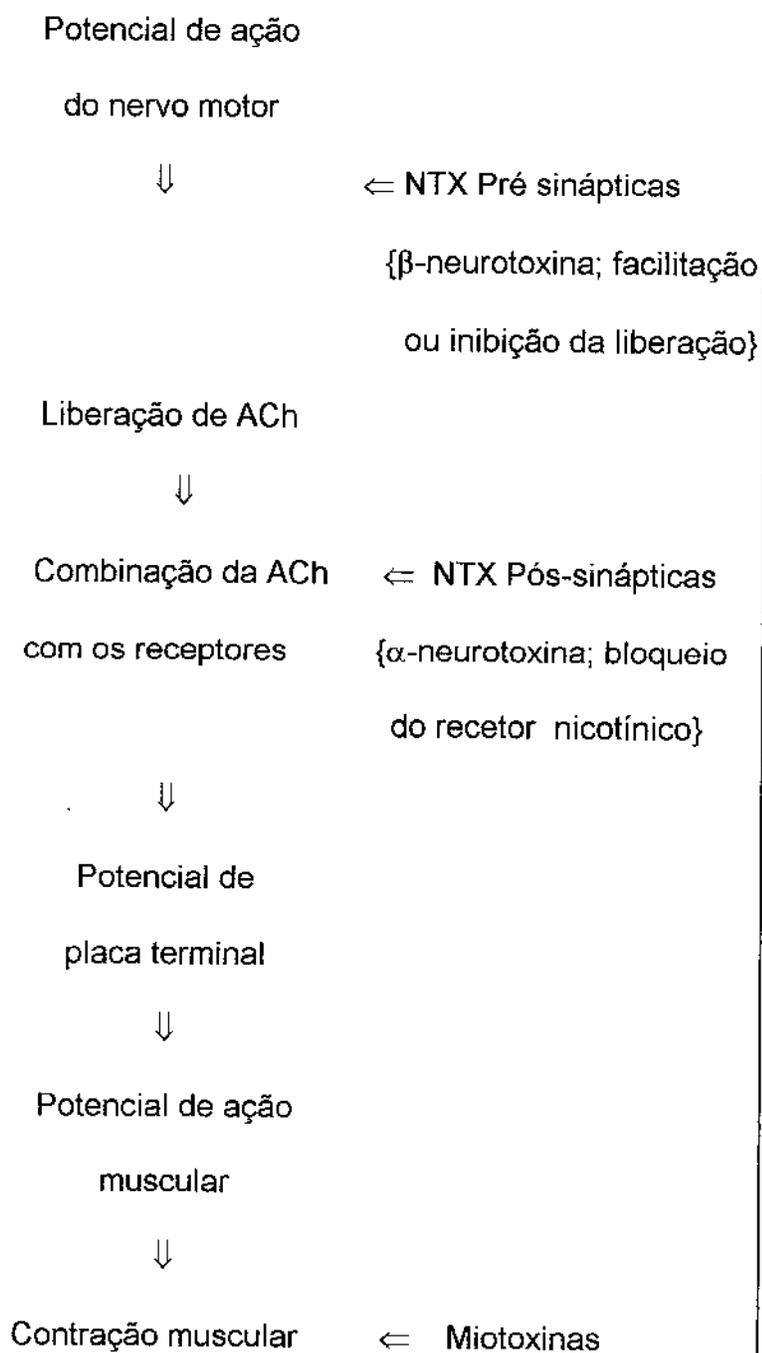
As α -toxinas podem ser divididas em dois grupos: aquelas que possuem cadeia longa como a α -bungarotoxina (α -Btx) da *Bungarus multicinctus* e aquelas de cadeia curta como a α -neurotoxina da *Naja naja atra*, *Naja naja siamensis*, *Naja mossambica* e a erabutoxina b da *Lauticauda semifasciata* (BRADLEY *et al.*, 1990)

(2)- **Ação neurotóxica pré-sináptica** - Também chamadas β -neurotoxinas, incluem toxinas que inibem ou facilitam a liberação do neurotransmissor do terminal nervoso motor. Aproximadamente 12 neurotoxinas de venenos de serpentes foram identificadas. São proteínas de peso molecular variável (β -bungarotoxina 12.000 daltons, taipoxina 5.000 daltons), básicas ou moderadamente ácidas. Todas exercem atividade fosfolipásica A_2 (VITAL BRAZIL, 1980). Apesar de ter uma potente ação pré-sináptica, essas toxinas induzem proeminente dano no músculo esquelético. Contudo, é interessante notar que as PLA_2 que agem pré-sinápticamente não são sempre miotóxicas. Um exemplo disto é a β -bungarotoxina (MEBS & OWNBY, 1990).

Existem toxinas provenientes de veneno de serpentes, que exibem alta neurotoxicidade. Apresentam ação pré-sináptica e afetam portanto a liberação de acetilcolina. Entre elas, citamos a β -bungarotoxina de *Bungarus multicinctus* (CHANG & LEE, 1963) notexina de *Notechis scutatus scutatus* (KARLSON, EAKER, RYDEN, 1972), taipoxina de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (FOHLMAN *et al.*, 1976) e crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938), que são as mais estudadas.

A causa da morte, na intoxicação por neurotoxinas pré-sinápticas, tem sido estabelecida como parada respiratória, por resultar da falência da neurotransmissão colinérgica. Usando uma preparação nervo-músculo esquelético, CHANG & LEE (1963) demonstraram que a β -bungarotoxina bloqueia a liberação da acetilcolina, normalmente induzida por estimulação indireta do nervo motor. A aplicação de técnicas eletrofisiológicas tem revelado que a β -bungarotoxina, assim como a fosfolipase do veneno de serpentes, reduzem a amplitude do potencial da placa terminal, sem afetar a sensibilidade da membrana pós-sináptica à acetilcolina.

RESUMO ESQUEMÁTICO DO MECANISMO DE AÇÃO DAS NEUROTOXINAS OFÍDICAS



(3)- **Ação Miotóxica**- São toxinas que lesam diretamente ou indiretamente as fibras musculares, causando mionecrose.

Segundo LOMONTE (1994), as toxinas que produzem lesão necrótica muscular podem ser classificadas em dois a quatro grupos, de acordo com diferentes pesquisas; OWNBY & COLBERG (1990) e MEBS & OWNBY (1990) dividiram em dois grupos principais, (1) miotoxinas de pequeno peso molecular desprovida de atividade enzimática, e (2) miotoxinas com atividade PLA₂. HARRIS & CULLEN (1990) incluíram os mesmos 2 grupos e um grupo adicional formado por (3) cardiotoxinas. GUTIÉRREZ & CERDAS (1984) acrescentaram também (4) toxinas hemorrágicas que podem danificar as fibras do músculo esquelético, indiretamente, talvez por isquemia.

Em algumas toxinas deste grupo, ocorre primeiramente uma ação neurotóxica pré-sináptica que evolui para uma ação miotóxica (HARRIS *et al.*, 1975; HARRIS & MALTIN, 1982; HAWGOOD, 1982; GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984).

Utilizando-se baixas concentrações de veneno, pode-se detectar a presença das neurotoxinas, e em altas concentrações, a presença das miotoxinas. Um exemplo é o veneno da *Naja naja kaouthia* e *Nothechis scutatus*,

que são primariamente neurotóxicas, mas em altas concentrações são também miotóxicas (HARVEY *et al.*, 1994).

(4)- **Ação Citotóxica** - As toxinas desse grupo são comumente chamadas cardiotoxinas. São proteínas básicas, de pequeno peso molecular, desprovidas de atividade enzimática. Estruturalmente são homólogas com a ação das neurotoxinas pós-sinápticas (DUFTON & HIDER, 1991). As cardiotoxinas causam despolarização persistente da membrana de células excitáveis ou não, acarretando distúrbio em sua função e estrutura. Essas proteínas ativas em membrana foram encontradas em venenos de serpentes elapídicas, incluindo as cobras (gênero *Naja*) e ringhals (gênero *Hemachatus*). Sua estrutura tridimensional é basicamente similar àquela das α -neurotoxinas, apesar de uma marcada diferença em sua atividade biológica (DUFTON & HIDER, 1991; REES & BILWES, 1993). O nome cardiotoxina se originou da habilidade desses componentes causarem parada cardíaca *in vivo* e *in vitro* (HARRIS & CULLEN, 1990; HARVEY, 1990). Entretanto, elas também atuam como agentes citolíticos, através de vários tipos de células, e dessa maneira, são também chamadas de citotoxinas (KINI & EVANS, 1989; DUFTON & HIDER, 1991).

1.4 O GÊNERO *Bothrops*: COMPONENTES DO VENENO E QUADRO CLÍNICO DOS ACIDENTADOS.

O gênero *Bothrops* compreende muitas espécies de serpentes, distribuídas nas Américas, desde o México até a Argentina (HOGE & ROMANO-HOGE, 1978).

No Brasil, 90% dos acidentes ofídicos são causados pelo gênero *Bothrops* (ROSENFELD, 1971). Segundo a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (1981) em algumas regiões, a mortalidade tem sido estimada em 2,4% e pode até mesmo ser mais alta que 8%, quando não é processado tratamento com o antiveneno.

Essas serpentes habitam, preferencialmente, os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas; locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferias de grandes cidades. Têm hábitos noturnos, e são consideradas as mais agressivas. São conhecidas popularmente por 'jararaca', 'jararacussu', 'urutu', 'cotiara', 'jararaca-do-rabo-branco' e outros. Destas, a 'jararaca' é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no sudoeste do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1991).

Diversos componentes isolados de venenos botrópicos, como fator hemorrágico (MANDELBAUM, REICHL, ASSAKURA, 1976; MANDELBAUM, ASSAKURA, REICHL, 1984), proteases, que atuam em etapas da coagulação sanguínea causando distúrbios de coagulação (NAHAS, KAMIGUT, BARROS, 1979; HOFMANN & BON, 1987), enzimas proteolíticas (ASSAKURA *et al.*, 1985; TANIZAKI *et al.*, 1989) e miotoxinas (GUTIERREZ, OWNBY, ODELL, 1984, GUTIÉRREZ *et al.*, 1989; HOMSI-BRANDERBURGO *et al.*, 1988; MOURA-DASILVA *et al.*, 1991) são responsáveis pelos sintomas clínicos exibidos no envenenamento botrópico.

De uma maneira geral, o quadro clínico dos pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops* consiste, sobretudo, em distúrbios da coagulação, hemorragia, edema e necrose local (HOMMA & TU, 1971; ROSENFELD, 1971).

A picada é seguida de dor e edema locais, de intensidade variável, que aparecem precocemente e são de caráter progressivo. Nos membros, o edema, quando intenso, pode estender-se de modo a atingir vários segmentos corpóreos, mas raramente atinge o tronco (MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1993).

Nas reações locais, induzidas pelos venenos botrópicos, pode-se observar a presença de exsudato purulento, edema e equimose com material sero-

sangüinolento. O quadro local, algumas vezes, evolui para necrose e, dependendo da extensão da lesão, podendo determinar a perda do membro afetado (ROSENFELD, 1971).

As principais causas de óbitos estão relacionadas à insuficiência renal aguda, sangramento em órgãos vitais e choque (AMARAL *et al.*, 1986; KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1991).

1.5 O GÊNERO *Crotalus*: COMPONENTES DO VENENO E QUADRO CLÍNICO DOS ACIDENTADOS.

As serpentes do gênero *Crotalus* são representadas na América do Sul, principalmente pela *Crotalus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel, e possuem um veneno de efeito altamente tóxico (ROSENFELD, 1971).

No Brasil, 10% dos acidentes ofídicos são crotálicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1987). A cascavel, geralmente é encontrada em campos abertos, em áreas secas e arenosas. Não tem por hábito atacar e, quando excitada, denuncia sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho.

As principais toxinas presentes neste veneno incluem a crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina, sendo a crotoxina o componente responsável pela elevada toxicidade do veneno (VITAL BRAZIL, 1972).

O diagnóstico clínico do envenenamento crotálico baseia-se, principalmente, na observação de manifestações sistêmicas decorrentes das ações neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes do veneno (ROSENFELD, 1971). A atividade coagulante de pequena intensidade e a inexistência de atividade proteolítica fazem com que, no local da picada, não haja alterações ou, quando existirem, sejam reduzidas a um discreto edema, ao redor do ponto de inoculação do veneno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1987).

A sintomatologia decorrente da atividade neurotóxica é consequência do bloqueio pré-sináptico da junção mioneural e pode aparecer precoce ou tardiamente (horas após), em virtude do elevado peso molecular da crotoxina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1987).

A atividade miotóxica parece ser responsável pelas dores musculares generalizadas (mialgias) e por discreto edema no local da picada. A urina de cor avermelhada ou de tonalidades variáveis, até o marrom, é a manifestação clínica mais evidente da intensidade da rabdomiólise, sendo a mioglobinúria responsável pela insuficiência renal aguda. Em consequência disso podem ocorrer grandes

elevações séricas de creatinofosfoquinase e da desidrogenase láctica (AZEVEDO-MARQUES, 1982)

O envenenamento humano provocado pelo veneno crotálico é o mais grave em nosso meio, devido às suas ações sistêmicas e atinge índice de letalidade de 2,5 % (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1991), sendo que o óbito é geralmente causado por insuficiência respiratória ou insuficiência renal aguda (AZEVEDO MARQUES *et al.*, 1987).

1.6 SOROTERAPIA

Preparações de imunoglobulinas heterogêneas com antiveneno têm sido usadas para o tratamento de picadas de serpentes desde o trabalho pioneiro de Calmette, em 1894.

No Brasil os primeiros soros antiofídicos foram preparados por VITAL BRAZIL (1905), contra o veneno da *Lachesis lanceolatus* (hoje classificada como *Bothrops jararaca*) e contra o veneno da *Crotalus terrificus* (hoje, *Crotalus durissus terrificus*).

* Calmette, C. *appud* MÉNEZ, A. Molecular immunology of snake toxins, *Pharmac. Ther.* **30**, 91-113, 1985.

A produção comercial envolve a imunização de animais, principalmente eqüinos que, dentre suas inúmeras vantagens, é dócil, fácil de manipular, possui longevidade e permite a sangria de vários litros. A inoculação no animal se dá com doses subletais de veneno(s) bruto, usualmente administrado com adjuvantes. Quando os níveis de anticorpo alcançam um predeterminado título de neutralização (contra o efeito letal do veneno), o plasma obtido é processado para a purificação das imunoglobulinas. Os antivenenos podem ser monovalentes, quando são preparados com o veneno de uma única espécie de serpente, ou polivalentes, quando preparados com a mistura de venenos de mais de uma espécie. Neste último caso, os mesmos são misturados com base em suas relações antigênicas (neutralização cruzada) e distribuição geográfica das espécies importantes do país ou região (THEAKSTON & WARRELL, 1991).

De acordo com a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (1981), antivenenos comerciais são avaliados por sua capacidade de neutralizar atividades específicas dos venenos tais como hemorragia, necrose e coagulação. Essa capacidade é importante, quando se trata do soro botrópico, desde que os acidentes provocados por picadas de serpentes, incluídas neste gênero, causam lesões locais graves.

Antivenenos são, usualmente, muito eficientes em neutralizar os efeitos sistêmicos dos venenos, como letalidade, mas exercem pouca atividade sobre os

extensos efeitos locais (McCOLLOUGH & GENERO, 1970; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981). A causa da diferença, na eficácia dos antivenenos, tem sido atribuída ao rápido efeito local, depois da picada da serpente, enquanto os efeitos sistêmicos que resultam em morte, desenvolvem-se mais lentamente (GUTIÉRREZ, ROJAS, CERDAS, 1987).

Nem todas as picadas de serpentes exigem o uso de antivenenos, depende da espécie de serpente envolvida e da quantidade de veneno inoculado. Entretanto, em envenenamentos graves, por algumas espécies muito venenosas, o uso de uma grande quantidade de antiveneno é decisivo para o tratamento clínico (REID, THEAN, MARTIN, 1963; RUSSEL *et al.*, 1975; WARREL *et al.*, 1980; REID & THEAKSTON, 1983; BENBASSAT & SHALEV, 1993).

1.7 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar as diferenças interespecíficas dos efeitos neurotóxico e miotóxico de alguns venenos botrópicos, utilizando como método de avaliação a capacidade de antivenenos comerciais em neutralizar estes efeitos. Para tal, utilizamos técnicas miográficas, determinação dos níveis de creatino quinase, bem como estudo morfológico ao microscópio óptico.

2-Material e Métodos

2.1 ANIMAIS

Foram usados pintainhos da linhagem HY LINE W36, fornecidos pela Granja Ito S/A (Campinas), com peso entre 40 a 50 g (4 a 8 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*.

2.2 PEÇONHAS

As peçonhas de *Bothrops jararaca* (JAR), *Bothrops jararacussu* (JSU), *Bothrops moojeni* (MOO), *Bothrops erythromelas* (ERY), *Crotalus durissus terrificus* (CDT) foram usados dos estoques de nosso laboratório e o veneno de *Bothrops neuwiedi* (NEU) foi cedido pelo biólogo Ronilson Agnaldo Moreno.

2.3 SOLUÇÃO NUTRITIVA

Os músculos *biverter cervicis* de pintainho foram incubados com solução de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,7; CaCl₂ 1,9; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0 e C₆H₁₂O₆ 11,7.

2.4 ESTUDO *in vivo*

2.4.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL₅₀)

A DL₅₀ das peçonhas de JRA, JSU, MOO, ERY, MOO e CDT foi determinada em pintainhos. A via foi intra-muscular (i.m.; 0,1 ml), em músculo peitoral esquerdo, e a sobrevivência dos animais foi avaliada 24 horas após. Foram utilizados pintainhos pesando de 40 a 50 g, empregando-se 6 animais para cada dose. As peçonhas foram dissolvidas em solução salina, para obtenção da solução estoque, a partir da qual prepararam-se quatro soluções de concentrações que guardaram entre si uma razão de 1,5. Para o cálculo da DL₅₀ foi usado o método de WEIL (1953).

2.5 ESTUDO *in vitro*

2.5.1 PREPARAÇÃO DO MÚSCULO *biventer cervicis* DE PINTAINHO

O músculo foi isolado e montado de acordo com o método descrito por GINSBORG & WARRINER (1960). A técnica consiste em anestésiar os animais com éter e dissecar a pele dorsal, longitudinalmente, desde a base do crânio, na parte posterior, até o início do tórax, expondo os dois músculos *biventer cervicis* (fig. 1). Após o isolamento, que foi feito com cuidado para não lesar o músculo, o

mesmo foi amarrado nas duas extremidades e fixado na cuba. O músculo foi suspenso em 5 ml de solução de Krebs, cuja composição foi descrita no item 2.3, e arejado de modo constante com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂; pH 7,5) e mantido a 37°C.

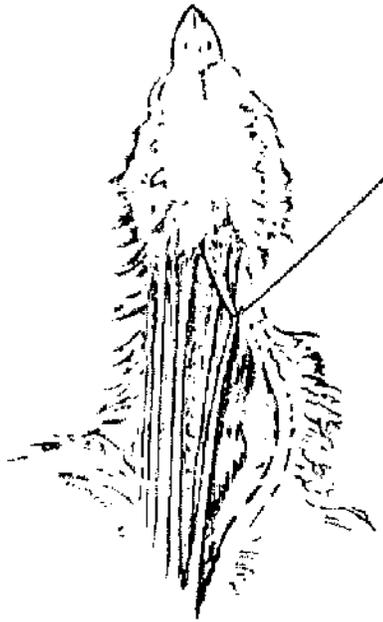


Fig. 1 - **Esquema mostrando a localização do músculo *biventer cervicis* de pintainho.** (LIVINGSTONE, 1971)

O músculo foi submetido a uma tensão constante de 0,5 g/cm e estimulado através de eletrodos bipolares, posicionados na região de transição entre o tendão e o músculo, de modo a proceder uma estimulação de campo. Usou-se estimulador GRASS S48 para submeter a preparação a estímulos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração. As contrações musculares, foram registradas em fisiógrafo GOULD RS 3400, através de transdutor isométrico BG-25

GM KULITE da Semiconductor Products Inc., durante 120 minutos. As preparações foram submetidas a um período de estabilização não inferior a 20 minutos. Após esse período, foi adicionado, ao banho, o veneno bruto nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ para os venenos de JRA, JSU, MOO, ERY; 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ para o veneno de NEU e 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ para o veneno de CDT, para verificação de seus efeitos.

Em alguns experimentos, a preparação foi mantida a temperatura ambiente (24°C) durante o tempo de incubação com o veneno de *B. neuwiedi* (20 $\mu\text{g/ml}$).

2.5.2 RESPOSTA À ACETILCOLINA (ACh) E POTÁSSIO (KCl):

Após feita uma curva dose-resposta para à ACh e KCl, na preparação *biventer cervicis* de pintainho, foi escolhida a dose efetiva 50% e observada a contratura muscular, em resposta à adição ao banho, de duas doses de ACh (60 e 120 μM) e uma dose de KCl (13,4 mM), na ausência de estimulação elétrica, antes e após 120 minutos de incubação com o veneno bruto ou com a mistura veneno + antiveneno.

2.5.3 ANTAGONISMO PELO SORO ANTIBOTRÓPICO

Os venenos botrópicos de JRA, JSU, MOO, ERY e NEU, nas doses de 200 µg/ml, por ser a dose onde observamos o melhor bloqueio neuromuscular, foram incubados durante 30 minutos a 37°C com 40 µl/ml do soro anti-botrópico (AB) (1 ml neutraliza 5 mg) proveniente do Instituto Vital Brazil S.A. (Lote 940608). Após incubação, a mistura foi adicionada ao banho (5 ml), contendo o músculo *biventer cervicis*, em solução de Krebs, durante 120 minutos.

2.5.4 ANTAGONISMO PELO SORO ANTICROTÁLICO

O veneno de CDT, na dose de 10 µg/ml, e os venenos de NEU e JSU, na dose de 200 µg/ml foram incubados com 33 µl e 660 µl, respectivamente, do soro-anticrotálico (AC) (1 ml neutraliza 1,5 g), proveniente do Instituto Vital Brazil (Lote 930201). Após incubação, por 30 min. a 37°C, a mistura foi adicionada ao banho (5 ml de solução de Krebs), contendo o músculo *biventer cervicis*, e deixada por 120 minutos.

2.5.5 DOSAGEM DE CREATINO QUINASE

Durante as experiências realizadas com o músculo *biventer cervicis* de pintainho para o registro das contrações musculares (conforme a técnica descrita no item 2.5.1), alíquotas de 0,1 ml foram retiradas do banho (completando-se no entanto o volume da cuba com a solução de Krebs), durante o período de repouso (estabilização da preparação) e após a adição do veneno bruto ou da incubação com a mistura veneno + soro antibotrópico (SAB) ou anticrotálico (SAC), em períodos correspondentes a 15, 30, 60, 90 e 120 min . Estas foram analisadas, usando-se o "Kit" GRANUTEST® 2.5 (E. Merck, 64271 Darmstadt, Germany) para determinação dos níveis de CK. Algumas preparações foram submetidas ao mesmo protocolo, na ausência dos venenos. Tais resultados foram lançados em um gráfico que relaciona a liberação de CK em U/l. Uma unidade de CK corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min a 25°C.

2.5.6 ESTUDO MORFOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS PELAS PEÇONHAS.

As preparações do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubadas por 120 minutos com 200 µg/ml das peçonhas de JAR, JSU, MOO, ERY e NEU e 10 µg/ml da peçonha de CDT, foram fixados em solução Bouin, durante 24 a 48

horas, após o término da incubação. O mesmo procedimento foi aplicado as preparações incubadas com os venenos e os soros antibotrópicos e anticrotáticos, segundo a metodologia descrita em 2.5.3 e 2.5.4. A fixação seguiu-se o procedimento de rotina, para a confecção das lâminas histológicas e para o estudo das alterações morfológicas (desidratação e inclusão em parafina). Secções de 7 μm foram obtidas em micrótomo, montadas e coradas com hematoxilina eosina (H.E.), para observação ao microscópio óptico. Após análise histopatológica dos músculos, procedeu-se à documentação dos resultados obtidos, através de fotografias (filme Kodak Plus-X pan 125 color) tiradas em em fotomicroscópio Zeiss AXIOPHOT.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância da diferença entre os dados dos grupos tratados com o veneno ou com veneno + SAB ou SAC foi determinada com test t-Student para dados não pareados. Foram considerados estatisticamente significantes diferenças com $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

3-Resultados

.3.1- TOXICIDADE

A tabela 1 mostra os valores da DL₅₀ dos venenos de JRA, JSU, MOO, ERY, NEU, CDT e seus limites de confiança em nível de 95%, determinadas em pintainho pela via intramuscular (i.m.). Os venenos botrópicos mostraram-se diferentes quanto à sua capacidade de determinar a morte dos animais, apresentando assim diferentes graus de potência. Sendo o veneno de ERY o que mostrou maior potência, e o de JSU foi o que exibiu menor potência.

Tab. 1 - **Valores da DL₅₀ de venenos botrópicos* e seus limites de confiança a 95%.**

VENENO	DL ₅₀ mg/kg
<i>B. erythromelas</i>	0,55 (0,34-0,88)
<i>B. neuwiedi</i>	1,56 (1,15-2,12)
<i>B. moojeni</i>	2,66 (2,10-2,78)
<i>B. jararaca</i>	5,00 (3,60-6,80)
<i>B. jararacussu</i>	26,90 (15,50-46,80)
<i>C. d. terrificus**</i>	0,038 (0,033 a 0,043)

* Os venenos foram administrados pela via i.m. (músculo peitoral esquerdo) em pintainho (30-40g).

** Veneno crotálico incluído para comparação.

3.2- ESTUDO MIOGRÁFICO

3.2.1. Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

3.2.1.1- Estimulação indireta:

Nos experimentos realizados para determinar-se o tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil do músculo, foram utilizadas as doses de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ para os venenos de JAR, JSU, MOO, ERY; 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ para o veneno de NEU e 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ para o veneno de CDT. Todos os venenos bloquearam a contração muscular de modo dose-dependente (figuras 2 e 3 e tabela 2).

O veneno de NEU, o mais potente em bloquear a junção neuromuscular, inibiu as respostas contráteis à estimulação indireta, na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 3). Todos os venenos estudados, em todas as doses, determinaram bloqueio de 50% das respostas musculares, em um período inferior a 120 minutos de incubação. Exceção ao veneno de JSU, que na dose de 50 $\mu\text{g/ml}$, não atingiu 50% de bloqueio neuromuscular ao final desse período (fig. 3). Os venenos de JAR, JSU, MOO e ERY, nas doses de 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$, mostraram-se capazes de induzir contratura. Esse efeito foi portanto dependente da dose (fig. 2).

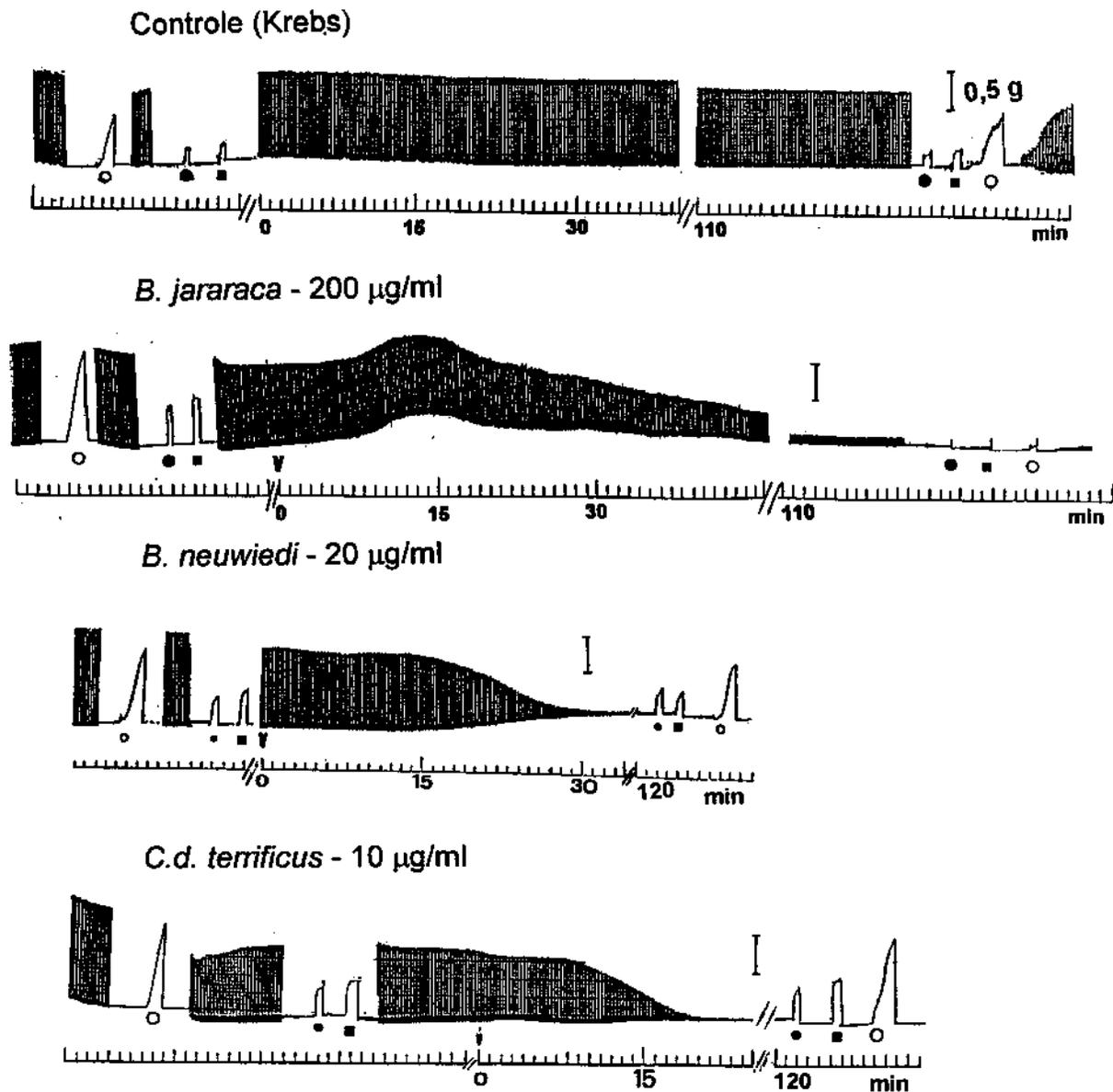


Fig. 2 - Resposta contrátil à estimulação elétrica indireta em preparação *biventer cervicis* de pintainho (pulsos supra-maximais de 0,2 msec e 0,1Hz). Resposta contraturante da ACh (● 60 µM, ■ 120 µM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno (v). O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

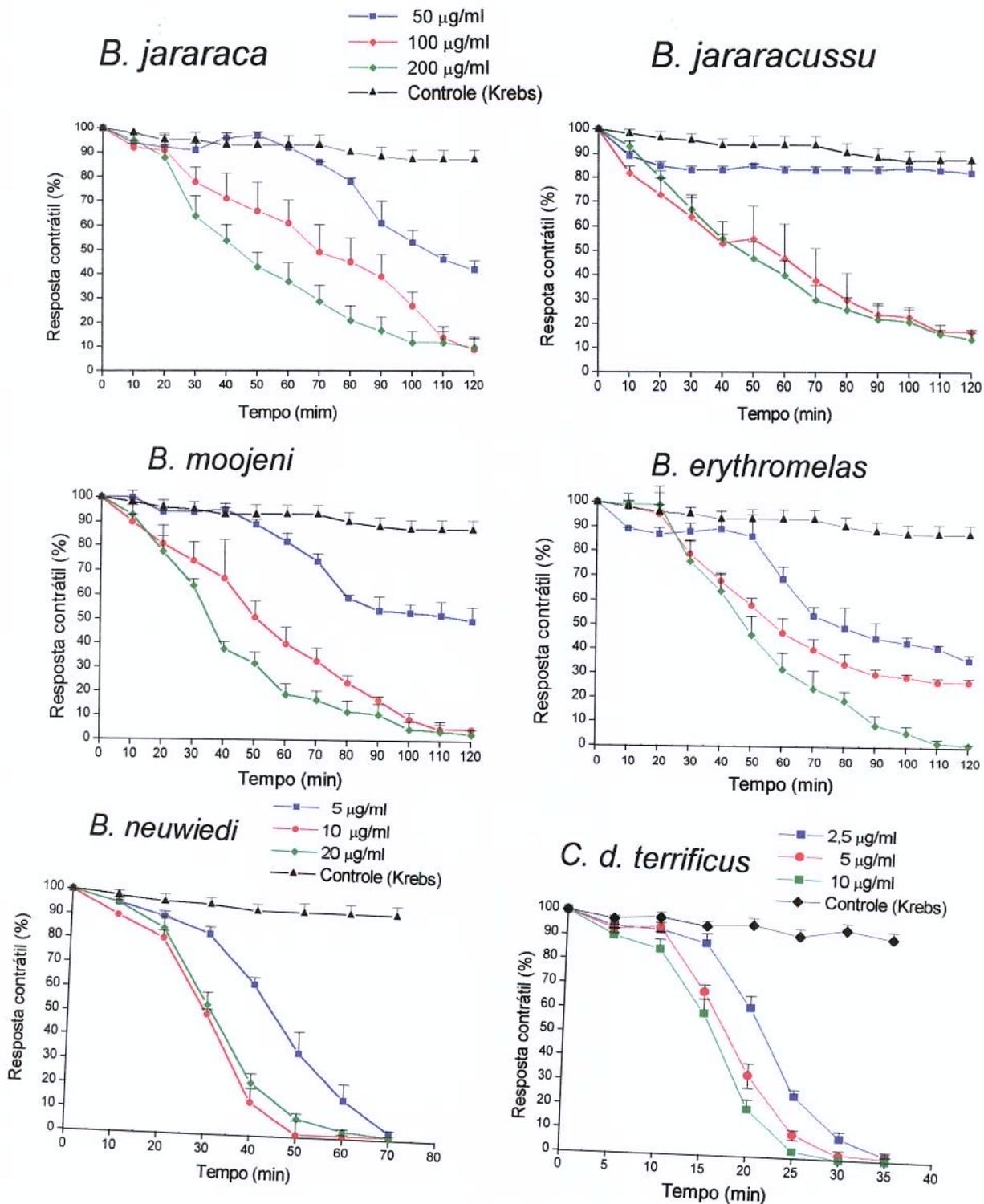


Fig. 3 - Capacidade dos diferentes venenos estudados em induzir bloqueio neuromuscular em preparação *biventer cervicis* de pintainho. Cada ponto representa a média de 3 a 10 experimentos \pm EPM.

Tab. 2 - Tempo necessário para o bloqueio de 50% da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho, incubado com veneno bruto.

VENENO	DOSE ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo para 50% de bloqueio (min)	n
<i>B. jararaca</i>	50	107,3 \pm 2,6	3
	100	68,0 \pm 8,1	3
	200	48,0 \pm 6,7	9
<i>B. jararacussu</i>	50	--	4
	100	58,6 \pm 13,7	3
	200	46,8 \pm 5,7	9
<i>B. moojeni</i>	50	95,0 \pm 11,2	3
	100	50,6 \pm 7,3	4
	200	34,0 \pm 1,2	7
<i>B. erythromelas</i>	50	87,0 \pm 9,6	3
	100	59,6 \pm 4,9	3
	200	47,4 \pm 6,4	6
<i>B. neuwiedi</i>	5	45,0 \pm 2,0	3
	10	30,0 \pm 1,9	6
	20	30,5 \pm 1,8	10
<i>C. d. terrificus</i>	2,5	22,0 \pm 1,0	3
	5	18,5 \pm 0,8	4
	10	15,8 \pm 0,6	8

3.2.1.2 Respostas ao efeito contraturante da acetilcolina e do potássio:

A incubação da preparação com os venenos de JAR, JSU, MOO e ERY reduziram de modo dose dependente a resposta contraturante da acetilcolina. Por outro lado, as contraturas induzidas pelo KCl, foram abolidas, após tratamento da preparação com esses venenos. Ao contrário, os venenos de NEU e CDT, determinaram um aumento da amplitude da contratura em resposta à adição de acetilcolina ao banho, os quais possibilitaram aumento na amplitude da resposta da ordem de 50 e 20% respectivamente. Em relação à resposta contraturante do KCl, observou-se redução de sua amplitude de forma dependente da dose, quando a preparação foi incubada com o veneno de NEU (fig. 4).

Nos experimentos controle, as respostas mantiveram-se estáveis, na ausência de veneno após 120 minutos de estimulação indireta; as respostas à ACh e ao KCl ficaram em média de $98\% \pm 14$ e $91\% \pm 3$, respectivamente.

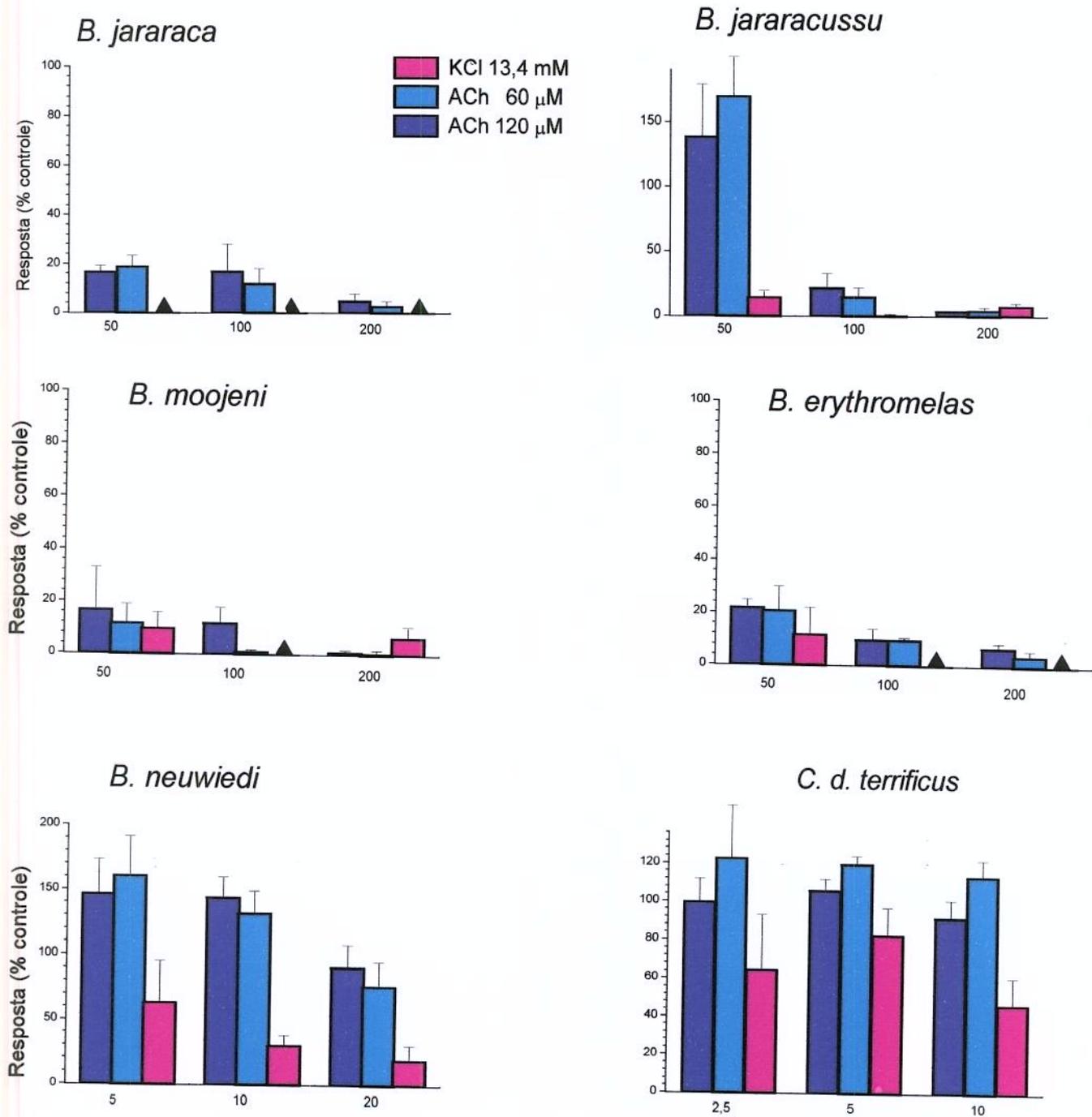


Fig. 4 - Efeito dos venenos estudados sobre as respostas da preparação *biventer cervicis* de pintainho à acetilcolina e potássio - As preparações foram expostas ao veneno, nas concentrações indicadas pelos números (μ g/ml) colocados sob cada histograma. O símbolo (\blacktriangle) na abscissa, indica que o veneno bloqueou totalmente as respostas à ACh e ao KCl. Cada ponto representa a média de 4 a 9 experimentos \pm EPM.

3.2.1.3 Antagonismo pelo antiveneno comercial

- *Bothrops jararaca*

Foram realizados 4 experimentos, utilizando-se a dose de 200 $\mu\text{g/ml}$ de veneno, previamente incubado a 37°C, com 40 $\mu\text{l/ml}$ de soro antibotrópico comercial, por 30 minutos. Na presença do antiveneno, o efeito bloqueador neuromuscular foi parcialmente abolido ao final de 120 minutos, com uma proteção de 65% da resposta contrátil (fig. 6). O antiveneno botrópico protegeu a resposta a acetilcolina ($p < 0,05$), mas não impediu de forma significativa a contratura induzida pelo KCl (fig. 5).

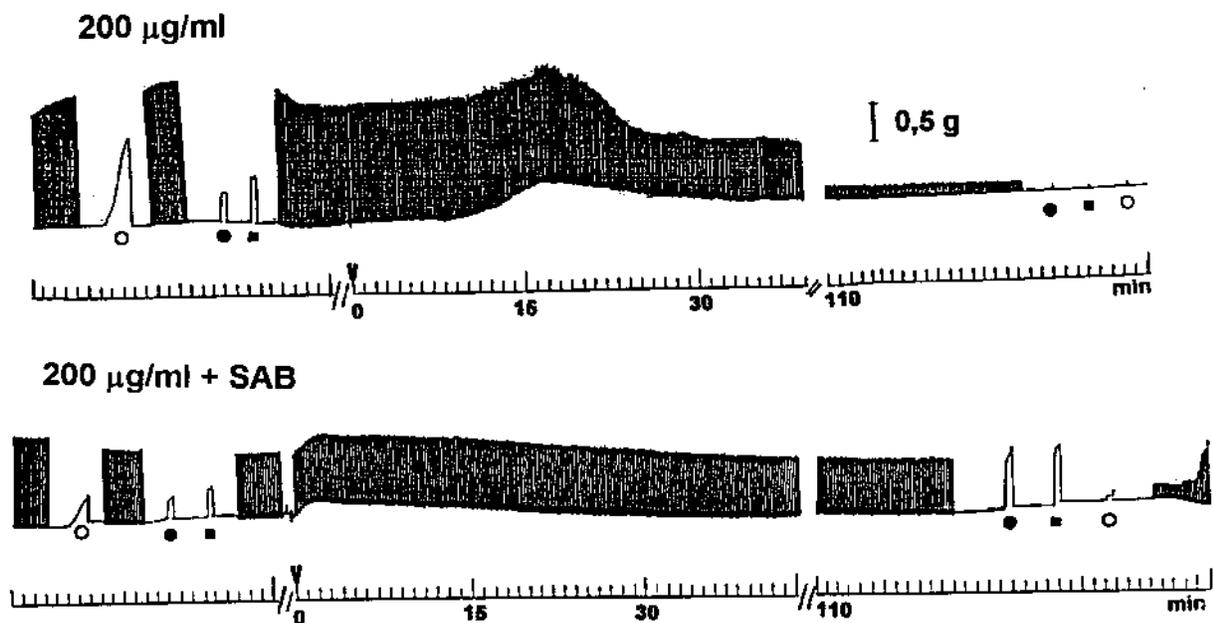


Fig. 5 - Efeito do veneno de *B. jararaca*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta ((), 2 msec e 0,1 Hz). Em v, veneno sozinho ou com SAB foi adicionado. Resposta contraturante da ACh (● 60 μM , ■ 120 μM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

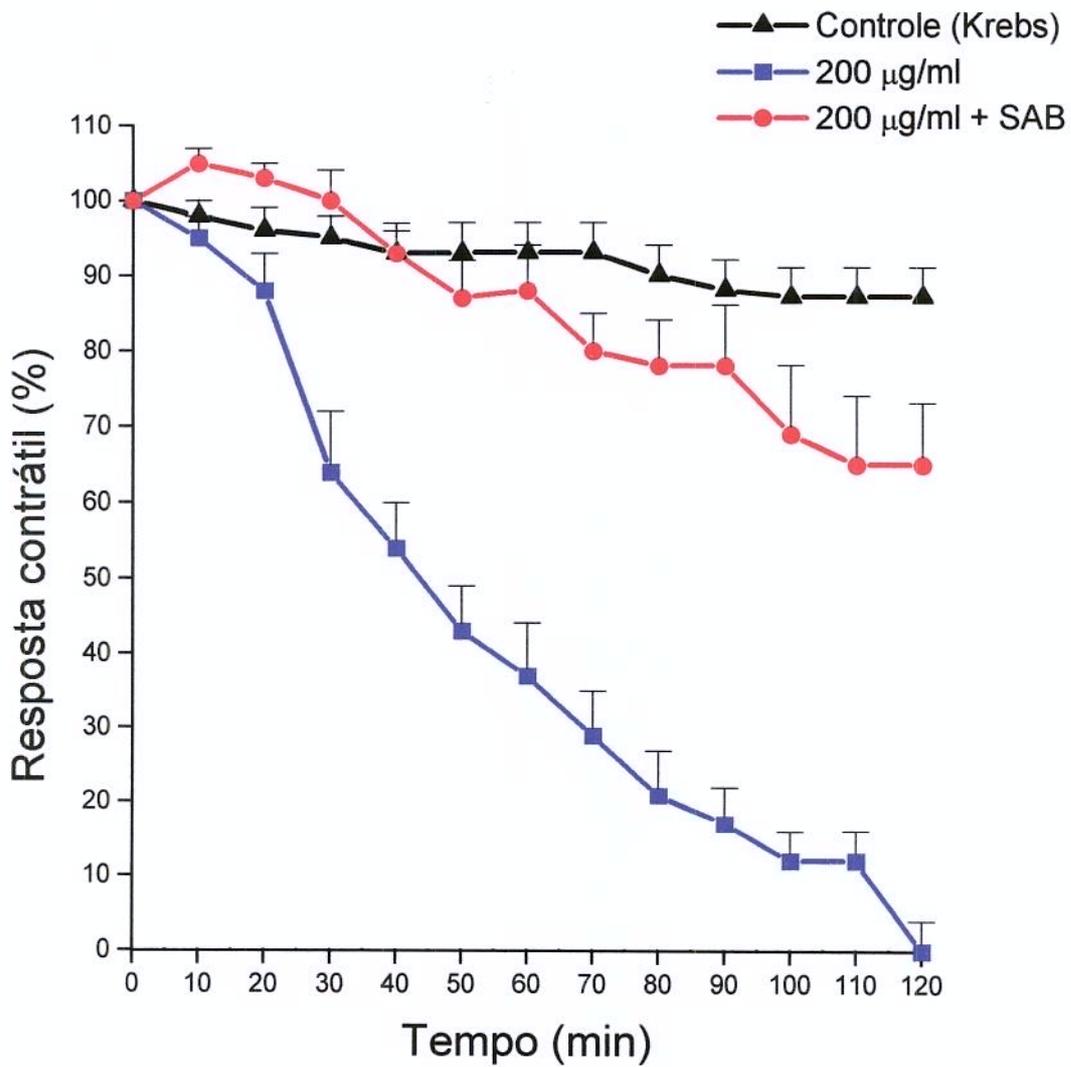


Fig. 6- Efeito do veneno de *B. jararaca* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 9 experimentos.

-Bothrops jararacussu

O soro antibotrópico comercial reduziu, em 50%, o efeito bloqueador neuromuscular provocado pelo veneno de JSU (n=4) (Fig. 8). A contratura, em resposta à acetilcolina, manteve-se abolida, após a incubação da preparação com o antiveneno, ao passo que houve uma pequena contratura induzida pelo KCl, que não foi significativamente diferente daquela induzido pelo veneno bruto (fig. 7).

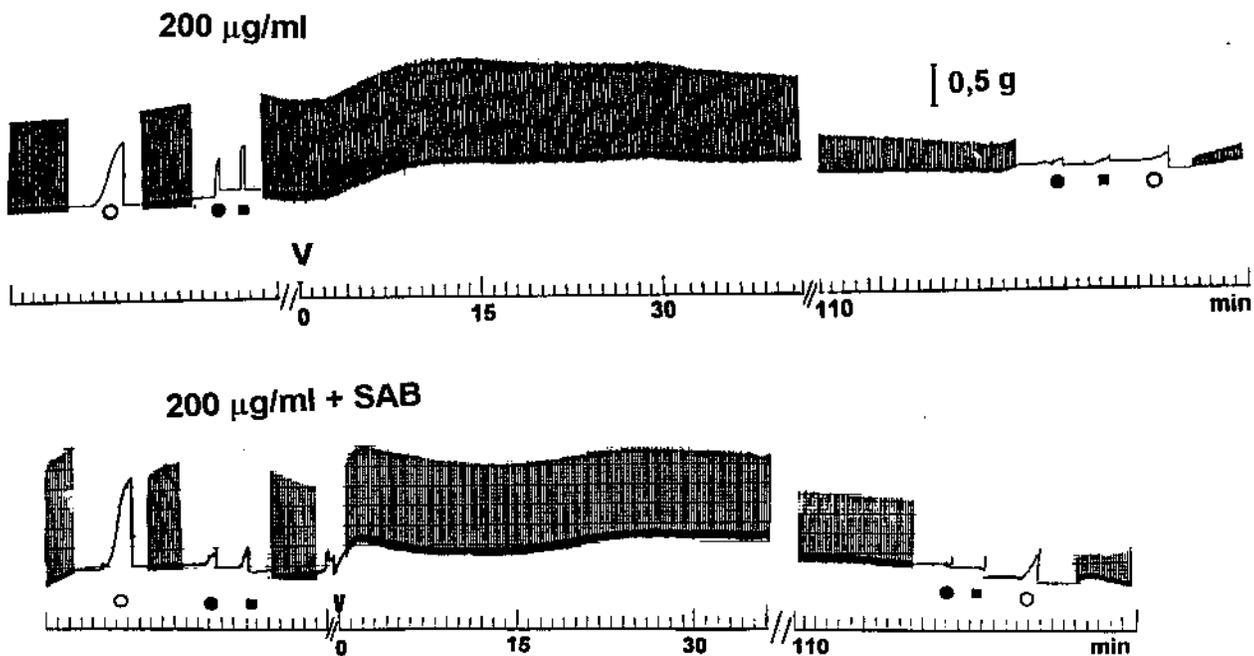


Fig. 7- Efeito do veneno de *B. jararacussu*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em v, veneno sozinho ou com SAB foi adicionado. Resposta contraturante da ACh (● 60 µM, ■ 120 µM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

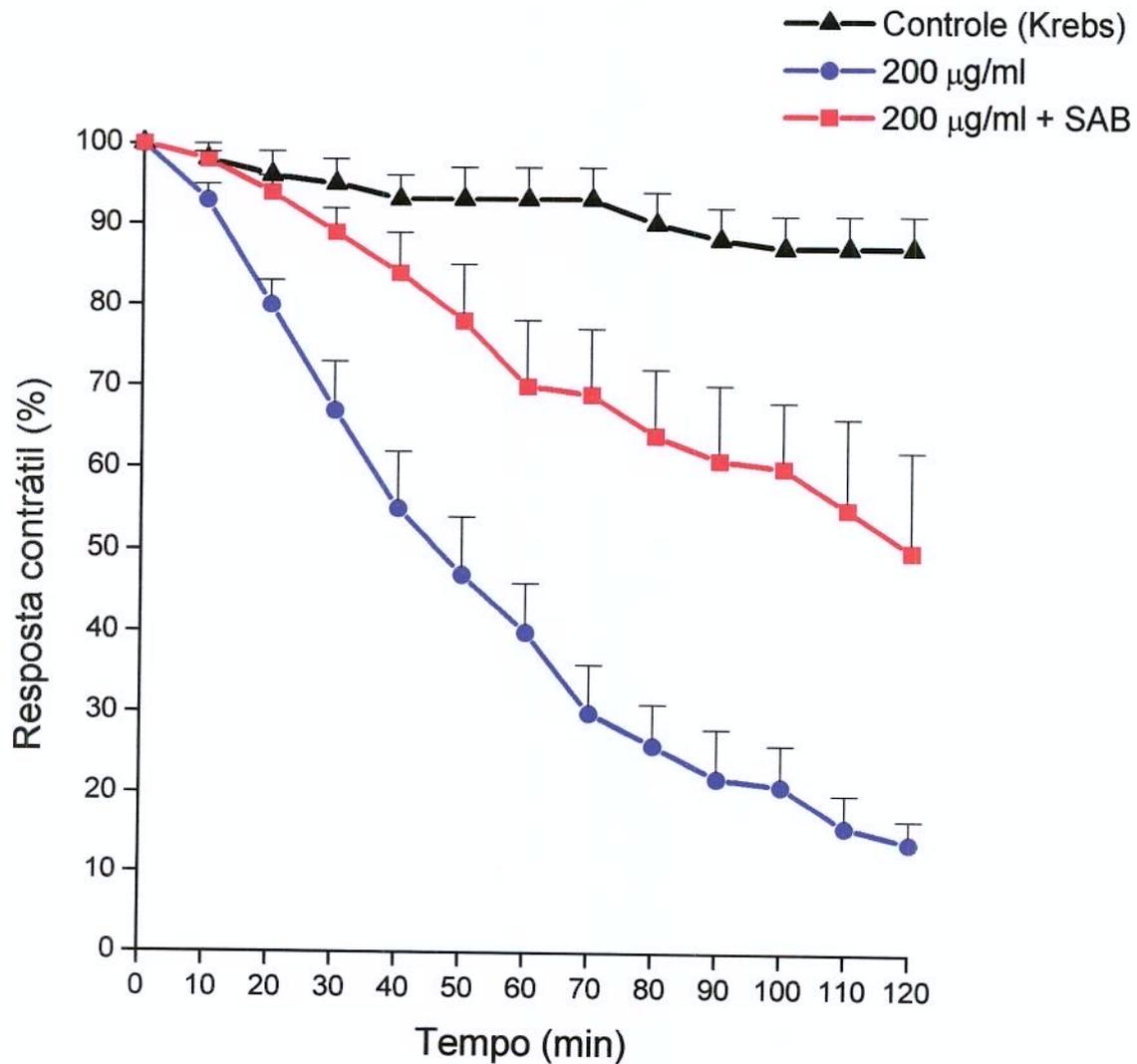


Fig. 8 - Efeito do veneno de *B. jararacussu* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização.

Cada ponto representa a média \pm EPM de 3 a 9 experimentos.

-Bothrops moojeni

Usando o mesmo protocolo, o veneno de MOO foi neutralizado pelo soro antibotrópico comercial, ao final de 120 minutos de incubação (n=5). Observou-se, além da completa inibição do bloqueio característico, um visível aumento da amplitude de contração (na ordem de 12%), nos primeiros 80 minutos (fig. 10). As respostas contraturantes à acetilcolina e ao KCl não foram significativamente diferentes daquelas obtidas com o veneno bruto, na ausência de incubação com o anti-soro comercial (fig. 9).

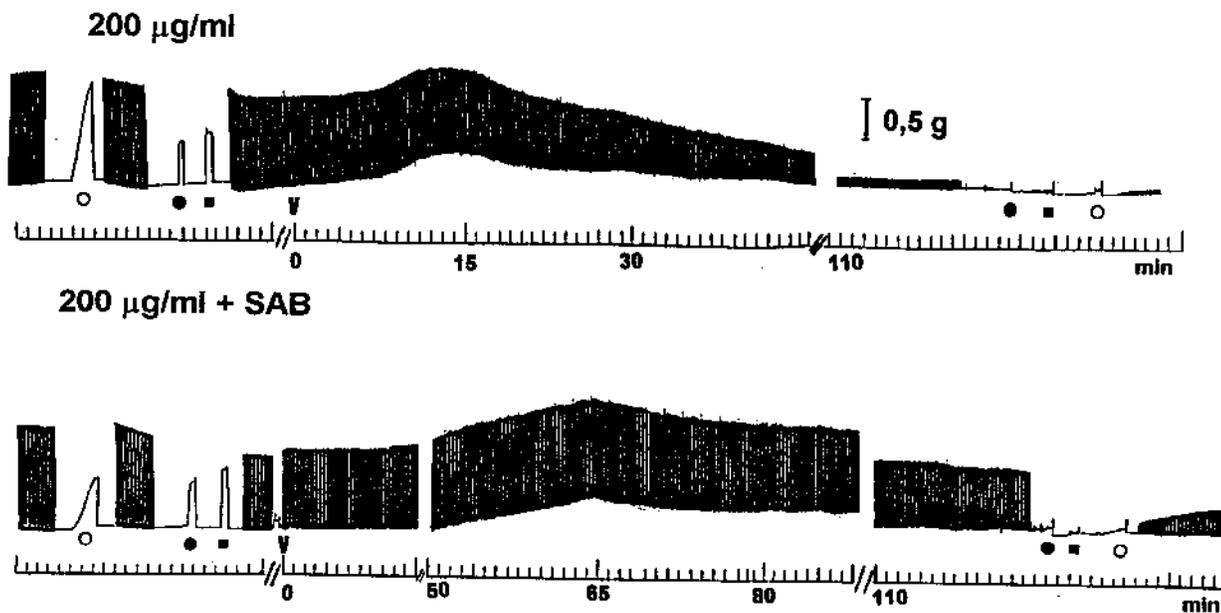


Fig. 9 - Efeito do veneno de *B. moojeni*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 mseg e 0,1 Hz). Em v, veneno sozinho ou com SAB foi adicionado. Resposta contraturante da Ach (● 60 µM, ■ 120 µM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

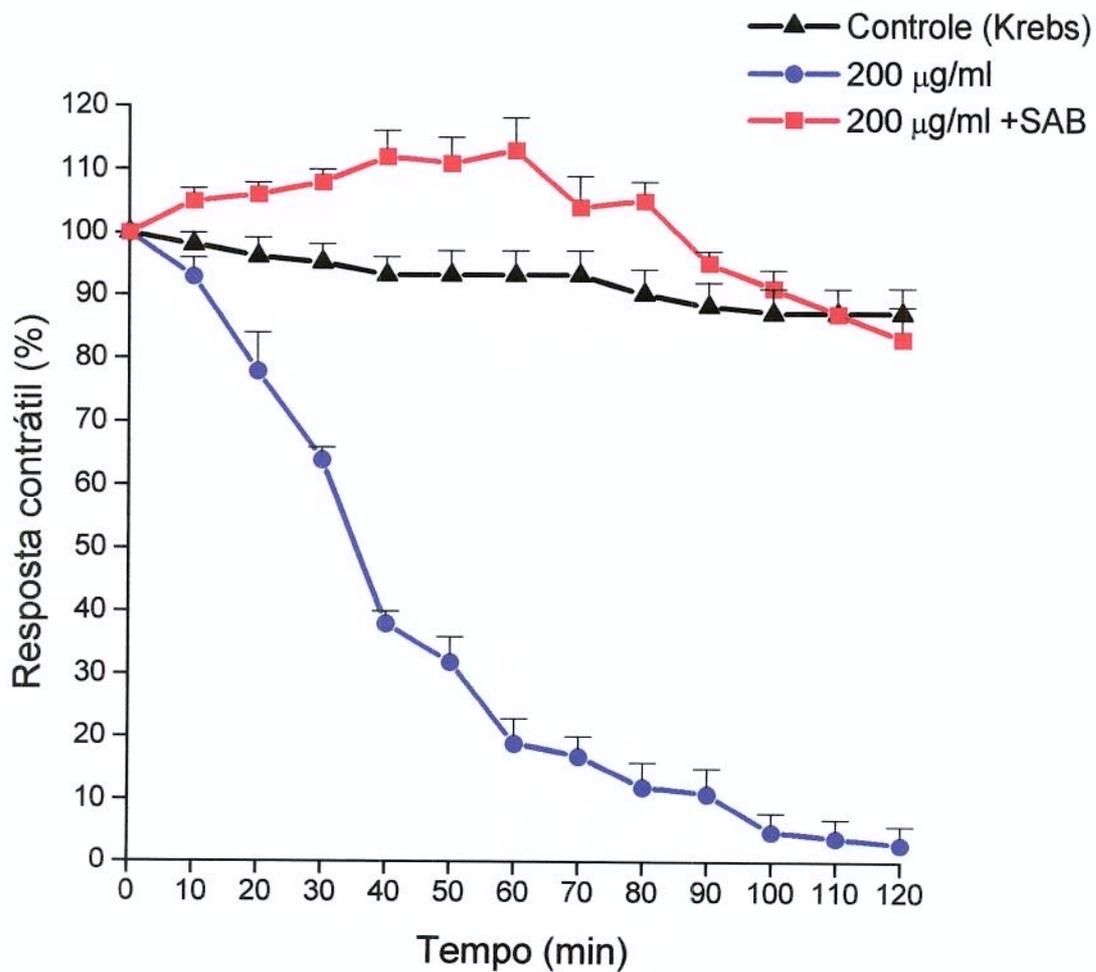
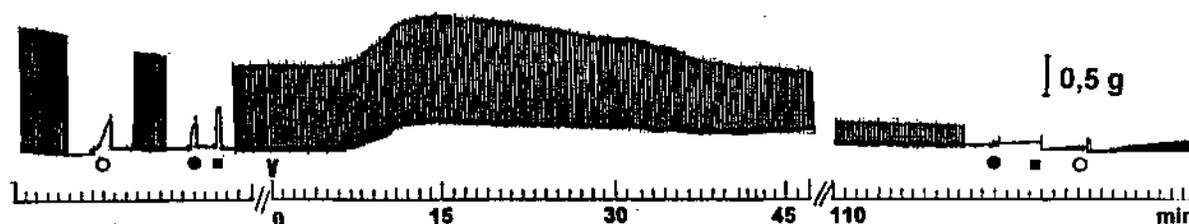


Fig. 10 - Efeito do veneno de *B. moojeni* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 a 7 experimentos.

-Bothrops erythromelas

O soro antibotrópico comercial protegeu somente de maneira parcial (40%) o efeito bloqueador neuromuscular do veneno de ERY, ao final de 120 minutos de incubação (n=5) (fig. 12). Nestas preparações, esse veneno exibiu um discreto e fugaz aumento da amplitude de contração muscular (3%), nos primeiros 20 minutos (figuras 11 e 12).

200 $\mu\text{g/ml}$



200 $\mu\text{g/ml}$ + SAB

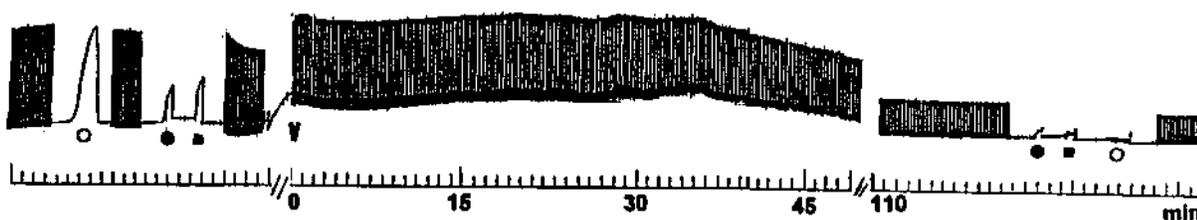


fig. 11 - Efeito do veneno de *B. erythromelas*, sobre o perfil miográfico, da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em v, veneno sozinho ou com SAB foi adicionado. Resposta contraturante da Ach (● 60 μM , ■ 120 μM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

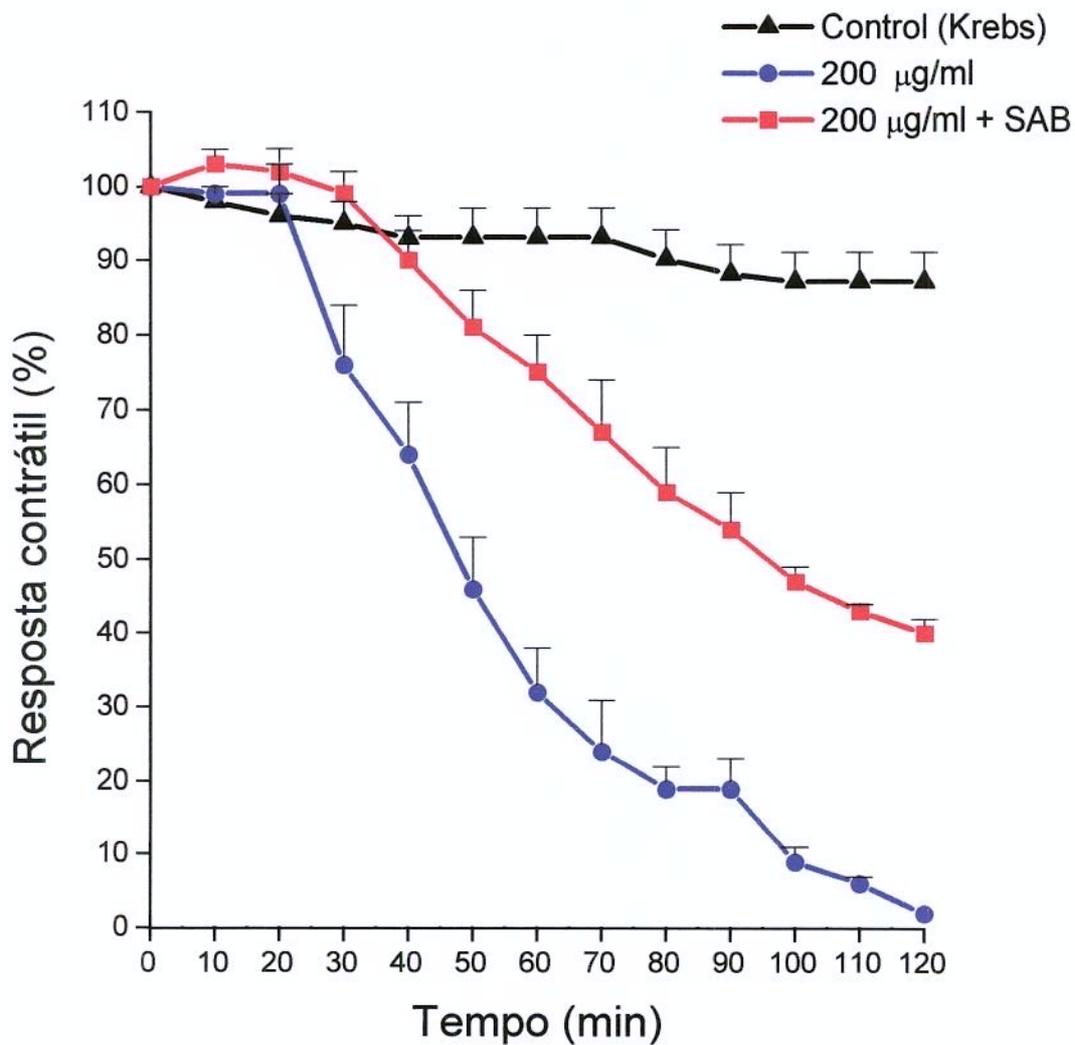


Fig. 12 - Efeito do veneno de *B. erythromelas* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 a 6 experimentos.

-*Bothrops neuwiedi*

O veneno de NEU, em pequenas doses (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$), exibe um perfil miográfico semelhante ao do veneno de cascavel ou crotoxina (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$), quando ensaiado na preparação *biventer cervicis* de pintainho. Assim, após o bloqueio completo das resposta musculares, o músculo ainda respondia com uma contratura à adição ao banho do agonista ACh e ao KCl (fig. 14). No entanto usando-se doses maiores (100 e 200 $\mu\text{g/ml}$) e, em condições experimentais semelhantes, esse veneno comporta-se como um veneno botrópico típico ou seja, com contratura precedendo o bloqueio neuromuscular, além da inibição das respostas à ACh e ao KCl (fig. 15).

O antiveneno botrópico comercial incubado com 20 e 200 $\mu\text{g/ml}$ do veneno, durante 30 minutos, não neutralizou com eficácia, o efeito bloqueador da resposta contrátil em 120 minutos de observação; no entanto houve um acentuado aumento (30%) na amplitude de contrações musculares, quando a dose utilizada foi 200 $\mu\text{g/ml}$ (fig.13) As respostas à acetilcolina foram mantidas totalmente, na presença do antiveneno, mas não a resposta ao KCl (fig. 15) .

Por outro lado, quando o antiveneno crotálico comercial foi usado em lugar do botrópico, nas mesmas condições experimentais, observou-se que as respostas contráteis foram totalmente neutralizadas, quando a dose utilizada foi

20 $\mu\text{g/ml}$ e parcialmente neutralizada quando a dose foi 200 $\mu\text{g/ml}$ de veneno (fig. 15).

Em 4 experimentos, usando-se a dose de 200 $\mu\text{g/ml}$, misturando-se os antivenenos botrópico e crotálico na proporção de 1:1 e seguindo-se o mesmo protocolo usado para os experimentos anteriores, observamos uma proteção do antiveneno sobre as respostas contráteis, no final de 120 minutos, além de um aumento da amplitude das contrações musculares, nos primeiros 50 minutos. A resposta à acetilcolina permaneceu como a do controle, mas não a resposta ao KCl (fig. 15).

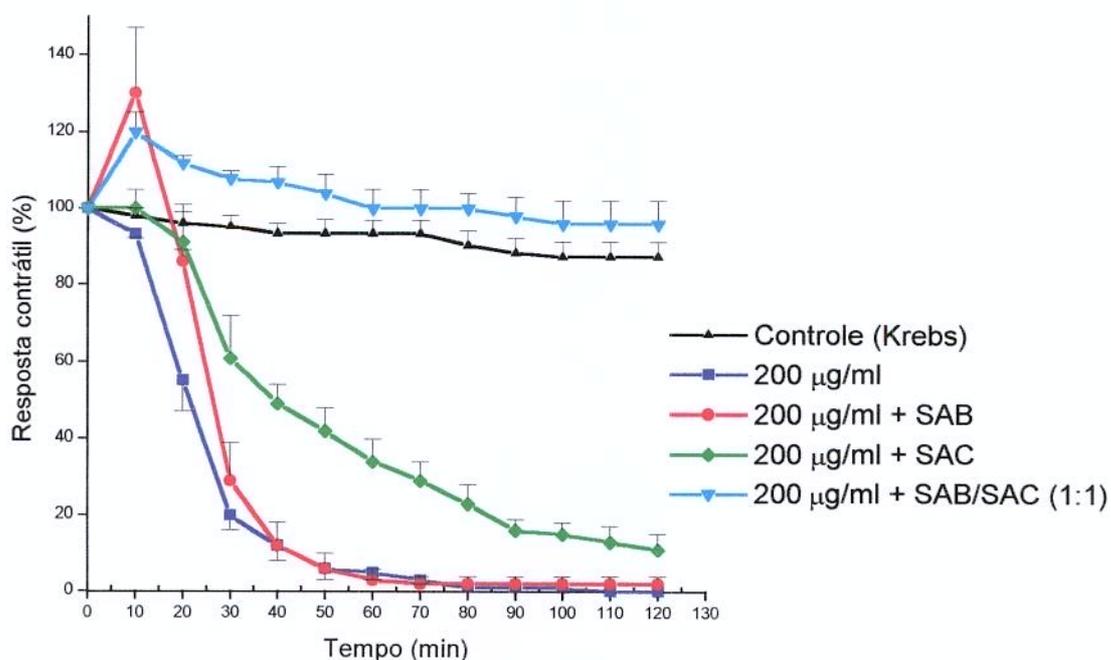


Fig. 13 - Efeito do veneno de *B. neuwiedi* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 10 experimentos.

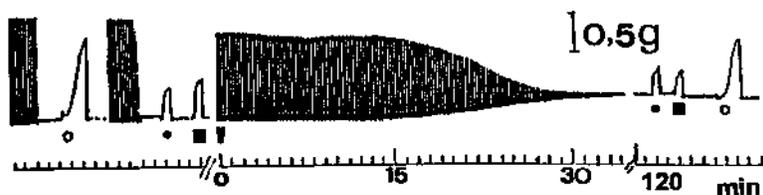
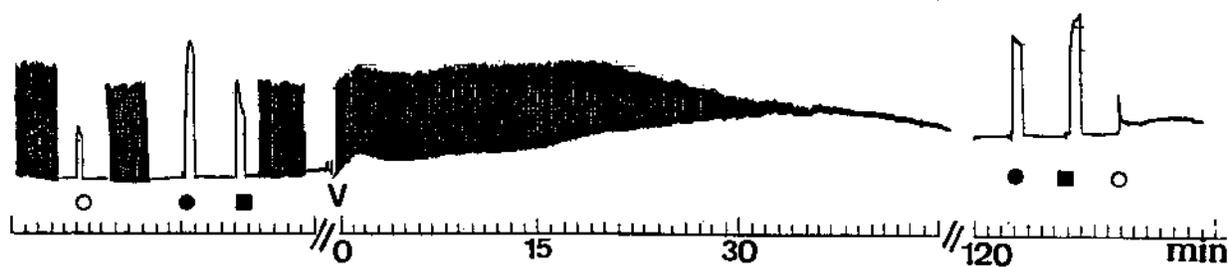
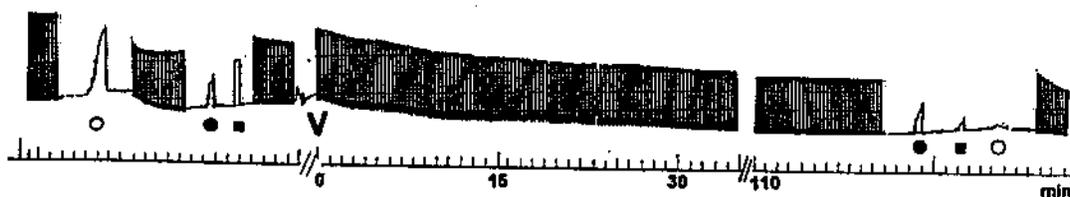
20 $\mu\text{g/ml}$ 20 $\mu\text{g/ml}$ + SAB20 $\mu\text{g/ml}$ + SAC

Fig. 14 - Efeito do veneno de *B. neuwiedi* (20 $\mu\text{g/ml}$) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em v, veneno de *B. neuwiedi* foi adicionado ao banho sozinho ou com o antiveneno (incubado por 30 minutos a 37°C, antes de usado). Resposta contraturante da ACh (● 60 μM , ■ 120 μM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

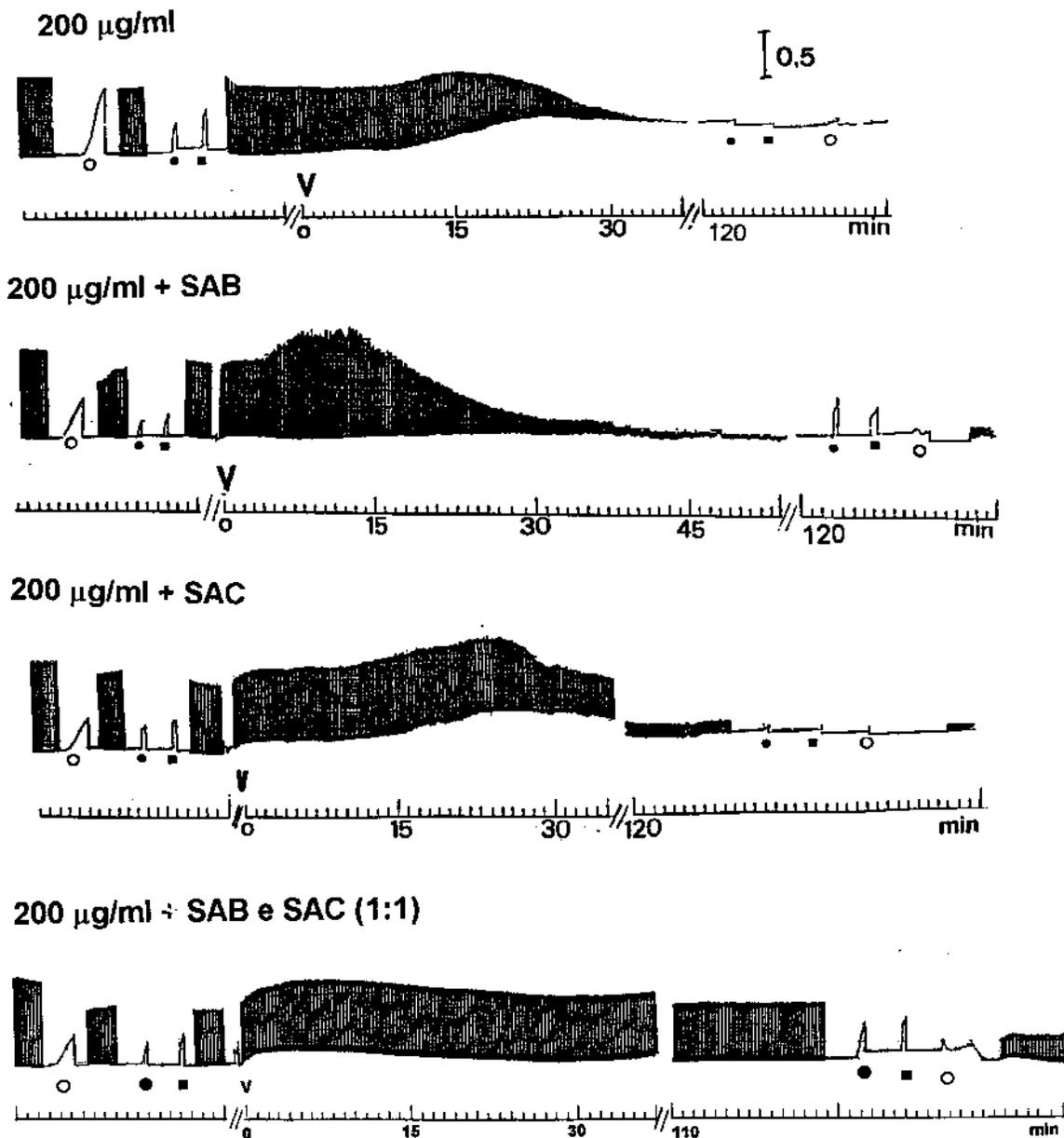
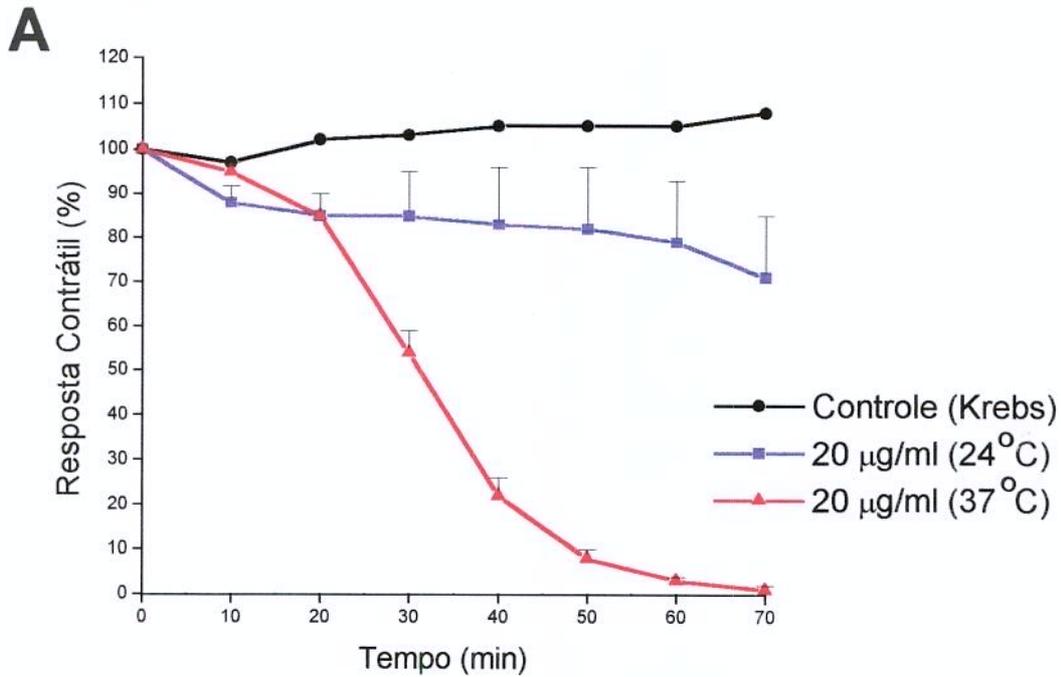


Fig. 15- - Efeito do veneno de *B. neuwiedi* (200 $\mu\text{g/ml}$) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em v, veneno de *B. neuwiedi* foi adicionado ao banho sozinho ou com o antiveneno (incubado por 30 minutos a 37°C, antes de usado). Resposta contraturante da ACh (● 60 μM , ■ 120 μM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

Alteração da temperatura de incubação:

À semelhança do que acontece com a crotoxina, o efeito do veneno de NEU sobre a junção neuromuscular, mostrou-se sensível à diminuição da temperatura. Assim em 3 experimentos em que a temperatura do banho foi mantida a 24°C em vez de 37°C, observou-se uma inibição do efeito bloqueador do veneno bruto (20 µg/ml). Desta forma evidenciou-se um aspecto a mais que aproxima a peçonha de NEU do veneno de CDT (fig. 16).



B

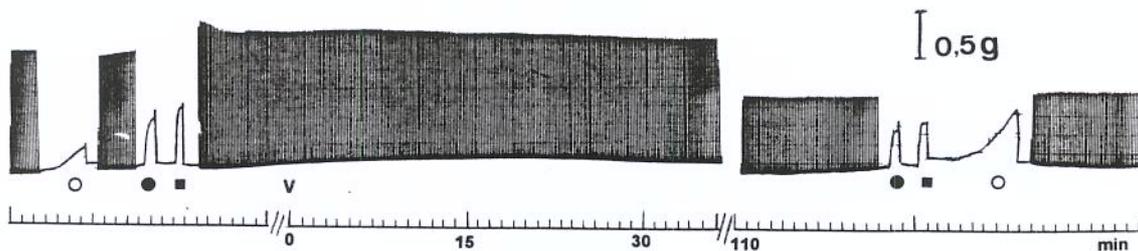


Fig. 16 - Efeito da temperatura sobre o bloqueio da resposta contrátil à estimulação elétrica indireta induzida pelo veneno de *B. neuwiedi* na preparação *biventer cervicis* (0,2 msec e 0,1 Hz) . A- Bloqueio da resposta contrátil à temperatura de 24°C comparado com a temperatura à 37°C. Cada ponto representa a média \pm EPM de 3 experimentos. B- Em v, *B. neuwiedi* (20 µg/ml) foi adicionado. Resposta contraturante da ACh (● 60 µM, ■ 120 µM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

-C. d. terrificus

O soro anticrotálico comercial neutralizou em 100%, o bloqueio das respostas contráteis do músculo, causadas pelo veneno, na dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 18). A resposta da preparação à acetilcolina manteve-se semelhante ao controle, após incubação com a mistura veneno + SAC, enquanto a resposta contraturante do KCl foi reduzida de modo significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle (fig. 17).

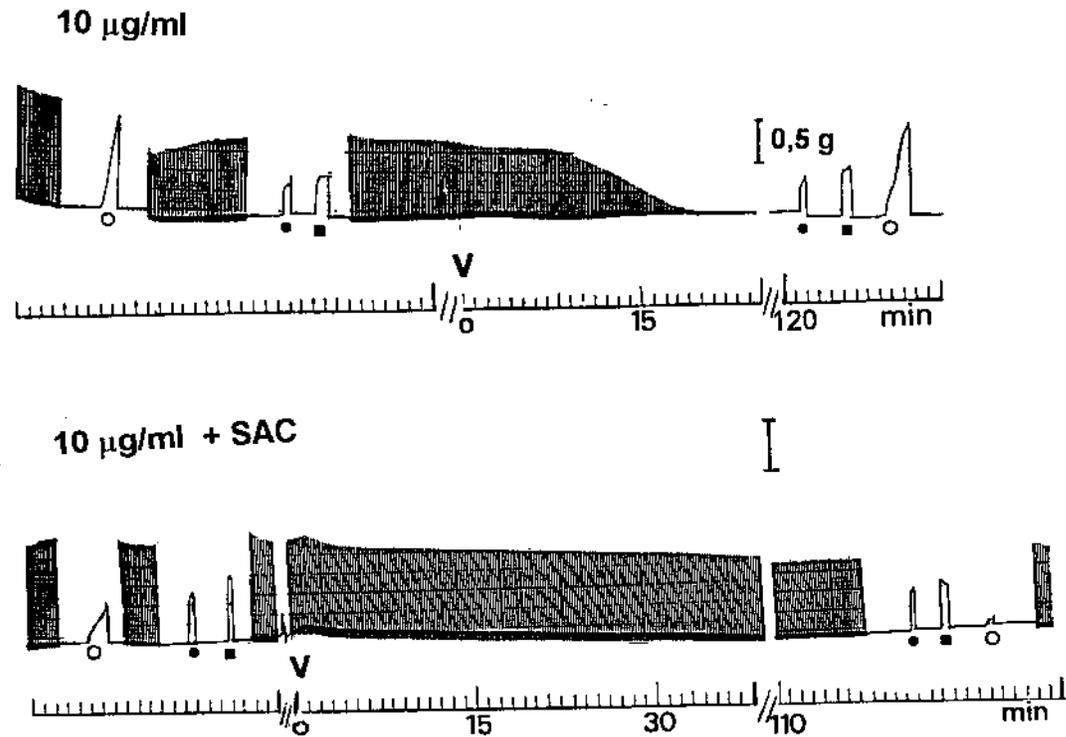


Fig. 17 - Efeito do veneno de *C.d.terrificus*, sobre o perfil miográfico da preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta (0,2 msec e 0,1 Hz). Em v, veneno sozinho ou com SAC foi adicionado. Resposta contraturante da ACh (● 60 μM , ■ 120 μM) e KCl (○ 13,4 mM) foi obtida antes e depois da adição do veneno. O traço superior vertical à direita indica a tensão usada nas preparações (0,5g).

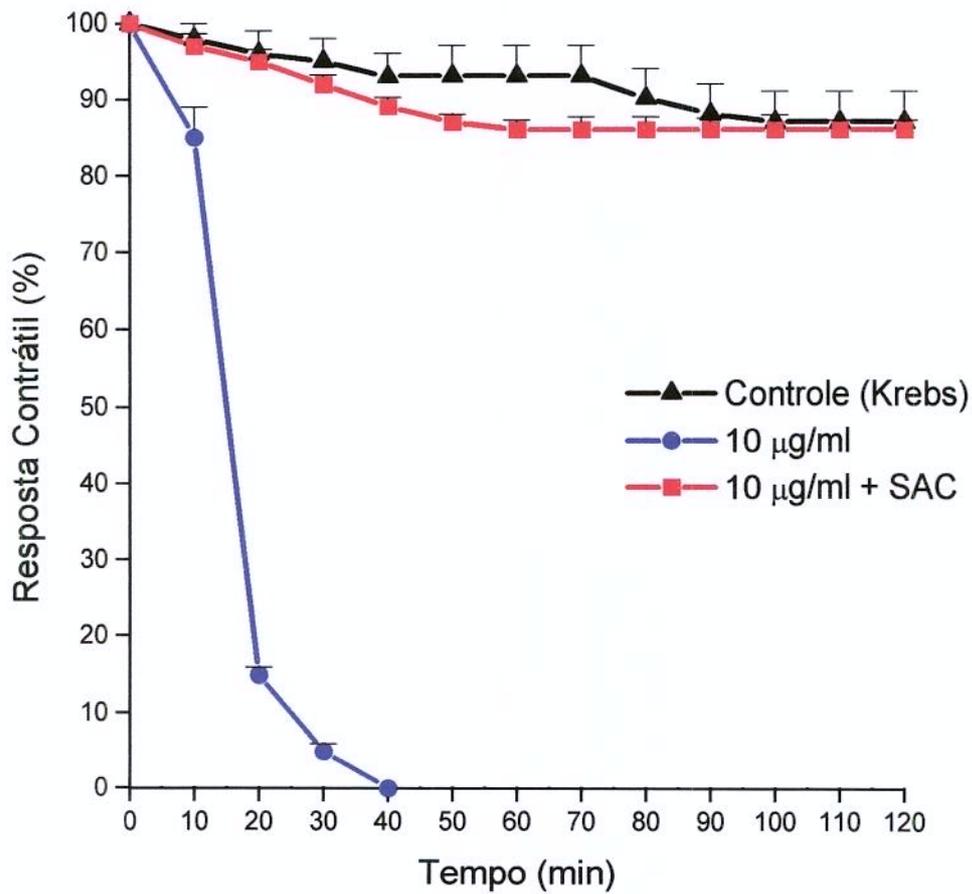


Fig. 18 - Efeito do veneno de *C. d. terrificus* sobre o bloqueio da resposta contrátil da preparação *biventer cervicis* de pintainho e sua neutralização. Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 a 8 experimentos.

3.3- ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE CREATINO QUINASE (CK)

A determinação dos níveis de CK liberada no meio de incubação usando-se a dose de 200 $\mu\text{g/ml}$ para os venenos botrópicos e 10 $\mu\text{g/ml}$ para o veneno crotálico, foi obtida através de alíquotas retiradas do líquido presente no banho. Todos os músculos *biventer cervicis* incubados com os diferentes venenos ensaiados, exibiram um significativo aumento ($p < 0.05$) nos valores de CK, em relação ao valor controle, a partir de 30 minutos de incubação da preparação. Os venenos de JSU e NEU foram os que levaram à maior liberação desta enzima e o de JAR foi o que levou à menor liberação, para a dose escolhida (fig. 19),.

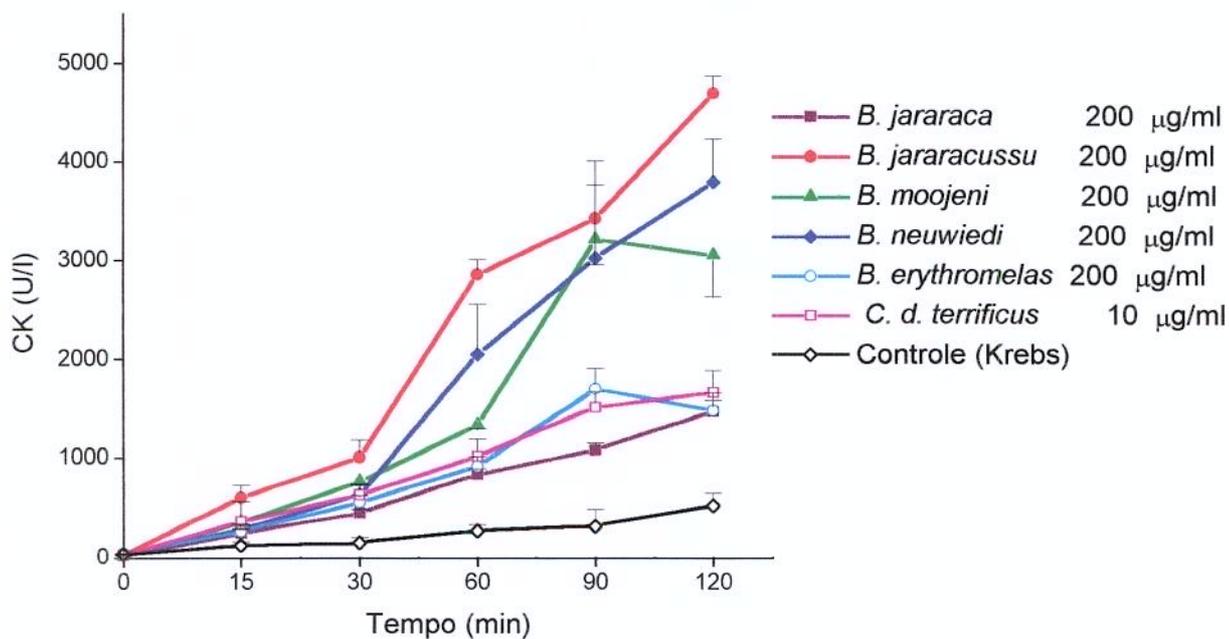


Fig. 19 - Liberação de CK induzida pelos venenos estudados. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos \pm EPM.

3.3.1 Antagonismo pelo antiveneno comercial

A liberação de CK foi diminuída, de modo significativo ($p < 0,05$), pelo antiveneno botrópico comercial para os venenos, JAR, MOO, ERY. Ambos os antivenenos, botrópico e crotálico, foram eficazes em neutralizar a liberação de CK induzida pelo veneno de NEU na preparação *biventer cervicis* de pintainho (fig. 20).

Quando o veneno ensaiado é o de JSU, a liberação de CK foi protegida pelo antiveneno, quando comparada com a liberação promovida pelo veneno bruto, mas não houve proteção se comparada com o controle (fig. 20).

O soro anticrotálico neutralizou eficazmente a liberação de CK pelo músculo ($p < 0,05$), quando o veneno ensaiado era o CDT (fig. 20).

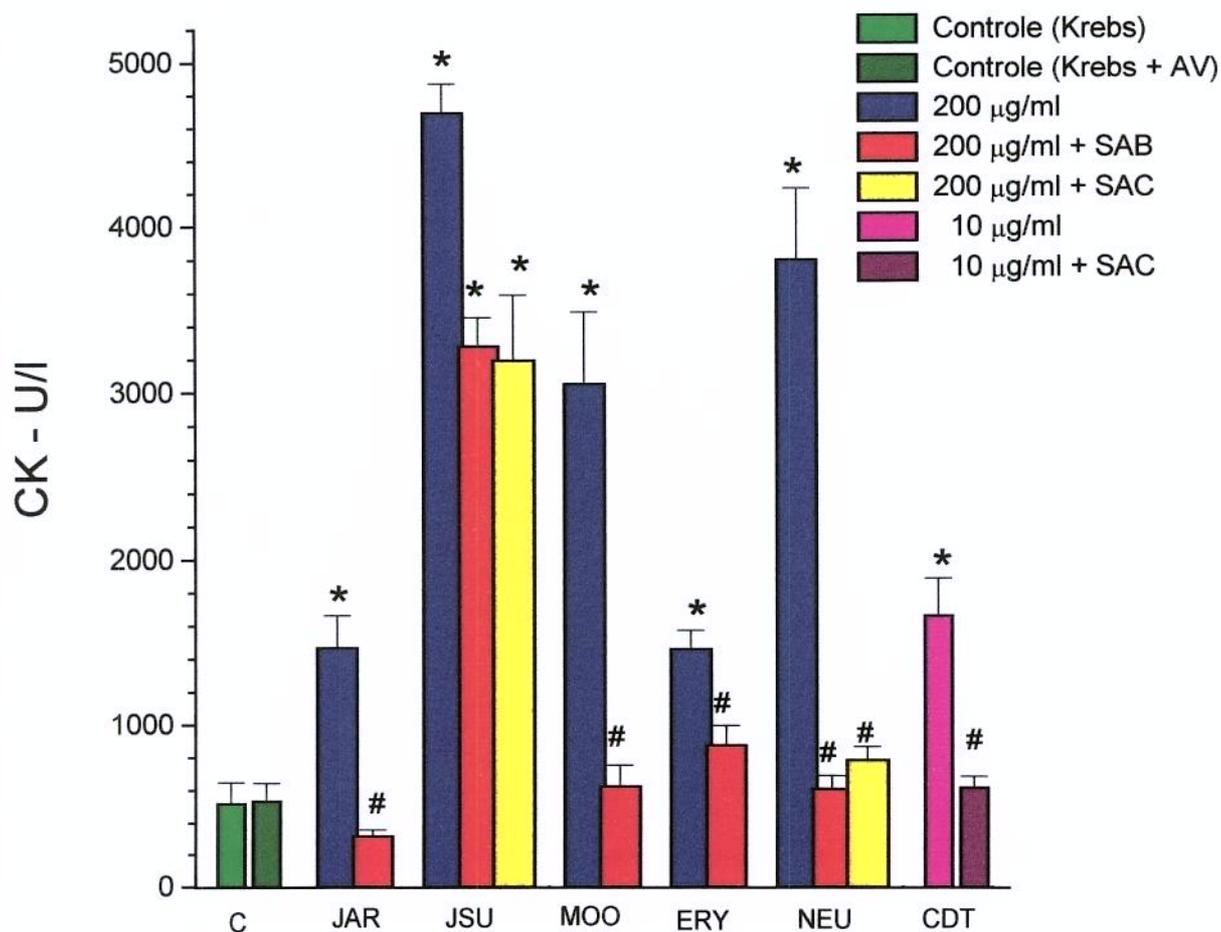
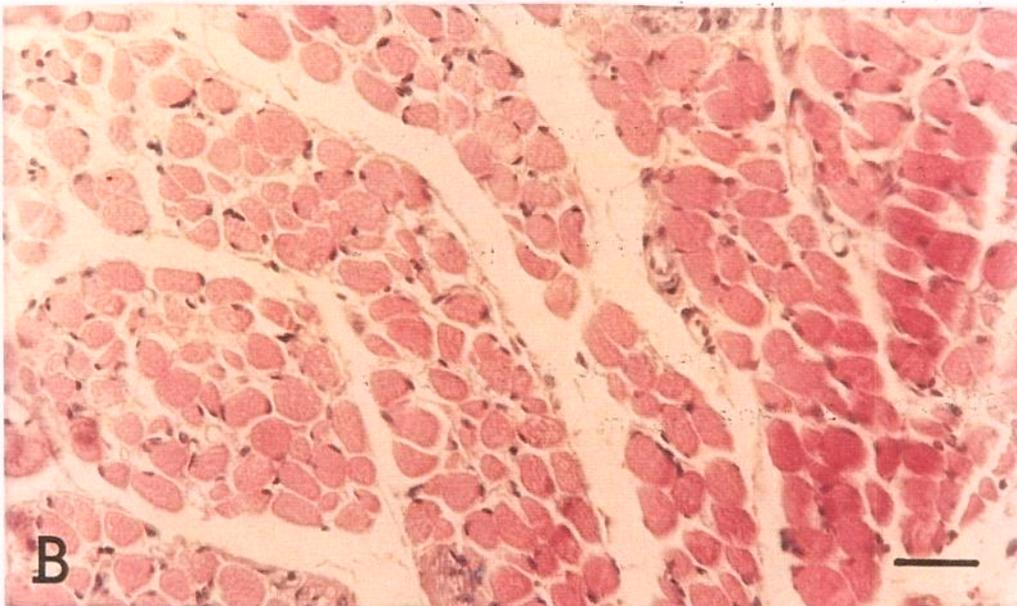
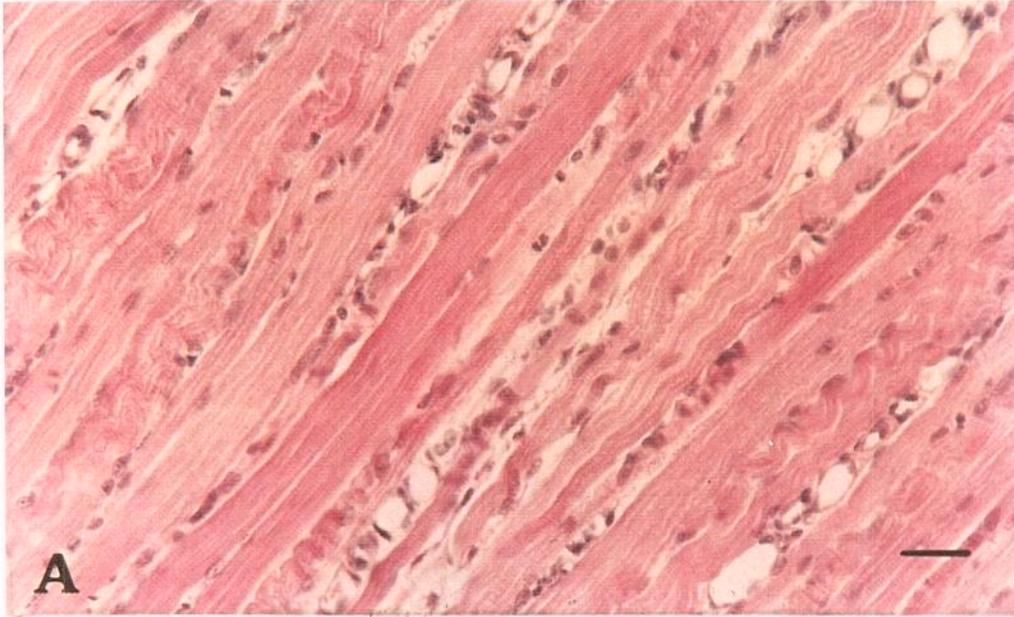


Fig. 20 - Efeito neutralizante do antiveneno comercial, sobre a liberação de CK, induzida pelos venenos estudados após 120 min de incubação. Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 a 8 experimentos, * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação aos venenos brutos.

3.4 ESTUDO MORFOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES CAUSADAS PELAS PEÇONHAS E SUA NEUTRALIZAÇÃO.

-Controle

A figura 21A e 21B mostra secção histológica do músculo *biventer cervicis* de pintainho, após 120 minutos de incubação com solução de Krebs, onde pode se observar o aspecto normal das fibras musculares esqueléticas com as estrias transversais normais e os feixes de fibras com aspecto poligonal normal.



Handwritten notes on the right side of the page, partially obscured and illegible.

Fig. 21 - **Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com solução de Krebs. H.E.**

(A) Secção longitudinal, mostrando o aspecto normal das fibras musculares, as estriações transversais e os núcleos periféricos grandes com cromatina frouxa. Barra=50 μm .

(B) Secção transversal dos feixes de fibras musculares que exibem perfil poligonal normal. Barra=30 μm .

O estudo *in vitro* da ação dos diferentes venenos botrópicos, sobre a estrutura histológica do músculo *biventer cervicis*, mostrou diferentes tipos de alterações nas fibras musculares, na dose de 200 µg/ml.

-B. jararaca

O veneno de JAR (200 µg/ml) mostrou atividade miotóxica importante que se expressou pela destruição abrupta das miofibrilas de forma que a fibra muscular aparecia 'quebrada' em ângulo reto e com o diâmetro levemente aumentado. Junto à área lesada, havia lise 'longitudinalmente' de feixes de miofibrilas, mantendo-se outras, ao longo de seu comprimento, aparentemente não rompidas, embora geralmente hipercontraídas. Nestes casos, o diâmetro da fibra muscular podia reduzir-se a menos da metade, restando uma substância pulverulenta na área da fibra muscular, onde as miofibrilas foram destruídas (fig. 22A). Como resultado dessa ação, as secções do músculo mostravam muitas regiões vazias ou frouxamente ocupadas por núcleos esparsos e restos de membranas.

A neutralização revelou um aspecto interessante, regionalizando a ação do anti-soro, isto é, as fibras musculares centrais do músculo não foram protegidas, enquanto as periféricas assemelhavam-se, morfológicamente, às características de músculos normais (fig. 22B).

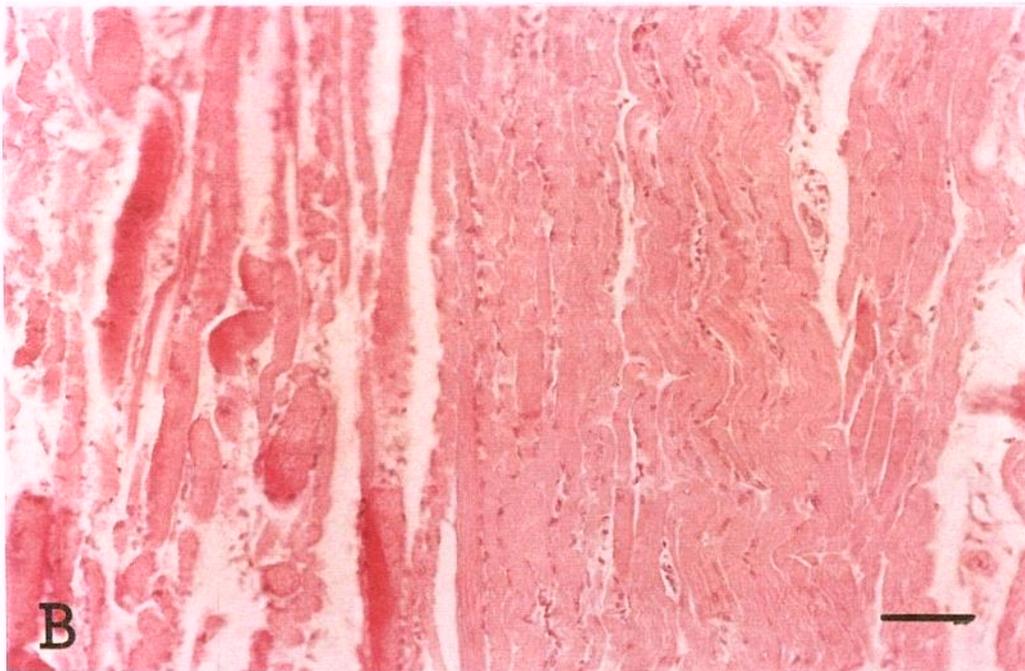
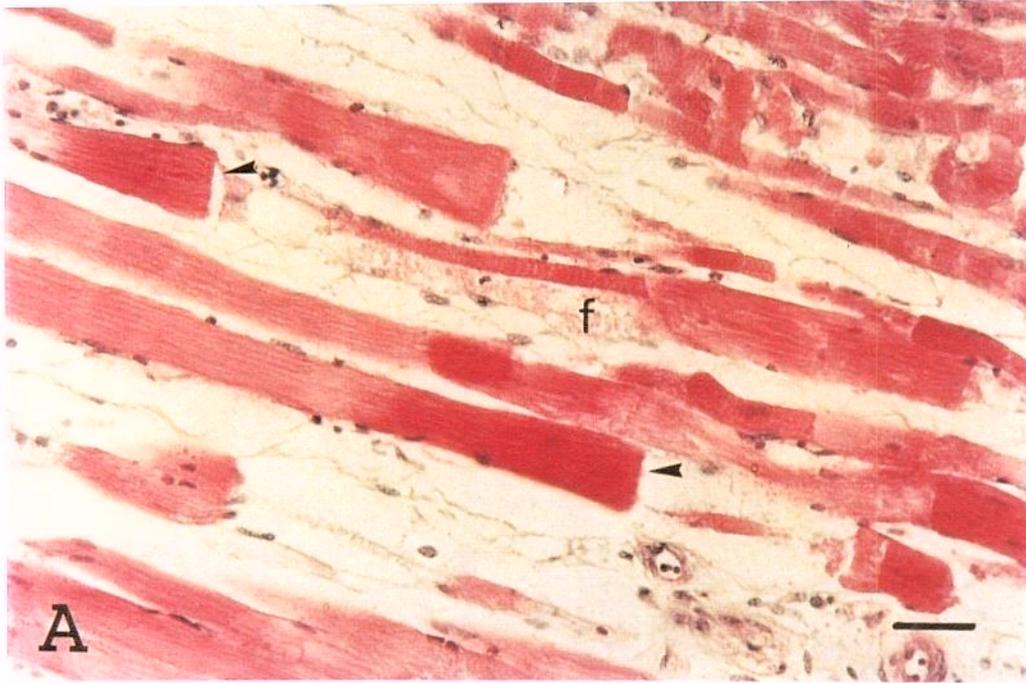


Fig. 22 - **Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. jararaca* (200 µg/ml). H.E.**

(A) Veneno: Em corte longitudinal, observe as drásticas alterações do diâmetro das fibras; hipercontração das extremidades truncadas (ponta de seta) e alterações do padrão de estriação. Note que há porções 'fantasmas' das fibras (f). Barra=30 µm.

(B) Veneno + SAB: A proteção foi mais evidente nas fibras periféricas, enquanto que as centrais não foram protegidas. Barra=40 µm.

-B. jararacussu

Com a mesma concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$, o veneno de JSU não só causou alterações que se assemelhavam às produzidas pelo veneno de JRA (destruição abrupta das miofibrilas ou de partes delas), mas também provocou nas porções das fibras musculares mantidas, alterações hialinas e (ou) desestruturação das miofibrilas ainda presentes. Como consequência, muitas porções das secções mostravam curtos perfis remanescentes de fibras mionecróticas ao lado de áreas com núcleos picnóticos soltos e com o que restou das miofibrilas destruídas (fig. 23A).

Em cortes transversais, havia regiões do músculo com grande heterogeneidade do diâmetro das fibras e, às vezes, apenas os seus núcleos soltos e picnóticos (fig. 23B).

A neutralização com o anti-soro parece ter prevenido a ação miotóxica do veneno de JSU (fig. 23C).

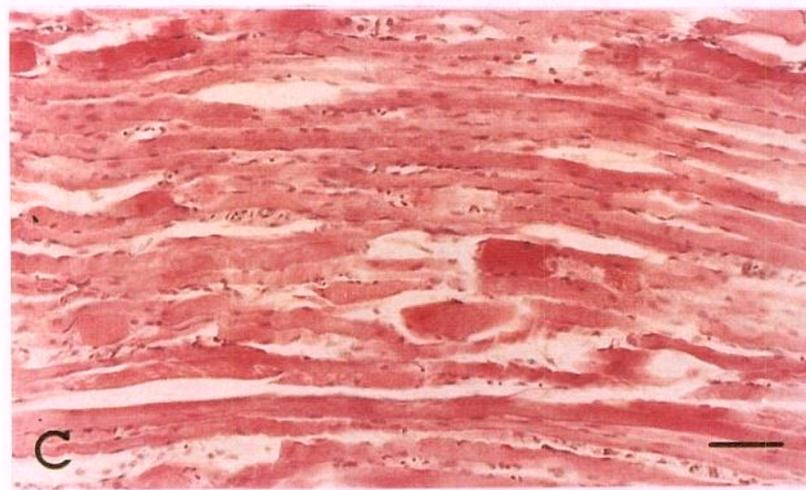
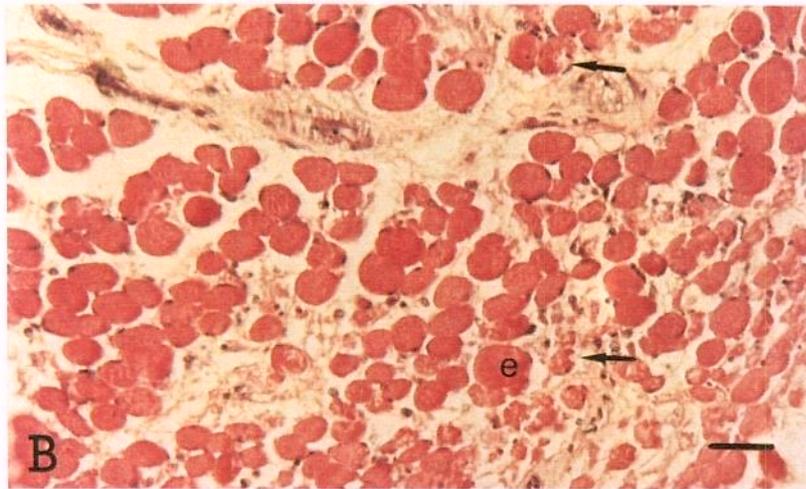
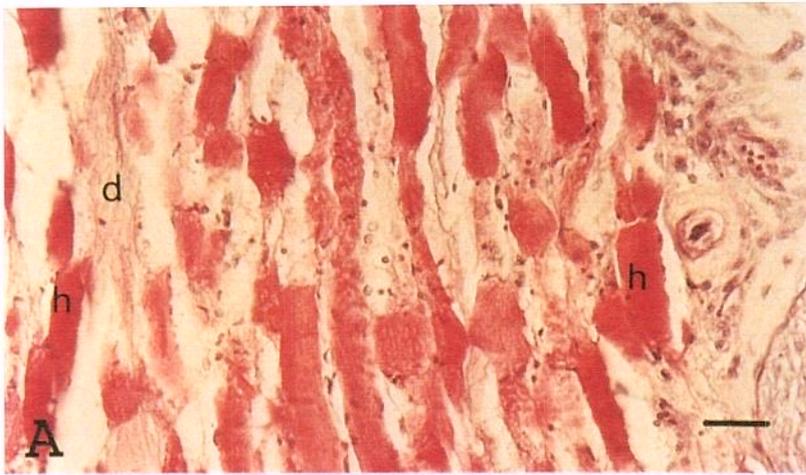


Fig. 23 - Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. jararacussu* (200 µg/ml). H.E.

(A) Veneno: Em corte longitudinal, as fibras estão hialinas (h), com aspecto amorfo, sem estriações aparente e núcleos condensados. Observe porções onde as fibras parecem estar 'digeridas' (d). Note também alteração do volume ao longo da mesma fibra. Barra= 30 µm

(B) Veneno: Corte transversal, apresentando desorganização dos feixes de fibras, diferença marcante no diâmetro das mesmas. Note fibras com lesão delta (setas) e edematosas (e). Barra= 30 µm

(C) Veneno + SAB: Proteção contra o efeito mionecrótico. Barra= 40 µm

-B. moojeni

O veneno de MOO (200 $\mu\text{g/ml}$) levou a um padrão diverso de alterações mionecróticas nas fibras musculares. Havia menos espaços entre as fibras musculares, indicando menos destruição de células inteiras ou porções delas (fig. 24A). Entretanto, o veneno também destruiu as miofibrilas, causando grande variabilidade no diâmetro das células, além de causar aumento da eosinofilia das mesmas (fig. 24B).

A incubação do músculo com o anti-soro se mostrou menos efetiva na prevenção ao aparecimento dessas alterações (fig. 24C).

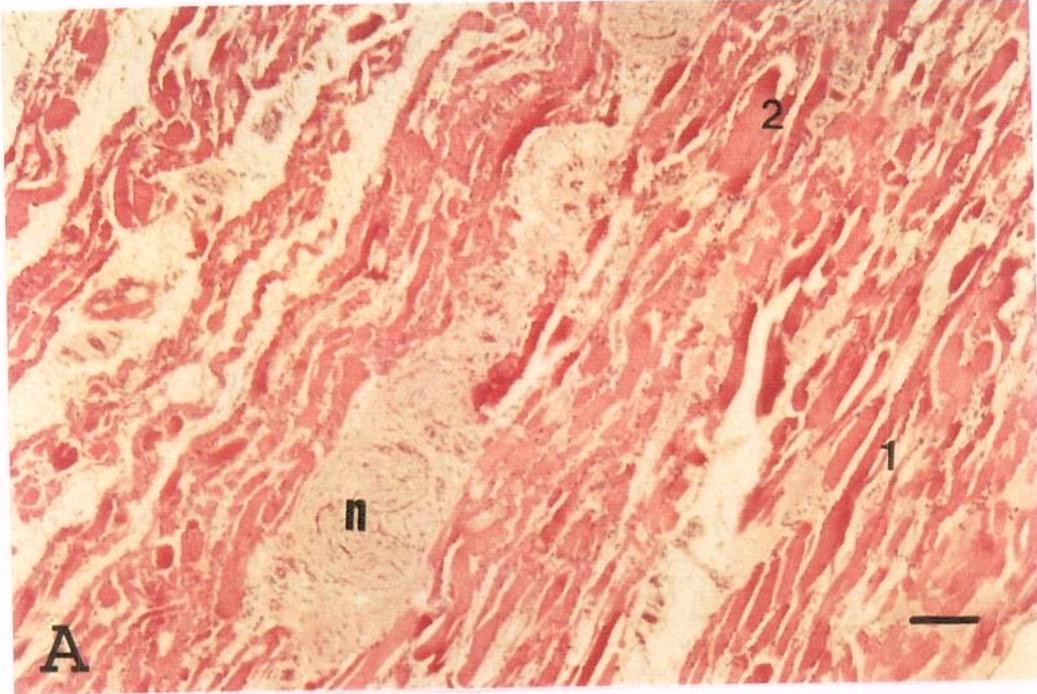


Fig. 24 - **Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. moojeni* (200 µg/ml). H.E.**

(A) Veneno: Vista panorâmica da secção do músculo, mostrando a heterogeneidade do diâmetro das fibras (1 e 2), o seu grau de contratura e os espaços aumentados entre elas; n= nervo. Barra= 100 µm.

(B) Veneno + SAB: Fibras apresentando-se edematosas, com grande diâmetro e algumas com extremidade cortada. Barra= 40 µm.

-B. erythromelas

A análise das secções de músculo *biventer cervicis* de pintainhos incubados com o veneno bruto de ERY, produziu células bastante edematosas com diâmetros avantajados ao lado de outras com diâmetros normais ou reduzidos (Figs. 25A e 25B). Curiosamente, várias fibras mostraram núcleos centrais, às vezes visíveis em disposição axial, outras mostravam-se hialinas. Em muitas, a estriação transversal era, contudo, visível.

A neutralização foi bastante eficaz na abolição desses efeitos miotóxicos (fig. 25C). Em corte transversal, foi possível verificar que a organização em feixes, das fibras, foi também preservada, no músculo incubado com o antiveneno (fig. 25D).

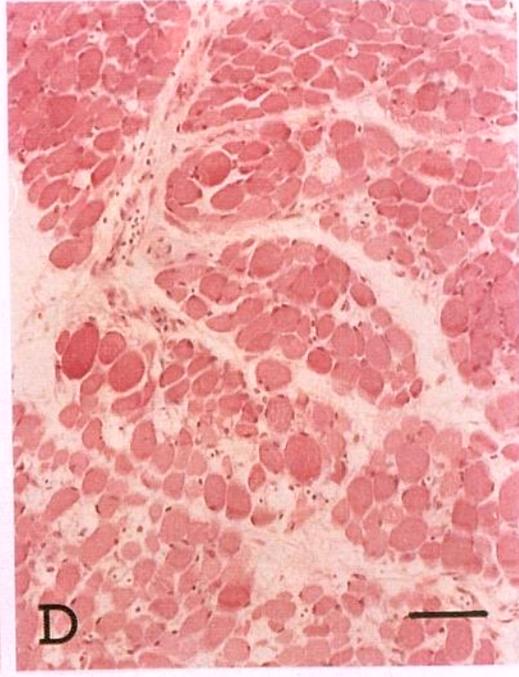
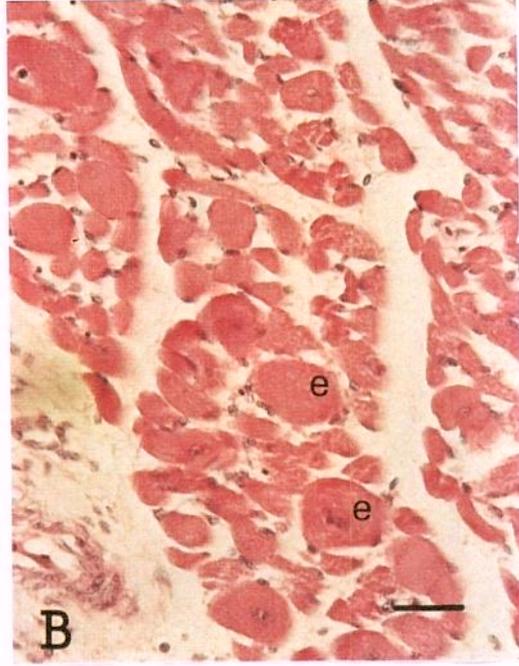


Fig. 25 - Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. erythromelas* (200 µg/ml). H.E.

(A) Veneno: Corte longitudinal, mostrando as fibras musculares degeneradas, algumas com extremidades abruptamente cortadas. Note que as estrias estão preservadas em algumas fibras. Barra= 30 µm.

(B) Veneno: Corte transversal, apresentando fibras edematosas (e), com grande diâmetro e núcleos centrais. Barra= 50 µm.

(C e D) Veneno + SAB: Proteção contra o efeito mionecrótico. Barra= 40 µm.

-B. neuwiedi

O veneno de NEU (200 $\mu\text{g/ml}$) produziu alterações severas nas fibras musculares do músculo *biventer cervicis*. Houve destruição maciça das fibras localizadas na porção central do músculo, revelada pela ampla região vazia. A região periférica do músculo, embora bastante afetada, mostrou número maior de fibras musculares. Muitas dessas fibras não portavam núcleos e, todas as periféricas e as centrais estavam bastante danificadas e com padrão hialino (fig. 26A). O aspecto amorfo, sem estriação transversal e mesmo longitudinal das fibras musculares, a presença de 'miofibrilas' esgarçadas com aspectos de rede frouxa, a celularidade aumentada com presença de macrófagos e, provavelmente monócitos, são algumas das alterações visíveis (fig. 26B).

O soro antibotrópico (SAB) preveniu parcialmente, as alterações causadas pela incubação do músculo com o veneno bruto da espécie. Em corte transversal, muitos feixes musculares estavam bem organizados e os diâmetros das fibras bastante homogêneos, porém largos espaços com restos de membranas e núcleos intercalavam-se aos feixes (fig. 26C). Se esses espaços correspondem a exsudados, ou se foram produzidos por destruição das fibras é difícil afirmar. Em corte longitudinal, de outras regiões do músculo, o aspecto poderia ser algo diverso, sem a presença dos espaços (fig. 26D).

O soro anticrotálico (SAC) foi bastante eficaz na neutralização da alterações mionecróticas das fibras periféricas do músculo, contudo menos eficiente para as fibras centrais. A fig. 26E mostra, de forma aguda, o padrão diverso de resposta das fibras musculares periféricas e centrais à neutralização pelo SAC. As alterações, ainda presentes no centro do músculo, foram fibras hialinas altamente eosinófilas e hipercontraídas, distorção de diâmetro, e restos membranosos.

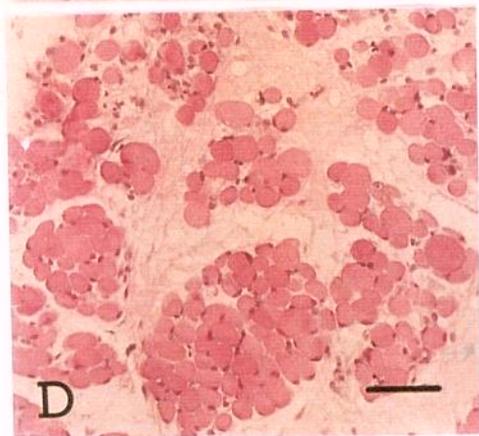
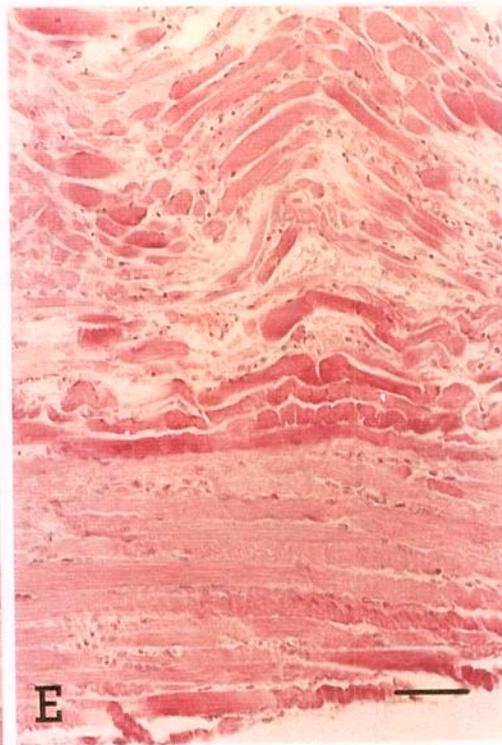
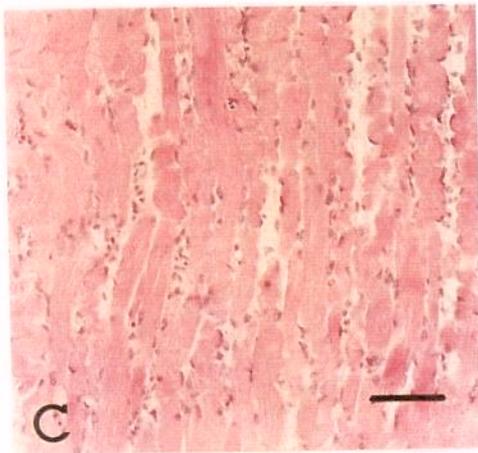
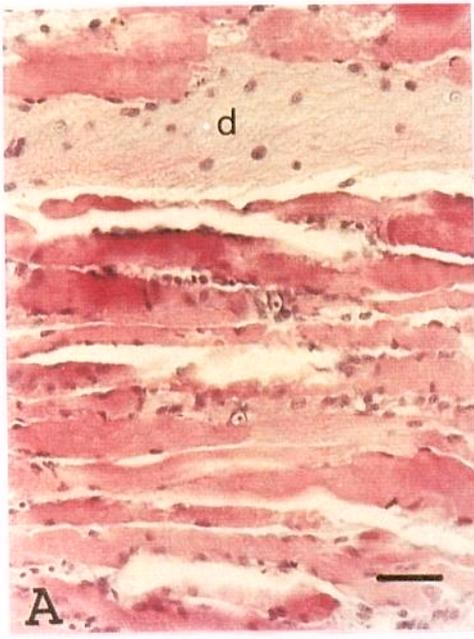


Fig. 26 - Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *B. neuwiedi* (200 µg/ml). H.E.

(A) Veneno: Corte longitudinal, mostrando mionecrose severa com fibras edematosas e porções onde as fibras foram totalmente digeridas. Barra= 30 µm.

(B) Veneno: Corte transversal, mostrando a parte central bastante danificada com aspecto amorto. Barra= 50 µm.

(C) Veneno + SAB: Corte longitudinal: feixes musculares bem organizados e com diâmetro homogêneo. Note os espaços entre eles. Barra= 40 µm.

(D) Veneno + SAB: Corte longitudinal, mostrando a proteção do soro. Barra=40 µm.

(E) Veneno + SAC: Corte apresentando proteção na parte periférica, note que, no centro do músculo, o SAC não foi eficaz em proteger as fibras. Barra= 40 µm.

-C. d. terrificus

O veneno bruto de CDT mostrou altíssima atividade miotóxica como revelado pelas importantes alterações morfológicas observadas. A faixa periférica do músculo, embora menos afetada (fig. 27A), foi bastante atingida levando à dispersão das miofibrilas e conseqüente má definição da fibra muscular como unidade morfológica e funcional. Em outras células, onde a dispersão miofibrilar não ocorreu, as fibras estavam eosinófilas e algo contraídas. Por outro lado, o veneno acometeu preponderantemente as fibras musculares centrais do músculo, destruindo total ou parcialmente muitas delas. Muitas vezes, apenas os núcleos foram os componentes da fibra que restaram (fig. 27B).

A incubação com o soro anticrotálico mostrou-se bastante eficaz na neutralização da ação miotóxica do veneno e prevenção do aparecimento dos danos morfológicos (fig. 27C). Como aconteceu com os venenos de *B. jararaca* (SAB) e *B. neuwiedi* (SAC) incubados com o antisoro, as fibras musculares do músculo *biventer cervicis* incubadas com o veneno de CDT + SAC, mostraram-se com o mesmo comportamento, ou seja, as fibras mais centrais estavam mais contraídas, denotando porém, zonas com estriação visível, enquanto as periféricas apresentavam-se normais, estriadas, núcleos periféricos com cromatina frouxa, enfim dentro dos padrões de integridade morfológica.

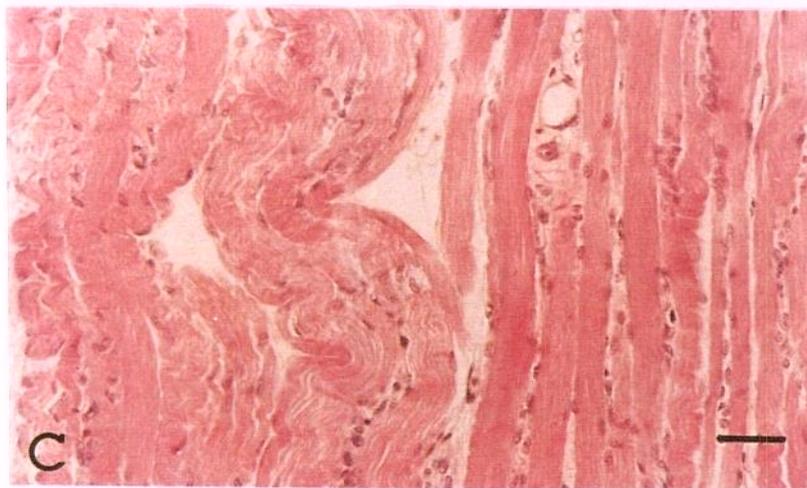
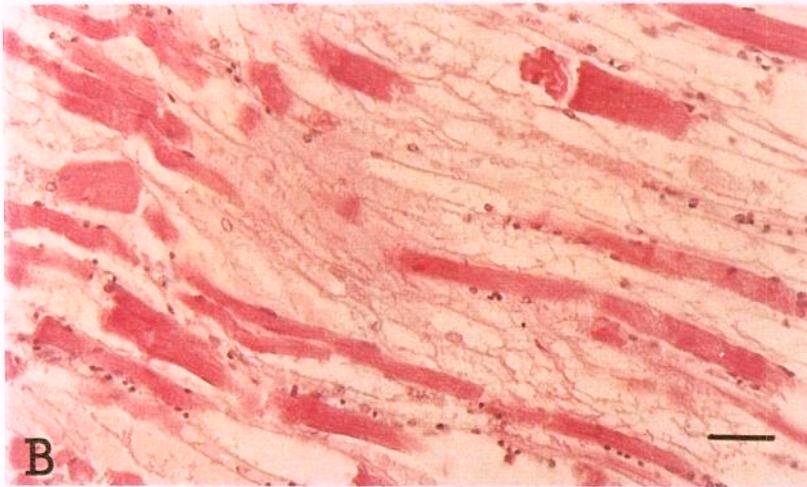
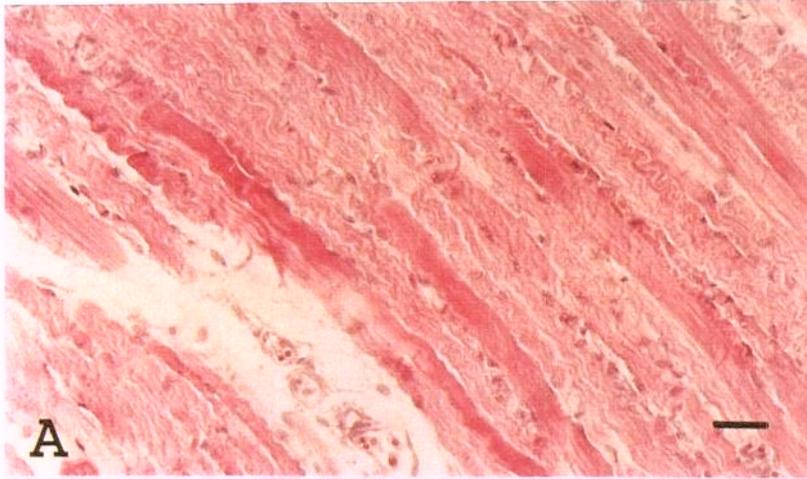


Fig. 27- Corte histológico do músculo *biventer cervicis* de pintainho, incubado durante 120 minutos com o veneno de *C. d. terrificus* (10 µg/ml). H.E.

(A) Veneno: Corte longitudinal: Vista panorâmica apresentando hipercontração e/ou esgarçamento dos miofilamentos. Barra= 50 µm.

(B) Veneno: Mionecrose severa com grande espaço entre as fibras. Barra= 30 µm.

(C) Veneno + SAC: Corte longitudinal, mostrando a proteção do soro na parte periférica. Fibras hipercontraídas na região central. Barra= 30 µm.

4-Discussão

Nos experimentos para a determinação da toxicidade dos venenos botrópicos estudados, observamos uma considerável diferença entre eles, quer em relação a potência como ao mecanismo bloqueador neuromuscular que exibem. Podemos citar, como exemplo, o valor da DL_{50} do veneno de *B. neuwiedi* (1,56 mg/kg) que se mostrou menos tóxico do que o veneno de *B. erythromelas* (0,55 mg/kg), entretanto quando comparados em termos de capacidade bloqueadora neuromuscular observou-se que o veneno de *B. neuwiedi* se revelou mais neurotóxico. Estas diferenças na atividade de cada veneno, provavelmente refletem as variações interespecíficas entre os distintos venenos botrópicos. Muitos estudos têm considerado as diferentes características bioquímicas dos venenos como sendo um critério para a diferenciação e classificação de espécies de serpentes (TAN & PONNUDURAI, 1991, 1992a). No entanto, outros autores argumentam que as propriedades do veneno não são aplicáveis, uma vez que os mesmos variam individualmente em sua composição, devido a diferenças geográficas, estacionais, de idade, sexo e dieta da serpente, além de diversidades quanto aos procedimentos de secagem e/ou estocagem do veneno (CHIPPAUX *et al.*, 1991; GUTIÉRREZ *et al.*, 1980b; LOMONTE *et al.*, 1983; MINTON & WEINSTEIN, 1986; MEIER, 1986; WILLEMSE, 1978; VITAL BRAZIL, 1987; CASAIS-E-SILVA, 1995). Além disso, a classe de animal a ser utilizada na experimentação constitui um fator a ser considerado para a análise da letalidade (DL_{50}), pois o veneno de JSU por exemplo, é pouco tóxico para aves, quando ensaiado em pintainho (DL_{50} , 26,90 mg/kg), no entanto é potente para mamíferos,

quando o animal é o camundongo (5,18 mg/kg) (VILLARROEL, *et al.*, 1978/1979b).

Os estudos das peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* têm sido, direcionados para a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos nos efeitos que as mesmas causam no local da picada; como hemorragia, edema e mionecrose. Entretanto, já foi demonstrado que, serpentes deste gênero, podem apresentar efeito neurotóxico como é o caso da *Bothrops jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI, BORGESE, CECCARELLI, 1983) e *Bothrops insularis* (COGO *et al.*, 1993).

Neurotoxinas presentes nos venenos de serpentes que causam paralisia neuromuscular agem pré-juncionalmente, interferindo sobre a liberação de acetilcolina ou pós-juncionalmente, bloqueando os receptores para a acetilcolina. HARVEY *et al.*, (1994) observaram que esses mecanismos de ação são melhor visualizados, quando os ensaios são realizados na preparação *biventer cervicis* de pintainho. A atividade pré-sináptica da neurotoxina pode abolir a contração evocada, sem afetar a resposta do agonista colinérgico e a resposta do músculo por contratura induzida pelo potássio (BARFARAZ & HARVEY, 1994). Neurotoxinas que agem pós-sinápticamente podem bloquear as respostas à acetilcolina assim como à estimulação indireta, mas não afetar as respostas ao potássio, e à estimulação direta no músculo.

No presente trabalho ficou demonstrado que, dos venenos botrópicos estudados, apenas o veneno de NEU, mostrou um efeito neurotóxico pré-sináptico. Essa demonstração é consubstanciada pelo fato de que, após o bloqueio neuromuscular completo, a preparação manteve-se respondendo à ação contraturante da acetilcolina e potássio, embora este resultado tenha sido obtido apenas com doses baixas do veneno (20 µg/ml). Já em altas doses (200 µg/ml), tal efeito foi abolido, passando a atuar tipicamente como os demais venenos botrópicos. Estes resultados corroboram com o que é conhecido da potência relativa de toxinas sobre preparações neuromusculares isoladas, onde baixas concentrações de veneno podem revelar a presença de neurotoxinas, enquanto altas concentrações podem ser necessárias para indicar a possível presença de componentes miotóxicos (HARVEY *et al.*, 1994). O efeito bloqueador neuromuscular, causado pelo veneno de NEU, não foi neutralizado pelo SAB, em qualquer das doses utilizadas (20 e 200 µg/ml), porém foi totalmente neutralizado pelo SAC, na dose de 20 µg/ml e parcialmente neutralizado, quando a dose usada foi de 200 µg/ml, sugerindo uma reação antigênica cruzada entre este veneno botrópico e o SAC. No entanto, o SAB mas não o SAC protegeu de maneira efetiva a resposta contraturante à ACh, ao final de 120 min. Além disso nenhum dos antivenenos (SAC ou SAB) utilizados, foram capazes de neutralizar o bloqueio da resposta contraturante do KCl, o que poderia estar relacionado ao uso de dose sub máxima de KCl (13,4 mM).

Quando utilizado o SAB, observamos proteção efetiva sobre o efeito bloqueador neuromuscular dos venenos de JRA e MOO, enquanto para os venenos de JSU e ERY esta ficou em torno de 50%. Com relação ao veneno de ERY, a proteção foi menos efetiva, provavelmente pelo fato desse veneno não constar no “pool” de imunização dos animais, na fabricação do AV, que é obtido após inoculação de uma mistura de venenos das espécies *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*. Em todos os venenos botrópicos estudados, com exceção da JSU, a incubação do veneno + AV determinou um aumento na amplitude das contrações musculares, o que poderia estar relacionado com a presença de uma substância termoestável do AV, com capacidade de induzir facilitação da neurotransmissão, pois a desnaturação da mistura veneno + AV (95°C durante 5 min) manteve esse efeito facilitador (FRANCO, 1997).

O SAB não foi capaz de proteger a resposta contraturante da acetilcolina e do potássio, o que correlaciona bem com a baixa eficiência da soroterapia em impedir a evolução das lesões locais em picados por serpentes do gênero *Bothrops* (FERREIRA, MOURA-DA-SILVA, MOTA, 1992).

Toxinas que induzem degeneração em células do músculo esquelético estão amplamente distribuídas nos venenos de serpentes (MEBS, EHRENFELD, SAMEJIMA, 1983). Do ponto de vista biológico, isso não parece surpreender,

porque o músculo esquelético compreende 80% da massa corpórea de mamíferos (HARRIS & CULLEN, 1990), e as peçonhas são funcionalmente importantes não só para matar a presa mas também para sua digestão (DUFTON, 1993).

As peçonhas botrópicas possuem a capacidade de liberar CK devido aos componentes que rompem a membrana celular. A CK é uma enzima que situa-se ao nível de pontes entre os filamentos de miosina, na região M da fibra muscular e transfere grupos fosfato da fosfocreatina ao ADP, transformando-o em ATP (Reação de Lohmann), que é rapidamente utilizado pela célula como fonte imediata de energia para a contração muscular. Esta é uma enzima essencialmente citoplasmática, e seu aparecimento no líquido nutritivo ou no soro de indivíduos pode indicar alterações na permeabilidade da membrana muscular ou mesmo lesão celular (SUAREZ-KURTZ, 1983).

A medida da concentração plasmática de CK é rotineiramente feita em pacientes com danos musculares severos, agudos ou crônicos (PRESTON *et al.*, 1990). Todavia, alguns problemas são levantados quanto à utilização deste método para a determinação de efeitos induzidos por venenos e/ou toxinas de serpentes. Além da ausência de correlação desta dosagem com o dano propriamente dito para alguns venenos, esta enzima também está presente em altas concentrações nas células do cérebro e músculo cardíaco. Assim, um aumento dos níveis séricos pode refletir uma necrose em qualquer destes tecidos.

Uma solução proposta por diversos autores é a de primeiro avaliar histologicamente estes órgãos em estudos prévios para determinar qual tecido foi lesado ou analisar as isoenzimas de CK (OWNBY *et al.*, 1982). NAKADA *et al.* (1980) determinaram que 99% da CK liberada após o envenenamento por serpente “habu” (*Trimeresurus flavoviridis*), é proveniente do músculo esquelético. Tal efeito também foi encontrado por OWNBY *et al.* (1982) com miotoxina *a* de *Crotalus viridis viridis*. De modo geral, é recomendado o uso de uma associação entre as análises histológica e enzimática dos tecidos.

Vários autores (GUTIÉRREZ, ARROYO, BOLANÓS, 1980; MELO & SUAREZ-KURTZ, 1987; MELO & SUAREZ-KURTZ, 1985; MORENO & GUTIERREZ, 1988) admitem a existência de uma correlação entre os níveis de CK liberado e a lesão celular provocada pelas miotoxinas ofídicas.

Todos os venenos estudados induziram a liberação de CK, entretanto os níveis de CK foram bastante diferentes para cada veneno, sendo que o veneno de *B. jararacussu* foi o que teve o maior nível de liberação desta enzima e os venenos de *B. jararaca* e *B. erythromelas* os que apresentaram menor nível. Resultados semelhantes foram observados por MOURA-DA SILVA, CARDOSO, TANIZAKI (1990).

A análise da neutralização da liberação de CK mostrou-se efetiva para os venenos investigados com exceção do veneno de JSU, que teve os níveis bastante elevados, tanto frente ao antiveneno botrópico quanto ao antiveneno crotálico.

Embora o soro antibotrópico não tenha interferido nos níveis de CK liberado pelas fibras musculares quando o veneno usado era o de *B. jararacussu*, esse resultado não encontrou, aparentemente correspondência com as observadas morfológicamente. O exame histológico mostrou que a utilização do soro antibotrópico parece ter prevenido bastante bem as alterações mionecróticas induzidas pelo veneno. Esta discrepância pode ser aparente, uma vez que a análise histológica não permite constatar alterações muito iniciais envolvendo a lise da membrana plasmática. A soroterapia impediria o avanço da mionecrose permanecendo esta no estágio inicial, mas já com comprometimento da membrana da fibra muscular, o que sustentaria os achados de níveis elevados de CK no meio nutritivo.

Vale lembrar que as alterações bioquímicas, assim como, as fisiológicas, nem sempre coincidem temporalmente com as alterações morfológicas, isto é, as vezes alterações funcionais já são evidentes, mas não há a correspondência quanto à alteração de estrutura e vice e versa. Isto ocorre entre outras razões, por

mecanismos relacionados com a margem de segurança que os sistemas biológicos possuem.

No presente trabalho demonstramos que todos os venenos botrópicos estudados possuem ação miotóxica, determinando mionecrose em diferentes graus, caracterizada por 'lesões delta', fibras edematosas, hipercontração das miofibrilas, fibras musculares abruptamente interrompidas, núcleos picnóticos, espaços vazios entre os feixes de fibras e alguns núcleos soltos no citoplasma desprovidos de miofibrilas. O grau de lesão foi maior para preparações incubadas com os venenos de JSU e NEU.

As alterações morfológicas causadas tanto por toxinas isoladas dos venenos de elapídeos (notexina, taipoxina, crotoxina) e de serpentes do gênero *Bothrops* (miotoxina de *B. asper*), quanto por veneno bruto, têm indicado que o tipo de mionecrose que determinam é devido à atividade de miotoxinas com ação fosfolipásica (GUTIÉRREZ & CERDAS, 1984). A fosfolipase atuaria diretamente degradando os fosfolipídeos, afetando portanto, a membrana sarcolemal (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984). Todavia, GUTIÉRREZ, *et al.* (1989) isolaram uma miotoxina do veneno de *Bothrops nummifer* que apresenta ação semelhante às anteriores, sem apresentar atividade fosfolipásica.

Na análise da neutralização da atividade miotóxica, verificou-se uma proteção para todos os venenos utilizados, contudo essa proteção revelou-se diferente para cada um deles. Para o de NEU foram utilizados tanto o AV botrópico quanto o AV crotálico, observando-se que os dois AVs foram eficazes em neutralizar o efeito miotóxico induzido pelo veneno bruto.

O antiveneno foi um importante instrumento corroborando a identificação das diferenças interespecíficas que existem entre os vários venenos botrópicos estudados.

5-Conclusões

-
- * Não houve relação direta entre a atividade bloqueadora neuromuscular *in vitro* e os valores das DL_{50} , provavelmente devido às diferenças na distribuição exibida desses venenos no organismo após injeção pela via intramuscular.

 - * Dos venenos botrópicos estudados, apenas o veneno de NEU, mostrou uma ação pré-sináptica, quando aplicado em baixas doses (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$), pois após o bloqueio neuromuscular total, foram mantidas as respostas contraturantes à ACh e ao KCl .

 - * O SAB neutralizou de maneira diferenciada a atividade neuromuscular dos venenos botrópicos estudados. Este AV foi incapaz de neutralizar a ação neuromuscular do veneno de NEU, ao passo que o SAC foi eficiente em proteger este efeito, sugerindo a presença de reatividade antigênica cruzada deste veneno com o AV crotálico.

 - * Verificou-se uma correlação positiva entre as alterações qualitativas mionecróticas e liberação de CK induzida por todos os venenos estudados.

 - * A associação de técnicas miográfica, histológica e enzimática, constitui um modelo útil no estudo de venenos ofídicos para demonstrar as diferenças interespecíficas.

6-SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the interspecific differences in the neurotoxic and myotoxic activities of *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops erythromelas* and *Bothrops neuwiedi* venoms as well as their neutralization by anti-bothropic antivenom for both activities. *Crotalus durissus terrificus* venom was used as a positive control. The chick *biventer cervicis* preparation was used throughout this study. There was no direct relationship between the *in vitro* neurotoxicity and the LD₅₀ of the venoms. The venom of *B. neuwiedi* was the only bothropic venom that showed neurotoxic activity, although this effect was seen only at low doses (5, 10 and 20 µg/ml); when a dose of 200 µg/ml was used this venom behaved like the other bothropic venoms. The neuromuscular blocking and myotoxic actions of this venom may involve a neurotoxic PLA₂ since the temperature at which the experiment was performed influenced the neurotoxic effect observed. Commercial anti-bothropic antivenom neutralized the *Bothrops* venoms to different degrees, and was unable to neutralize the neuromuscular effects of *B. neuwiedi* venom. In contrast, anti-crotalic antivenom showed some degree of protection against the acting to this venom. All of the venoms stimulated the release of CK, with those of *B. jararacussu* and *B. neuwiedi* being the most potent. Commercial anti-bothropic antivenom prevented the release of CK by the venoms, although its efficacy against *B. jararacussu* venom was low. All of the venoms produced myonecrosis, including fragmentation of the fibers, delta lesions, hypercontraction of the myofibrils and edema. The venoms of *B. jararacussu* and *B. neuwiedi* were the

most potent in destroying fibers. Commercial anti-bothropic antivenom was efficient in neutralizing this activity, except in the case of *B. jararacussu* venom.

***7-Referências
Bibliográficas***

Referências Bibliográficas*

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; DOS REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G. & CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **28**: 220-227, 1986.

ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; ASPERTI, M.C.A. & MANDELBAUM, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon* **23**: 691-706, 1985.

ASSAKURA, M.T., FURTADO, M.De F.D. & MANDELBAUM, F.R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comp. Biochem. Physiol.* **4**: 727-732, 1992.

AZEVEDO MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myomecrosis, myoglobinuria and renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, **23**: 631-636, 1982.

AZEVEDO MARQUES, M.M.; CUPO, P. & HERING, S.E. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in human causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*, **25**: 1163-1168, 1987.

* De acordo com: Associação Brasileira de Normas e técnicas.
Referências Bibliográficas: NB 66/78 (BIREME).

- BARFARAZ, A. & HARVEY, A.L. The use of chick *biventer cervicis* preparation to assess the protective activity of six international reference antivenoms on the neuromuscular effects of snake venom *in vitro*. *Toxicon* **32**: 267-272, 1994.
- BENBASSAT, J. & SHALEV, O. Envenomation by *Echis coloratus* (Mid-East sawscaled viper): a review of the literature and indications for treatment. *J. Med. Sci.* **29**: 239-250, 1993.
- BRADLEY, R. J.; EDGE, M. T. & CHAU, W. C. The alfa-neurotoxin erabutoxin b cause fade at the rat end-plate. *Eur. J. Pharmacol.* **176**: 11-21, 1990.
- BRAZIL, V. Contribution à l'étude d'origine ophidiene. *A. Maloine, Paris*, 1905.
- CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. The venomous reptiles of America. *Comstock Publishing, Ithaca*, pp. 180-226, 1989.
- CASAI-SILVA, L.L. Caracterização das atividades biológicas e enzimáticas do veneno de duas espécies de *Micrurus* (Serpentes; Elapidae) do estado da Bahia. São Paulo, 1995. 98p. (Tese de Mestrado - Universidade de São Paulo).
- CHANG, C. C. & LEE, C. V. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch. Inst. Pharmac.* **144**: 241, 1963.
- CHAVES, F., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. & CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. *Toxicon* **27**: 1085-1093, 1989.

- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V. and WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon* **29**: 1279-1303, 1991.
- COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon*, **10**: 1237-1247, 1993.
- DUFTON, M. J. Kill and cure: the promising future for venom research. *Endeavour*, **17**: 138-140, 1993.
- DUFTON, M.J. & HIDER, R.C. The structure and pharmacology of elapid cytotoxins. In: *Snake Toxins* (Harvey, A.L., Ed.), pp.259-302. New York, Pergamon Press, 1991.
- FERREIRA, M.L.; MOURA-DA-SILVA, A. & MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon*, **12**: 1591-1602, 1992.
- FOHLMAN, J.; EAKER, D.; KARLSON, E. & THESLEFF, S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. *Eur. J. Biochem.*, **68**: 457-469, 1976.
- FRANCO, Y. O. Atividade neurotóxica e miotóxica dos venenos *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu* e de suas principais toxinas, perante antivenenos. Campinas, 1997, 137 p. (Tese de mestrado - UNICAMP).
- FURTADO, M.DE F.D., COLLETO, G.M.D.D. & DA SILVA, W.D. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e

- farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*, **2**: 149-159, 1991.
- GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. The isolated *biventer cervicis* nerve muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.*, **15**: 410-411, 1960.
- GOPALAKRISHANAKONE, P & HAWGOOD, B. J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon*, **22**: 791-804, 1984.
- GLOYD, H.K. The rattlesnakes, genera *Sistrurus* and *Crotalus*. *Chicago Acad. Sci. Spec. Publ.* **4**: 1-266, 1940.
- GUTIÉRREZ J.M.; ARROYO, O. & BOLANÓS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*, **18**: 603-610, 1980a.
- GUTIÉRREZ, J.M. & CERDAS, L. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Rev. Biol. Trop.* **32**: 213-222, 1984.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O. & PORTILLA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* **19**: 493-500, 1981.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENE, J. A.; LAMONTE, B.; CAMACHO, Z. & SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* **27**: 735-745, 1989.

- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; ROJAS, E. & BOLAÑOS, R. Efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* en ratón blanco. *Toxicon* **18**: 633-639, 1980b.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. & ODELL, G. V. Isolation of myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* **22**: 115-128, 1984.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, R. & CERDAS, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon* **25**: 713-720, 1987.
- HARRIS, J. B. Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. In: *Progress In Medical Chemistry* vol. 21(Ellis, G.P. & West, G.B Eds) pp 65-109 Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984.
- HARRIS, J. B. & CULLEN, M. J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc. Rev.*, **3**: 183-211, 1990.
- HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. & KARLSSON, E. Pathological response of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharmac. Physiol.* **2**: 383-404, 1975.
- HARRIS, J. B. & MALTIN, C. A. Myotoxic activity of crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin of the Australian taipan *Oxyuranus scutellatus*. *Br. J. Pharmacol.*, **76**: 61-75, 1982.
- HARVEY, A.L. Cytolytic toxins: In: *Handbook of toxinology* (Shier, W.T. and Mebs, D., Eds), pp.1-66. New York, Marcel Dekker, 1990.

- HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S. & HARRIS, J.B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. *Toxicon* **32**: 257-265, 1994.
- HAWGOOD, B. J. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: Rattlesnake Venoms. Their Actions and Treatments, (Tu, A.T., Ed.). p 121. New York: Marcel Dekker, 1982.
- HOFMANN, H. & BON, C. Blood coagulation induced by venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. *Biochemistry* **26**: 780-787, 1987.
- HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGUE, S. A. R. W. L. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the pit vipers Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. *Mem. Inst. Butantan* **42**: 179-310, 1978.
- HOMMA, M. & TU, A. T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br. Exp. Pathol.*, **52**: 538-542, 1971.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization of bothropstoxin. *Toxicon* **26**: 615-627, 1988.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Biochemistry of snake venoms. *Clin. Toxicol.*, **3**: 389-431, 1970.
- JIMÉNES-PORRAS, J. M. Pharmacology of peptides and proteins in snake venoms. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **8**: 299-318, 1968.

- KARDONG, K.V. "Protovipers" and the evolution of snake fangs. *Evolution* **33**: 433-458, 1979.
- KARLSSON, E. L.; EAKER, D. & RYDEN, L. Purification of a presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon*, **10**: 405-413, 1972.
- KINI, R.M. & EVANS, H.J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *J. Peptide Prot. Res.* **34**: 277-286. 1989.
- KINI, R. M. & IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases. II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon*, **24**: 895-905, 1986.
- KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, **25**: 65-106, 1987.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIGELLI, C.; LOBO, S. M. A. & GUIMARÃES, S. M. Fatal extradural haematoma after snakebite (*Bothrops moojeni*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **85**: 552, 1991.
- LIVINGSTONE, E. Pharmacological Experiments on isolated preparations. pp 54-57, Great Britain, 1971.
- LOMONTE, B. *Tissue damage and inflammation induced by snake venoms*. Tese de doutorado unidade de Goteborg, 87 p. 1994.
- LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; GUTIÉRREZ, J.M. & CERDAS, L. Estudio comparativo de los venenos de serpientes cascabel (*Crotalus durissus*

- terrificus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon*, **21**: 379-384, 1983.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. & REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwied* (jararaca pintada). *Toxicon* **22**: 193-206, 1984.
- MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: *Animal, plant and microbial toxins*, Vol **1**, pp 111-121 (Ohsaka, A.; Hayashi, K. & Saway, Y., Eds). Plenum Press. London, 1976.
- MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento. Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. 1993.
- McCOLLOUGH, M. C. & GENARO, J. F. Treatment of venomous snake bite in the United States. *Clin. Toxicol.* **3**: 483-487, 1970.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M. & SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. *Toxicon*, **21**: 393-404, 1983.
- MEBS, D. & OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharm. Ther.* **48**: 223-236, 1990.
- MEHRTENS, J. *Living snakes of the world*, 480pp. Sterling Publishing. New York 1987.

- MEIER, J. Individual and age-dependent variation in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon*, **24**: 41-46, 1986.
- MELO, P.A. & SUAREZ-KURTZ, G. Effects of polyanions on the stimulation of sarcoplasmic enzyme release induced by *Bothrops jararacussu* venom. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **18**: 754, 1985.
- MELO, P.A. & SUAREZ-KURTZ, G. Interaction of *Bothrops* venoms and antivenom on the release of creatine kinase from skeletal muscle. *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, **20**: 821-824, 1987.
- MENGDEN, G. The taxonomy of Australian elapid snakes. *Records Australian Museum*, **35**: 195-222, 1983.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes ofídicos, Brasília D.F., p 1-53, 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Ofidismo: - Análise epidemiológica*. Brasília, D.F., p. 1-49, 1991.
- MINTON, S.A. & WEISTEIN, S.A. Geographical and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*, **24**: 71-80, 1986.
- MORENO, E. & GUTIÉRREZ, J.M. Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. *Toxicon*, **26**: 403-409, 1988.

- MOURA-DA-SILVA, A.M., DESMOND, H., LAING G. & THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snake. *Toxicon* **29**: 713-723. 1991.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F. & TANIZAKI, M.M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon*, **28**: 1293-1301, 1990.
- NAHAS, L.; KAMIGUT, A. S. & BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X activator components of *Bothrops* snakes venoms. *Thromb. Haemost.* **41**: 314-328, 1979.
- NAKADA, F., UEZU, N., OHSHIRO, M. & MIYAGI, K. Relation between serum creatine phosphokinase activity and the amount of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) snake venom injected in thigh muscle in rabbits. *Toxicon* **18**: 351, 1980.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE Progress in characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: World Health Organization, 1981.
- OWNBY, C.L. & COLBERG, T.R. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of several venoms of snakes in the family Crotalidae. *Toxicon* **28**: 189-199, 1990.
- OWNBY, C.L., GUTIÉRREZ, J.M., COLBERG, T.R. & ODELL, G.U. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* **20**: 877-885, 1982.

- PERKINS, J. R.; PARKER, C. E. & TOMER, K. B. The characterization of snake venoms using capillary electrophoresis in conjunction with electrospray mass spectrometry: black mambas. *Electrophoresis*, **14**: 458-468, 1993.
- PRESTON, S.A.; DAVIS, C.E. & HARRIS, J.B. The assessment of muscle fibre loss after the injection of the venom of *Notechis scutatus* (Australian tiger snake). *Toxicon*. **28**: 201-214, 1990.
- REES, B. & BILWES, A. Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* **6**: 385-406, 1993.
- REID, H. A.; THEAN, P. C. & MARTIN, W. J. Specific antivenom and prednisolone in viper-bite poisoning: controlled trial. *Br. Med. J.* **II**, 1378-1380, 1963.
- REID, H. A. & THEAKSTON, R. D. G. The management of snake bite. *Bull. W.H.O.* **61**: 885-895, 1983.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N. & CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience*, **2**: 475-489, 1983.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: *Venomous animals and their venoms*, Vol 2, pp 395-362 (Bücherl, W. and Buckley, E.E., Eds).: *Academic Press*, New York, 1971.
- RUSSELL, F. E. *Snake venom poisoning*, p. 235-343. Scholium Internacinal Inc.. New York, 1983.

- RUSSELL, F. E.; CARLSON, R. W.; WAINSCHEL, J. & OSBORNE, A. H. Snake venom poisoning in the United States. Experiences with 550 cases. *J.A.M.A.*, **233**: 341-344, 1975.
- SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; FURLAMENTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongo. *Mem. Inst. Butantan*, **42/43** 325-336, 1978.
- SLOTTA, K. & FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascaval. *Mem. Inst. Butantan* **12**: 505, 1938.
- SUAREZ-KURTZ, G. Enzyme release from skeletal muscle. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **16**: 283-290, 1983.
- SWAROOP, S. & GRAB, B. Snakebite mortality in the world. *Bull W.H.O.* **10**: 35-76, 1954.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some sea snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* **99B**, 351-354, 1991.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. A comparative study on the electrophoretic patterns of snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**, 103-109, 1992a.
- TANIZAKI, M. M.; ZINGALI, R. B.; KAWAZAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S. & SUZUKI, K. Purification and some characteristics of a zinc metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* **27**: 747-755, 1989.

THEAKSTON, R.D.G. & WARRELL, D.A. Antivenoms: a list of hyperimmune sera currently available for treatment of envenoming by bites and stings. *Toxicon* **29**: 1419-1470, 1991.

TU, A. T. Venoms: chemistry and molecular biology, Wiley and Sons, New York, pp 560, 1977.

VITAL BRAZIL, O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **29**: 119-126, 1987.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas In: Farmacodinâmica (Cobertt, C. E., ed). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, pp 1044-1074, 1982.

VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. Ass. Med. Brasil*, **26**: 212-218, 1980.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake venom. *J. Farm. Med. Assoc.*, **71**: 394-396, 1972.

WARRELL, D.A. Comparison of Pasteur and Behringwerke antivenoms in envenoming by the carpet viper (*Echis carinatus*). *Br. Med. J.* **1**: 607-609, 1980.

WARRELL, D. A. Clinical aspects of envenoming. In: international congress on envenomations and their treatments, p. 55, Paris, Institut Pasteur, 1995.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. *Comp. Biochem. Physiol.*, **61B**: 553-557, 1978.

WEIL, C. S. Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD_{50} or ED_{50}) and instructions for their use. *Biometrics*. 249-263, 1953.