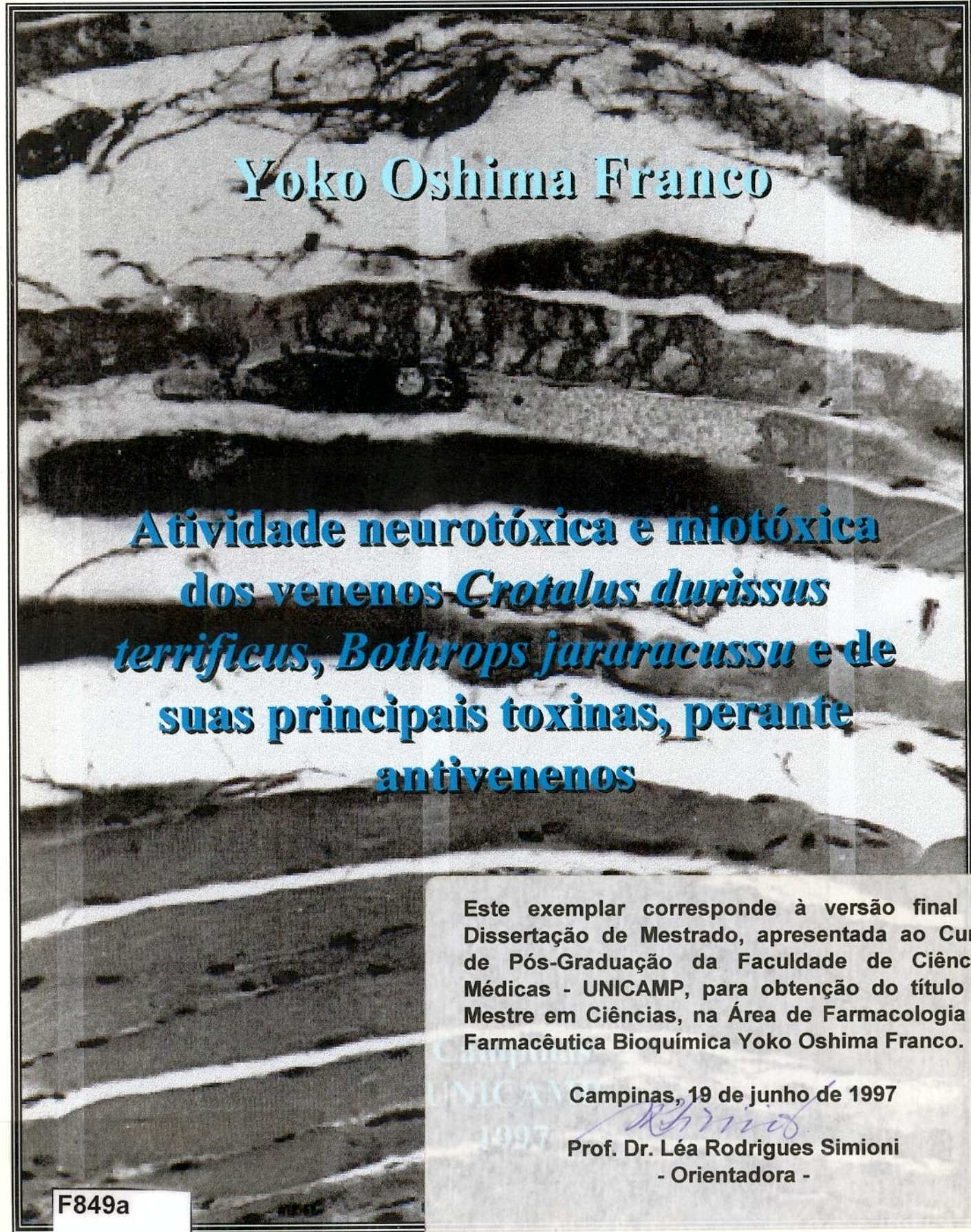


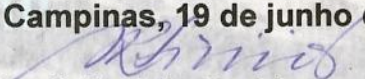


Yoko Oshima Franco

**Atividade neurotóxica e miotóxica
dos venenos *Crotalus durissus*
terrificus, *Bothrops jararacussu* e de
suas principais toxinas, perante
antivenenos**

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 Farmacêutica Bioquímica Yoko Oshima Franco.

Campinas, 19 de junho de 1997


Prof. Dr. Léa Rodrigues Simioni
- Orientadora -

F849a

31205/BC

Errata

p.15 - 1.6., onde se lê:

MEBS & OWNBY (1990) definem miotoxicidade como uma ação específica do veneno sobre o músculo esquelético, causado por substâncias denominadas miotoxinas, que exercem, portanto, uma ação direta e específica sobre o músculo esquelético, levando à degeneração e morte celular (mionecrose).

leia-se:

MEBS & OWNBY (1990) definem miotoxicidade como uma ação direta e específica do veneno sobre o músculo esquelético, causada por substâncias denominadas miotoxinas, que levam à degeneração e morte celular (mionecrose).

p. 27 - Quadro 1, onde se lê:

	Oligúria ou anúria
Leve	ausente ou tardia

leia-se:

	Oligúria ou anúria
Leve	ausente

p. 32 - 2.2.1.1. Procedimento, onde se lê, na última linha:

(...) determinar a capacidade neutralizante dos AV específicos.

leia-se:

(...) determinar a capacidade neutralizante dos AV (comercial e específico).

p. 33 - 2.2.2., onde se lê:

Após a anestesia (hidrato de cloral 10%) (...)

leia-se:

Após a anestesia com hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p.) (...)

YOKO OSHIMA FRANCO

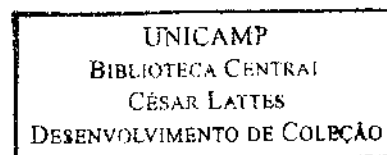
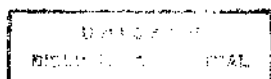
**Atividade neurotóxica e miotóxica dos venenos de
Crotalus durissus terrificus, *Bothrops jararacussu* e de
suas principais toxinas, perante antivenenos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Léa Rodrigues-Simioni

Co-Orientador: Profa. Dra. Maria Alice Cruz-Höfling

Campinas
UNICAMP
1997



11000011

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	F849a
INSTITUIÇÃO	UNICAMP
DATA	31.2.05
P.º DE	283/97
C.º	0
P.º DE	11.00
DATA	25/07/97
N.º C.º	

CM-00099257-5

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

F848a Franco, Yoko Oshima
Atividade neurotóxica e miotóxica dos venenos de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu* e de suas principais toxinas, perante antivenenos / Yoko Oshima Franco. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

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

1. Crotoxina. 2. Neurotoxina-veneno. 3. Junção Neuromuscular.
4. Cascavel - veneno - efeitos fisiológicos. I. Léa Rodrigues-Simioni.
II. Maria Alice Cruz-Höfling. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. LÉA RODRIGUES-SIMIONI

Membros:

1. Profa. Dra. LÉA RODRIGUES-SIMIONI

2. Profa. Dra. JÚLIA PRADO-FRANCESCHI

3. Profa. Dra. HELOISA SOBREIRO SELISTRE DE ARAUJO

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

Data:

19.06.97

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

DEDICATÓRIA

A DEUS!

A meus pais, pelo presente da vida.

***A Leno e a meus filhos, André, Juliana e Jacqueline,
fonte inesgotável de amor.***

AGRADECIMENTOS

A meus pais, cuja meta principal foi proporcionar estudo aos sete filhos, por acreditarem ser, a Educação, o maior patrimônio que se pode legar.

A minha família, que tornou possível realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Léa Rodrigues-Simioni, por acolher nossa orientação e nos levar ao crescimento pelo caminho da liberdade e da responsabilidade.

À Profa. Dra. Maria Alice Cruz-Höfling, pela co-orientação e apoio.

A Gildo B. Leite, por toda assistência e amizade, ambas inesquecíveis.

Ao Dr. José L. Donato, pela orientação e segurança transmitida em todo o processo de imunização.

Ao Instituto Butantan, nas pessoas das Dras. Harumi e Ivone, pela receptividade e pelas informações concedidas, quanto à produção e purificação de antivenenos.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela contribuição no desenvolvimento e interpretação de ELISA.

Aos amigos Stella, Maura, Jadson, Simone, Solange, que, pacientemente, socializaram seus conhecimentos; e a Zé Ilton e 'chefe' Miguel, pela colaboração prestada, sempre com muita disposição.

À Dra. Júlia Prado-Franceschi, pelas horas do seu precioso tempo, que ocupamos na discussão dos resultados.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia que contribuíram para minha formação.

Aos amigos do laboratório, a todos os alunos do Curso de Pós-Graduação e funcionários do Departamento de Farmacologia, pela convivência madura e respeitosa que tivemos.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia, pela atenção dispensada.

À Seção de Apoio Didático da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, pelos serviços prestados.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Classificação das serpentes	3
1.2. Dados epidemiológicos	3
1.3. Gênero <i>Crotalus</i>	4
1.3.1. <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt)	5
1.3.2. Crotoxina (CrTX)	6
1.4. Gênero <i>Bothrops</i>	9
1.4.1. <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu)	10
1.4.2. Bothropstoxina (BthTX)	12
1.5. Neurotoxinas (NTX)	14
1.6. Miotoxinas	15
1.7. Soroterapia	25
1.8. Objetivo	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. Materiais	30
2.2. Preparações biológicas (camundongos)	31
2.2.1. Nervo frênico-diafragma (NFD)	31
2.2.1.1. Atividade neurotóxica e neutralização	32
2.2.2. <i>Extensor digitorum longus</i> (EDL)	33

SUMÁRIO

2.2.2.1. Atividade miotóxica e neutralização	33
2.2.2.1.1. Determinação de creatinoquinase (CK)	34
2.2.2.1.2. Microscopia óptica	36
2.3. Estudos <i>in vivo</i>	
2.3.1. Imunização direta (coelhos)	36
2.3.2. Avaliação da potência dos antivenenos (AV)	37
2.4. Estudos <i>in vitro</i>	
2.4.1. Imunodifusão dupla (Ouchterlony)	38
2.4.2. ELISA	39
2.4.3. Dosagem de proteínas	41
2.5. Análise estatística	43
3. RESULTADOS	44
3.1. Estudo miográfico dos venenos e toxinas	45
3.1.1. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD)	46
3.1.1.1. <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt)	46
3.1.1.2. Crotoxina (CrTX)	46
3.1.1.3. <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu)	47
3.1.1.4. Bothropstoxina (BthTX)	47
3.1.2. Preparação <i>extensor digitorum longus</i> (EDL)	50
3.1.2.1. <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) - 10µg/ml	50
3.1.2.2. Crotoxina (CrTX) - 10 µg/ml	50
3.1.2.3. <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu) - 50 µg/ml	51

SUMÁRIO

3.1.2.4. Bothropstoxina (BthTX) - 20 µg/ml	51
3.2. Ensaio realizado com os antivenenos (AV)	53
3.2.1. Dosagem de proteínas	54
3.2.2. ELISA	54
3.2.3. Potência dos antivenenos (AV)	57
3.3. Neutralização do bloqueio neuromuscular	58
3.3.1. Preparação nervo frênico-diafragma (NFD)	59
3.3.1.1. <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) - 10 µg/ml	59
3.3.1.2. Crotoxina (CrTX) - 10 µg/ml	60
3.3.1.3. <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu) - 50 µg/ml	60
3.3.1.4. Bothropstoxina (BthTX) - 20 µg/ml	61
3.3.2. Preparação <i>extensor digitorum longus</i> (EDL)	67
3.4. Miotoxicidade (preparação <i>extensor digitorum longus</i> - EDL)	70
3.4.1. Liberação enzimática de creatinoquinase (CK)	71
3.4.2. Neutralização da liberação de creatinoquinase (CK)	73
3.4.3. Aspectos morfológicos e neutralização	75
3.4.3.1. Preparação incubada com solução de Tyrode (controle)	76
3.4.3.2. Dano muscular causado por Cdt	77
3.4.3.3. Dano muscular causado por CrTX	83
3.4.3.4. Dano muscular causado por Bjssu	90
3.4.3.5. Dano muscular causado por BthTX	96

SUMÁRIO

4. DISCUSSÃO	102
5. CONCLUSÃO	111
6. SUMMARY	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácido (s)
ACh	Acetilcolina
AV	Antiveneno (s)
BthTX	Bothropstoxina-I
Bjssu	Veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i>
Cdt	Veneno bruto de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
CK	Creatinoquinase
CrTX	Crotoxina
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
HE	Hematoxilina-eosina
JNM	Junção neuromuscular
NFD	Nervo frênico-diafragma
NTX	Neurotoxina (s)
PLA ₂	Fosfolipase (s) A ₂
RS	Retículo sarcoplasmático
SABC	Soro antibotrópico comercial
SACC	Soro anticrotático comercial
Vb	Veneno (s) bruto (s)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabelas:

1	Classificação das miotoxinas	24
2	Diferenças no tempo de bloqueio neuromuscular entre as preparações	51

Quadros:

1	Acidente crotálico	27
2	Acidente botrópico	27
3	Dosagem de proteínas	54
4	Potência dos antivenenos específicos	57

Gráficos:

Fig. 1	Bloqueio da resposta contrátil em preparação NFD de camundongo	48
Fig. 2	Registros da força de contração muscular em preparação NFD (estímulo indireto)	49
Fig. 3	Preparação EDL (estímulo indireto)	52
Fig. 4	ELISA	56
Fig. 5	Neutralização do bloqueio neuromuscular em preparação NFD (Cdt)	62
Fig. 6	Neutralização do bloqueio neuromuscular em preparação NFD (CrTX)	63
Fig. 7	Neutralização do bloqueio neuromuscular em preparação NFD (Bjssu e BthTX)	64
Fig. 8	Efeito facilitador de AV comercial	65
Fig. 9	Neutralização cruzada de Bjssu e BthTX em preparação NFD	66
Fig. 10	Neutralização do bloqueio neuromuscular em preparação EDL	68

Fig. 11	Neutralização de BthTX com AntiCrTX em preparação EDL	69
Fig. 12	Determinação de CK em preparação EDL	72
Fig. 13	Neutralização de CK	74

Fotografias:

Fig. 14	Preparação incubada com solução de Tyrode (controle)	76
Fig. 15	Dano muscular causado por Cdt	77
Fig. 16	Neutralização de Cdt com SACC	79
Fig. 17	Neutralização de Cdt com AntiCdt	81
Fig. 18	Neutralização de Cdt com AntiCrTX	82
Fig. 19	Dano muscular causado por CrTX	83
Fig. 20	Neutralização de CrTX com SACC	85
Fig. 21	Neutralização de CrTX com AntiCdt	87
Fig. 22	Neutralização de CrTX com AntiCrTX	89
Fig. 23	Dano muscular causado por Bjssu	91
Fig. 24	Neutralização de Bjssu com SABC	93
Fig. 25	Neutralização de Bjssu com AntiBjssu	95
Fig. 26	Dano muscular causado por BthTX	97
Fig. 27	Neutralização de BthTX com SABC	99
Fig. 28	Neutralização de BthTX com AntiBjssu	101

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades neurotóxica e miotóxica das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt, 10 µg/ml), *Bothrops jararacussu* (Bjssu, 50 µg/ml) e de suas principais toxinas, crotoxina (CrTX, 10 µg/ml) e bothropstoxina (BthTX, 20 µg/ml), respectivamente. Utilizamos antivenenos (AV) comerciais e específicos para avaliar a capacidade de neutralização dessas atividades, em preparações biológicas (camundongo), nervo frênico-diafragma (NFD) e *extensor digitorum longus* (EDL).

O AV eqüino comercial empregado foi produzido pelo Instituto Vital Brazil. O AV específico foi produzido por inoculação sucessiva, em coelhos, com veneno total de Cdt, Bjssu e da toxina CrTX. O acompanhamento da produção de anticorpos foi realizado por imunodifusão e, posteriormente, confirmado pela técnica de ELISA.

A atividade neurotóxica foi avaliada por intermédio de técnica miográfica e a miotóxica, através de determinação de creatinoquinase (CK), *in vitro*, e de análise histológica.

Os dois venenos e suas respectivas toxinas produziram bloqueio neuromuscular dose-dependente e mionecrose, em diferentes graus. O estudo do bloqueio neuromuscular evidenciou diferenças entre as preparações utilizadas (NFD e EDL), quanto à sensibilidade aos venenos e toxinas, provavelmente pela constituição predominante de fibras de contração rápida (EDL) e lenta (NFD).

A neutralização do bloqueio neuromuscular mostrou ser dose-dependente na preparação NFD e, a partir de determinada dose de AV, foi registrada uma facilitação importante para os AV comerciais. A neutralização cruzada também foi investigada para Bjssu e BthTX, em ambas as preparações, e novamente a resposta foi diferente entre elas.

Os elevados níveis obtidos da enzima CK, liberada após 120 minutos de exposição aos AV, sozinhos, o que pretendia ser um simples controle, revelou que, possivelmente a quantidade de proteínas interfira no mecanismo liberador de CK. Isto sugere que a determinação enzimática, em associação à análise histológica, pode constituir um parâmetro quantitativo de mionecrose, mas deve ser interpretada com cuidado na avaliação de lesão celular se estudada individualmente.

A análise histológica revelou que a capacidade do veneno botrópico de destruir a musculatura esquelética é maior do que a do crotálico, nas condições experimentais empregadas. Os AV específicos foram eficientes na neutralização da miotoxicidade.

Pode-se concluir que, o estudo da neutralização com AV produzido de frações purificadas, associada aos parâmetros miográficos e miotóxicos, pode constituir um modelo útil na dissociação entre as atividades neurotóxica e miotóxica das toxinas.

1. INTRODUÇÃO

Os venenos ofídicos consistem de uma mistura de proteínas, dotadas de atividades enzimáticas e (ou) tóxicas, e de outros constituintes. De acordo com VITAL BRAZIL (1982), o estudo farmacológico dos venenos animais e de suas * toxinas é da mais alta importância sob múltiplos aspectos, pois:

- através dele é possível adquirir conhecimento adequado da fisiopatologia dos envenenamentos e instituir medidas racionais a serem acrescentadas ao tratamento soroterápico;
- tem revelado substâncias que vêm contribuindo, de modo decisivo, para o esclarecimento, principalmente em nível molecular, de vários fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos;
- tem contribuído para o desenvolvimento de substâncias que se revelam promissoras em terapêutica, cujo estudo da estrutura química e das funções pode contribuir para esclarecer relações taxonômicas entre os animais venenosos.

As peçonhas ofídicas produzem efeitos no organismo animal, quer indiretamente, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, quer diretamente, através de ações nas membranas celulares. Seus princípios ativos são proteínas de estrutura, ponto isoelétrico e peso molecular muito variável. Algumas podem encerrar, também, polipeptídios farmacologicamente ativos. Muitas proteínas dos venenos ofídicos exercem atividades enzimáticas. Contudo, das múltiplas atividades enzimáticas detectadas nas peçonhas dos tanatofídios, poucas são de importância na gênese de efeitos farmacológicos. Dentre estas, destacam-se as proteásicas, a fosfolipásica e a hialuronidásica.

* O termo toxina é geralmente empregado no sentido de 'veneno' ou 'peçonha', podendo designar a peçonha ou veneno integrais ou apenas um de seus componentes. Neste estudo, designamos toxina como um dos componentes do veneno (crotoxina ou bothropstoxina).

As peçonhas ofídicas produzem uma variedade de sintomas quando injetadas em animais, ou mesmo em humanos, em caso de acidente (MEBS & OWNBY, 1990). Além de efeitos agudos, que podem representar uma ameaça à vida, como falência cardiovascular ou renal, choque e paralisia; outras manifestações, como edema hemorrágico e necrose local, afetam não só a pele, como também a camada muscular, causando, muitas vezes, incapacidade prolongada ou permanente. Alterações patológicas são observadas após injeção de várias peçonhas no tecido muscular, desde edema e hemorragia, até eventos degenerativos e graves processos miolíticos (HOMMA & TU, 1971; OWNBY, 1982; MEBS, EHRENFELD, SAMEJIMA, 1983).

1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES

As serpentes venenosas existentes no Brasil pertencem a duas famílias, Elapidae e Viperidae (subfamília Crotalinae). O único gênero da família Elapidae, no Brasil, é o *Micrurus*, cujas espécies são conhecidas popularmente por corais. Os representantes da subfamília Crotalinae pertencem aos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*.

1.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os acidentes ofídicos têm importância médica em virtude do grande número de pessoas atingidas e pela própria gravidade que representam. No Brasil, das notificações de acidentes ofídicos (janeiro de 1990 a dezembro de 1993) informando o gênero a que a serpente pertencia, 90,5% eram do gênero *Bothrops*; 7,7%, *Crotalus*; 1,4%, *Lachesis* e 0,4%, *Micrurus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

No Estado de São Paulo, nos anos de 1986 a 1990 observou-se a seguinte frequência: 86% do gênero *Bothrops*; 12,9%, *Crotalus* e 1,1%, *Micrurus*. Não há relatos de acidentes por serpentes do gênero *Lachesis* no Estado de São Paulo (MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1993).

1.3. GÊNERO *Crotalus*

As serpentes do gênero *Crotalus* são representadas na América do Sul por várias subespécies de *Crotalus durissus*. As principais ações do veneno de *C. d. terrificus* são (JORGE & RIBEIRO, 1990; MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1993):

- 'neurotóxica' (derivada da ação da fração crotoxina do veneno), cuja manifestação caracteriza o chamado 'facies miastênico' - ptose palpebral uni ou bilateral e paralisia da musculatura facial (ROSENFELD, 1971; VITAL BRAZIL, 1980);
- 'miotóxica', caracterizada por lesões de fibras musculares esqueléticas, que liberam enzimas e mioglobina para o sangue e, posteriormente, para a urina (mioglobinúria). A mioglobinúria constitui a manifestação clínica mais evidente da necrose da musculatura esquelética (rabdomiólise). Não está identificada a fração do veneno que produz este efeito miotóxico sistêmico. A ação miotóxica do veneno manifesta-se nas dores musculares generalizadas e no escurecimento da urina, sendo o óbito geralmente causado por insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERING, 1987);
- 'coagulante', cuja atividade *in vitro* é do tipo trombina, podendo provocar incoagulabilidade sanguínea (RAW *et al*, 1986; ALEXANDER *et al*, 1988).

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).

1.3.1. *Crotalus durissus terrificus* (Cdt)

Duas variedades regionais (BARRIO & VITAL BRAZIL, 1951) de veneno podem ser identificadas nesta espécie:

Tipo I (Brasil, Argentina) - induz, numa primeira fase, ataque espasmódico em camundongos e ratos; rigidez muscular em cães. Numa fase posterior, hipotonia muscular e paralisia flácida.

Tipo II (Brasil) - produz apenas hipotonia muscular e paralisia flácida.

Tal diferença no comportamento farmacológico deve-se, respectivamente, à presença ("crotamine-positive") ou ausência ("crotamine-negative") da crotamina no veneno. Esta é uma toxina polipeptídica, fortemente básica, com PM de 4.900.

As principais toxinas presentes no veneno de Cdt incluem, além da crotamina (responsável pela ação muscular), giroxina, convulxina e crotoxina, que é o principal componente tóxico e responsável pela elevada toxicidade do veneno (VITAL BRAZIL, 1972).

O veneno de Cdt tem sido muito investigado, tanto biológica como farmacologicamente, com o isolamento de toxinas e enzimas (TU, 1977, 1982). BERCOVICI *et al.* (1987), isolaram sistematicamente, do mesmo lote: 5'-nucleotidase, fosfodiesterase, enzima tipo trombina, fosfolipase A₂, crotapotina, convulxina e giroxina. Em outras frações, foram identificadas a presença de L-amino ácido oxidase, atividade de calicreína tipo

tissular e NAD-hidrolase.

1.3.2. Crotoxina (CrTX)

Esta toxina, isolada por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT (1938), tem PM de 30.000. É um complexo com duas subunidades, possivelmente em combinação iônica, uma das quais (subunidade básica, fosfatidato 2-acilhidrolase, EC 3.1.1.4) possui a atividade fosfolipásica (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; RUBSAMEN, BREITHAUPT, HABERMANN, 1971; BREITHAUPT, 1976). A subunidade ácida (crotapotina) não tem nenhuma atividade catalítica, mas, quando adicionada à subunidade básica, aumenta sua atividade farmacológica (BON *et al.*, 1979).

A CrTX apresenta atividades neurotóxica (VITAL BRAZIL, 1966), miotóxica (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1982; CUPO, AZEVEDO-MARQUES, HERING, 1988) e hemolítica (ROSENFELD, 1971).

A atividade neurotóxica da CrTX deve-se, provavelmente, à inibição do influxo do íon cálcio, necessário à liberação da ACh pelos impulsos nervosos (VITAL BRAZIL, FONTANA, HELUANY, 1979). A ação pré-sináptica produz uma alteração trifásica na liberação evocada do transmissor (LEE & HO, 1982; CHANG, 1985; STRONG, 1987): inibição inicial, atribuída à ligação da toxina ao sítio pré-sináptico específico, seguida por facilitação da liberação de ACh e progressiva depressão, até bloqueio irreversível da transmissão. A CrTX também bloqueia o aumento do efluxo de Na⁺ de microvesículas excitáveis, causado pela carbamilcolina, em preparação de órgão elétrico de *Torpedo marmorata*, tendo, portanto, ação pós-sináptica (BON *et al.*, 1979), originalmente observada por VITAL BRAZIL (1966), em preparação isolada de diafragma de rato.

A CrTX tem sido estudada há mais de meio século, através de métodos cromatográficos, eletroforéticos e biológicos (vide BON *et al.*, 1989). Estudos bioquímicos permitiram o seqüenciamento parcial de ambas as subunidades (FRAENKEL-CONRAT, JENG, HSIANG, 1980; AIRD *et al.*, 1985) e, posteriormente, os seqüenciamentos completos das subunidades básica e ácida da CrTX (AIRD *et al.*, 1986; 1990).

A neutralização com antiveneno (AV) tem sido outro instrumento utilizado por diversos pesquisadores, como HANASHIRO, DA SILVA, BIER (1978). Eles demonstraram que o AV produzido, em coelho, contra a subunidade básica da CrTX, foi capaz de neutralizar a atividade letal da CrTX intacta e da CrTX do veneno total, em camundongos. KAISER & MIDDLEBROOK (1988) produziram anticorpo monoclonal através de imunização, em camundongos, com CrTX, para melhor entender sua função biológica.

GOPALAKRISHNAKONE *et al.* (1980); GOPALAKRISHNAKONE, HAWGOOD, THEAKSTON (1981) demonstraram que o AV contra CrTX reconstituída reagia com a toxina Mojave (*Crotalus scutulatus scutulatus*), neutralizando-a, quando pré-incubada com a mesma, antes da injeção em camundongos. A toxicidade ao músculo esquelético foi demonstrada *in vivo* por GOPALAKRISHNAKONE *et al.* (1984).

Mais recentemente, métodos de ELISA e imunodifusão de Ouchterlony têm sido utilizados (KAISER *et al.*, 1986) para determinar a eficácia relativa de AV contra a CrTX e suas subunidades, em camundongos.

Outras abordagens com a CrTX têm sido consideradas, a saber: seus efeitos no coração isolado de cobaia (SANTOS *et al.*, 1990), consequências de inibidores do metabolismo do ácido araquidônico na indução da neurotoxicidade pela CrTX, na JNM (EDWARDS, HAWGOOD, SMITH, 1990), ações sobre agregação plaquetária

(LANDUCCI *et al.*, 1994) e efeitos sobre o comportamento (ansiedade e emocionalidade), em ratos (MOREIRA *et al.*, 1995).

Uma proteína com propriedade neutralizante foi isolada do sangue da cascavel e mostrou agir especificamente sobre a CrTX. Ela foi denominada CICS ("crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum") por PERALES *et al.* (1995). Seu efeito neutralizante foi demonstrado *in vivo* por ensaios contra letalidade. A CICS liga-se à subunidade fosfolipásica básica da CrTX (mas não à ácida), inibindo-a eficientemente. Também inibiu a CrTX total. Os autores sugerem que a CICS age fisiologicamente como um falso CrTX-aceptor, que poderia reter a toxina no sistema vascular, impedindo, então, sua ação sobre o sistema neuromuscular.

Foi pesquisado o efeito citostático da CrTX (DONATO *et al.*, 1996), associado à sua atividade fosfolipásica, sobre células de carcinoma epidérmico, obtendo-se altos níveis de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFr). A CrTX foi efetiva em inibir o crescimento destas células. Cardiotoxina, uma outra toxina que age sobre membranas, sem atividade PLA₂ intrínseca, não apresentou ação antiproliferativa. Resumindo, os autores encontraram evidências de receptores transmembrana envolvidos no crescimento, que funcionariam como alvo celular e potentes efetores da atividade antiproliferativa, mediada por fosfolipases de veneno de cobra.

NASCIMENTO *et al.* (1996) pesquisaram a influência da radiação ionizante sobre as atividades bioquímicas e imunológicas da CrTX. Observaram que a irradiação de proteínas tóxicas poderia promover significativa detoxificação e preservar muitas das propriedades antigênicas e imunológicas originais da CrTX nativa.

1.4. GÊNERO *Bothrops*

Apresenta 32 espécies e subespécies que se distribuem por todo o território nacional (HOGE & ROMANO-HOGE, 1972).

O veneno botrópico possui três atividades principais (JORGE & RIBEIRO, 1990; MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1993):

- 'proteolítica', que possui um papel na necrose, na região da picada, e no edema inflamatório (BRAZIL, 1911; ROSENFELD, 1965; JORGE & RIBEIRO, 1989) decorrentes da presença de proteases, fosfolipases, hialuronidases e outras enzimas. Secundariamente, pode haver liberação de autacóides endógenos, principalmente histamina, bradicinina e serotonina, que parecem estar relacionados às manifestações sistêmicas (hipotensão e choque);
- 'hemorrágica', que leva ao extravasamento de sangue dos capilares para o interstício da região da picada (ROSENFELD, 1965; 1976), com conseqüente formação de equimoses, às vezes extensas. As 'hemorraginas' são metaloproteínas que atuam independentemente da ação coagulante do veneno. Embora não exista comprovação, tem-se considerado que esta atividade possa ser a principal responsável por hemorragias sistêmicas;
- 'coagulante', em razão, fundamentalmente, de proteases que atuam em pontos específicos da cascata de coagulação. A maioria dos venenos de *Bothrops* possui, isolada ou simultaneamente, ação sobre o fibrinogênio, a protrombina, o fator X e as plaquetas, resultando em alterações na coagulação sanguínea. Nesses casos, o tempo de coagulação do sangue total pode estar prolongado e o sangue parcialmente coagulável ou incoagulável. Essas alterações são decorrentes do consumo dos fatores

da coagulação, notadamente do fibrinogênio, havendo formação de microcoágulos de fibrina, que são depositados em capilares e arteríolas, os quais são, posteriormente, removidos pelo sistema fibrinolítico (NAHAS, KAMIGUTI, BARROS, 1979).

De modo geral, o quadro clínico dos pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops* consiste, sobretudo, de distúrbios da coagulação, hemorragia, edema e necrose local (HOMMA & TU, 1971; ROSENFELD, 1971). As principais causas de óbito estão relacionadas à insuficiência renal aguda, sangramento em órgãos vitais e choque (AMARAL *et al.*, 1986; KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1991).

1.4.1. *Bothrops jararacussu* (Bjssu)

O estudo do veneno de Bjssu teve seu início com BRAZIL & RANGEL PESTANA, em 1909, sendo que, já em 1903, BRAZIL mostrava que o soro anticrotálico revelava-se muito mais ativo que o antibotrópico sobre a peçonha de Bjssu. BRAZIL (1911) descreveu que os sinais e sintomas exibidos no envenenamento causado pela Bjssu assemelhavam-se, em parte, aos observados no acidente crotálico. O veneno demonstrava intensa atividade coagulante e discreta ação proteolítica, quando comparado a outras espécies do gênero *Bothrops*.

GONÇALVES (1956) descreveu que o veneno de Bjssu continha um peptídio "crotamine-like", enquanto VITAL BRAZIL (1966) verificou que esta peçonha apresentava, à semelhança da CrTX, a propriedade de inibir a contratura causada pela ACh no diafragma desnervado de rato.

Os venenos botrópicos das espécies brasileiras, de um modo geral, foram pouco estudados em seus componentes isolados e o veneno de Bjssu, em particular, foi

fracionado pela primeira vez por VIDAL & STOPPANI (1971), que dele isolaram duas fosfolipases A₂. RODRIGUES-SIMIONI, BORGESE, CECCARELLI (1983) pesquisaram a ação deste veneno sobre a preparação nervo-músculo *cutaneous pectoris* de rã. O veneno rapidamente inibia a contração muscular, evocada direta ou indiretamente através do nervo motor, e abolia o potencial de ação composto do músculo e do nervo. O veneno foi fracionado e a fração principal - "pool IV" - reproduziu, na preparação isolada utilizada, a maioria dos efeitos da peçonha.

QUEIROZ *et al.* (1984) estudaram os efeitos locais do veneno de Bjssu, após injeção em músculo tibial anterior de camundongo. Os autores constataram que o veneno produzia necrose da fibra muscular, seguida de alterações vasculares e trombose. A recuperação da fibra muscular era muito deficiente, podendo resultar em seqüela permanente.

AMARAL *et al.* (1985) detectaram necrose do córtex renal em indivíduos picados por *B. jararacussu*.

Pesquisas sobre peçonhas têm surgido tanto no campo da biologia molecular, quanto da celular, pois aquelas são proteínas mediadoras de muitos processos patológicos. Concomitantemente, a tecnologia do DNA permite um acesso rápido aos genes que controlam estes processos. Nesta linha, MOURA-da-SILVA *et al.* (1995) seqüenciaram o cDNA para uma PLA₂ de Bjssu, e por análise comparativa de seqüências, sugeriram que as PLA₂ do grupo II evoluíram por duplicação genética.

ZAGANELLI *et al.* (1996) descreveram os resultados da purificação e caracterização de uma serina proteinase de Bjssu, que demonstrou possuir atividades amidase e fibrinogênio-coagulante.

1.4.2. Bothropstoxina (BthTX)

O Vb de Bjssu foi fracionado através de filtração em gel em Sephadex G-50, por RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1983), obtendo-se, deste procedimento, uma fração, "pool IV", com atividade miotóxica, e equivalente a 30% do conteúdo protéico do veneno total. A miotoxina, constituída por dois polipeptídios básicos, com PM aproximadamente de 13.000, apresentava atividade hemolítica indireta na presença de íons Ca^{2+} , baixa ação PLA_2 sobre lecitina de ovo, nenhuma atividade proteolítica e mostrou-se responsável pela ação bloqueadora das respostas musculares tanto a estímulos elétricos diretos, como indiretos. Os autores sugeriram, então, uma ação semelhante à das cardiotoxinas para a(s) proteína(s) responsável(eis) pela atividade tóxica.

HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* (1988) purificaram o veneno de Bjssu, combinando filtração em gel Sephadex G-75 com cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25. A fração isolada $\text{S}_{III}\text{SP}_V$, correspondente à fração purificada relatada por RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1983) - "pool IV" - foi denominada "bothropstoxina-I (BthTX-I)", especificamente miotóxica, ao contrário do Vb, que, embora também miotóxica, afeta artérias e veias intramusculares podendo levar à trombose. A fração $\text{S}_{III}\text{SP}_{IV}$ foi denominada BthTX-II.

HELUANY *et al.* (1992) descreveram os efeitos induzidos pela BthTX sobre preparações musculares de camundongos e aves: contratura; bloqueio das contrações musculares; despolarização, sendo, ainda, capaz de abolir o potencial de ação composto do músculo. Observaram que a atividade bloqueadora da junção neuromuscular (JNM) não

* Neste estudo, BthTX-I será referida simplesmente como BthTX.

envolvia a participação do receptor nicotínico, nem a ativação do canal de Na^+ . Os autores sugeriram uma atuação da toxina sobre os sítios de ligação de Ca^{2+} na membrana.

CINTRA *et al.* (1993) descreveram a seqüência completa de aminoácidos da BthTX (fração $\text{S}_{III}\text{SP}_V$), toxina que corresponde a 15% das proteínas do veneno total. Trata-se de uma proteína Lys49 de estrutura fosfolipásica, constituída por uma única cadeia polipeptídica, com 121 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 13.720.

MELO *et al.* (1993) investigaram o antagonismo dos efeitos miotóxicos do veneno de *Bjssu* e da BthTX por poliânions (heparina, dextran sulfato e condroitina sulfato). A miotoxicidade foi estudada em camundongos, *in vivo* e *in vitro*, pela determinação enzimática de creatinoquinase (CK) liberada. Observaram que poliânions formam complexos ácido-básicos com as miotoxinas básicas de venenos botrópicos, neutralizando sua miotoxicidade.

ARNI *et al.* (1995) cristalizaram a miotoxina Lys49 fosfolipásica BthTX-I. Análises preliminares revelaram a presença de 4 moléculas na unidade assimétrica, em comparação à miotoxina II da *B. asper*, que contém 2 moléculas nesta unidade.

O seqüenciamento do código de cDNA da BthTX foi realizado por WARD *et al.* (1995), com o objetivo de entender a afinidade estrutura/função de dano à membrana, causado pela subfamília Lys49- PLA_2 . Tal estudo mostrou que a BthTX tem uma Lys49 e, em comparação com a já conhecida estrutura da miotoxina II da *B. asper*, demonstrou que os aminoácidos (a.a.) envolvidos na formação de uma nova estrutura dimérica na proteína também foram conservados.

RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1995) investigaram a função da atividade fosfolipásica, verificando o armazenamento de Ca^{2+} intracelular, em cultura de miócitos, sobre a ação

farmacológica da BthTX. Os resultados demonstraram que a baixa atividade fosfolipásica da BthTX parece não desempenhar papel relevante sobre o efeito bloqueador da atividade contrátil. Dos estudos com dantrolene, droga que impede a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS), os autores concluíram que os mecanismos e (ou) “pools” de Ca^{2+} , que podem ser antagonizados por este agente, não estão ligados aos efeitos da BthTX sobre a contração muscular.

1.5. NEUROTOXINAS (NTX)

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 JNM, de constituintes denominados neurotoxinas.

Dividem-se, quanto ao modo de ação, em dois grupos:

- Pré-sinápticas:

Atuam nas terminações nervosas motoras, inibindo a liberação do neurotransmissor (ACh) pelos impulsos nervosos. Encontram-se na peçonha de algumas Elapidae e em algumas espécies de cascavel. São exemplos de NTX elapídicas, a β -bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*), a notexina (*Notechis scutatus scutatus*), a taipoxina (*Oxyuranus scutellatus*) e as toxinas III-A e III-B (*Bungarus coeruleus*). A peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* encerra, também, toxina ou toxinas deste grupo. A CrTX é a NTX da cascavel sul-americana.

Todas as NTX pré-sinápticas exibem atividade fosfolipásica A_2 , em geral, fraca. Esta atividade é essencial para a ação pré-sináptica das toxinas. Contudo, o seu mecanismo de

ação nas terminações nervosas não se acha perfeitamente esclarecido. São as NTX pré-sinápticas os componentes mais tóxicos das peçonhas ofídicas. Além da ação pré-sináptica, a principal, a maioria destas toxinas atua, também, em doses geralmente maiores, na membrana das fibras musculares, onde podem provocar diminuição ou perda da excitabilidade e mionecrose.

- Pós-sinápticas:

Ligam-se aos receptores colinérgicos de placa terminal, sem promoverem a sua despolarização. Atuam, portanto, de modo semelhante ao curare, mas a sua combinação com os receptores, embora não envolva ligações de covalência, é sempre lentamente reversível ou irreversível.

Ocorrem em todas as peçonhas das serpentes Elapidae e Hydrophidae. São proteínas básicas, de pequeno peso molecular (entre 7.000 e 8.000), desprovidas de atividade enzimática.

1.6. MIOTOXINAS

MEBS & OWNBY (1990) definem miotoxidade como uma ação específica do veneno sobre o músculo esquelético, causado por substâncias denominadas miotoxinas, que exercem, portanto, uma ação direta e específica sobre o músculo esquelético, levando à degeneração e morte celular (mionecrose). Essa ação direta diferencia as miotoxinas de outros componentes tóxicos, como as hemorraginas, que podem, indiretamente, destruir o músculo esquelético e outros tecidos. Uma 'verdadeira' miotoxina não destrói nervos terminais, células satélites, vasos sanguíneos ou tecidos conectivos. Encontram-se amplamente distribuídas nos venenos de serpentes (MEBS *et al.*, 1983).

Sua classificação abrange de 2 a 4 grupos (Tabela 1), de acordo com os diferentes pesquisadores. OWNBY (1990) e MEBS & OWNBY (1990) dividem-nas em 2 grupos principais: (1) pequenas miotoxinas e (2) miotoxinas fosfolipásicas. HARRIS & CULLEN (1990) incluíram os mesmos grupos e adicionaram um outro, formado pelas (3) cardiotoxinas. GUTIÉRREZ & CERDAS (1984) adicionaram um quarto grupo, as (4) toxinas hemorrágicas, que podem causar danos às fibras musculares esqueléticas, indiretamente, provavelmente por isquemia.

(1) Pequenas miotoxinas:

Elas apresentam ponto isoelétrico básico (acima de 9,0), peso molecular em torno de 4.000, 42-45 a.a. e nenhuma atividade enzimática. São exemplos deste grupo, a crotamina, miotoxina a e o peptídeo c (Tabela 1).

Quando injetadas em camundongos, causam prostração imediata, contratura dos membros e dificuldade respiratória. Alterações morfológicas incluem vacuolização nas fibras do músculo esquelético, que evoluem para necrose, 48 horas após a injeção.

Através da microscopia eletrônica, tem sido demonstrado que esta vacuolização é causada por dilatação do RS e do espaço perinuclear, não afetando o sistema T, nem a membrana plasmática, que permanece intacta. Não afeta, também, outras células, como fibroblastos e células endoteliais (OWNBY, CAMERON, TU, 1976; OWNBY, 1990; MEBS & OWNBY, 1990). Não são citolíticas, *in vitro*, às células musculares precursoras, como os mioblastos (BAKER, TU, MIDDLEBROOK, 1993; BRUSÉS *et al.*, 1993), a despeito de sua potente ação miotóxica *in vivo*.

O mecanismo de ação molecular dessas toxinas não está completamente

estabelecido. Tem-se demonstrado que tanto a crotamina, como a miotoxina a ativam os canais de Na^+ , aumentando a permeabilidade da membrana a este íon, em preparações de músculo esquelético de camundongos e ratos (CHANG & TSENG, 1978; VITAL BRAZIL *et al.*, 1979; HONG & CHANG, 1985). Esta ação seria seguida pelo influxo de Na^+ e água, causando intumescimento do RS e, finalmente, necrose da célula muscular (MEBS & OWNBY, 1990).

Outros pesquisadores propõem uma ação direta sobre o RS, pelas evidências *in vitro* da interação com Ca^{2+} -ATPase do RS (VOLPE *et al.*, 1986; UTAISINCHAROEN, BAKER, TU, 1991; BAKER, UTAISINCHAROEN, TU, 1991); sobre a detecção citoquímica da miotoxina a ao RS em secções do músculo em estudos *in vitro* (TU & MORITA, 1983) e da ligação reversível ao sarcolema, observada em cultura de mioblastos de ratos (BAKER, 1993), além do uso de peptídios correspondentes às porções N-terminal e C-terminal, que mostrou que ambas as regiões estão envolvidas na ligação da toxina a sítios do sarcolema (BAKER, 1993). Esses resultados sugerem que a miotoxina a interage especificamente com o sarcolema e também com o RS, possivelmente pela ligação a domínios semelhantes sobre duas ou mais diferentes proteínas (YUDKOWSKY, BEECH, FLETCHER, 1994).

(2) Fosfolipásicas:

2a. Neurotóxicas:

Quimicamente essas toxinas são variadas, como a notexina, constituída por uma única cadeia, ou como a crotoxina e a taipoxina, constituídas por duas, três ou mais diferentes cadeias de polipeptídeos, não-covalentemente ligadas.

São, contudo, homólogas às PLA_2 pancreática ou de venenos de serpentes. Será enfatizada, a seguir, a habilidade desse grupo de toxinas em induzir mionecrose local.

Essas toxinas levam a uma rápida degeneração da fibra muscular, evidente num período de 0,5 a 3 horas. As alterações são caracterizadas por hipercontração de sarcômeros e aparecimento de lesões do tipo delta. Mitocôndrias também mostram sinais de danos, como intumescimento, cristas anormais, degeneração flocular e ruptura. CK e outras enzimas são rapidamente liberadas das células danificadas e podem ser detectadas no sangue. O processo degenerativo é também acompanhado por um edema precoce e infiltração de células fagocitárias. Entre 12 e 24 horas, as fibras musculares encontram-se totalmente destruídas com aparência amorfa e hialina. A lâmina basal e a microcirculação são preservadas.

Igualmente, células satélites imaturas, situadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática das fibras musculares, também são mantidas (HARRIS & CULLEN, 1990; MEBS & OWNBY, 1990). Isso é importante, pois se acredita que as células satélites sejam responsáveis pela formação de mioblastos, miotubos e, finalmente, pela regeneração do músculo esquelético após necrose, se as condições forem adequadas.

Da mesma forma que as pequenas miotoxinas, as miotoxinas neurotóxicas não são citolíticas ao músculo imaturo em cultura (HARRIS, JOHNSON, MACDONELL, 1980; JIANG *et al.*, 1987; HARRIS & CULLEN, 1990), exceto a nigexine da *Naja nigricollis*, a qual exibe atividade citotóxica (CHWETZOFF *et al.*, 1989; CHWETZOFF, 1990) além de exercer ação neurotóxica e provocar lesão muscular direta (ROWAN, HARVEY, MÉNEZ, 1991). Ainda não está estabelecido como essas PLA₂ induzem necrose da célula muscular.

Dados de estudos morfológicos sugerem que a ação primária dessas toxinas seja a hidrólise de fosfolipídeos da membrana plasmática da célula muscular (HARRIS & MacDONELL, 1981; GOPALAKRISNAKONE *et al.*, 1984; GUTIÉRREZ, OWNBY, ODELL, 1984b). A importância da atividade enzimática na miotoxicidade (e outras ações

farmacológicas, incluindo a neurotoxicidade) ainda não é clara, apesar dos esforços de muitos grupos de pesquisadores nos últimos 20 anos (ROSENBERG, 1986; KINI & EVANS, 1989).

Em muitos casos, a modificação química de a.a. específicos tem resultado em dissociação parcial das atividades catalítica e farmacológica (ROSENBERG, 1986; 1990), sugerindo que a miotoxicidade, como outra ação tóxica, pode ser parcialmente mediada por mecanismos não-enzimáticos, ao contrário do que se pensava *a priori*, que os efeitos tóxicos seriam causados pela atividade enzimática.

2b. Não-neurotóxicas:

Esse grupo inclui um grande número de enzimas, encontradas principalmente em serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae. A ausência de neurotoxicidade reflete-se na baixa atividade letal, neste caso, ligada à mioglobinúria e falência renal (MEBS & OWNBY, 1990).

Algumas toxinas desse grupo são encontradas em venenos de várias espécies de *Bothrops* (GUTIÉRREZ, OWNBY, ODELL, 1984a; GUTIÉRREZ, LOMONTE, CERDAS, 1986; GUTIÉRREZ *et al.*, 1991; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989; HELUANY *et al.*, 1992), *Agkistrodon* (MEBS & SAMEJIMA, 1986; JOHNSON & OWNBY, 1993) e *Trimeresurus* (MEBS & SAMEJIMA, 1986; KIHARA *et al.*, 1992).

As alterações morfológicas causadas por essas miotoxinas são similares às aquelas provocadas pelas neurotóxicas. Contudo, duas diferenças entre elas abrem a possibilidade de que as miotoxinas não-neurotóxicas utilizem um mecanismo diferente para a miotoxicidade. Primeiro, algumas miotoxinas deste grupo são diretamente citotóxicas às

células imaturas musculares *in vitro* (BRUSÉS *et al.*, 1993; BULTRÓN, THELESTAM, GUTIÉRREZ, 1993b). Segundo, um número elevado de variantes naturais destas toxinas (ou isoformas) tem sido encontrado neste grupo, que, apesar da estrutura fosfolipásica, não hidrolisam fosfolipídios, por causa de alterações em resíduos de a.a. essenciais ao mecanismo catalítico. Como essas isoformas conservam a habilidade em danificar o músculo, não necessitam da atividade enzimática para induzir mionecrose.

O progresso alcançado no estudo do mecanismo de ação deste grupo de miotoxinas liga-se à obtenção de dados demonstrando que o sítio de ação primário é a membrana plasmática da fibra muscular, pelas seguintes evidências indiretas:

1. observação ultra-estrutural da ruptura precoce da membrana ou descontinuidade em fibras musculares afetadas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984b; JOHNSON & OWNBY, 1993);
2. aumento da concentração de cálcio intracelular em tecido muscular afetado (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984a; 1989);
3. a imunodeteção de miotoxinas sobre a membrana plasmática de secções de músculo exposto *in vitro* (BRENES, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1987);
4. a habilidade das miotoxinas em romper vários tipos de lipossomos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1989; DÍAZ *et al.*, 1991; DÍAZ, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1992; RUFINI *et al.*, 1992; BULTRÓN, GUTIÉRREZ, THELESTAM, 1993a; PEDERSEN, CESARONI, RUFINI, 1993) e,
5. a falta de ação inibitória por agentes bloqueadores de endocitose (cloreto de amônio e cloroquina) sobre os efeitos citolíticos induzidos *in vitro* (BULTRÓN *et al.*, 1993b).

(3) Cardiotoxinas:

São assim denominadas pela habilidade em causar parada cardíaca *in vivo* e *in vitro* (HARRIS & CULLEN, 1990). Também são conhecidas como citotoxinas, toxinas de

membrana e fatores líticos diretos. São desprovidas de atividade enzimática e estruturalmente homólogas às neurotoxinas pós-sinápticas ou α -neurotoxinas (DUFTON & HIDER, 1991). Encontram-se nos venenos elapídicos, incluindo-se as serpentes dos gêneros *Naja* e *Hemachatus*. Poucos estudos sobre a atividade miotóxica das cardiotoxinas estão disponíveis. MEBS & SAMEJIMA (1986) referiram que as cardiotoxinas da *Naja nivea* e *N. nigricollis* eram desprovidas de miotoxicidade. Outros estudos, usando cardiotoxinas do veneno de *Dendroaspis jamesoni* (DUCHEN *et al.*, 1974), *Naja mossambica mossambica* (d'ALBIS *et al.*, 1988) e *Naja naja atra* (OWNBY, FLETCHER, COLBERG, 1993), indicaram claramente a ação miotóxica desenvolvida no local de injeção.

A observação microscópica do tecido, após injeção de cardiotoxina-1 da *N. n. atra*, revelou mionecrose, com ruptura da membrana plasmática nas áreas de lesões do tipo delta, e condensação de miofibrilas em densas áreas, alternando com áreas claras, contendo elementos do sistema sarcotubular e mitocôndrias danificadas. A lâmina basal das células musculares permaneceu intacta durante todo o processo degenerativo e as células endoteliais dos capilares também foram poupadas do dano (OWNBY *et al.*, 1993). *In vitro*, a despolarização de membrana foi seguida por visível dano muscular de miotubos (de embriões de pintainho) em cultura (HODGES *et al.*, 1987). A base molecular para a ação citolítica de cardiotoxinas tem sido intensivamente estudada, mas a natureza dos receptores de membrana, ou sítios de ligação, continuam desconhecidos (HARVEY, 1990; DUFTON & HIDER, 1991; REES & BILWES, 1993).

(4) Toxinas hemorrágicas:

Este grupo inclui toxinas como a toxina b (*Crotalus atrox*) e a viriditoxina (*Crotalus viridis viridis*), que podem induzir dano muscular local, não por uma via de ação direta, mas como uma consequência secundária ao prejuízo causado à microcirculação: perturbações

do fluxo sanguíneo e desenvolvimento de isquemia. Incluem algumas toxinas hemorrágicas (OWNBY, BJARNASON, TU, 1978; FABIANO & TU, 1981; QUEIROZ *et al.*, 1985a; 1985b; YAGIHASHI *et al.*, 1986; KOMORI & SUGIHARA, 1988; KAMIGUTI *et al.*, 1991), que podem ser um fator de complicação ao se atribuir, aos venenos brutos (Vb), atividade direta de dano muscular (MEBS & OWNBY, 1990; HARRIS & CULLEN, 1990).

A patogênese da hemorragia tem sido estudada com detalhes para algumas toxinas e pode ocorrer por dois mecanismos distintos. Hemorragia *per diapedesis*, quando eritrócitos passam através das junções intercelulares, entre as células endoteliais adjacentes à parede dos vasos. Hemorragia *per rhexis*, quando eritrócitos passam através de grandes fendas no endotélio, causadas por degeneração e ruptura de células endoteliais, enquanto as junções intercelulares permanecem intactas (OWNBY, 1990).

A mionecrose observada após injeção de algumas toxinas hemorrágicas parece desenvolver-se mais lentamente (após cerca de 4 a 6 horas). Dano à célula muscular seria, então, devido às condições isquêmicas no tecido e não a uma ação direta da toxina hemorrágica (OWNBY, 1990).

Contudo, a morfologia da fibra muscular danificada por toxinas hemorrágicas também parece ser diferente, tendo uma aparência mais hialina (YAGIHASHI *et al.*, 1986), referida como necrose do tipo 'coagulativo' (HOMMA & TU, 1971; OWNBY & COLBERG, 1988), ao contrário da aparência 'miolítica', causada pelas toxinas de ação direta.

Podem existir discordâncias sobre o conceito de um lento desenvolvimento do dano muscular causado por toxinas hemorrágicas, como observado por YAGIHASHI *et al.* (1986) e SMITH (1987), que relataram a ocorrência de danos em fibras musculares após 1 hora. Algumas toxinas podem causar extenso dano à microcirculação, sem provocar mionecrose

SELISTRE *et al.*, 1990). Isso sugere que fatores adicionais, ao lado dos danos à microcirculação, podem ser necessários para produzir injúria ao músculo, como:

- indução de edema (com conseqüente compressão tecidual, ação isquêmica e, portanto, anóxia);
- efeitos sobre os componentes da cascata de coagulação e sobre as plaquetas, sendo, ambos, críticos no desenvolvimento de distúrbios do fluxo sanguíneo.

Existem vários métodos para a avaliação da atividade miotóxica de venenos e toxinas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre eles, a análise histológica de tecido muscular injetado é indubitavelmente o método de referência e pode ser feito quantitativamente (OWNBY *et al.*, 1982; KOUYOUMDJIAN, HARRIS, JOHNSON, 1986; OWNBY & COLBERG, 1988; PRESTON, DAVIS, HARRIS, 1990; McLOON, BAUER, NIRTSCHAFTER, 1991). Contudo, a análise histológica quantitativa é muito trabalhosa, requerendo instrumentos adequados e, por esta razão, muitos estudos têm utilizado a avaliação histológica apenas qualitativamente.

Como alternativa, métodos baseados na medida de indicadores bioquímicos do dano muscular têm sido utilizados. Tais métodos incluem a quantificação de enzimas intracelulares específicas, liberadas após injúria celular, pelo aumento de sua atividade no plasma (ou soro) ou pela diminuição do conteúdo intracelular no tecido muscular afetado. A determinação de CK tem sido freqüentemente utilizada. Esta enzima ocorre em três isoformas eletroforeticamente distintas: MM, MB e BB, que são preferencial e respectivamente expressas nos músculos esquelético, cardíaco e no sistema nervoso central (RAPHAEL, 1983).

Tabela 1. CLASSIFICAÇÃO DAS MIOTOXINAS

(OWNBY, 1990; MEBS & ONWBY, 1990; HARRIS & CULLEN, 1990; GUTIÉRREZ & CERDAS, 1984)

GRUPO	CARACTERÍSTICAS
(1) Pequenas	Básica, não-enzimática, cadeia única de peptídeo com 42-45 a.a. Ex.: crotamina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>) miotoxina a (<i>Crotalus viridis viridis</i>) peptídeo c (<i>Crotalus viridis hellen</i>)
(2) Fosfolipásicas	
a. neurotóxicas	Básica, cadeia única (~120 a.a.) ou complexada a proteínas com atividades neurotóxica e fosfolipásica. Ex.: notexina (<i>Notechis scutatus scutatus</i>) taipoxina (<i>Oxyuranus scutellatus</i>) crotoxina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)
b. não-neurotóxicas	Básica, cadeia única (~120 a.a.) ou proteínas diméricas com estrutura fosfolipásica.
b1. com atividade enzimática	Asp-49 PLA ₂ Ex.: miotoxina I (<i>Bothrops asper</i>)
b2. sem atividade enzimática	Lys-49 (ou outra variante) PLA ₂ Ex.: miotoxina (<i>Bothrops nummifer</i> e <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>) BthTX (<i>Bothrops jararacussu</i>) miotoxina II (<i>Bothrops asper</i>) proteínas básicas I e II (<i>Trimeresurus flavoviridis</i>) amoditina L (<i>Vipera ammodytes</i>)
(3) Cardiotoxinas	Básica, não-enzimática, cadeia única de proteínas com ~60 a.a. Ex.: toxina gama (<i>Naja nigricollis</i>)
(4) Toxinas hemorrágicas	Atuam por mecanismos indiretos, talvez por isquemia. Ex: toxina b (<i>Crotalus atrox</i>) viriditoxina (<i>Crotalus viridis viridis</i>)

1.7. SOROTERAPIA

O tratamento usual no acidente ofídico é a soroterapia, introduzida por Calmette (1894). Apesar de os venenos serem misturas complexas de macromoléculas, com vários epitopos capazes de estimular muitos clones de anticorpos secretados por linfócitos (SJOSTROM *et al.*, 1994), são fracos imunógenos, ainda que muito tóxicos (MAGALHÃES *et al.*, 1986). A maioria dos AV comerciais existentes são de origem equina e constituídos por IgG intactas ou por fragmentos F(ab)₂. Apenas 5 a 13% dos anticorpos, ou fragmentos destes, ligam-se especificamente aos componentes do veneno usados para imunizar o cavalo (SJOSTROM *et al.*, 1994).

No Brasil e em outros países, os AV são produzidos por imunização de cavalos, com a vantagem da sangria de vários litros (acima de 10). Além disso, o cavalo é um animal dócil, de fácil manipulação e com longevidade (pode produzir AV por 15 anos ou mais). O processamento do soro comercial envolve, pelo menos, a precipitação das imunoglobulinas com sulfato de amônio, a fim de eliminar um excesso indesejável de proteínas séricas. Os laboratórios que produzem esses imunoderivados para a rede de saúde pública são: Instituto Butantan (São Paulo), Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais) e Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro).

A imunização é realizada com venenos de um número limitado de espécies do mesmo gênero, ou de diferente gênero para aumentar o espectro de neutralização do AV (RUSSEL, 1988). A neutralização de venenos de espécies diferentes daquelas usadas na imunização pode ocorrer devido à reatividade antigênica cruzada. Realmente, os venenos podem estar relacionados entre si, farmacológica e (ou) estruturalmente, o que permite a conseqüente neutralização por AV heterólogo (MÉNEZ, 1985).

A soroterapia AV, quando indicada, é passo fundamental no tratamento adequado dos pacientes picados pela maioria dos animais peçonhentos. A dose utilizada deve ser a mesma para adultos e crianças, visto que o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade possível de veneno circulante, independentemente do peso do paciente. A aplicação deve ser feita, preferencialmente, na Unidade de Emergência ou de Internação (MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1993).

A via de aplicação recomendada é a endovenosa (EV) e o soro pode ser administrado sem necessidade de diluição, lentamente, entre 20 e 30 minutos, sob estrita vigilância médica e da enfermagem, pois, nas primeiras horas após o início da soroterapia, há maior possibilidade do aparecimento de reações precoces (urticária, tremores, vômitos, dor abdominal e diarreia) e do tipo 'anafilática', com hipotensão, choque e (ou) quadro obstrutivo das vias respiratórias. É conveniente que estes pacientes sejam mantidos internados, no mínimo, por 24 horas, para detecção de outras reações que possam se correlacionar à soroterapia.

Uma reação tardia, também conhecida como 'doença do soro', decorrente da soroterapia, pode ocorrer após 5 a 24 dias. Os pacientes podem apresentar febre, artralgia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, urticária e proteinúria. A patogenia da doença deve-se à formação do complexo imune AV/veneno, com ativação e consumo de complemento (MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 1993).

O tratamento geral diz respeito à contenção dos sintomas acima citados, com administração de medicamentos apropriados, conforme orientações constantes do MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (1993). O tratamento específico (soroterapia) para os acidentes crotálico e botrópico estão representados nos Quadros 1 e 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997), a seguir.

CLASSIFICAÇÃO QUANTO À GRAVIDADE E TRATAMENTO ESPECÍFICO DE ACIDENTES OFÍDICOS

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997)

Quadro 1 . ACIDENTE CROTÁLICO

Gravidade	Manifestações					Nº ampolas*/via
	Fácies miastênica/ visão turva	Mialgia	Urina vermelha ou marrom	Oligúria ou anúria	Tempo de coagulação (TC)	
Leve	ausente ou tardia	ausente ou tardia	ausente ou tardia	ausente ou tardia	normal ou alterada	5/EV
Moderada	discreta	discreta	pouco evidente ou ausente	ausente	normal ou alterado	10/EV
Grave	evidente	presente	presente	presente ou ausente	normal ou alterado	20 /EV

Quadro 2. ACIDENTE BOTRÓPICO

Gravidade	Manifestações	Nº ampolas**/Via
Leve	TC incoagulável apenas e (ou) edema local discreto, sem sangramento e sem alteração sistêmica	2-4/EV
Moderado	edema local evidente e (ou) hemorragia, sem alteração sistêmica	4-8/EV
Grave	edema evidente e (ou) hemorragia e alteração sistêmica (hipotensão, sudorese, choque, hemorragia intensa)	12 /EV

*Soro anticrotálico ou soro antibotrópico-crotálico (1 ampola =10 ml).

**Soro antibotrópico ou soro antibotrópico-crotálico ou soro antibotrópico-laquélico
(1 ampola =10 ml).

1.8. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade neurotóxica e miotóxica das peçonhas de Cdt, Bjssu e de suas principais toxinas, CrTX e BthTX, respectivamente, perante a capacidade neutralizante de AV comerciais e específicos, contra ambas as atividades, em preparações biológicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Animais:

Coelhos machos New Zealand, adquiridos de produtor e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia (UNICAMP); camundongos Swiss, fornecidos pela Central de Bioterismo (UNICAMP).

Venenos e AV:

Vb de Bjsu e Cdt, procedentes do Instituto Butantan; BthTX-I, fornecida pelo Dr. J. R. Giglio, da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; CrTX, fornecida pelo Dr. Stephen Hyslop, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP; AV comerciais (antibotrópico L940608, L950101 e anticrotálico L930210) do Instituto Vital Brazil, fornecidos pelo ERSA-Escritório Regional de Saúde - dos municípios de Campinas e Piracicaba.

Reagentes:

Adjuvante completo de Freund H₃₇ Ra DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA) e adjuvante incompleto NUJOL® da Schering-Plough. Kit Granutest® 2.5 (1.12 134.0001 CK) MERCK, Darmstadt, Germany; IgG anticoelho (H+L) produzido em cabra e conjugado com peroxidase (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, California, EUA); placas para ELISA

(CORNING, EUA); O-fenilenodiamina (OPD) (SIGMA Chemical Company); IgG. anticavalo produzido em coelho e conjugado com peroxidase (SIGMA Chemical Company).

Solução nutritiva: Solução de Tyrode (pH 7,0): composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl_2 1,8; MgCl_2 0,49; NaH_2PO_4 0,42; NaHCO_3 11,9 e glicose 11,1. Utilizada nas preparações biológicas.

2.2. PREPARAÇÕES BIOLÓGICAS (camundongos):

2.2.1. NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA (NFD)

Após anestesia com éter etílico, os camundongos foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragma, juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico) foi cuidadosamente retirada (BÜLBRING, 1946), colocada em cuba contendo 4 ml de solução de Tyrode e, em seguida, presa, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O_2 e 5% CO_2).

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos supramaximais, foi realizado através de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400.

O músculo foi submetido à tensão constante de 5 g/cm (por meio de um fio preso à porção tendinosa e ao transdutor isométrico) e à estimulação indireta (nervo frênico), com pulsos supramaximais, gerados por estimulador S48F (Grass Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, por um período de 20 minutos para estabilização. Findo este período, o músculo recebeu vários tratamentos, descritos abaixo.

2.2.1.1. ATIVIDADE NEUROTÓXICA E NEUTRALIZAÇÃO:

Para o estudo da atividade neurotóxica, foi utilizada a preparação NFD de camundongo. Esta preparação representa, sob o ponto de vista anatômico, a JNM. Fisiologicamente, pode-se dizer que ela é fundamental para o mecanismo de contração muscular, pois permite que a estimulação da fibra muscular pelo nervo motor desencadeie um potencial de ação, que se propaga nas duas direções do sarcolema, penetra no interior da fibra muscular pelos túbulos T, promove a liberação de Ca^{++} no sarcoplasma e, conseqüentemente, a contração muscular. Farmacologicamente, é utilizada no estudo de drogas capazes de interferir na transmissão neuromuscular, cuja existência é conhecida a partir de *CLAUDE BERNARD, que demonstrou que a paralisia progressiva produzida pelo curare, era de causa periférica, por interferência com a transmissão do sinal motor do nervo para o músculo.

Procedimento: Venenos totais de Cdt (2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) e Bjssu (50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$) e suas respectivas toxinas, CrTX (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) e BthTX (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$), foram adicionadas à cuba contendo a preparação, a fim de se conhecer a curva da resposta contrátil, a porcentagem de bloqueio, a contratura e a facilitação. Misturas veneno-AV, variando-se a concentração do AV (comercial e específico), foram pré-incubadas, a 37° C, por 30 minutos e, posteriormente, adicionadas à cuba contendo a preparação, para determinar a capacidade neutralizante dos AV específicos.

* BERNARD, C. *apud* OLIVEIRA, L. F. - Relaxantes musculares. In: (SILVA, P., ed.) *Farmacologia*. 2. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1985. p. 507-512.

2.2.2. *Extensor digitorum longus* (EDL)

Após a anestesia (hidrato de cloral 10%) atingir nível cirúrgico, realizamos ampla incisão sobre a face ântero-lateral de uma das patas posteriores do animal e expusemos os tendões dos músculos EDL e tibial, bem como este último músculo. Procedemos à secção dos tendões e à retirada do músculo tibial, com exposição total do músculo EDL. Este foi dissecado, desde sua inserção tendínea distal até a proximal.

Durante o procedimento, mantivemos a preparação umedecida com solução de Tyrode. Retirada a preparação, o músculo EDL foi colocado em cuba contendo 3 ml de solução de Tyrode e mantido sob aeração constante com carbogênio, a 37°C. O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos supramaximais, foi realizado através de transdutor isométrico Load Cell BG - 10 GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Universal Amplifier Model RS 3400.

O músculo foi submetido à tensão constante de 0,5 g/cm (por meio de um fio preso à porção tendinosa e ao transdutor isométrico) e à estimulação elétrica, através de pulsos gerados por estimulador S48F (Grass Instruments). Um eletrodo bipolar de platina foi colocado em torno da preparação que continha o tronco do nervo peroneal, suprimindo o músculo. A preparação foi submetida à estimulação indireta, com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. Antes do início do experimento, a preparação foi lavada por um período de 30 minutos, com intervalos de 10 minutos, findo o qual ela recebeu vários tratamentos, descritos abaixo.

2.2.2.1. ATIVIDADE MIOTÓXICA E NEUTRALIZAÇÃO

Neste estudo, a utilização da preparação EDL foi mais vantajosa do que a da NFD, por ser possível sua retirada de maneira integral, ao contrário da segunda, que, ao ser

cortada ao meio (hemidiafragma), sofre lesão e conseqüente liberação de enzimas, como a CK.

A atividade miotóxica foi abordada sob dois aspectos: enzimático e histológico, pois foi observado um aumento de CK no soro (MEBS *et al.*, 1983; NAKADA *et al.*, 1984) nas ocorrências de miotoxicidade e a análise histológica demonstrou produção de fibras musculares vacuolizadas, com desorganização das fibrilas e infiltrado inflamatório no local picado (GUTIERREZ *et al.*, 1986; OWNBY & COLBERG, 1988).

Procedimento: Antes de realizarmos os ensaios enzimáticos e histológicos, registramos a resposta contrátil para: Cdt 10 µg/ml, CrTX 10 µg/ml, Bjssu 50 µg/ml e BthTX 20 µg/ml. Alíquotas de 100 µl foram retiradas do banho nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, com reposição de igual volume de solução nutritiva. As alíquotas foram mantidas a 4°C até o momento da dosagem enzimática. A concentração de AV para a neutralização foi mantida constante, pois utilizamos a potência contra o efeito letal, obtida para cada AV (AntiCdt, AntiBjssu e AntiCrTX), e a informação da potência do AV comercial, descrita na ampola. A mistura veneno-AV foi pré-incubada a 37°C, por 30 minutos. Alíquotas de 100µl foram retiradas nos mesmos tempos e mantidas refrigeradas a 4°C, para posterior dosagem enzimática. Ao término do experimento, as preparações foram fixadas em Bouin, para posterior processamento histológico.

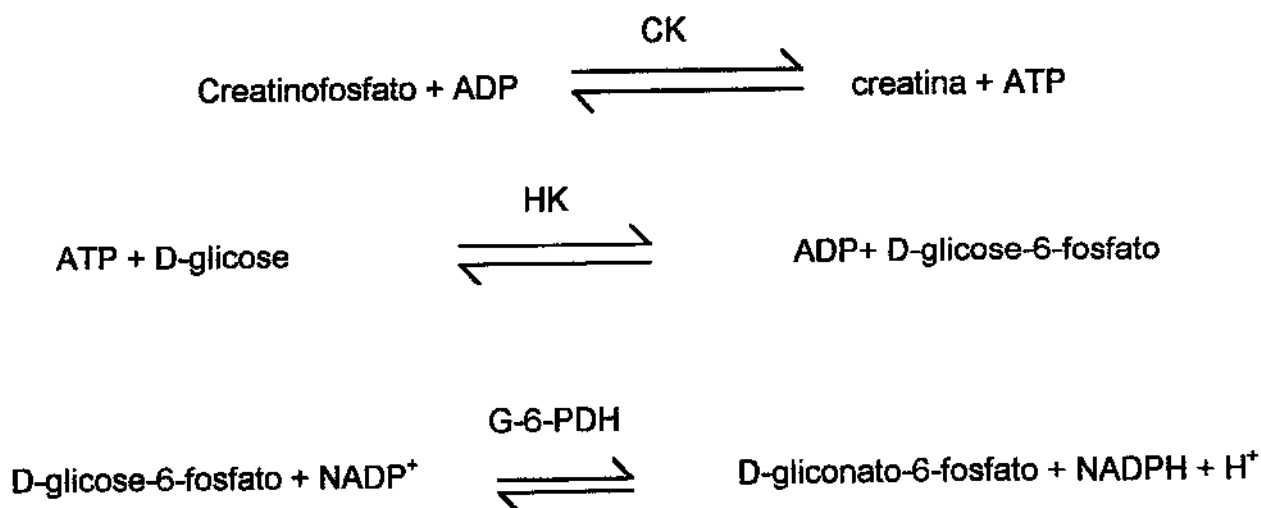
2.2.2.1.1. DETERMINAÇÃO DE CREATINOQUINASE (CK)

A contração de células musculares esqueléticas depende de ATP como fonte de energia, porém, o suplemento de ATP não é suficiente para sustentar a contração por um longo período de tempo. Então, para a célula estar ativa e manter a contração, o ATP precisa ser continuamente abastecido. Isto acontece através da metabolização da glicólise e

da ação do ciclo do ácido tricarboxílico. Enquanto o oxigênio está disponível, a célula muscular mantém uma elevada reserva de fosfato, na forma de creatinofosfato, composto rico em energia. A enzima que vai agir sobre o creatinofosfato é a CK, presente no citoplasma da célula muscular. Sua determinação é importante em alguns diagnósticos clínicos, em casos de danos tissulares, como nas distrofias musculares e infarto do miocárdio (NAKADA *et al.*, 1984).

Procedimento: As alíquotas sobrecitadas foram analisadas utilizando-se o “kit” Granutest® 2.5 (Diagnostica MERCK, Germany), para determinação dos níveis de CK, conforme orientações do fabricante.

Princípio:



A formação de NADPH é determinada fotometricamente e é diretamente proporcional à atividade de CK na amostra. O valor de CK foi expresso em unidades por litro (U/l).

ADP= Adenosina difosfato; ATP= Adenosina trifosfato; CK= ATP:creatino-N-fosfotransferase, EC 2.7.3.2; HK= ATP:D-hexose-6-fosfotransferase, EC 2.7.1.1; NADP⁺=Nicotinamida-adenina dinucleotídio fosfato; NADPH= Nicotinamida-adenina dinucleotídio fosfato, forma reduzida.

2.2.2.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

Para se avaliar a miotoxicidade de um componente de veneno, tem-se utilizado exame histológico do tecido muscular, em associação a métodos como a determinação sérica de níveis de CK (MEBS & OWNBY, 1990).

Procedimento: O músculo EDL incubado com: Cdt, CrTX, Bjssu ou BthTX, foi fixado em Solução Bouin, após o término do experimento (120 minutos), e reservado para posterior análise histológica. O mesmo procedimento foi utilizado com as preparações provenientes de misturas veneno-AV, pré-incubados a 37°C, por 30 minutos. Solução de Tyrode e AV representaram os controles. Após fixados, os músculos foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados com xilol e embebidos em parafina, para inclusão à temperatura ambiente. Após confecção dos blocos, estes foram cortados em micrótomo e as secções (5 µm de espessura) foram montadas em lâminas. Após o procedimento de rotina, as secções foram coradas em hematoxilina-eosina (HE), para observação ao microscópio óptico. Após análise, foram fotografadas (Kodak preto e branco, 100 ASA, Plus x Pan) em fotomicroscópio Zeiss AXIOPHOT.

2.3. ESTUDOS *in vivo*:

2.3.1. IMUNIZAÇÃO DIRETA (COELHOS)

Os coelhos machos New Zealand, em condições normais de saúde, com peso variando de 2 a 2,5 Kg, recebendo ração e água *ad libitum*, foram mantidos em gaiolas individuais. A primeira sangria feita antes de qualquer tratamento representou a condição controle. A dose definida de cada veneno e toxina foi de 25% da DL50, para coelhos, via s.c., ou 2 a 3 vezes a DL50, para camundongo, via i.v. ou i.p., respectivamente (MIDDLEBROOK & KAISER, 1989).

Os animais foram imunizados contra os venenos totais (Cdt e Bjssu) e contra a toxina CrTX, por múltiplas injeções s.c. Para cada veneno ou toxina, foram utilizados dois coelhos. A primeira imunização foi com adjuvante completo de Freund. Após um intervalo de 3 semanas, injeções subseqüentes foram realizadas com adjuvante incompleto (NUJOL®), com intervalo de 1 semana entre elas. A formação de anticorpos foi acompanhada por imunodifusão dupla, pela técnica de OUCHTERLONY (1949). Após um período de 8 a 10 semanas, quando uma forte reação de Arthus (reação predominantemente mediada pela IgG) foi produzida, o animal foi ex-sanguinado via carótida. O soro foi separado, aliquotado e armazenado em freezer, a -25°C, constituindo os AV específicos AntiCdt, AntiBjssu e AntiCrTX.

2.3.2. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DOS ANTIVENENOS (AV)

Há dois tipos básicos de experimentos: aqueles em que venenos e AV são previamente incubados e aqueles em que são injetados independentemente, sem prévia incubação, tentando reproduzir as condições naturais do envenenamento (GUTIÉRREZ *et al.*, 1990).

Nos experimentos com pré-incubação, a capacidade neutralizante de AV é expressa como dose efetiva 50% (DE50), definida como a razão AV μ l/veneno mg (em termos relativos) ou AV μ l/veneno μ g (em termos absolutos), na qual o efeito do veneno é reduzido em 50%.

Procedimento: No presente estudo, avaliamos a neutralização do efeito letal. Uma dose de 2 a 7 DL50 foi selecionada, para assegurar a morte de todos os animais, que foram injetados apenas com o veneno (controle positivo). Utilizamos o primeiro tipo de experimento, ou seja, o com pré-incubação de veneno e AV. Preparamos misturas que

continham uma quantidade constante de veneno com várias diluições do AV e incubamos a 37°C, durante 30 minutos. As misturas foram injetadas em vários grupos, compostos por 4 a 6 camundongos, machos, adultos jovens, pesando entre 25 e 32 gramas. As inoculações foram realizadas através da via i.p. Os animais foram observados por um período de 48 horas (SILES VILLARROEL *et al.*, 1978,1979b).

2.4. ESTUDOS *in vitro*:

2.4.1. IMUNODIFUSÃO DUPLA (Ouchterlony)

Quando em dois pontos diferentes de uma camada de gel, posta em posição horizontal, colocam-se o antígeno e o anticorpo, um difunde-se contra o outro, formando o precipitado. Esse método foi descrito por OUCHTERLONY (1949), sendo ainda largamente empregado, pois podemos comparar, por exemplo, dois antígenos contra o mesmo sistema de anticorpos e, talvez por isso, certos autores prefiram considerá-lo como bidimensional. A velocidade de difusão vai depender do PM, isto é, do coeficiente de difusão, respectivamente do anticorpo e do antígeno. A curvatura estará dirigida sempre para o orifício em que se encontra a substância de maior PM (CALICH &VAZ, 1989).

Procedimento: Lâminas de microscopia, de 7,5 X 2,5 cm e de 1 cm de espessura, devidamente desengorduradas, foram recobertas com 4 ml de ágar 1,2% em PBS. Em posições adequadas do gel, foram feitos orifícios, utilizando-se uma seringa de 3 mm de diâmetro como perfuradora. Os fragmentos de ágar foram retirados com auxílio de uma agulha. No centro, foi colocada a solução de antígeno (1 mg/ml). Ao redor e na forma de um triângulo, o AV contendo o anticorpo. Na mesma lâmina foram testados o soro do animal sem qualquer tratamento, o que representou a condição controle, e o soro obtido após a

imunização. Em todas as reações, o volume do AV e da solução de antígeno foi padronizado em 0,02 ml.

As lâminas foram colocadas em placas de Petri, em meio umedecido por chumaço de algodão molhado em água e nele mantidas por 48 horas. Em seguida, foram lavadas por 3 dias, imersas em água destilada, renovada duas vezes ao dia. Após este período, foram envolvidas em papel de filtro umedecido em água destilada e deixadas à temperatura ambiente até secar. Posteriormente, foram coradas com corante para imunodifusão {negro de amido (0,5 g), metanol (125 ml), ácido acético glacial (25 ml), água destilada (100 ml)} e o excesso foi retirado com solução de metanol (50%)/ácido acético (10%).

O acompanhamento da produção de anticorpos era realizado até que a linha de precipitação se tornasse intensa, sinalizando, então, a interrupção do processo de imunização e posterior sacrifício do animal.

2.4.2. ELISA

Anticorpos ou antígenos podem ser acoplados à enzima, de maneira que, ao ser adicionado o substrato da enzima à reação, gera-se um produto colorido, que poderá ser medido por espectrofotometria usando-se uma leitora de placas multipoços.

A reação é desenvolvida em placas de plástico contendo séries de pocinhos, onde são depositados os reagentes. Antígenos ou anticorpos, dependendo do objetivo do método, são adsorvidos à placa. Há vários métodos para se processar o ensaio enzimático, entre os quais, o competitivo, o indireto e o sanduíche (CALICH & VAZ, 1989).

Procedimento: Curvas dos AV comerciais (SACC e SABC) e específicos (AntiCdt, AntiBjssu e AntiCrTX) foram obtidas usando ELISA (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.* 1993), método indireto, compreendendo as seguintes etapas: sensibilização da placa "overnight", a

4°C com a adição de 100 µl, em cada poço, de solução de antígeno apropriado, diluído em "coating buffer". Em seguida, a placa foi lavada 2 vezes, com a solução de lavagem. Posteriormente, adicionou-se 100 µl da solução de bloqueio e aguardou-se por 1 hora, antes de nova lavagem, por duas vezes. Adicionou-se 100 µl do soro diluído em tampão de incubação (1:1000), em cada poço, e aguardou-se por 1 hora, antes de se lavar a placa, por 5 vezes.

Etapas seguintes envolveram a adição de 100 µl, em cada poço, do segundo anticorpo (IgG antiovelho, para os AV específicos ou IgG anticavalo, para os AV comerciais), conjugado com peroxidase e diluído em tampão de incubação (1:30.000 e 1:2000, para IgG antiovelho e anticavalo, respectivamente). O tempo de incubação foi de 1 hora, à temperatura ambiente. Procedeu-se à lavagem da placa por 5 vezes, com solução de lavagem. Adicionou-se 100 µl da solução substrato, em cada poço, e a placa foi mantida no escuro, por 15 a 20 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 20 µl de H₂SO₄ (diluído 1:20), em cada poço, e a leitura efetuada em leitora de placas multipoços, em comprimento de onda de 492 nm.

Soluções utilizadas:

"Coating Buffer" (pH= 9,6): 1,59 g Na₂CO₃; 2,93 g NaHCO₃; água destilada q.s.p. 1 litro. Solução mantida em geladeira.

Solução de lavagem: 9 g NaCl; 0,5 ml Tween 20; água destilada q.s.p. 1 litro. Solução mantida em geladeira.

Solução de bloqueio: caseína 2% em PBS. Solução guardada no congelador.

Tampão de incubação: caseína 0,25%; Tween 20 0,05% diluído em PBS. Solução guardada no congelador.

Solução substrato: substrato (OPD) 20 mg; H_2O_2 12 μ l; tampão citrato 100 ml. Preparado no momento do uso.

Tampão citrato (pH=5,0): 7,10 g Na_2HPO_4 ou 13,4 g $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$; 5,19 g de ácido cítrico; água destilada q.s.p. 1 litro. Mantido em geladeira.

2.4.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Utilizamos um método simples baseado em uma curva padrão de proteínas ("linear log-log"), proposto por PETERSON (1977).

Procedimento:

As amostras (SACC, SABC, AntiCdt, AntiBjssu e AntiCrTX) foram diluídas 1:100 em água destilada e, desta diluição, foram tomadas alíquotas de 20 μ l e novamente diluídas em 480 μ l de água destilada. Foram adicionados 500 μ l da solução de trabalho A. Os tubos foram agitados em vórtex e deixados em repouso, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Foram adicionados 250 μ l da solução de trabalho B, agitando em vórtex e aguardando-se 40 minutos à temperatura ambiente, para a leitura das absorbâncias, em espectrofotômetro, a 700 nm, contra água destilada. Um branco de reativos foi utilizado substituindo-se a amostra por água destilada e recebendo o mesmo tratamento. O conteúdo de proteínas (mg/ml) foi quantificado pela extrapolação da curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), processada paralelamente às amostras biológicas, em função das leituras de absorbâncias obtidas.

Soluções usadas:

Reativo I:

Sulfato cúprico pentahidratado	0,2g
Tartarato duplo de sódio e potássio	0,4g
Bicarbonato de sódio	20,0g
Água destilada q.s.p.	100 ml

1) Dissolver o bicarbonato de sódio em 50ml de água destilada.

2) Dissolver o tartarato duplo de sódio e potássio nos 50ml de água destilada restantes e adicionar o sulfato cúprico pentahidratado, sob agitação.

3) Misturar a solução 1 com a solução 2, agitando.

Reativo II: Solução SDS ("sodium dodecyl sulfate") 10%

Reativo III: Hidróxido de Sódio 0,8N

Reativo IV: Reagente para fenol de Folin Ciocalteau 2N

Padrão: BSA 1 mg/ml

Soluções de trabalho:

A: reativo I: reativo III: água destilada: reativo II (1:1:1:1)

B: reativo IV: água destilada (1:2). Preparada no momento do uso.

Curva padrão de BSA: a solução-mãe (1mg/ml) foi diluída em água destilada até atingir as seguintes concentrações finais: 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

3. RESULTADOS

3.1. ESTUDO MIOGRÁFICO DOS VENENOS E TOXINAS

(Bloqueio neuromuscular)

3.1.1 - PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA (NFD)

3.1.1.1. *Crotalus durissus terrificus* (Cdt):

Foram ensaiadas as doses ($\mu\text{g/ml}$) de: 2,5; 5; 10 e 20, conforme Figura 1A. Os resultados mostraram que o efeito pré-sináptico - decorrente da facilitação da liberação de ACh e observado pelo aumento de amplitude da contração muscular - é dose-dependente, enquanto que, para o efeito pós-sináptico, observado pelo progressivo bloqueio, não se observou discriminação. A partir da curva dose-efeito obtida, elegeu-se a dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ para os ensaios posteriores de neutralização. O tempo necessário para se obter um bloqueio de 50% (10 $\mu\text{g/ml}$) foi de 103 ± 9 min. A Figura 2A mostra o registro da resposta contrátil, com facilitação intensa, seguida de bloqueio da transmissão neuromuscular, não se observando, na dose de 10 $\mu\text{g/ml}$, contratura.

3.1.1.2. Crotoxina (CrTX):

Os ensaios foram realizados nas doses ($\mu\text{g/ml}$) de: 5, 10 e 20, conforme mostrado na Figura 1B. A dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ foi escolhida por intermediar duas respostas distintas: a de 5 $\mu\text{g/ml}$, que foi ineficaz em provocar bloqueio significativo, e a de 20 $\mu\text{g/ml}$, que apresentou bloqueio e discreta facilitação da transmissão neuromuscular. O tempo para um bloqueio de 50%, para a dose escolhida, foi de 75 ± 9 min. O registro da resposta contrátil é mostrado na Figura 2B, evidenciando o efeito bloqueador e uma discreta facilitação, na dose de 10 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.1.3. *Bothrops jararacussu* (Bjssu):

Doses de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ foram testadas e a escolha da dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ foi baseada no rápido bloqueio provocado pelas outras duas doses, conforme ilustrado na Figura 1C. O tempo para um bloqueio de 50%, para a dose escolhida, foi de 70 ± 11 min. Nesta dose, observou-se apenas o bloqueio neuromuscular, conforme ilustrado na Figura 2C.

3.1.1.4. Bothropstoxina (BthTX):

Foram ensaiadas doses de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ e esta última foi escolhida para posteriores ensaios. Observou-se contratura seguida de bloqueio da junção neuromuscular, sendo que em 1 experimento de 3 realizados, foi observado uma discreta facilitação (Figura 1D). A Figura 2D representa um registro típico dos efeitos mais representativos da BthTX na preparação, ou seja, contratura seguida por bloqueio. O tempo para um bloqueio de 50% foi de 31 ± 6 min.

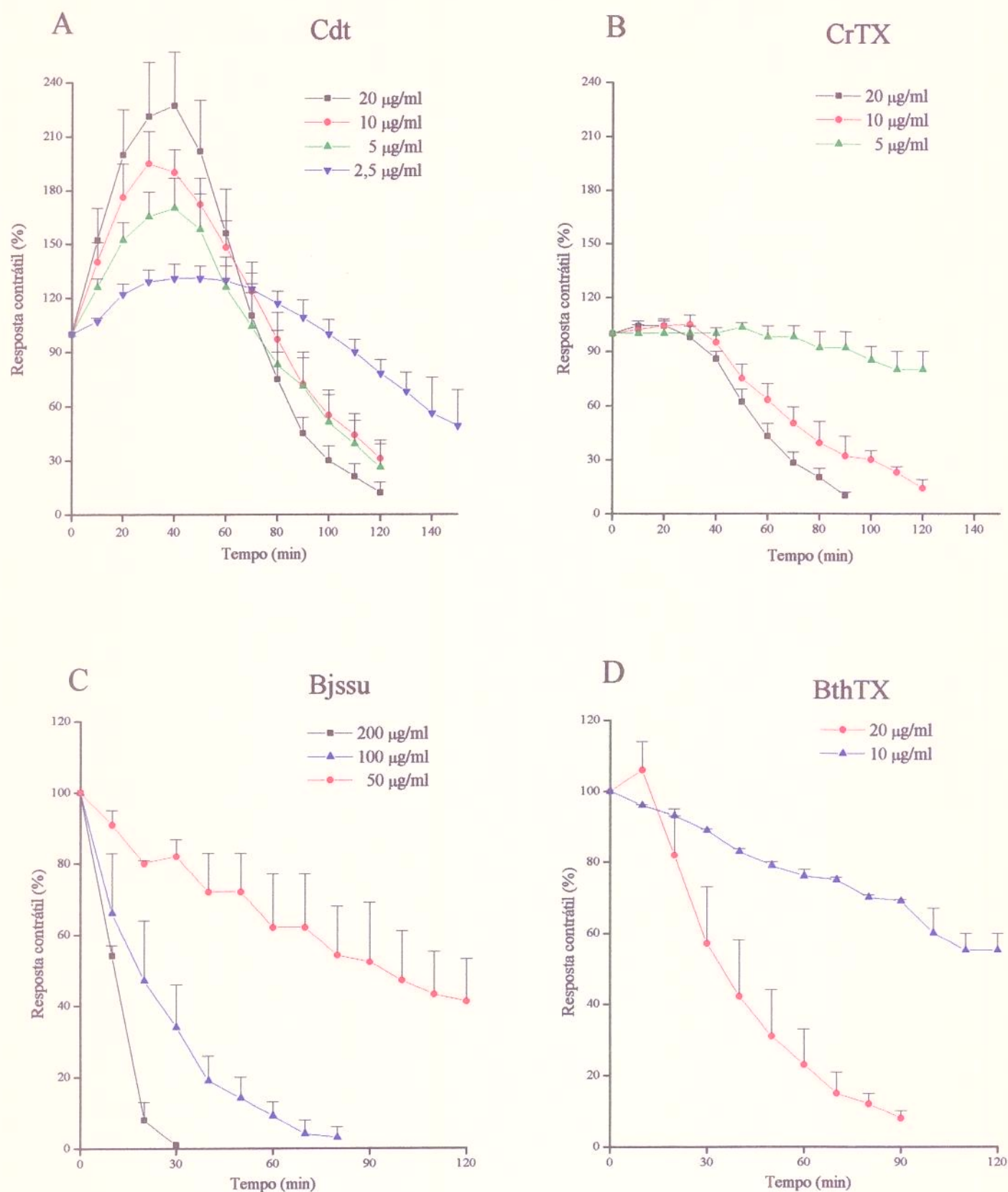


Fig. 1 - Bloqueio da Resposta Contrátil em Preparação NFD (Estímulo indireto). O tempo de bloqueio neuromuscular é dose-dependente. Cada ponto corresponde à média $\pm$ erro padrão de 3 a 6 experimentos.

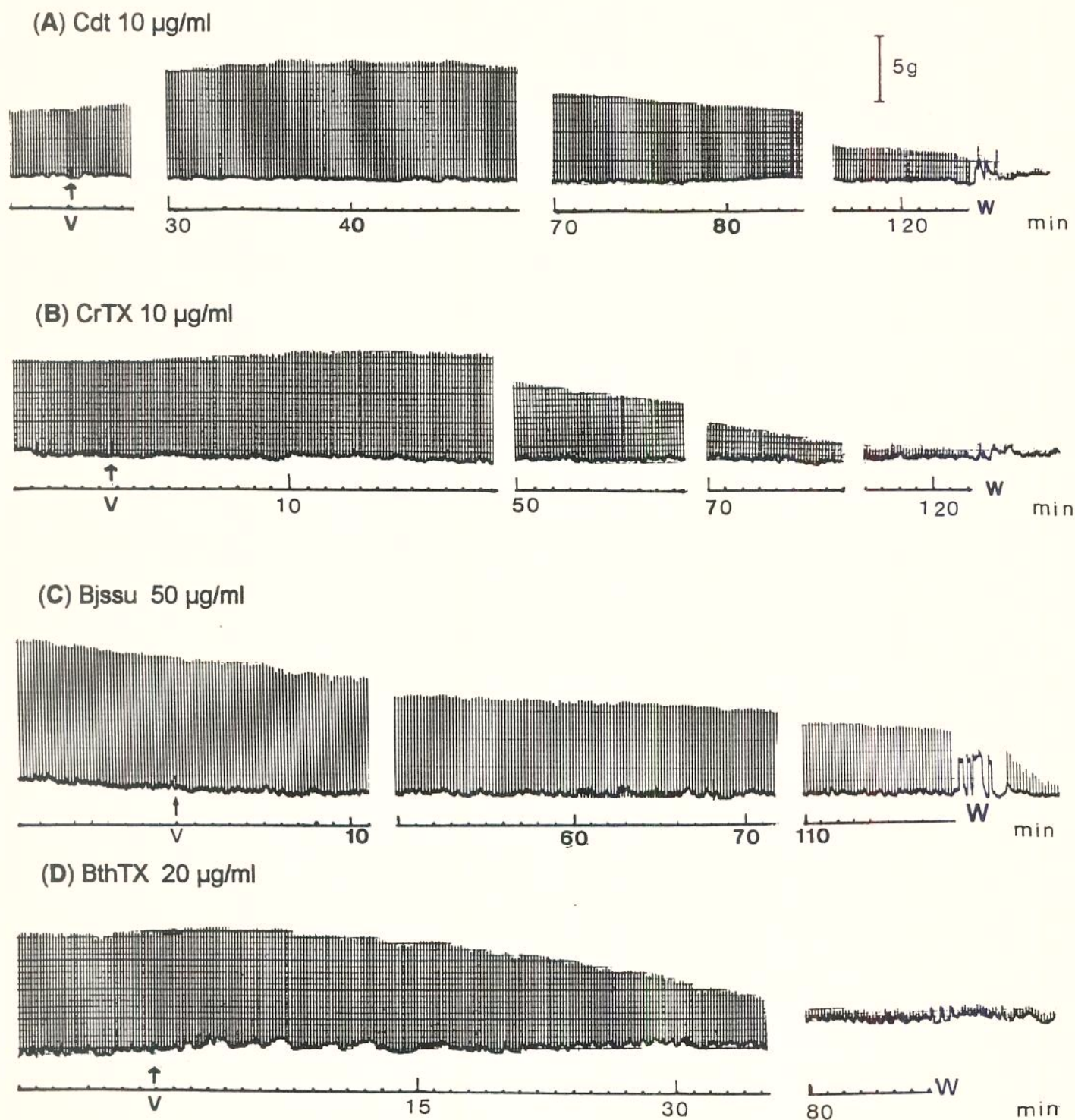


Fig. 2 - Registros da Força de Contração Muscular em Preparação NFD (Estímulo indireto). A, B, C e D ilustram o perfil miográfico do efeito dos Vb e toxinas, nas doses escolhidas para os ensaios de neutralização. V: veneno ou toxina; W: lavagem.

3.1.2. PREPARAÇÃO *extensor digitorum longus* (EDL)

A preparação EDL, como referido em Materiais e Métodos, foi eleita para os estudos da atividade miotóxica. Porém, foi necessário conhecer o perfil miográfico do efeito dos Vb e toxinas, pois o EDL, sob o ponto de vista enzimático e histoquímico, é um músculo constituído por fibras de contração predominantemente rápida e com elevada capacidade glicolítica (TAKEKURA, KASUGA, YOSHIOKA, 1994). O músculo diafragma é constituído por fibras de contração predominantemente lenta (as de contração rápida transformam-se em lentas, com a idade, conforme relatado por JECKEL-NETO *et al.*, 1996) e com maior capacidade oxidativa. As doses para os ensaios em EDL foram as mesmas usadas na preparação NFD.

3.1.2.1. *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) - 10 µg/ml:

Na referida dose, o tempo para um bloqueio de 50% foi de 59 ± 6 min, mostrando uma maior sensibilidade deste músculo, quando comparado à preparação NFD. O efeito facilitador, observado pelo aumento de amplitude da contração muscular, é discreto e a contratura foi observada em apenas 6 experimentos, de 14 realizados. O registro da resposta contrátil, assim como o bloqueio neuromuscular, podem ser observados nas Figuras 3A e 3B.

3.1.2.2. Crotoxina (CrTX) - 10 µg/ml:

Diferentemente do resultado acima, o tempo para um bloqueio de 50%, para a CrTX, foi de 110 ± 7 min, conforme ilustrado na Figura 3A. O registro da resposta contrátil está representado na Figura 3C.

3.1.2.3. *Bothrops jararacussu* (Bjssu) - 50 µg/ml:

As Figuras 3A e 3D mostram o bloqueio da resposta contrátil. A contratura foi observada em 5 de 16 experimentos realizados. O tempo para um bloqueio de 50% foi de 58 ± 8 min, revelando uma maior sensibilidade desta preparação ante o veneno, quando comparado à preparação NFD.

3.1.2.4. Bothropstoxina (BthTX) - 20 µg/ml:

As Figuras 3A e 3E ilustram o perfil da BthTX nesta preparação. Não houve diferença significativa no tempo para um bloqueio de 50% (30 ± 3 min), quando comparado à preparação NFD.

Os resultados obtidos, em tempo, para um bloqueio neuromuscular de 50%, nas duas preparações, estão resumidos na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Diferenças no Tempo de Bloqueio Neuromuscular entre as Preparações

Veneno ou Toxina	Tempo para um Bloqueio de 50% (min)	
	Preparação NFD	Preparação EDL
Cdt 10 µg/ml	103 ± 9 (n=6)	59 ± 6 (n=14)
CrTX 10 µg/ml	75 ± 9 (n=3)	110 ± 7 (n=5)
Bjssu 50 µg/ml	70 ± 11 (n=5)	58 ± 8 (n=16)
BthTX 20 µg/ml	31 ± 6 (n=3)	30 ± 3 (n=5)

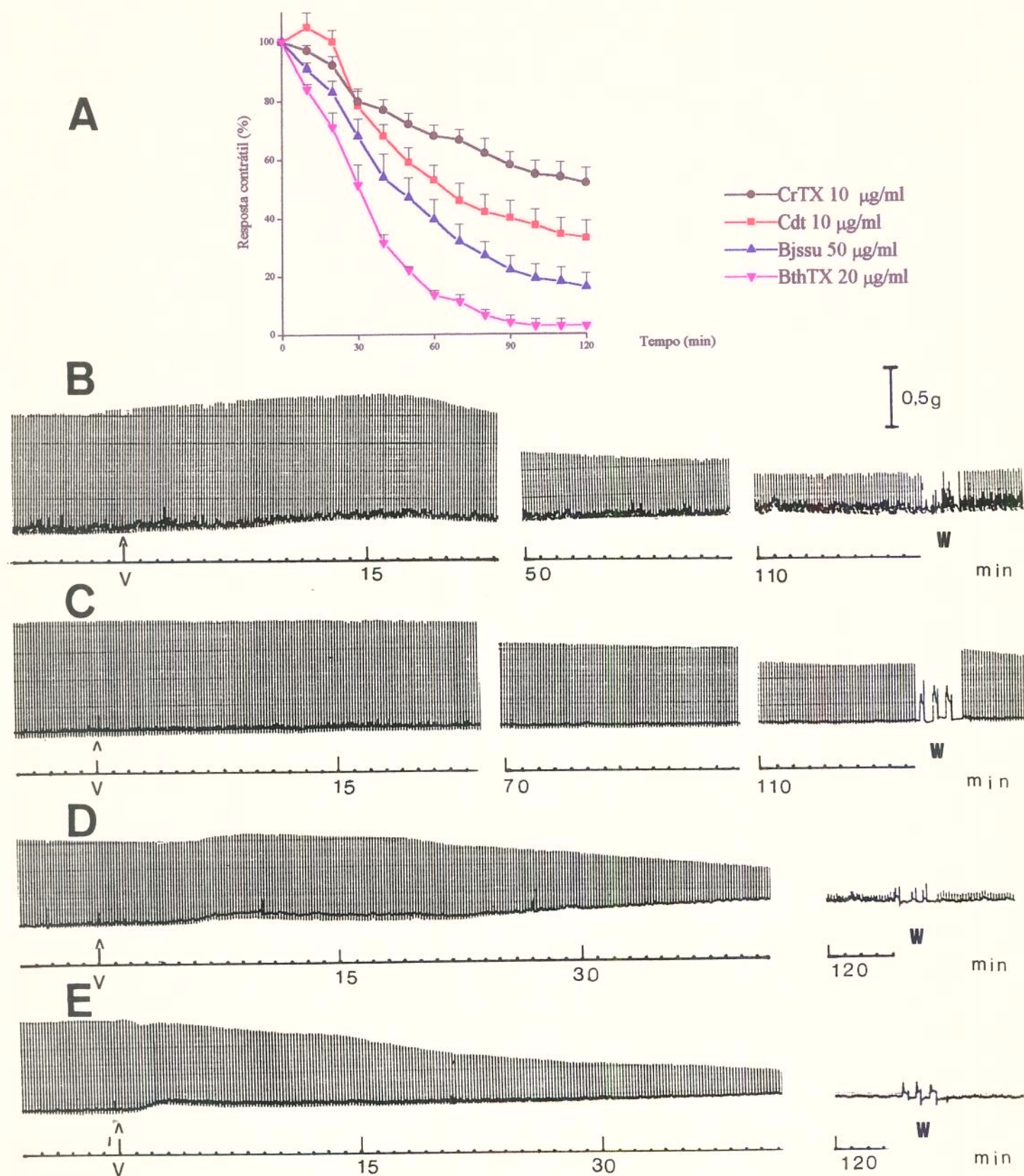


Fig. 3 - Preparação EDL (Estímulo indireto). A representa o bloqueio neuromuscular dos Vb e toxinas. B, C, D e E ilustram os registros miográficos dos efeitos de Cdt, CrTX, Bjssu e BthTX, respectivamente (nas doses de A). V: veneno ou toxina; W: lavagem.

3.2. ENSAIOS REALIZADOS COM OS ANTIVENENOS (AV)

3.2.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O Quadro 3 ilustra a quantidade de proteína total presente em cada AV.

Quadro 3. Dosagem de Proteínas
(PETERSON, 1977)

AV (1:100)	Proteínas (mg/ml)
SACC	51
SABC	61
AntiCdt	80
AntiCrTX	86
AntiBjssu	69

3.2.2. ELISA

O acompanhamento do processo de imunização (produção de anticorpos) foi feito através da intensidade da reação de dupla difusão em ágar (técnica de Ouchterlony), enquanto o método de ELISA foi utilizado apenas para verificar a reatividade dos AV produzidos por imunização direta em coelhos, com os seus respectivos antígenos.

Os resultados comprovam a antigenicidade dos venenos Cdt e Bjssu e da CrTX, uma vez que estes foram capazes de produzir anticorpos (imunogenicidade) e, também, de reagir com os mesmos (antigenicidade).

Observou-se uma maior sensibilidade para os AV AntiCdt e AntiCrTX, diante dos antígenos Cdt (Figura 4A) e CrTX (Figura 4B), quando comparados com o SACC, sugerindo que os antígenos contêm algo que os AV específicos reconhecem melhor.

Resposta semelhante de sensibilidade foi obtida com o AntiBjssu, diante do antígeno BthTX (Figura 4D). A Figura 4C representa os AV SABC e AntiBjssu, perante o antígeno Bjssu, não havendo diferenças, entre eles, quanto à sensibilidade.

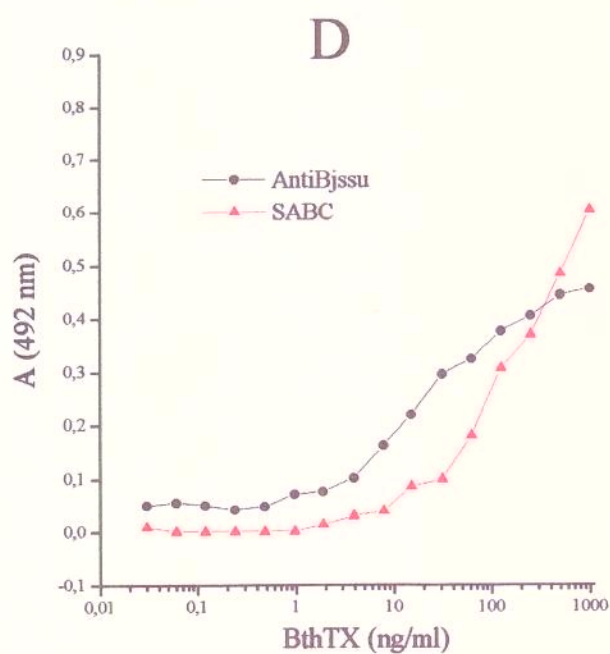
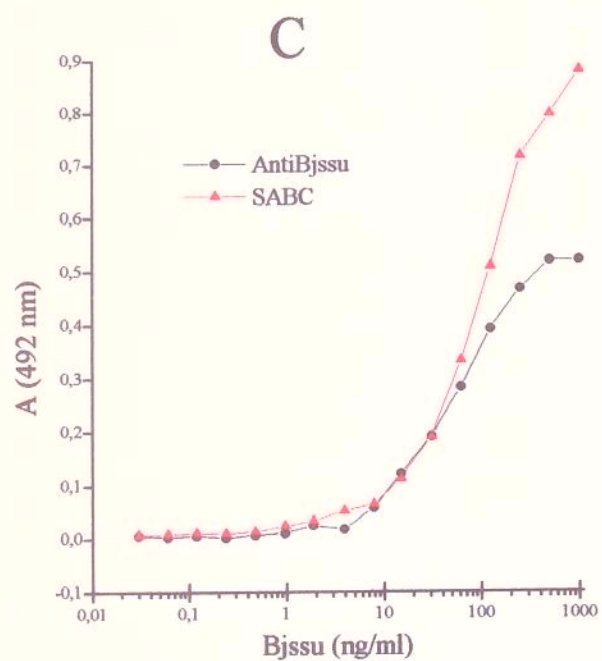
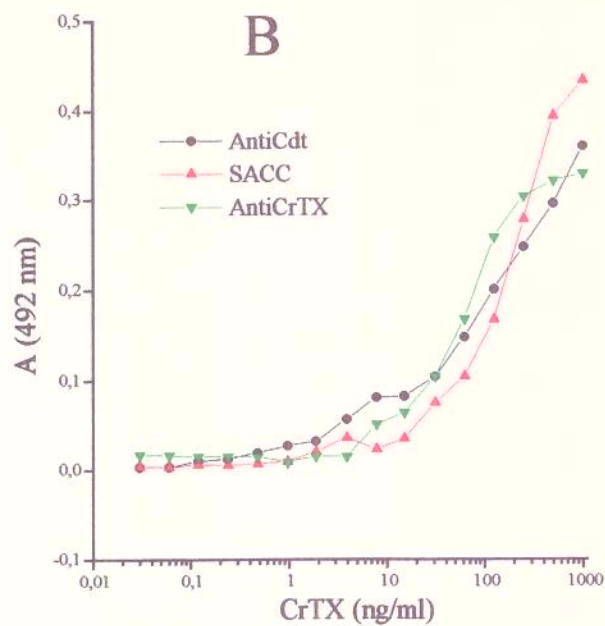
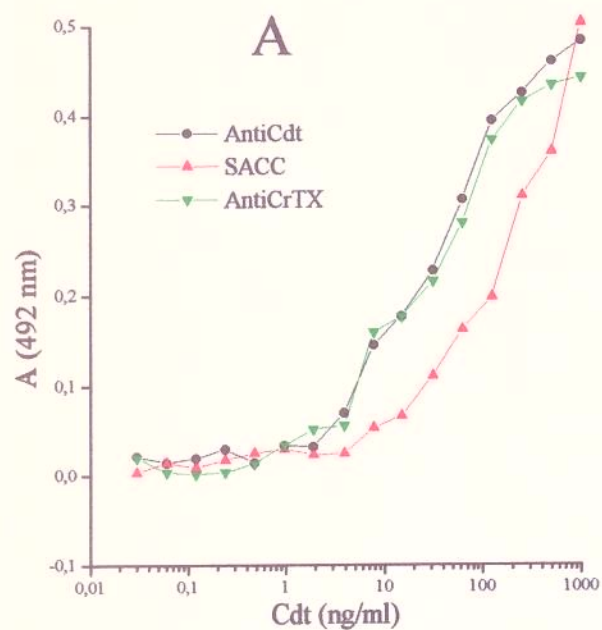


Fig. 4 - ELISA realizado com os AV produzidos em coelhos (AntiCdt, AntiCrTX e AntiBjssu) e comparados com os comerciais (SACC e SABC). Antígenos utilizados: A (Cdt), B (CrTX), C (Bjssu) e D (BthTX). Todos os AV foram diluídos 1:1000.

3.2.3. POTÊNCIA DOS ANTIVENENOS (AV)

Os AV comerciais, produzidos por imunização em eqüinos, são submetidos ao teste de potência em camundongos, tomando-se amostra do “pool” de plasma, antes da purificação, e também do soro dialisado concentrado correspondente. Uma quantidade fixa de veneno (5DL50) é misturada a diluições variadas de soro ou plasma, para proceder à soroneutralização, e, então, inoculada em camundongos. Cada tipo de soro traz a informação de sua potência. Assim, 1ml de SACC neutraliza 1,5 mg de Cdt e 1ml de SABC neutraliza 5 mg de Vb de *B. jararaca*. O Quadro 4, abaixo, mostra os resultados obtidos das potências dos AV específicos em camundongos, fixando-se a dose de veneno e utilizando-se diluições variadas de AV. Em paralelo, os AV comerciais, SACC e SABC, foram submetidos ao mesmo protocolo (dados não mostrados), servindo como referência.

Quadro 4 . Potência dos Antivenenos Específicos

Vb ou toxina	X DL ₅₀	X AV	Sobrevida (48 h)	Potência AV DE50= µl AV/µg Vb	Observações
Controle AntiCdt	6 6,3 µg/0,5 ml 6,3 µg/0,5 ml	3 - 18,9 µl	0 5	3:1	n=5, P=27,5g DL ₅₀ =0,038 mg/kg (pintainho, ip) (ZAMUNÉR, PRADO-FRANCESCHI, RODRIGUES-SIMIONI, 1995)
Controle AntiCrTX	7 18 µg/0,5 ml 18 µg/0,5 ml	12 - 216 µl	0 4	12:1	n=4, P=31,5g DL ₅₀ =80 µg/kg (cam., ev) (Vital-Brazil, 1982)
Controle AntiBjssu	2 259 µg/0,5 ml 259 µg/0,5 ml	0,8 - 207,2 µl	0 4	0,8:1	n=4, P=25g DL ₅₀ =5,18 mg/kg (cam., ip) (SILES VILLARROEL <i>et al.</i> , 1978,1979a)

DE50 = dose efetiva 50%

3.3. NEUTRALIZAÇÃO DO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR

3.3.1. PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA (NFD)

3.3.1.1. *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) - 10 µg/ml

A Figura 5 ilustra os ensaios realizados com misturas pré-incubadas de veneno e AV (cujas doses utilizadas foram expressas em proporção, ou seja, veneno:AV), por 30 min, a 37°C e aerados com carbogênio. Os tempos *t*, a seguir mencionados, representam minutos.

Como resultado desse procedimento, observou-se o efeito protetor do SACC, em diferentes doses (Figura 5A). Na proporção 1:0,5 obteve-se proteção contra o efeito bloqueador neuromuscular ($P < 0,05$ em t_{90-120}). A proteção contra o efeito facilitador (aumento na amplitude da contração muscular) é vista na proporção 1:3 ($P < 0,05$ em t_{10-60}). A proporção 1:1 pode ser considerada a melhor, pois protegeu contra ambos os efeitos, conforme análise estatística: $P < 0,05$ em t_{20-50} e $t_{100-120}$.

Na Figura 5B, a proteção contra o efeito bloqueador neuromuscular ocorre a partir da proporção 1:3, guardando estreita coerência com a potência encontrada para o AntiCdt, *in vivo* ($P < 0,05$, t_{20-50} e t_{90-120}). A proporção 1:10 teve $P < 0,05$ nos tempos t_{20-50} e $t_{110-120}$. A proporção 1:1 não foi estatisticamente significativa.

Em 5C, demonstramos que o AntiCrTX é tão eficiente quanto o SACC e AntiCdt na proteção contra o bloqueio neuromuscular, a partir da proporção 1:3 ($P < 0,05$, t_{30-40} e $t_{100-120}$). Na proporção 1:1 não se observou proteção contra o bloqueio neuromuscular.

3.3.1.2. Crotoxina (CrTX) - 10 µg/ml

A Figura 6 representa o efeito da pré-incubação da CrTX, com diferentes doses de AV. Em 6A, observa-se o efeito protetor do SACC na proporção 1:3 (veneno:AV). No entanto, usando-se a proporção 1:4, observou-se aumento da facilitação pré-sináptica. Ambas as doses foram significantes ($P < 0,05$ em t_{70-120}), quando comparadas com o controle.

Em 6B, foi utilizado o AntiCdt, cuja melhor resposta no impedimento do bloqueio foi obtida na proporção 1:10 ($P < 0,05$ em t_{60-120}). Na proporção 1:4, parâmetros significativos ($P < 0,05$) foram obtidos nos tempos t_{70-120} .

Em 6C, o resultado foi semelhante: o melhor efeito neutralizante foi obtido na proporção 1:10 ($P < 0,05$, t_{50-120}), revelando a necessidade de maior quantidade de proteínas que os demais AV (SACC e AntiCdt). Os AV usados nas proporções 1:1 e 1:3 não se mostraram significantes.

3.3.1.3. *Bothrops jararacussu* (Bjssu) - 50 µg/ml

A informação do fabricante para a potência do SABC é de que 1 ml neutraliza 5 mg de veneno. A Figura 7A mostra o efeito protetor do SABC nas proporções, veneno:AV, 1:1 e 1:3 ($P < 0,05$ nos tempos t_{10-120} , para ambas as proporções). Na segunda proporção, foi registrada uma importante facilitação. Tal efeito, observado quando elevadas doses de soro comercial são utilizadas, foi pesquisado utilizando-se o seguinte protocolo: pré-incubação veneno+AV e aquecimento da mistura a 95°C, por 5 minutos, para desnaturação total. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi adicionado à preparação. A Figura 8 ilustra o efeito da facilitação inicial.

A Figura 7B ilustra Bjssu diante do AV AntiBjssu, nas proporções 1:1 e 1:3. A primeira não se mostrou eficiente, nem estatisticamente significativa para proteger contra o bloqueio *in vitro*, muito embora tenha sido eficaz em proteger contra o efeito letal *in vivo*. A segunda proporção teve $P < 0,01$ nos tempos t_{30-120} .

3.3.1.4. Bothropstoxina (BThTX) - 20 µg/ml

A Figura 7C representa a capacidade protetora do SABC ante a BthTX. Apesar de estarem ilustradas apenas as proporções veneno:AV de 1:1 e 1:10, várias outras foram ensaiadas (1:3; 1:4) e nenhuma delas foi eficaz na neutralização do bloqueio neuromuscular. A proporção 1:1, embora não tenha protegido contra o bloqueio, preservou a preparação contra a contratura. Na relação 1:10 houve proteção contra ambos, bloqueio e contratura ($P < 0,01$ nos tempos t_{10-120}), porém esta proporção levou à facilitação da resposta contrátil, provavelmente por interferência de alguma substância não-protéica, presente no soro comercial.

A Figura 7D ilustra a BthTX perante a ação do AntiBjssu. Não se observa facilitação com o AV produzido por imunização em coelhos, provavelmente por este não conter conservantes, nem ter recebido qualquer tratamento de purificação. Ambas as doses foram eficazes em proteger contra o bloqueio e a contratura ($P < 0,05$ nos tempos t_{40-120}).

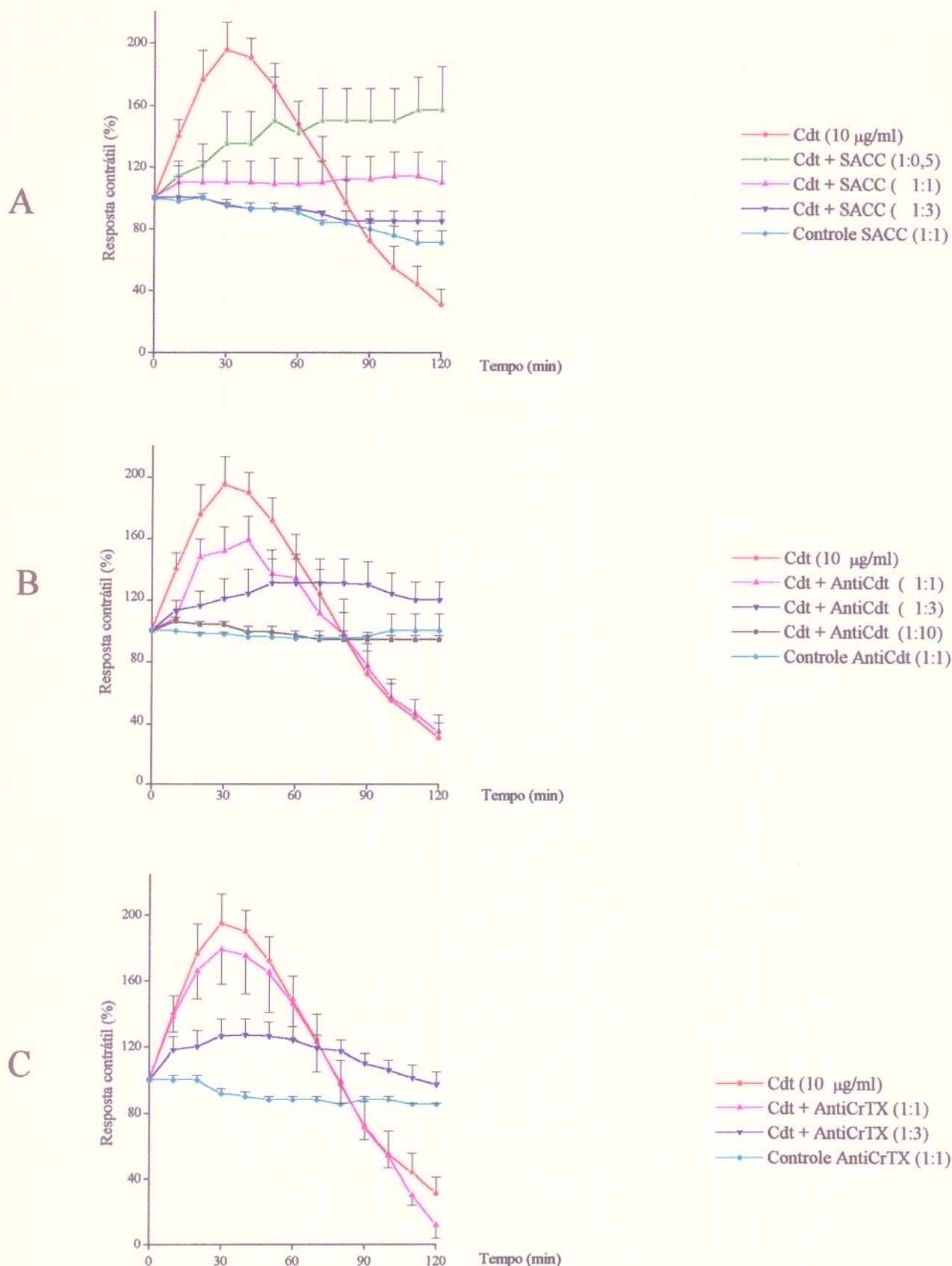


Fig. 5 - Neutralização do Bloqueio Neuromuscular em Preparação NFD (Estímulo indireto). Ensaio com Cdt e diferentes doses de AV: A, comercial; B, AntiCdt e C, AntiCrTX. A neutralização é dose-dependente. Cada ponto corresponde à média $\pm$ erro padrão de 3 a 6 experimentos.

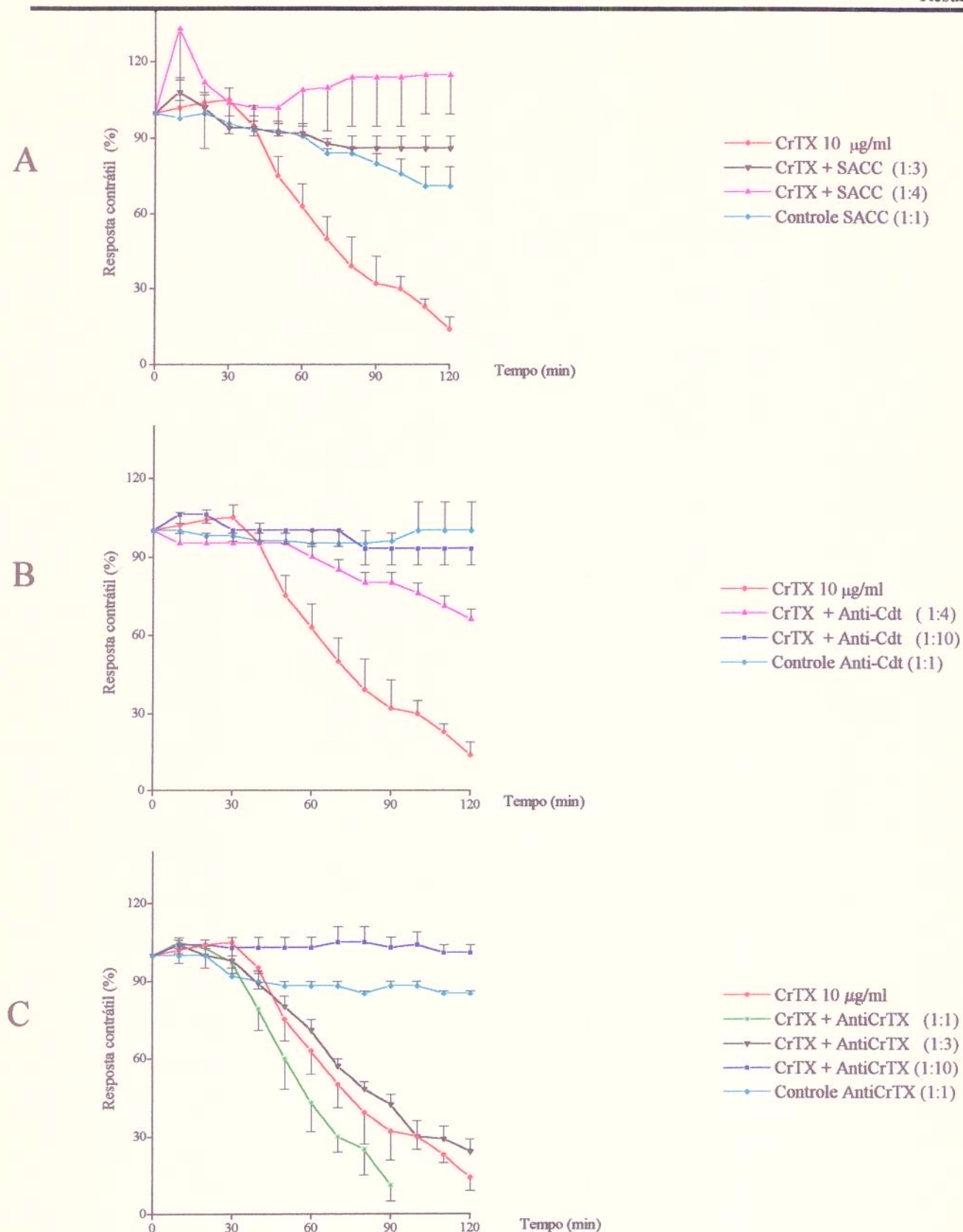


Fig. 6 - Neutralização do Bloqueio Neuromuscular em Preparação NFD (Estímulo indireto). Ensaio com CrTX e diferentes doses de AV: A, comercial; B, AntiCdt e C, AntiCrTX. A neutralização é dose-dependente. Cada ponto corresponde à média $\pm$ erro padrão de 3 a 5 experimentos.

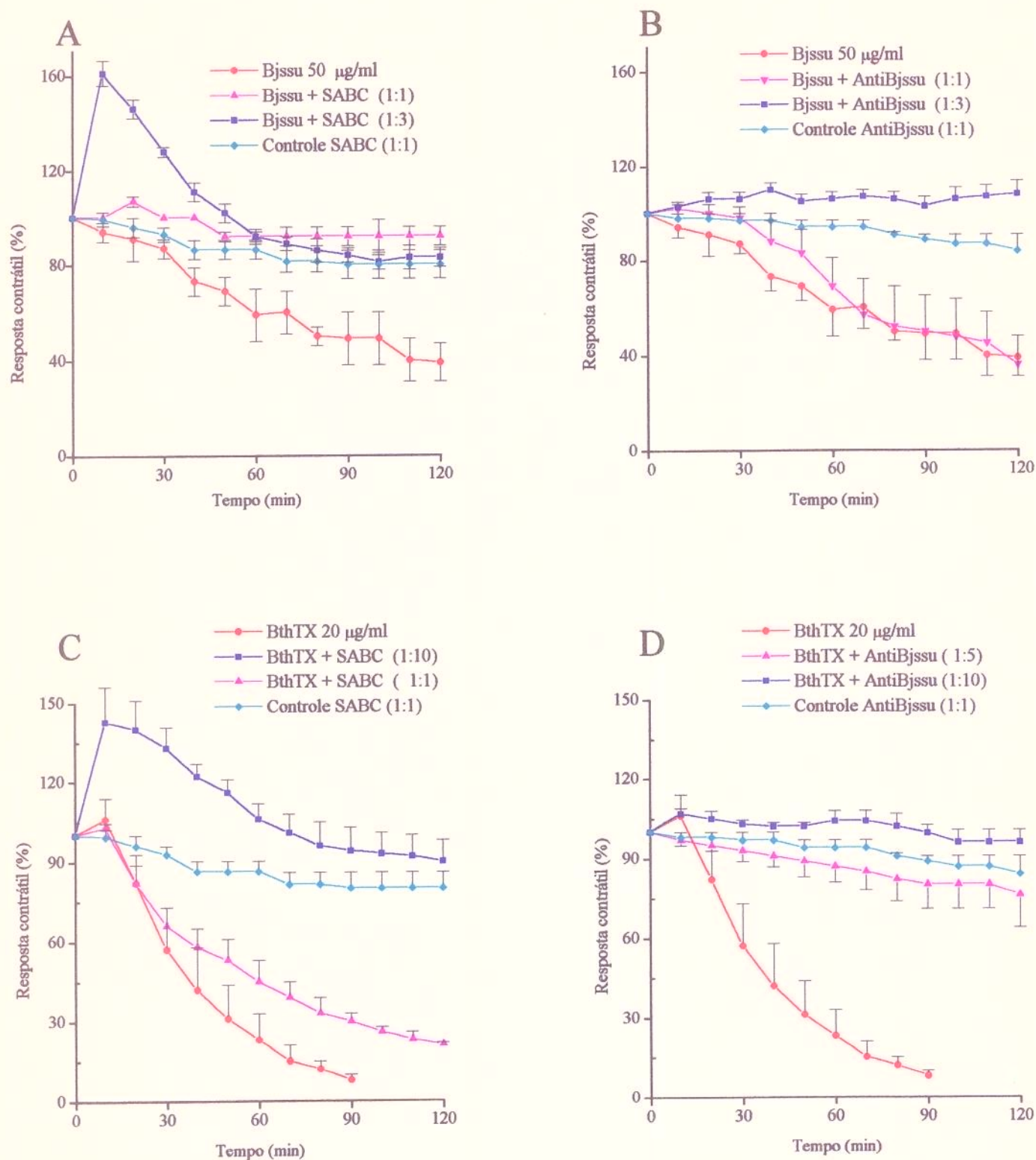


Fig. 7 - Neutralização do Bloqueio Neuromuscular em Preparação NFD (Estímulo indireto). A e B correspondem à Bjssu ante a diferentes doses de AV: SABC e AntiBjssu, respectivamente. BthTX, diante do SABC, está representado em C e, perante o AntiBjssu, em D. Nota-se facilitação com doses excessivas de SABC em A e C, o mesmo não ocorrendo com AntiBjssu, em B e D. Cada ponto indica a média $\pm$ erro padrão de 3 a 5 experimentos.

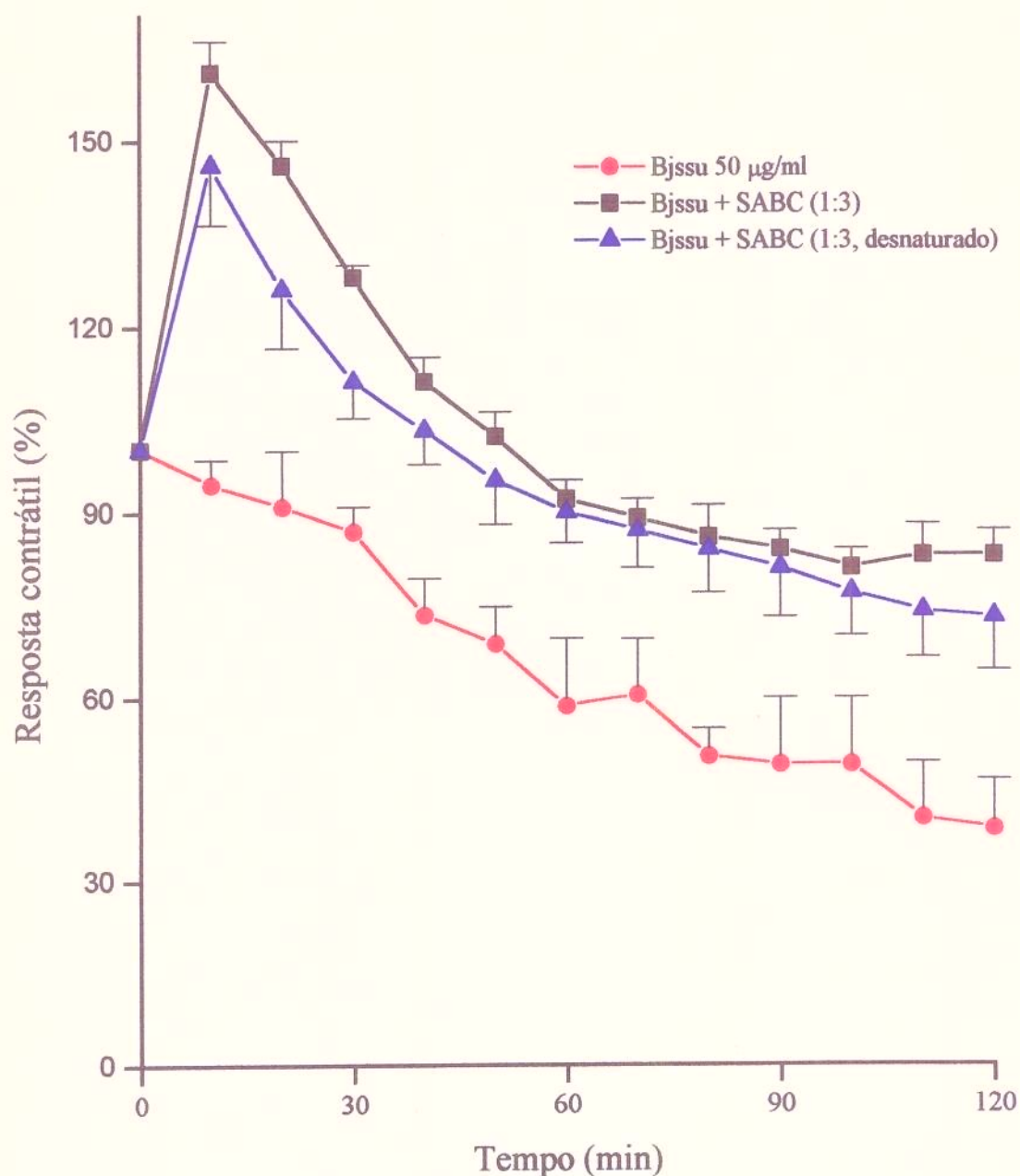


Fig. 8 - Efeito facilitador de AV comercial. O gráfico ilustra o efeito do SABC em mistura com Bjssu (sem e com desnaturação de proteínas). Nota-se que a facilitação inicial é preservada e ocorre a partir da utilização de determinada dose de AV, sugerindo a presença de substância termo-estável no AV comercial. Cada ponto representa a média $\pm$ o erro padrão de 3 a 5 experimentos.

VITAL BRAZIL (1903) já havia relatado sobre a eficiência do soro anticrotálico em proteger contra o envenenamento causado por Bjssu. Através da neutralização *in vitro*, utilizando os AV SACC, AntiCdt e AntiCrTX, perante Bjssu e BthTX, observamos os resultados ilustrados nos gráficos abaixo:

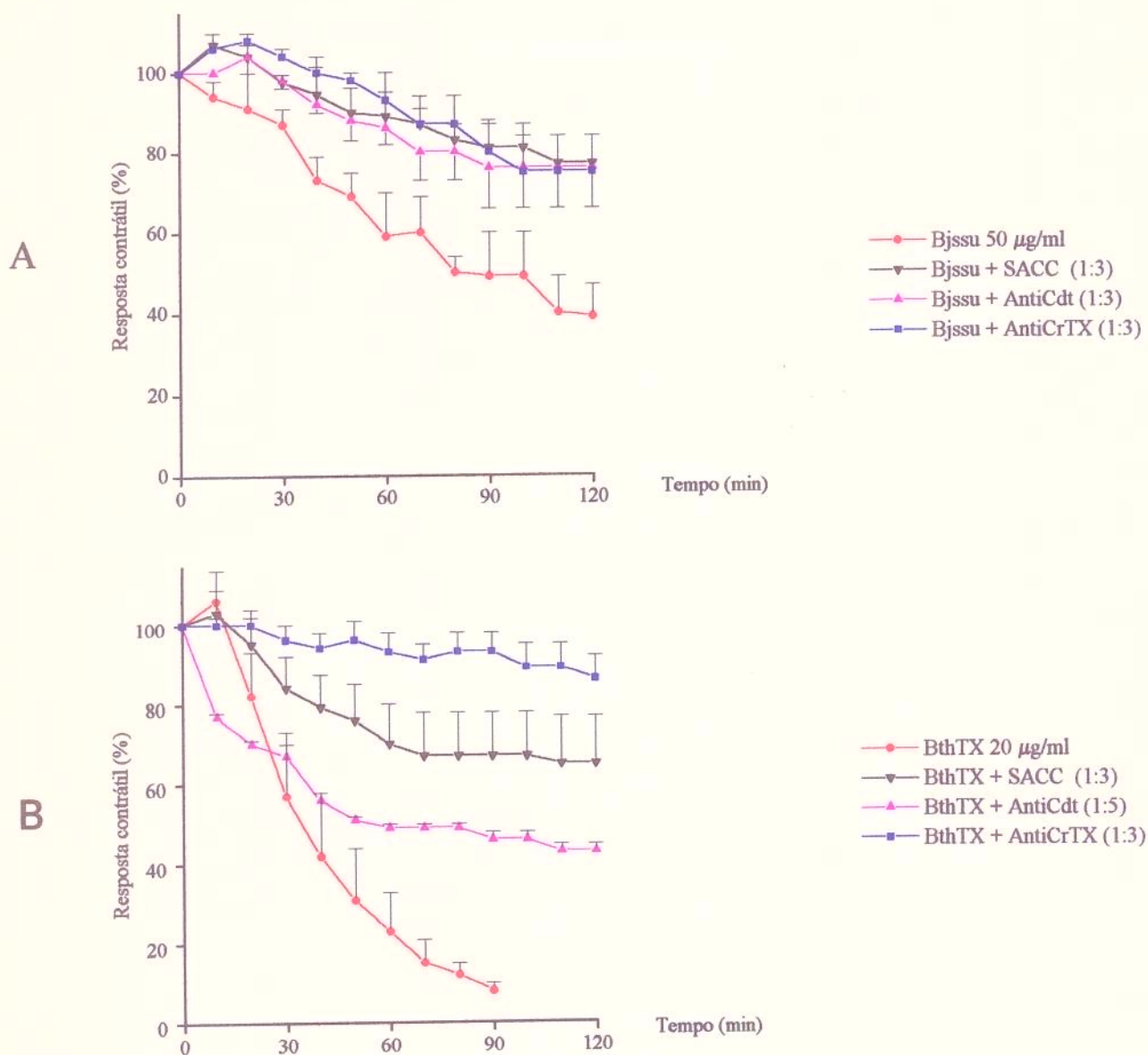


Fig. 9 - Neutralização cruzada de Bjssu e BthTX em preparação NFD. Os 3 AV comportaram-se de forma semelhante diante do Vb (A). Com a BthTX (B), no entanto, o AntiCrTX foi superior em proteger contra o bloqueio neuromuscular ($P < 0,05$, $t_{30, 50-120}$), quando comparado com SACC ($P < 0,05$, t_{60-120}) e AntiCdt ($P < 0,05$, t_{10}). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 3 experimentos.

3.3.2. PREPARAÇÃO *extensor digitorum longus* (EDL)

A Figura 10 ilustra a capacidade neutralizante dos AV sobre o bloqueio neuromuscular induzido pelos Vb e toxinas. A análise estatística *t*-Student foi utilizada na avaliação dos resultados.

Em A, estão representados os controles: preparações sob estimulação elétrica, por 120 min, em Tyrode e após a adição dos AV SACC, SABC, AntiBjssu, AntiCdt e AntiCrTX, mostrando que, sozinhos, não interferem na resposta neuromuscular.

Em B, está representada a resposta do Cdt ante os AV. O AntiCdt, na proporção veneno:AV, na qual protegeu *in vivo* (1:3), não impediu o bloqueio neuromuscular. A proteção contra este bloqueio foi obtido somente usando-se SACC ($P < 0,05$, $t_{100-120}$) e AntiCrTX ($P < 0,05$, t_{30-120}). Não houve diferença significativa entre ambos, quando comparados entre si, porém, o efeito neutralizante dos AV foi mais intenso com AntiCrTX.

A CrTX ensaiada com os AV está representada na Figura 10C. O SACC, na proporção utilizada, não protegeu contra o efeito bloqueador após 120 minutos de observação. Apesar do AntiCdt ter sido eficaz ($P < 0,05$, t_{10-30}), o AntiCrTX foi o único capaz de proteger contra o bloqueio neuromuscular ($P < 0,01$ nos tempos t_{30-120}).

Os AV SABC e AntiBjssu foram comparados diante dos efeitos causados pela Bjssu (Figura 10D). Estatisticamente, o SABC não foi significante em nenhum ponto da curva. Houve diferença significativa com o AntiBjssu, comprovando a eficiência deste em proteger contra o bloqueio neuromuscular. Quando comparados entre si, SABC e AntiBjssu foram significativamente diferentes.

Em 10E, representamos as respostas obtidas a partir do tratamento da BthTX com os AV. Ambos os tratamentos (SABC e AntiBjssu) mostraram-se diferentes em relação à toxina, porém, não-significativamente diferentes entre si.

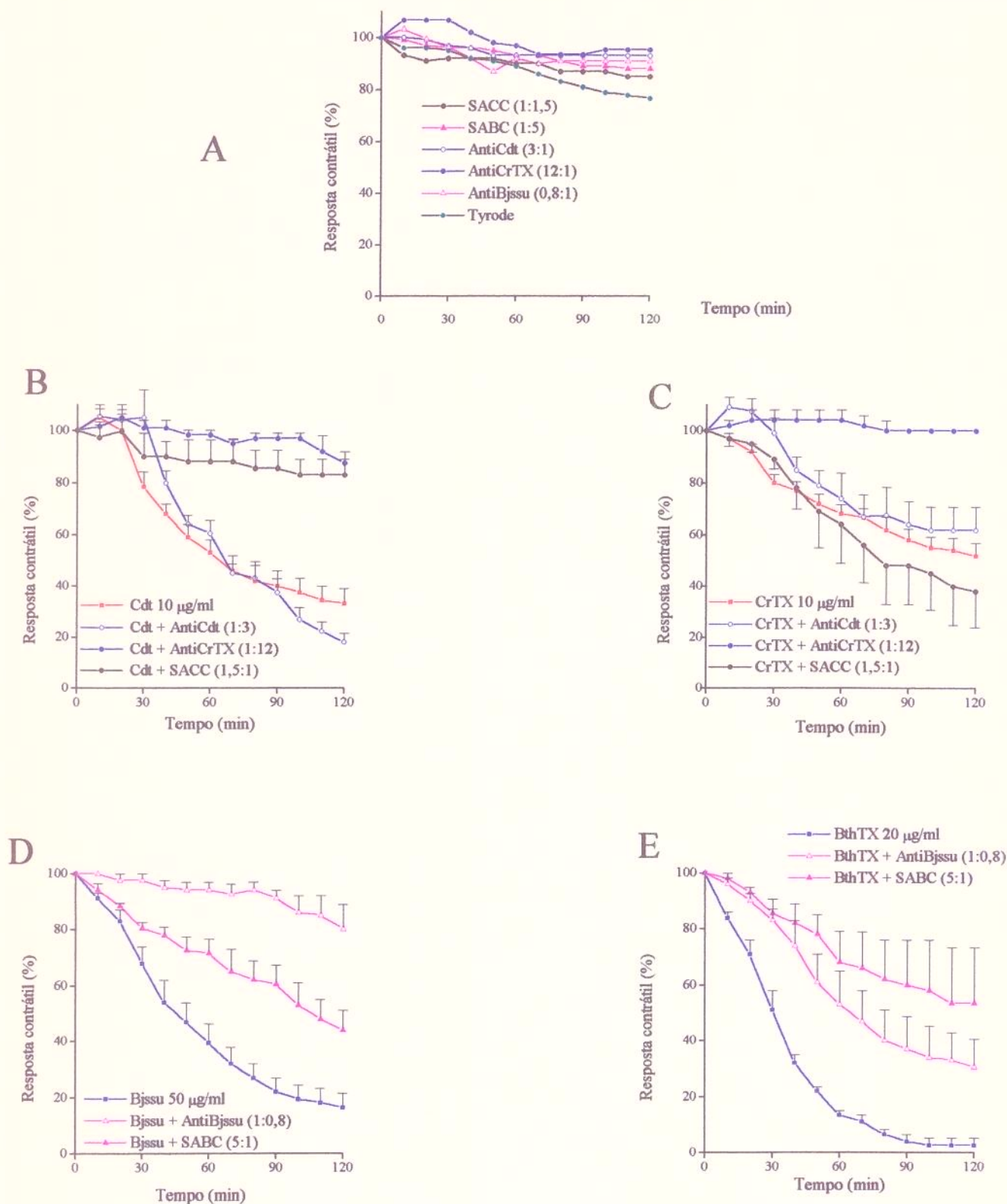


Fig. 10 - Neutralização do Bloqueio Neuromuscular em Preparação EDL (Estímulo indireto). A representa a condição controle, como descrito em Métodos. Os demais gráficos representam a neutralização induzida pelos AV ante os Vb (B e D) e toxinas (C e E). A dose dos AV foi definida em relação a sua potência contra o efeito letal em camundongos (*in vivo*). Cada ponto indica a média $\pm$ erro padrão de 3 a 6 experimentos.

A neutralização de BthTX com AntiCrTX mostrou-se muito eficiente, quando testada na preparação NFD. A BthTX, ainda, apresentou tempo para um bloqueio de 50% muito semelhante em ambas as preparações (Tabela 2). Desta forma, interessou-nos investigar esta mesma neutralização (BthTX com AntiCrTX), na preparação EDL. Os resultados obtidos estão ilustrados no gráfico abaixo:

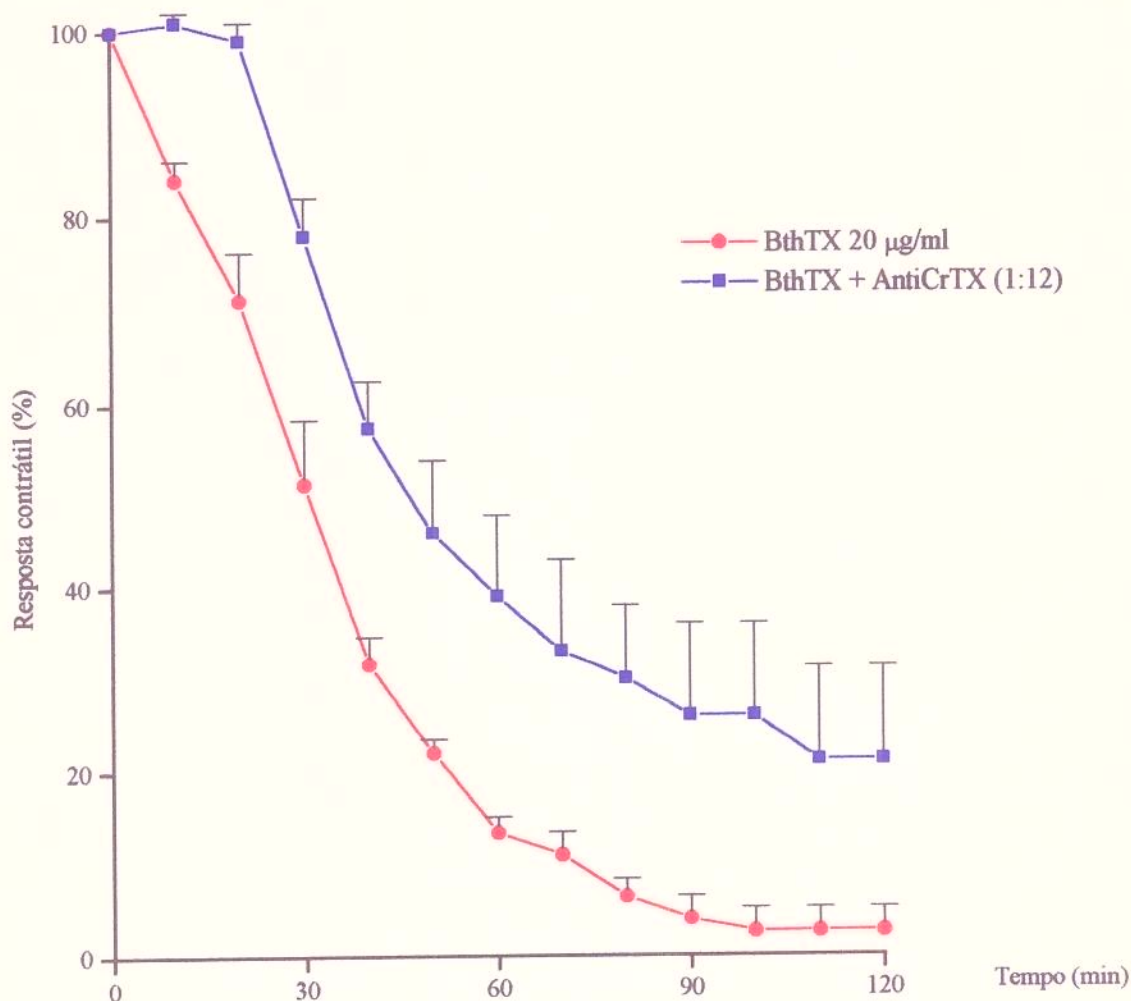


Fig. 11 - Neutralização de BthTX com AntiCrTX em preparação EDL. A figura mostra que esta preparação comporta-se de modo oposto em relação à preparação NFD. Cada ponto indica a média $\pm$ erro padrão de 3 experimentos.

3.4. MIOTOXICIDADE

(PREPARAÇÃO *extensor digitorum longus* - EDL)



3.4.1. LIBERAÇÃO ENZIMÁTICA DE CREATINOQUINASE (CK)

A Figura 12 representa a capacidade liberadora de CK, dos Vb, toxinas e controles (Tyrode, SACC, SABC, AntiCdt, AntiCrTX e AntiBjssu).

Em 12A está ilustrado o perfil liberador de CK dos Vb e toxinas. Nota-se a discreta liberação de CK provocada pelo veneno de Cdt (10 µg/ml), não-significante em relação ao controle Tyrode. A CrTX (10 µg/ml), liberou uma quantidade maior, que é significante em relação ao Tyrode. A cinética de liberação, para Bjssu e BthTX (50 e 20 µg/ml, respectivamente), diferencia-se no tempo e na quantidade: Bjssu mostra uma liberação mais lenta até os 30 minutos, atingindo concentrações máximas em 60 minutos e diminuindo seus níveis aos 120 minutos. BthTX, ao contrário, tem uma liberação quase imediata, observada aos 15 minutos, para, depois, liberar CK gradativamente, ao longo dos 120 minutos de observação.

A Figura 12B mostra a quantidade de CK liberada aos 120 minutos pelos venenos e toxinas, que foram significativamente diferentes em relação ao Tyrode ($P < 0,01$), com exceção do Cdt. Nossos resultados demonstram que a capacidade liberadora de CK de Bjssu e BthTX é marcadamente superior à Cdt e CrTX.

A Figura 12C registra a liberação de CK, aos 120 minutos, dos controles dos AV. A proporção contida na legenda da figura, refere-se à potência dos AV. Assim, 1 ml de SACC neutraliza 1,5 mg de veneno (1:1,5); 1 ml de SABC neutraliza 5 mg de veneno (1:5); 0,8 ml de AntiBjssu neutraliza 1 mg de Bjssu (0,8:1); 12 ml de AntiCrTX neutraliza 1 mg de CrTX (12:1) e, 3 ml de AntiCdt neutraliza 1 mg de Cdt (3:1). Em relação ao Tyrode, apenas o SABC e AntiCdt não foram significativamente diferentes; o SACC teve valor $P < 0,01$; AntiBjssu, $P < 0,01$ e, o AntiCrTX, $P < 0,05$.

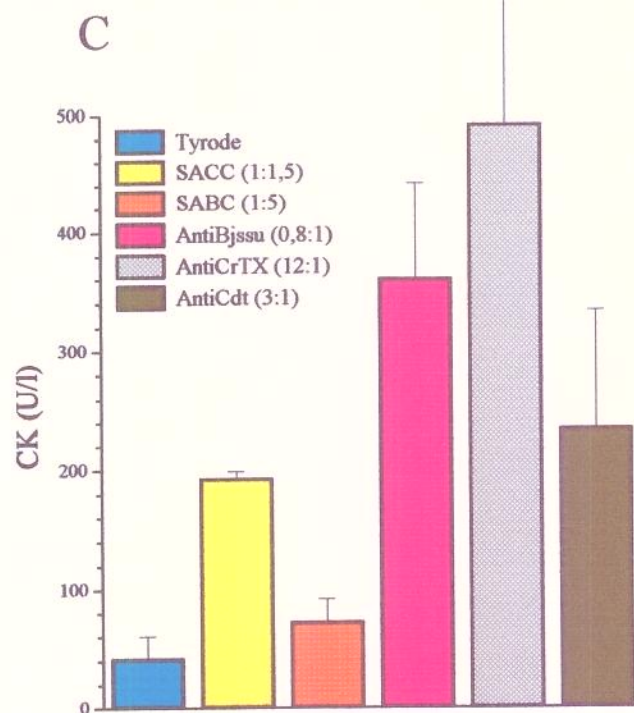
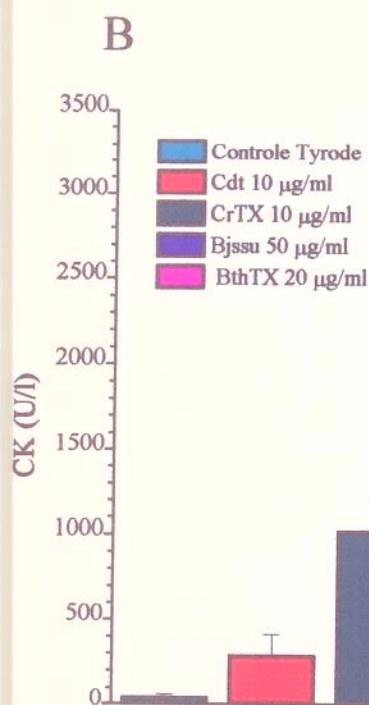
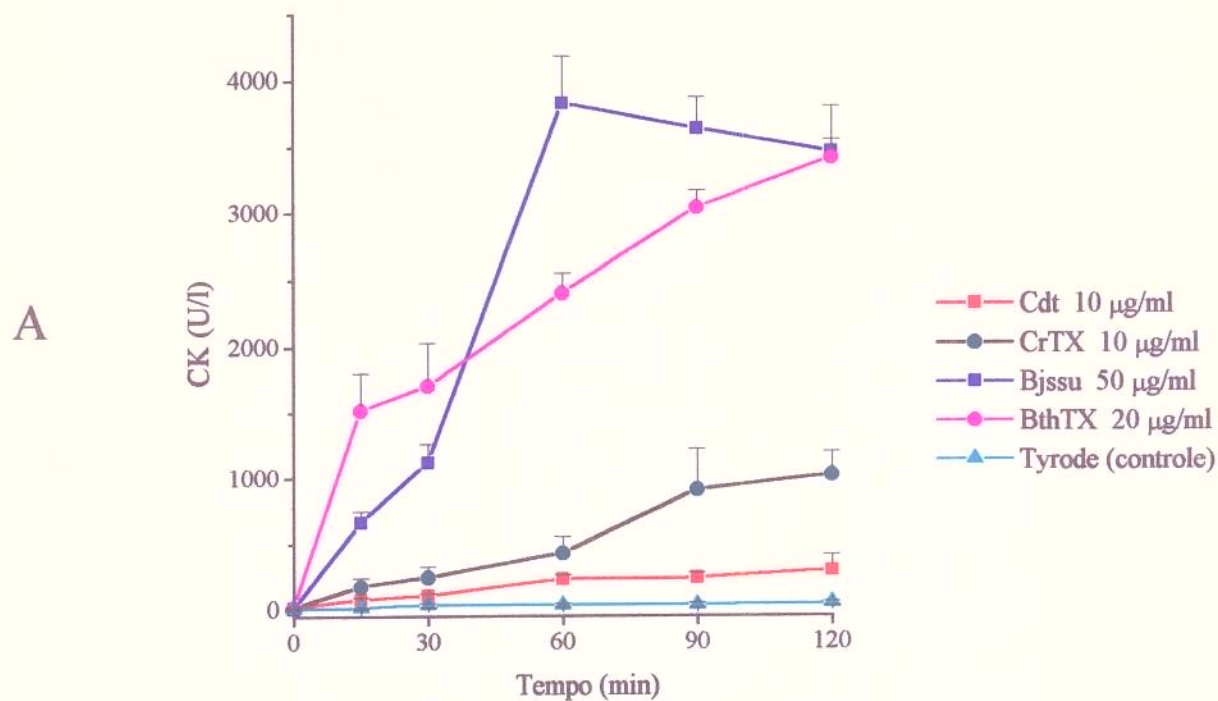


Fig. 12 - DETERMINAÇÃO DE CK EM PREPARAÇÃO EDL. O painel A ilustra o perfil de liberação de CK dos venenos e toxinas; B representa a liberação de CK dos Vb e toxinas, aos 120 minutos de exposição; C ilustra os controles (Tyrode e AV), após 120 min. Cada ponto indica a média $\pm$ erro padrão de 4 a 7 experimentos.

3.4.2. NEUTRALIZAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CREATINOQUINASE (CK)

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do teste *t*-Student e comparados aos Vb ou toxinas.

SACC, AntiCdt e AntiCrTX foram não-significantes para Cdt, que, por sua vez, foi não-significante em relação ao Tyrode. Este resultado pode ser considerado um controle 'negativo' para os demais. (Figura 13A)

SACC, AntiCdt e AntiCrTX foram significantes ($P < 0,05$) para CrTX, que também foi significativa em relação ao Tyrode. (Figura 13B)

SABC e AntiBjssu foram eficientes em neutralizar a liberação de CK ($P < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os dois AV. (Figura 13C)

SABC e AntiBjssu neutralizaram a liberação de CK ($P < 0,01$), sendo o SABC mais efetivo nesta proteção (significativamente diferente do AntiBjssu, $P < 0,01$). (Figura 13D)

Podemos interpretar, a partir destes dados, que o Cdt praticamente não libera CK e, portanto, os AV têm papel irrelevante nesta neutralização. Com a CrTX, no entanto, que apresenta uma liberação de CK importante, todos os AV foram eficientes em impedir esta liberação, de modo semelhante.

Quando os AV SABC e AntiBjssu são pré-incubados com Bjssu e BthTX, o efeito liberador de CK é neutralizado quase que completamente.

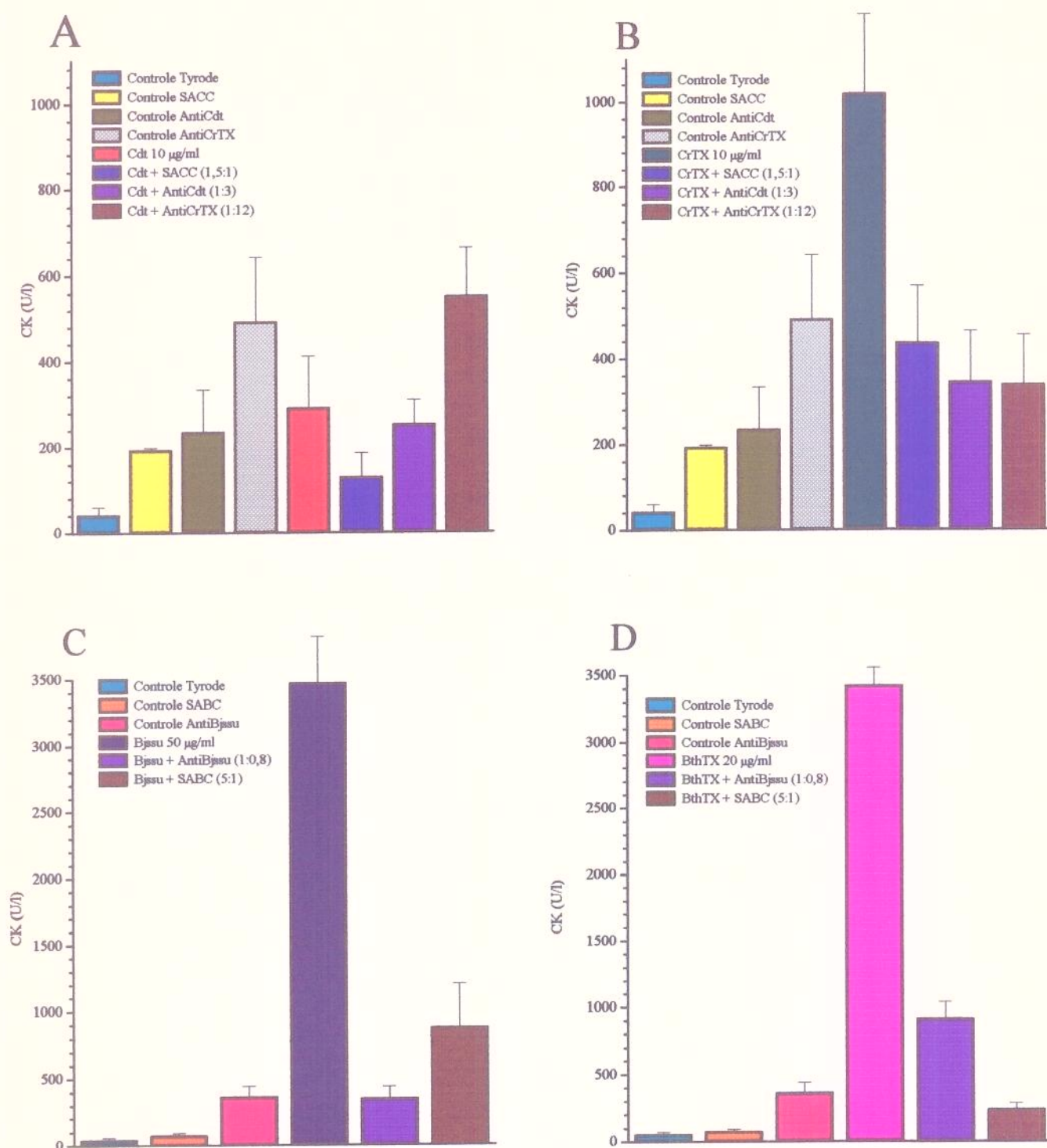


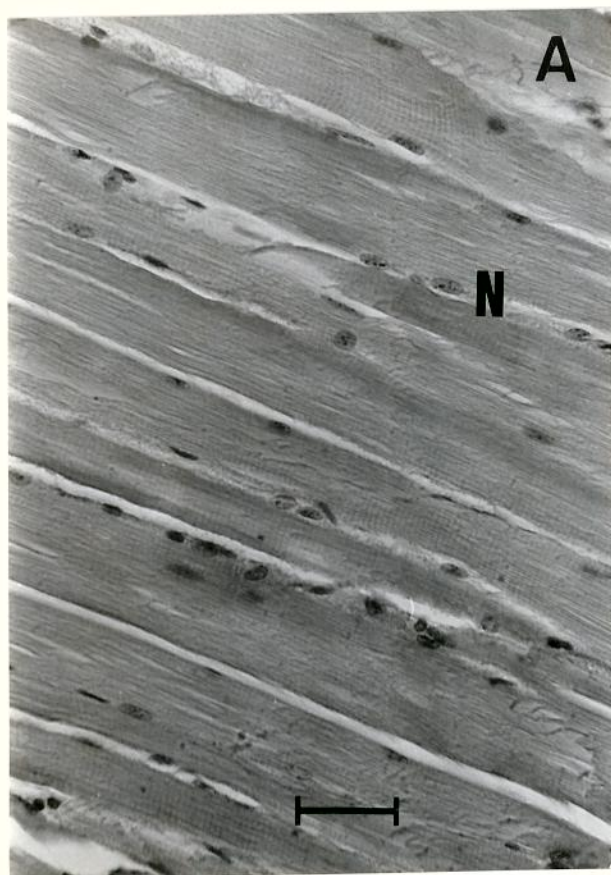
Fig. 13 - NEUTRALIZAÇÃO DE CK - 120 min (Preparação EDL). A e C representam os Vb Cdt e Bjsu, respectivamente, diante dos AV. B e D correspondem às toxinas CrTX e BthTX, respectivamente, na mesma situação. As misturas foram previamente incubadas a 37°C, por 30 minutos.

3.4.3. ASPECTOS MORFOLÓGICOS E NEUTRALIZAÇÃO

3.4.3.1. Preparação incubada com solução de Tyrode (controle)

(Figura 14)

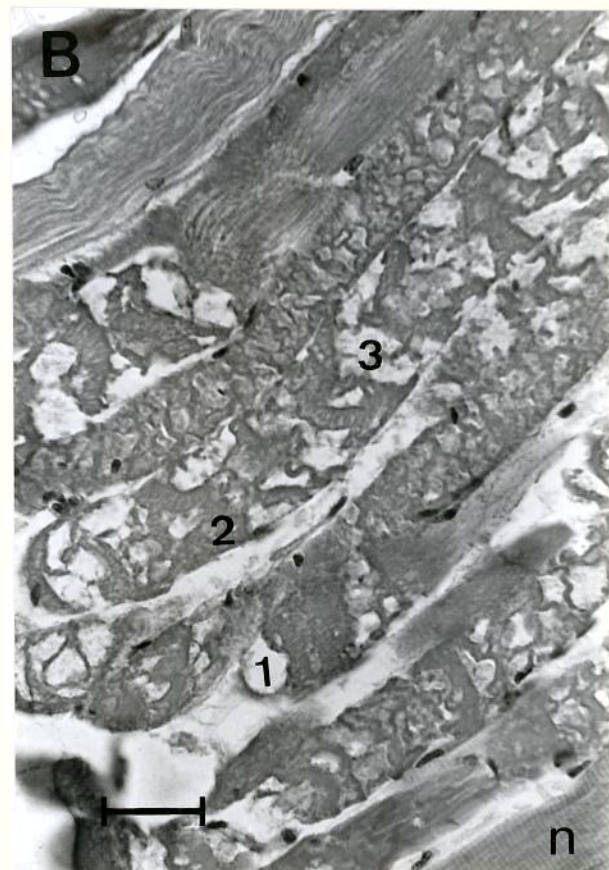
A preparação EDL normal (sem nenhum tratamento) foi examinada em tempos diferentes: no tempo zero, ou seja, logo que retirada do animal, e no tempo 120 min, apenas em solução de Tyrode e submetida a estímulos elétricos indiretos. A Figura 14A mostra um corte longitudinal da preparação EDL, no tempo zero: observam-se as fibras musculares organizadamente dispostas, núcleos (N) periféricos localizados abaixo do sarcolema e estriações transversais. A Figura 14B ilustra, em corte longitudinal, a preparação EDL, aos 120 min: nota-se que as fibras estão com aparência diferente, apresentando ondulações, efeito provável da estimulação elétrica recebida ao longo dos 120 minutos. A (HE, barra=30 μ m) e B (HE, barra=10 μ m).



3.4.3.2. Dano muscular causado por Cdt

(Figura 15)

O veneno total de Cdt, na dose de 10 $\mu\text{g/ml}$, induziu mionecrose na preparação EDL, examinada após 120 min de incubação com o veneno. Nas figuras A e B foram observadas características de mionecrose, tais como alterações do tipo lesões delta (1) sobre a membrana celular e regiões de hipercontração (2) e condensação das miofibrilas, alternando-se com espaços vazios no sarcoplasma (3). Regiões de lise com desorganização do material intracelular foram mais freqüentes próximo ao tendão (t), como na Figura 15A. Em 15B, mostramos miofibrilas condensadas, em diferentes estágios de agregação, dando uma aparência de mosaico às fibras musculares. Notam-se fibras com aparência normal (n) ao lado da área lesada. A (HE, barra=10 μm) e B (HE, barra=30 μm).

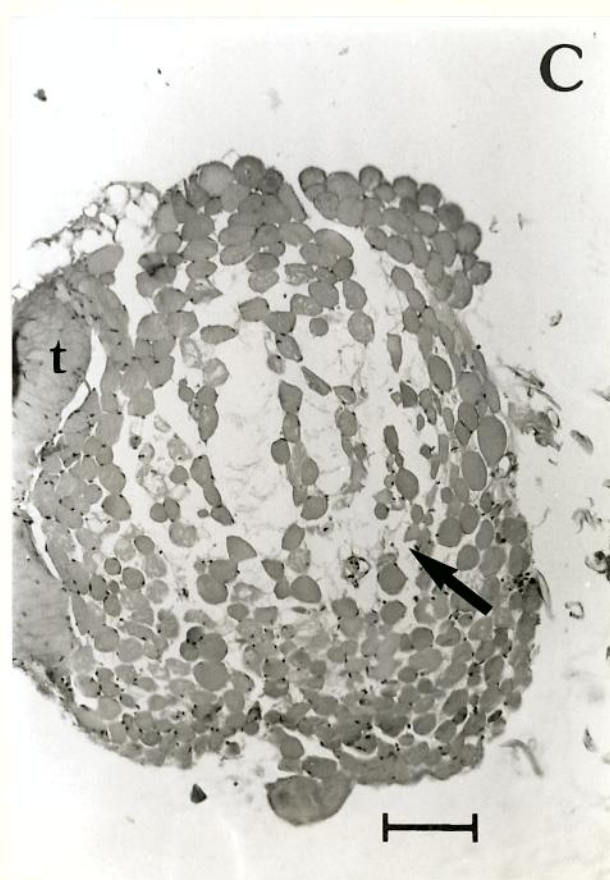
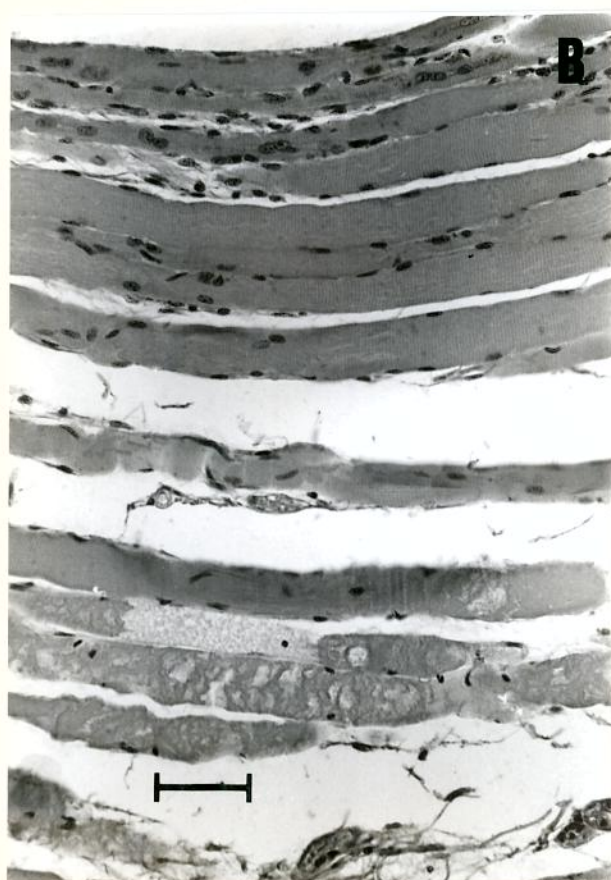


Neutralização de Cdt com SACC

(Figura 16)

O AV comercial foi o menos efetivo em proteger contra a mionecrose causada por Cdt. A Figura 16A mostra um padrão de lesão semelhante ao causado pelo veneno total. Maiores detalhes são vistos na Figura 16B. Uma secção transversal é ilustrada na Figura 16C, mostrando pouca proteção, principalmente na área central, onde os espaços representam áreas de perda de fibras, por ação miotóxica do veneno (seta). t = tendão. A (HE, barra=10 μ m), B (HE, barra=20 μ m) e C (HE, barra=10 μ m).

Figura 16. Neutralização de Cdt com SACC



Neutralização de Cdt com AntiCdt

(Figura 17)

O AntiCdt preservou bem as fibras lesadas, como mostra a Figura 17. O padrão de lesão central foi abolido pelo AV, sugerindo que aquelas fibras susceptíveis ao Cdt foram protegidas. As figuras 17A e 17B apresentam cortes longitudinais. Em 17C, corte transversal mostrando a proteção do AV. Nota-se que há maior densidade de fibras, dando um aspecto mais compacto ao músculo, como resultado da eficaz neutralização promovida pelo AV específico. Ao centro da Figura 17C, observa-se um fuso neuromuscular (seta) e, na borda inferior, parte do tecido conjuntivo fibroso do tendão (t). A (HE, barra=10 μ m), B (HE, barra=20 μ m) e C (HE, barra=20 μ m).

Figura 17. Neutralização de Cdt com AntiCdt

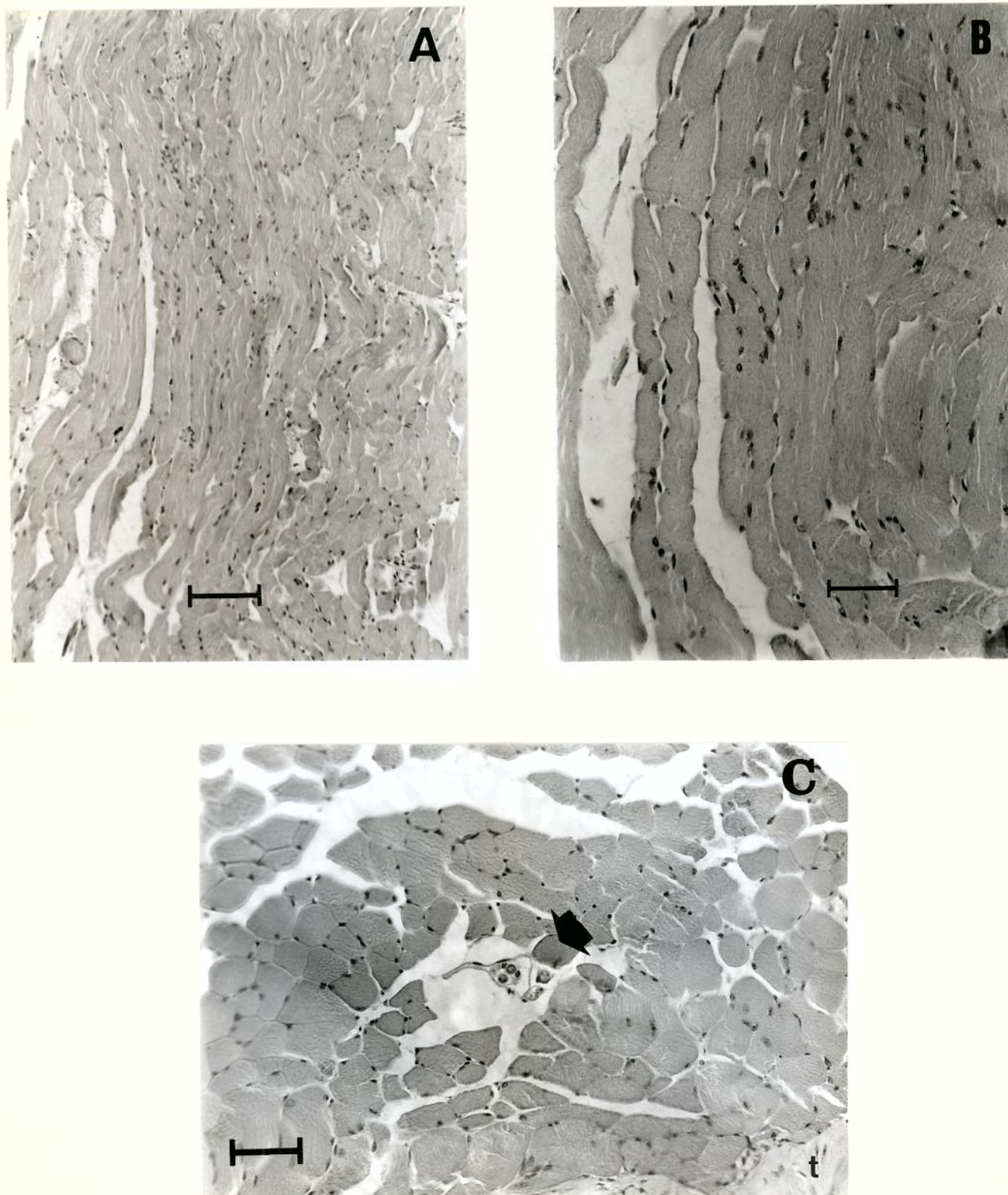
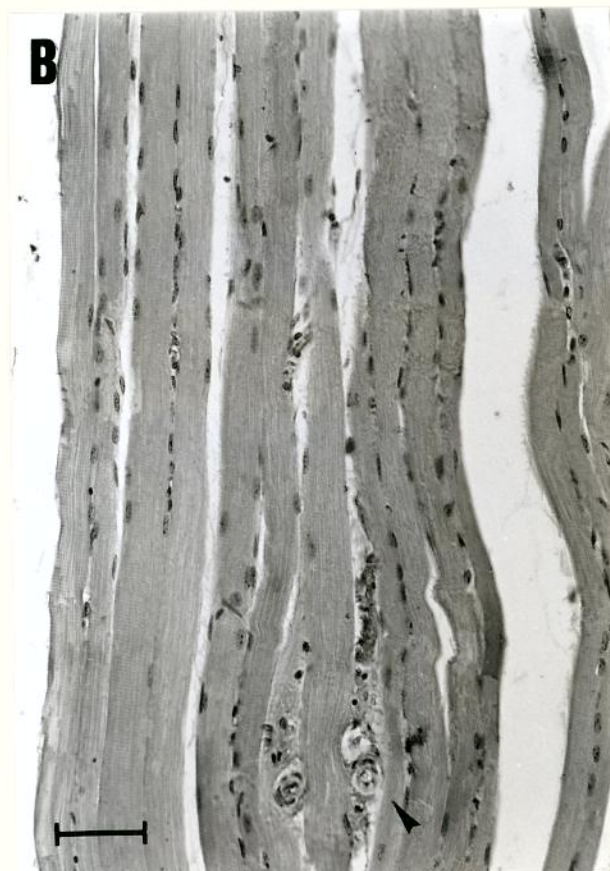


Figura 18. Neutralização de Cdt com AntiCrTX

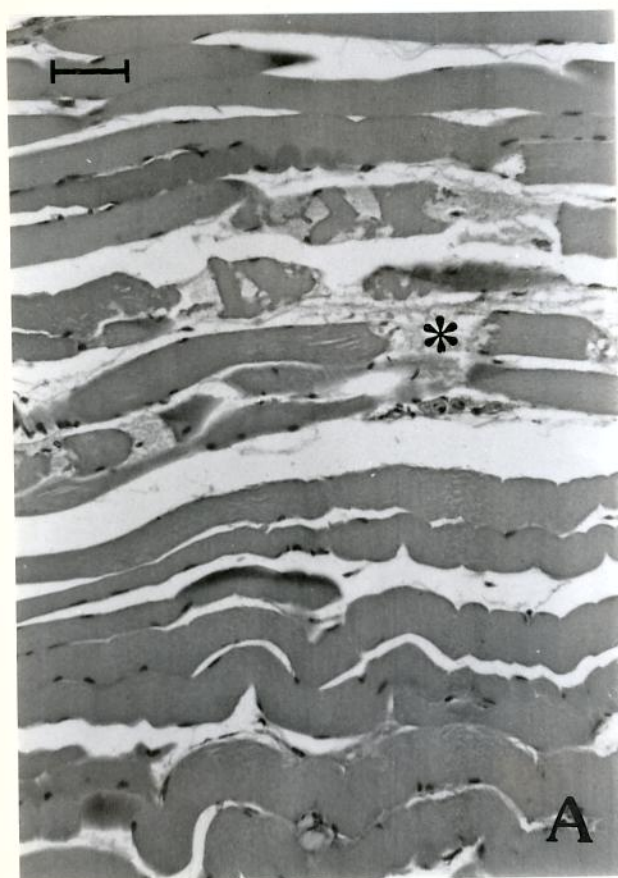
A Figura 18 ilustra a neutralização do Cdt pelo AntiCrTX. A Figura 18A mostra que, em termos de quantidade de fibras lesadas, a diferença não foi marcante, demonstrando que o AV não protegeu quanto a este número. Entretanto, uma observação mais detalhada mostra que cada fibra, individualmente, apresenta-se menos lesada na sua extensão. Observa-se, ainda, que o aspecto em mosaico, visto com o veneno total de Cdt na Figura 15, mudou de padrão. A Figura 18B mostra uma região de proteção do AntiCrTX, com preservação de fusos (ponta de seta) e estriações, mais circunscritas à periferia do EDL. A (HE, barra=10 μ m) e B (HE, barra=20 μ m).



3.4.3.3. Dano muscular causado por CrTX

(Figura 19)

A CrTX incubada por 120 min, na dose de 10 $\mu\text{g/ml}$, produziu mionecrose na preparação EDL, com padrão de lesão semelhante ao produzido pelo veneno total, como mostra a Figura 19A. Igualmente, a necrose acometeu preferencialmente as fibras no centro da secção do EDL. Houve fragmentação das miofibrilas, que correspondem às áreas claras (*) e condensação das mesmas, com áreas escuras irregulares (★), além de deformação na disposição das fibras. O aspecto mionecrótico das fibras, embora com padrão em mosaico, não é tão 'rendilhado' como o induzido pelo veneno total. Observam-se os núcleos escuros e as fibras com aparência hialina em 19B, vê-se também ruptura do sarcolema (seta), seguida por focos descontínuos de miofibrilas, resultando em total desorganização da estrutura normal das fibras. A (HE, barra=20 μm) e B (HE, barra=30 μm).

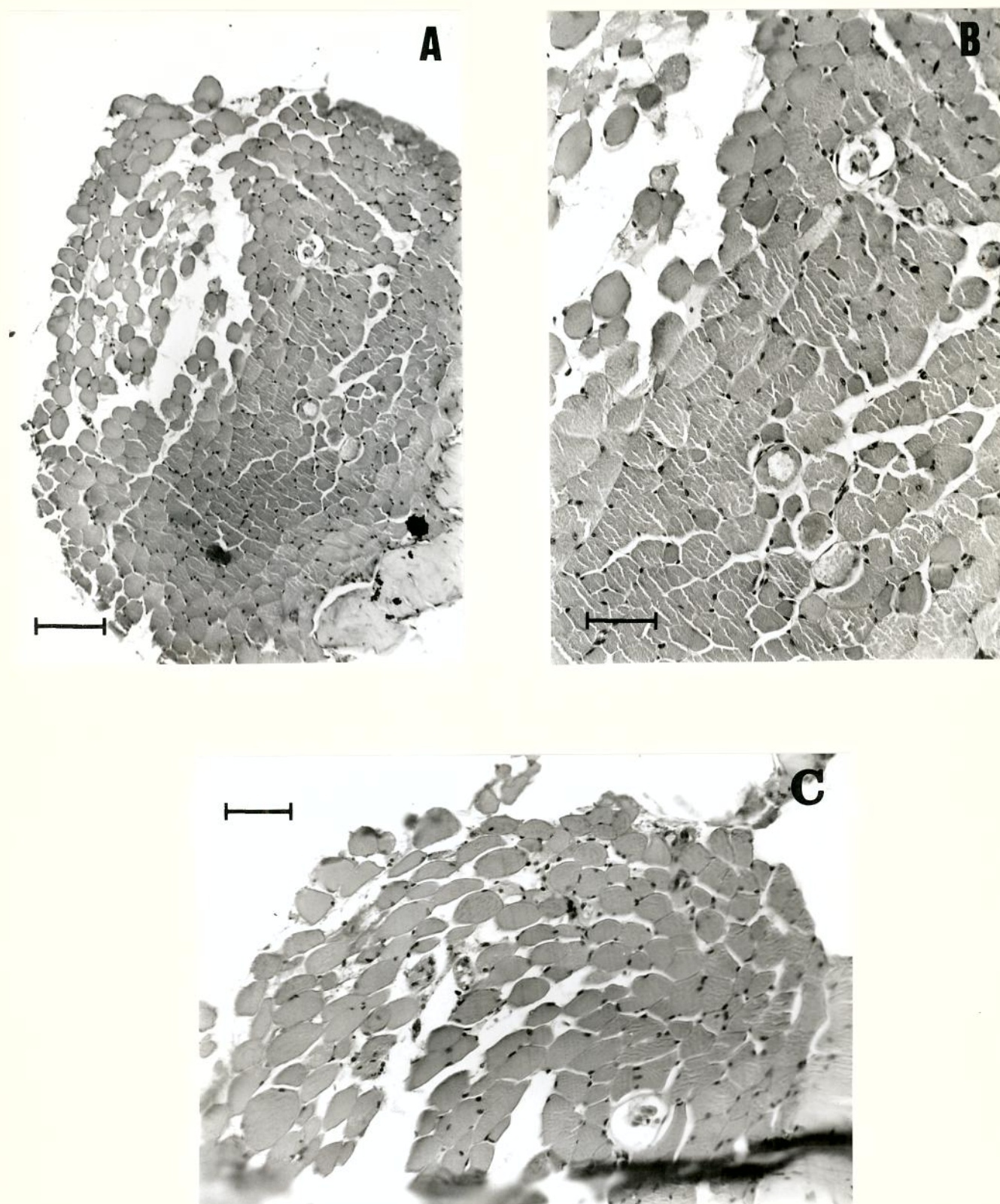


Neutralização de CrTX com SACC

(Figura 20)

O AV comercial foi o menos efetivo (comparando-se com o AntiCdt, da Figura 21, e com o AntiCrTX, da Figura 22) em proteger a preparação dos efeitos da CrTX, como observado na Figura 20. Em 20A, uma visão geral do EDL, em corte transversal, mostra, ainda, várias células necrosadas e, na orla do músculo, fibras bastante edematosas. Em 20B, a mesma secção mostrando, em detalhe, núcleos bastante condensados e uma fibra com as miofibrilas centrais ausentes. A Figura 20C, mostra outra preparação, também com células de aspecto hialino e edematosas. A (HE, barra=10 μ m), B (HE, barra=20 μ m) e C (HE, barra=20 μ m).

Figura 20. Neutralização de CrTX com SACC

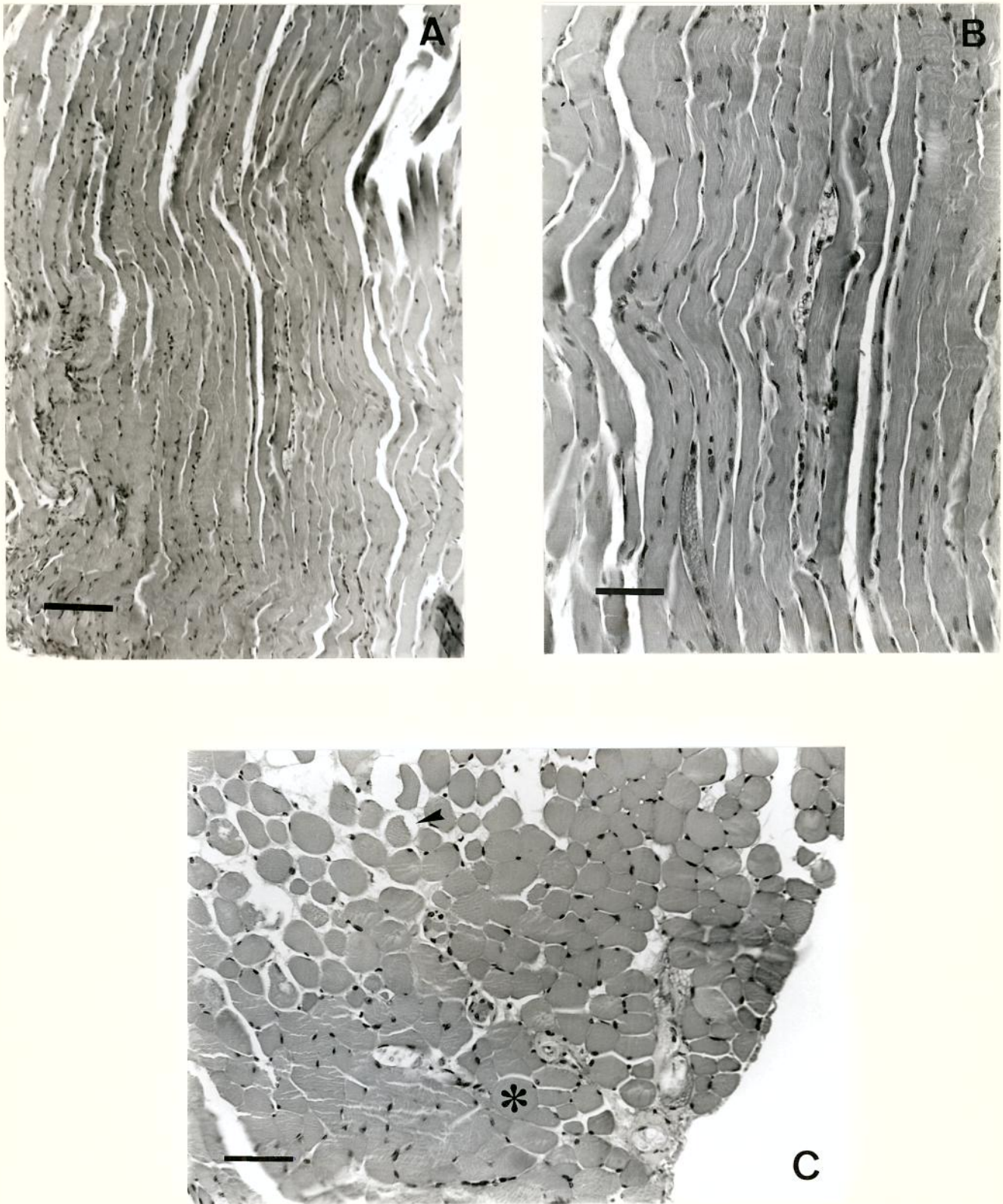


Neutralização de CrTX com AntiCdt

(Figura 21)

A Figura 21 ilustra a neutralização da CrTX com AntiCdt. As Figuras 21A e 21B, em corte longitudinal, representam a mesma preparação em posições e aumentos diferentes. Nota-se uma maior eficácia na proteção contra o efeito tóxico, quando comparada com SACC. Outra preparação é mostrada em 21C, numa secção transversal, contendo algumas células com lesão em delta (ponta de seta) e outras mostrando perfil arredondado (*), em vez de poligonal, porém, em maior grau de proteção que no SACC. A (HE, barra=10 μ m), B (HE, barra=20 μ m) e C (HE, barra=20 μ m).

Figura 21. Neutralização de CrTX com AntiCdt

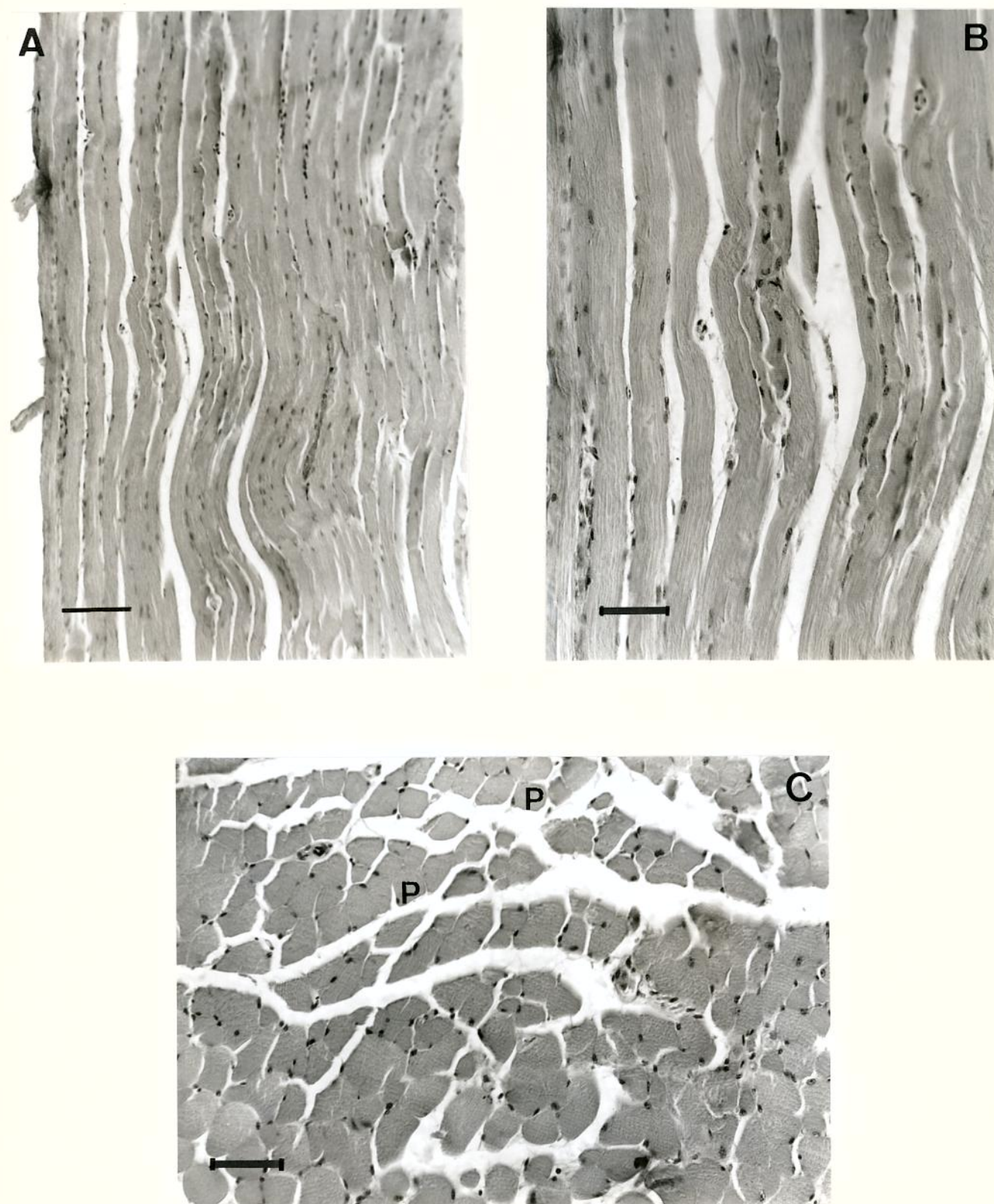


Neutralização de CrTX com AntiCrTX

(Figura 22)

O AV AntiCrTX foi o mais eficiente em se contrapor à ação da CrTX, melhor preservando a morfologia das fibras, como mostra a Figura 22. Em 22A e 22B, são mostrados cortes longitudinais da mesma preparação, em diferentes posições e aumentos. Observa-se a organização das fibras e a presença de estriações. Em 22C, outra preparação, em corte transversal, retrata a disposição organizada de feixes do músculo EDL e o perfil poligonal (P) de cada fibra, que indica a ausência de edema e, portanto, de preservação das propriedades de permeabilidade da musculatura celular. A (HE, barra=10 μ m), B (HE, barra=20 μ m) e C (HE, barra=20 μ m).

Figura 22. Neutralização de CrTX com AntiCrTX

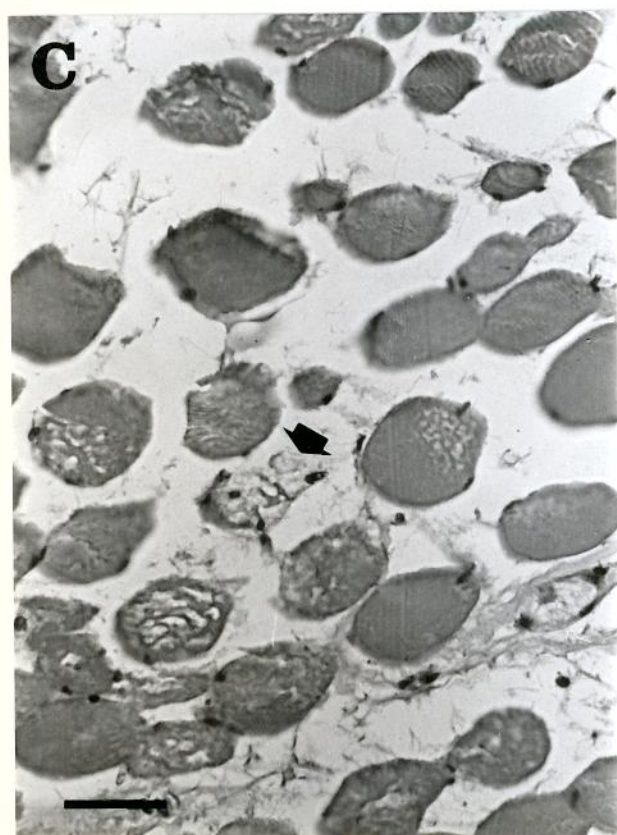
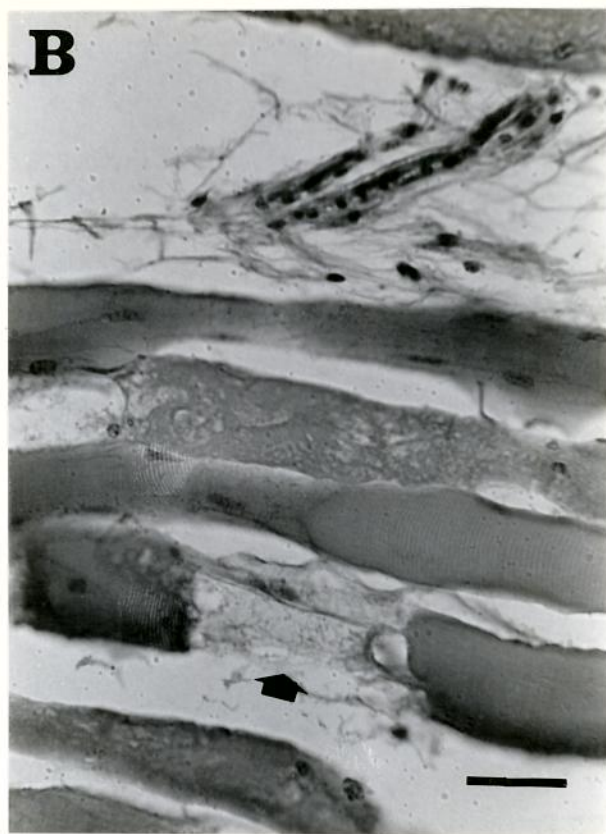
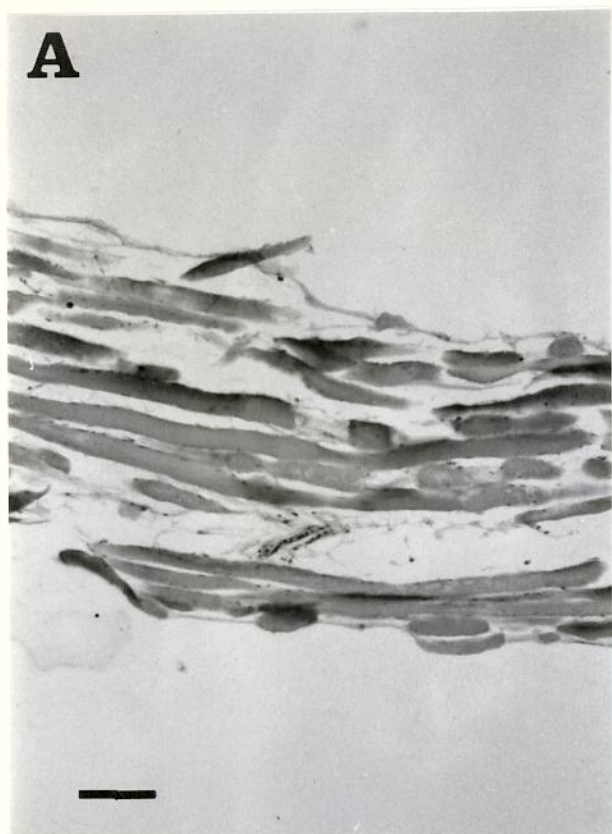


3.4.3.4. Dano muscular causado por Bjssu

(Figura 23)

O veneno total de Bjssu, na dose de 50 $\mu\text{g/ml}$, produziu intensa mionecrose na preparação EDL, submetida a experimento por um tempo de 120 min. Observaram-se fibras musculares fragmentadas, miofibrilas condensadas e núcleos picnóticos. A Figura 23 ilustra uma seqüência de fotos, com os danos causados pelo veneno: em 23A, nota-se inexistência de fibras com arquitetura íntegra e a notória redução da massa muscular a cerca de 13 fibras nesse plano do corte. Em 23B e D está mostrado, respectivamente em secção longitudinal e transversal, o efeito de lise da fibra em maiores detalhes, em diferentes regiões. Em 23C, o corte oblíquo mostra a intensidade da mionecrose, com espaços opticamente vazios, tornando a fibra bastante rarefeita (setas). A (HE, barra=10 μm), B (HE, barra=30 μm), D (HE, barra=30 μm) e C (HE, barra=30 μm).

Figura 23. Dano muscular causado por Bjssu

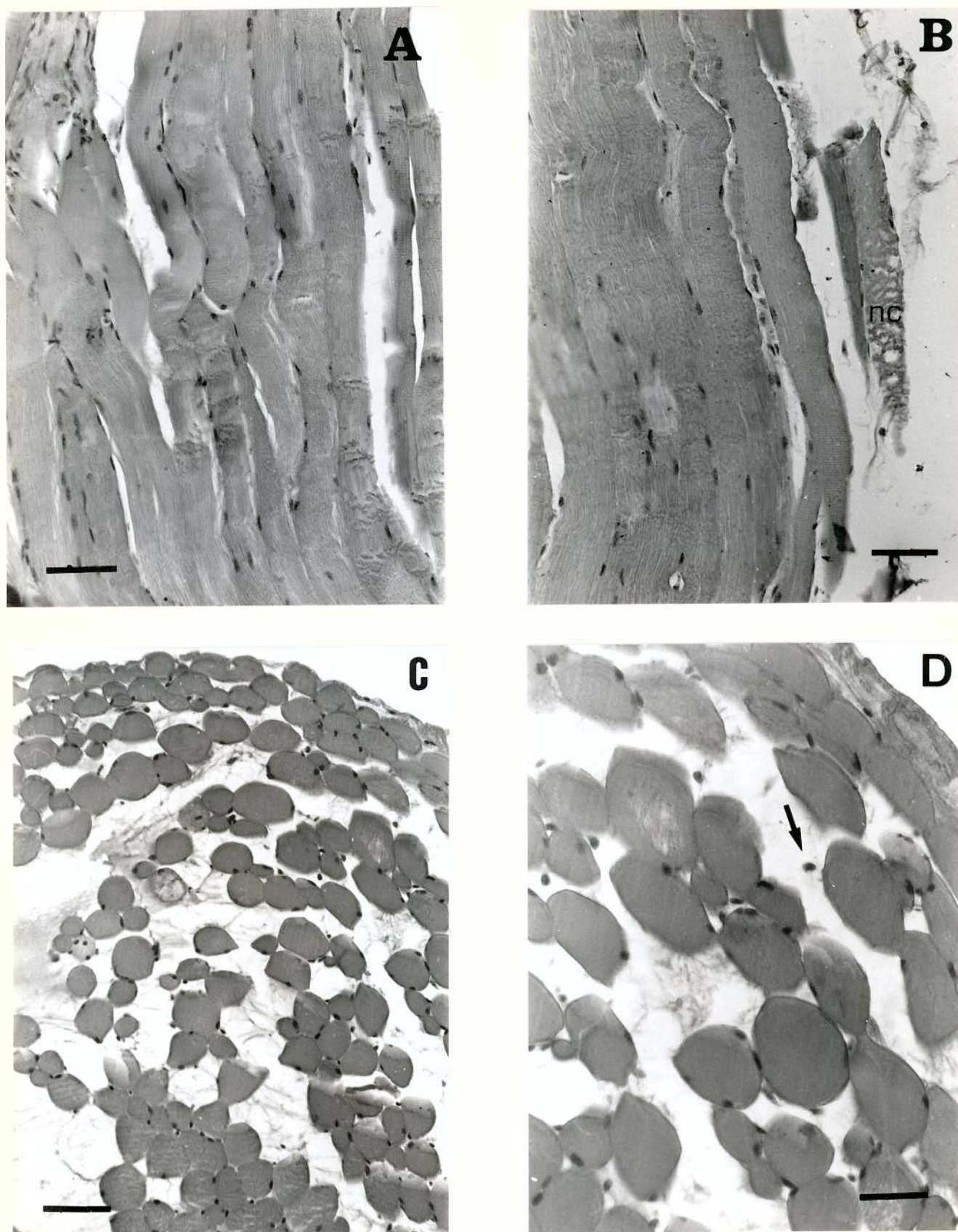


Neutralização de Bjssu com SABC

(Figura 24)

A Figura 24 ilustra a ação protetora do AV comercial, evidenciada pela maior massa muscular (24A), apesar de conter fibras necrosadas (nc), conforme se observa em 24B. Cortes transversais são mostrados em 24C e D, em diferentes aumentos, sugerindo um efeito 'tudo ou nada', ou seja, é provável que determinada população de fibras não seja protegida pelo AV. Esta observação decorre da presença de células "ghost" nas regiões opticamente vazias, onde existem núcleos soltos e restos de membrana (seta). A (HE, barra=20µm), B (HE, barra=20µm), C e D (HE, barra=20µm e 40µm, respectivamente).

Figura 24. Neutralização de Bjssu com SABC

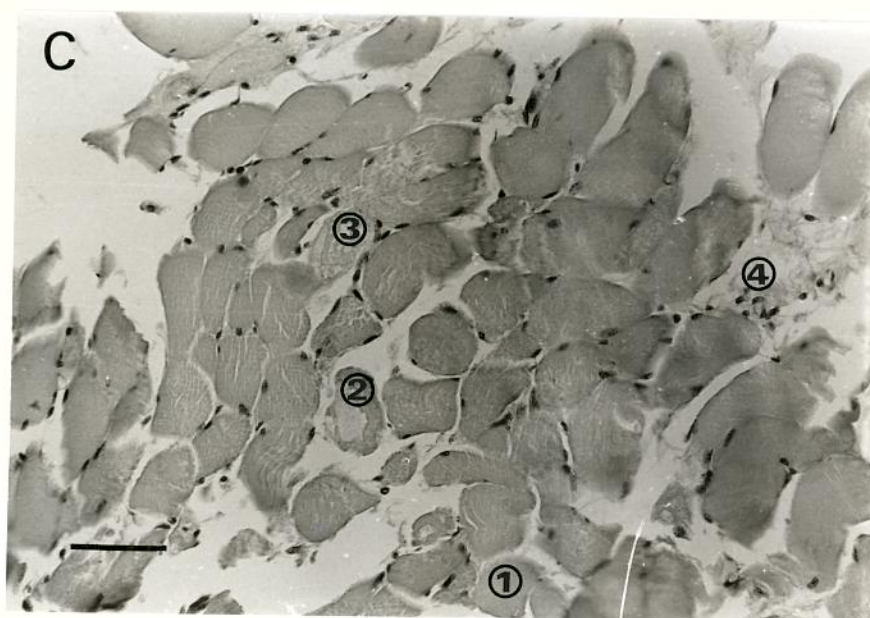


Neutralização de Bjssu com AntiBjssu

(Figura 25)

A Figura 25A mostra uma proteção maior, quanto ao número de fibras preservadas, em relação à proporcionada pelo SABC, embora apresente algumas regiões afetadas altamente eosinófilas (E), representadas por regiões escuras das fibras. A Figura 25B, mostra outro experimento, com as mesmas características de 25A. O corte transversal, em 25C, não mais exhibe o padrão 'tudo ou nada' e, sim, gradação (1, 2, 3 e 4) na intensidade da lesão em delta, aglutinação miofibrilar e edema, evidenciando, enfim, uma superioridade no AV específico em proteger diferentes populações de fibras. A (HE, barra=10 μ m), B (HE, barra=10 μ m) e C (HE, barra=20 μ m).

Figura 25. Neutralização de Bjssu com AntiBjssu

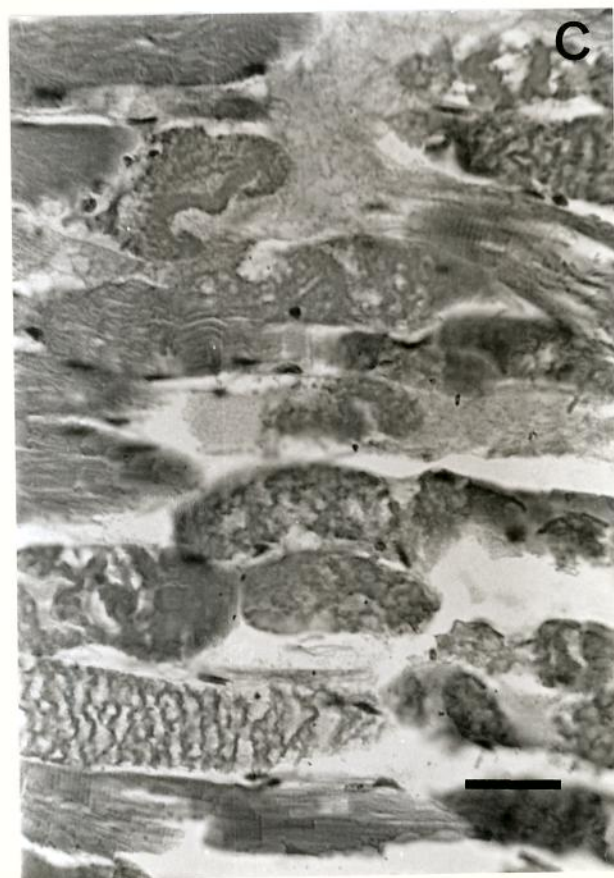
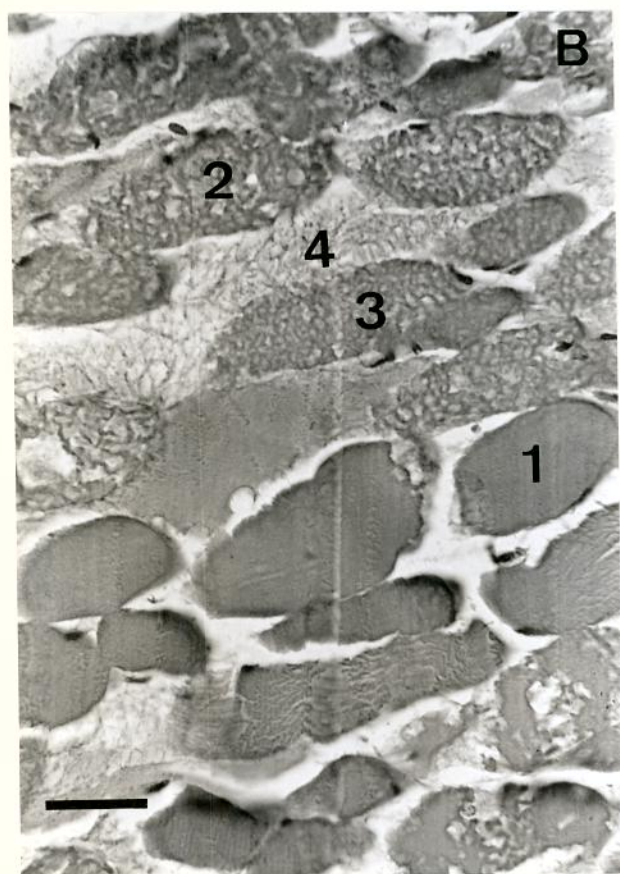
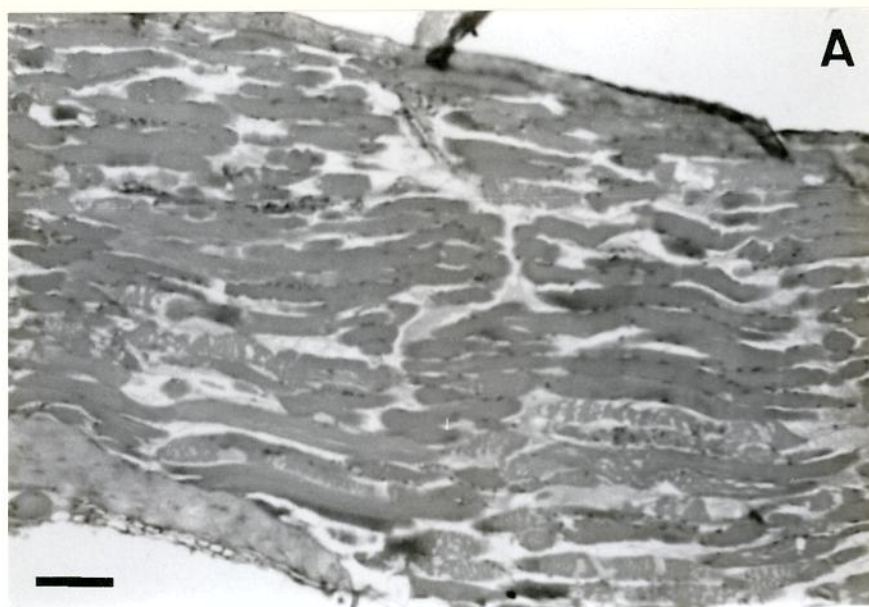


3.4.3.5. Dano muscular causado por BthTX

(Figura 26)

Após 120 min de incubação com BthTX, na dose de 20 µg/ml, a preparação EDL apresentou-se mionecrótica, porém, o grau de lesão foi inferior ao exibido pelo Vb. Observa-se presença de maior número de células, conforme Figura 26A. As Figuras 26B e 26C ilustram os estágios de condensação de miofibrilas até o desaparecimento de fibras (1, 2, 3 e 4), sugerindo que toxina e Vb apresentam diferente cinética no padrão de lesão. A (HE, barra=10µm), B e C (HE, barra=30µm).

Figura 26. Dano muscular causado por BthTX

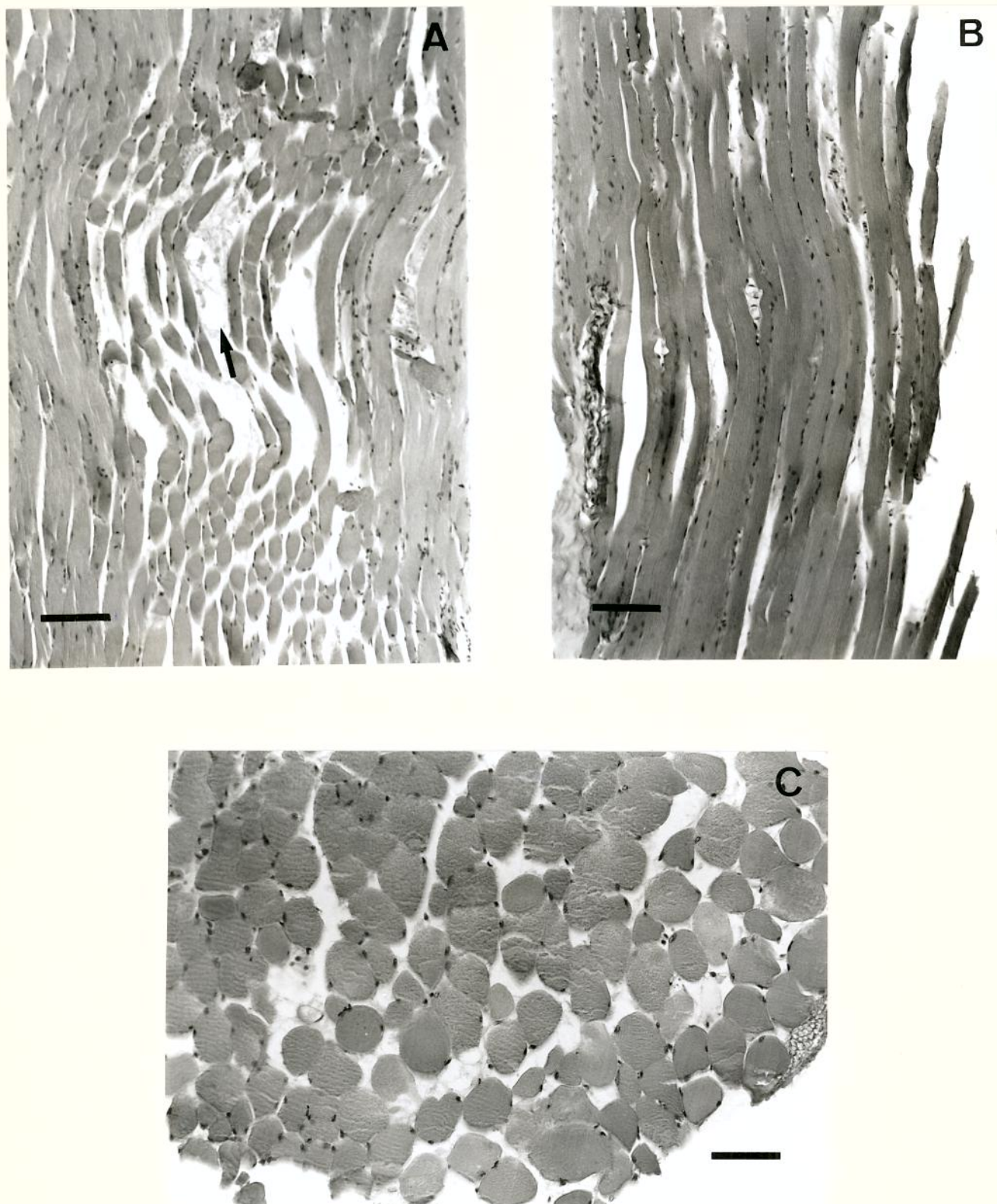


Neutralização de BthTX com SABC

(Figura 27)

A Figura 27 mostra a ação altamente neutralizante do AV comercial na preparação, a qual caracterizou-se por maior eficácia nas bordas laterais e menor na região central, evidenciada por lacunas produzidas pela ausência de fibras (seta) que não foram protegidas (27A). Em 27B, outra região, da mesma preparação, evidencia que não há alterações ao longo das fibras, que se mostram longas e ininterruptas. Em 27C, um corte transversal de outra preparação mostra grande proteção e preservação do perfil poligonal das células. Há poucos espaços indicativos de lise de fibras. A (HE, barra=10 μ m), B (HE, barra=10 μ m) e C (HE, barra=20 μ m).

Figura 27. Neutralização de BthTX com SABC

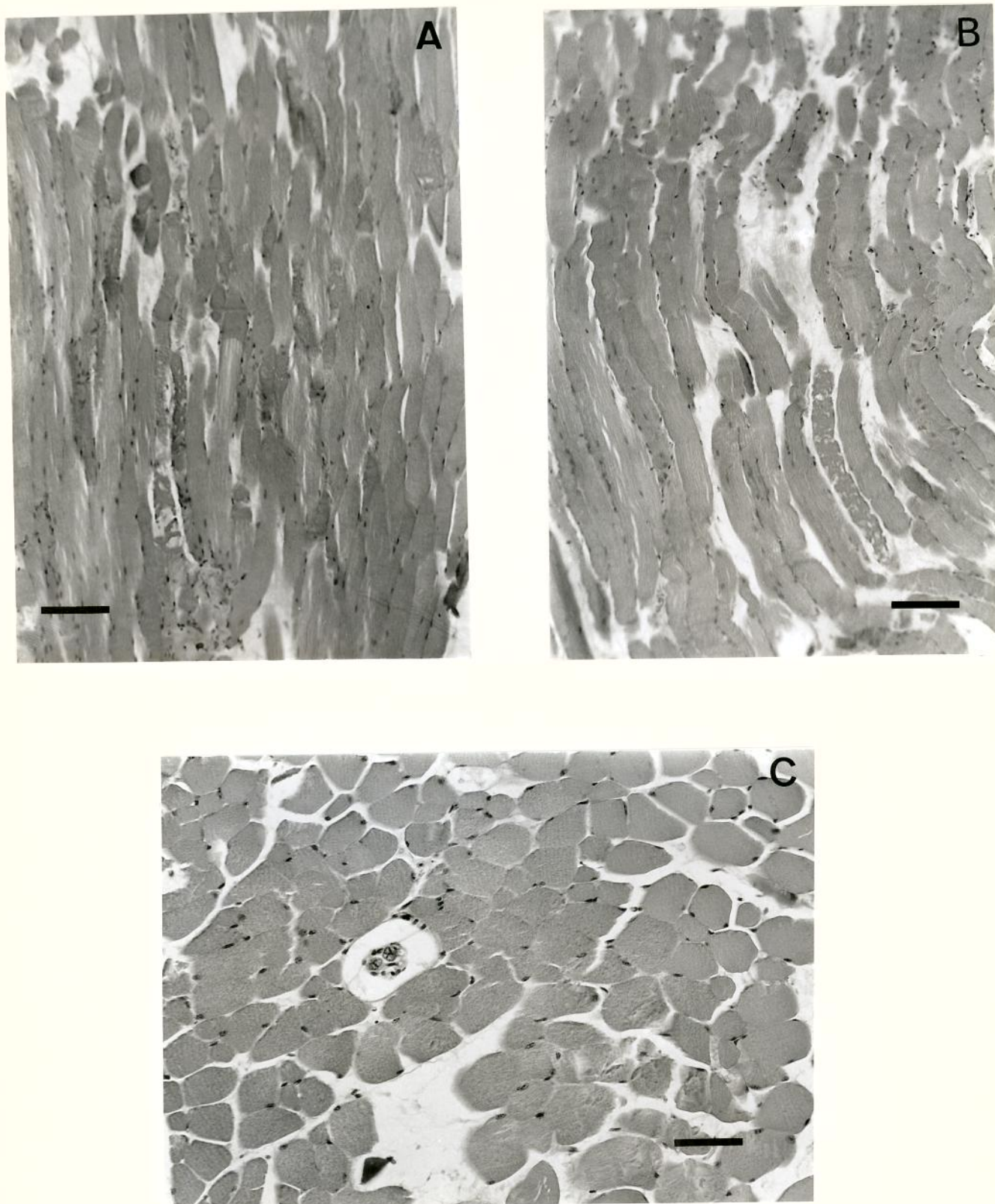


Neutralização de BthTX com AntiBjssu

(Figura 28)

A Figura 28 ilustra a neutralização da BthTX pelo AntiBjssu. À maneira do SABC, houve maior proteção nas bordas laterais do EDL. Entretanto, o AntiBjssu protegeu mais que o SABC, pois não se verifica ausência de fibras. Em decorrência, observa-se na região central do músculo, fibras com diferentes graus de alteração, indicando a neutralização parcial. As Figuras 28A e 28B pertencem à mesma preparação. Notam-se fibras onduladas, hialinas e, algumas delas, com vários pontos de lesões tipo delta. O corte transversal, em 28C mostra um padrão semelhante ao SABC. Ao centro, observa-se um fuso neuromuscular. A e B (ambas HE, barra=10 μ m), C (HE, barra=20 μ m).

Figura 28. Neutralização de BthTX com AntiBjssu



4. DISCUSSÃO

Experimentalmente, a neutralização constitui importante ferramenta na tentativa de se entender o mecanismo de ação dos venenos e toxinas, além de ser a principal forma de tratamento nos acidentes causados por animais ofídicos. Estudos sobre neutralização têm sido realizados com AV específicos, produzidos por imunização direta em animais como camundongos (TRÉMEAU *et al.*, 1986; LOMONTE & KAHAN, 1988; MOLLIER *et al.*, 1989; MOLLIER, CHWETZOFF, MÉNEZ, 1990; MOURA DA SILVA *et al.*, 1990; LOMONTE *et al.*, 1992), coelhos (LOMONTE *et al.*, 1987a; MIDDLEBROOK & KAISER, 1989; KASTURI & GOWDA, 1990; OWNBY & COLBERG, 1990), carneiros (LOMONTE, MORENO, GUTIÉRREZ, 1987b; SJOSTROM *et al.*, 1994) ou com AV comerciais, produzidos por imunização em eqüinos (LOMONTE *et al.*, 1990; 1991; SJOSTROM *et al.*, 1994).

Os AV específicos e os comerciais mostraram-se efetivos em neutralizar o bloqueio neuromuscular e o efeito letal dos Vb e toxinas. Quanto à miotoxicidade, porém, em nossas condições experimentais, houve variação quanto ao grau de proteção e ao tipo de veneno, tanto para AV comerciais, como para os específicos. Como observado por LOMONTE *et al.* (1987a), "a capacidade neutralizante de AV comerciais pode ser mais aparente que real, considerando que são preparações ricas em globulinas, pois são fracionadas e purificadas, tratamento não realizado com os AV específicos, além de que, a concentração absoluta de anticorpos específicos não foi quantificada. Ainda, os AV comerciais são produzidos em cavalos, cuja produção de anticorpos ocorre há anos, enquanto os AV específicos são produzidos num esquema de imunização por cerca de 3 semanas". Em nosso estudo, apesar destas considerações, a determinação de ELISA comprovou a reatividade dos AV específicos.

O estudo miográfico dos Vb e toxinas marcou as diferenças entre as preparações NFD e EDL. A razão do Cdt apresentar tempo para um bloqueio de 50% tão diferente nas duas preparações e o significado da CrTX ser menos sensível que o seu Vb na preparação EDL permanecem para ser elucidados. Duas hipóteses podem ser formuladas: a primeira estaria relacionada às características bioquímicas e fisiológicas das fibras musculares dos dois tipos de músculo, isto é, o EDL, com predominância de fibras glicolíticas de contração rápida, e o diafragma, com fibras oxidativas de contração lenta, as quais teriam sensibilidade diferente às ações do Cdt e da CrTX. A segunda hipótese estaria relacionada às características farmacológicas próprias do Cdt e CrTX (ação pré-sináptica). Esta hipótese encontra suporte nos resultados com Bjssu e BthTX (ação pós-sináptica), nos quais a diferença no perfil miográfico das duas preparações não foi significativa.

Diferença na sensibilidade, entre músculos de contração rápida e lenta, a alguns venenos de cobra e miotoxinas foi recentemente relatada por MELO & OWNBY (1996), quanto à miotoxicidade produzida nos músculos EDL e Soleus. Um músculo é denominado branco, quando contém fibras com baixo conteúdo mitocondrial, e, vermelho, quando tem fibras ricas em mitocôndrias. O EDL é um músculo branco, de contração rápida e com predominância de fibras glicolíticas. O diafragma é um músculo vermelho, predominantemente lento e, por ser constantemente ativo, requer elevada capacidade oxidativa, sendo possível que a maior proporção de fibras lentas proporcione, ao mesmo, um certo grau de resistência à fadiga. As diferenças nos perfis ultra-estrutural e metabólico para os mesmos tipos de fibras, em diferentes músculos esqueléticos, são influenciadas pelo crescimento, enquanto que o volume mitocondrial é idade-músculo-dependente (TAKEKURA *et al.*, 1994; JECKEL-NETO *et al.*, 1996).

Com base no exposto sobre os estudos realizados em diferentes músculos esqueléticos, diafragma, EDL e Soleus, é evidente que existem diferenças marcantes entre as preparações por nós utilizadas (NFD e EDL), no que diz respeito à arquitetura, ultra-estrutura, distribuição de enzimas e receptores envolvidos na fisiologia das mesmas. O estudo miográfico permitiu apontar as diferenças entre elas. Pesquisas futuras, comparando os aspectos morfológicos de ambas as preparações, determinariam quais as estruturas e em que grau seriam afetadas, auxiliando no entendimento da ação desses venenos e toxinas.

A neutralização do bloqueio neuromuscular, avaliada na preparação NFD, para os Vb e toxinas, mostrou ser dose-dependente e, para os AV comerciais, foi observado, a partir de determinada dose, um efeito facilitador. Se este é atribuído à presença de alguma substância termo-estável no AV ou se é simplesmente excesso na dose do mesmo, ainda permanece sem esclarecimento. A desnaturação da mistura veneno-AV a 95°C, por 5 minutos, manteve o efeito facilitador, porém, como este só aparece com doses elevadas, o mais provável é que ambos os fatores estejam relacionados.

Tem-se discutido sobre a dose de AV administrada no tratamento dos acidentes ofídicos. THEAKSTON *et al.* (1992) demonstraram que baixas concentrações de veneno de *B. jararaca* persistiam na circulação por mais de 3 dias após a administração de AV. Este, contudo, continuava presente por longo tempo, em quantidade suficiente para se ligar ao veneno liberado do local da picada, e a aplicação de uma segunda dose poderia ser considerada após um período de 12 a 14 horas. JORGE *et al.* (1995) realizaram um estudo randômico cego com duas doses de AV (sendo uma, a dose preconizada e, a outra, 50% menor) para o gênero *Bothrops*, em envenenamentos leve e moderado. Não houve diferença entre os dois grupos, indicando a possibilidade de redução das doses convencionais.

AMARAL *et al.* (1996) analisaram a interação veneno-AV, em pacientes envenenados por *Crotalus durissus*. Embora tenha sido detectado elevados títulos de AV, através de ensaios de ELISA, 24 horas após o início do tratamento, ainda não é possível atestar ser viável a redução das doses iniciais de AV. Talvez os nossos achados *in vitro*, que demonstraram o efeito facilitador, a partir de determinada concentração de AV comercial, possam, de alguma forma, contribuir nesta questão clínica.

A neutralização cruzada do bloqueio neuromuscular foi investigada para Bjssu e BthTX, com AV crotálicos: SACC, AntiCdt e AntiCrTX. Os 3 AV apresentaram perfil semelhante, quando em mistura com Bjssu. A preparação NFD foi protegida em 75% contra o bloqueio neuromuscular. Os resultados obtidos não foram inesperados, uma vez que a para-especificidade do soro anticrotálico ante o veneno total de Bjssu, já havia sido observado por VITAL BRAZIL (1903). Contudo, a capacidade neutralizante do AntiCrTX para a BthTX foi ainda maior que para a Bjssu, apesar de, quando a preparação foi substituída por EDL, tais resultados não se reproduziram com a mesma intensidade. Novamente evidenciam-se as diferenças entre as duas preparações e (ou) entre a mistura veneno-AV: em qual sítio da BthTX ocorre a ligação do AV AntiCrTX?

SILES VILLARROEL *et al.* (1976,1977) admitem a existência, no gênero *Bothrops*, de dois grupos de venenos com características imunogênicas distintas. O primeiro deles seria representado pelos venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis* e *B. cotiara*, entre os quais pode ser observada uma maior aproximação, por apresentarem um grande número de componentes antigênicos comuns e de constituintes com identidade completa; o segundo grupo seria representado pelos venenos Bjssu e *B. moojeni*, que guardam entre si uma estreita relação imunogênica, com características próprias que os afastam do primeiro

grupo. Atualmente, tem-se investigado a ocorrência de proteínas imunologicamente relacionadas à CrTX em venenos botrópicos, principalmente na Bjssu (SILVA *et al.*, 1997), o que poderá ajudar na compreensão deste fato.

Ficou evidenciada a cinética de liberação de CK para cada veneno e toxina, sendo que, também neste caso, houve uma diferença importante para Cdt e CrTX em relação a Bjssu e BthTX. Para os primeiros, a cinética de liberação segue um padrão linear e são baixos os níveis de liberação de CK, quando comparados aos segundos, cuja cinética de liberação é distinta, ou seja, BthTX apresenta níveis elevados, em 15 minutos, para depois aumentar linear e progressivamente. Bjssu tem um efeito tardio, atingindo valores máximos em uma hora, para depois sofrer um ligeiro declínio. Essas diferenças podem explicar o padrão de alteração morfológica de cada veneno e toxina.

Os achados morfológicos e enzimáticos, portanto, mostraram uma correlação entre si, diante dos venenos e toxinas utilizados na avaliação da miotoxidade, tendo sido importante o acompanhamento da liberação de CK, em intervalos de tempo, pois permitiu entender o resultado da lesão ocorrida aos 120 minutos de exposição.

Um achado interessante foi a influência dos AV na liberação de CK. Numa ordem decrescente, níveis significativos da enzima foram encontrados para o AV AntiCrTX (superiores aos induzidos pelo Cdt), AntiBjssu e AntiCdt. Uma explicação para isso seria a concentração de proteínas presente na solução do banho, que coincide com a potência de cada AV, 12:1, 3:1 e 0,8:1, respectivamente para AntiCrTX, AntiCdt e AntiBjssu. SUAREZ-KURTZ (1982), trabalhando com preparações de músculo esquelético de rã, demonstrou que a CK, apesar de ser uma enzima de considerável tamanho (81 kDa), pode ser

liberada por alterações osmóticas, com aparente ausência de dano celular irreversível, julgado pelo critério miográfico (quantificação da amplitude de contração muscular).

É possível, portanto, que, no caso dos AV específicos, a elevada concentração de proteínas tenha promovido a liberação de CK, ainda que a resposta miográfica (contração muscular) não tenha sido afetada. Histologicamente, a preparação mudou sua aparência normal (tornando-se semelhante ao ilustrado na Figura 14B), mas não se verificou mionecrose. Isso pode significar que a liberação de CK nem sempre pode ser atribuída à lesão da célula muscular. O contrário também já foi demonstrado: *Notechis s. scutatus* não apresentou nenhum efeito significativo nos níveis de CK, embora manifestasse severas reações locais, com vários estágios de necrose muscular (MEBS *et al.*, 1983), o que também foi observado por nós, no caso de Cdt.

Embora os AV específicos, sozinhos, tenham promovido uma significativa liberação de CK, conforme explicitado acima, quando em mistura com os venenos ou toxinas, foram eficazes em impedi-la. Assim, ambos os AV, comercial e específico, foram eficazes em proteger a preparação contra o mecanismo liberador de CK.

A análise histológica traz mais informações sobre a capacidade neutralizante dos AV: para o Cdt, por exemplo, a ordem de proteção foi o AntiCdt, AntiCrTX e SACC. Qualitativamente, a melhor proteção do AntiCdt pode ser explicada pela especificidade e afinidade dele com os vários componentes do Vb, pois este encerra outros integrantes que podem estar envolvidos na ação miotóxica, além de que, pode ter havido produção de anticorpos contra estes outros constituintes.

No caso da CrTX, a ordem de proteção foi o AntiCrTX, AntiCdt e SACC. A superioridade do AntiCrTX também foi verificada em relação ao bloqueio neuromuscular.

Esses resultados constituem mais uma evidência da interdependência dos dois fenômenos (bloqueio neuromuscular e miotoxidade). Também são coerentes com os de GOPALAKRISHNAKONE & HAWGOOD (1984), que verificaram, através de microscopia óptica e eletrônica, haver alteração degenerativa após uma única injeção i.m. de dose subletal de CrTX no músculo Soleus de camundongo. Um padrão semelhante de mionecrose foi obtido quando se injetou a subunidade fosfolipásica sozinha, enquanto que a CrTX reconstituída de uma PLA₂ quimicamente modificada, com baixa atividade catalítica, mostrou fraca mionecrose e a subunidade não-enzimática, a crotapotina, foi inativa. É interessante salientar a associação dos parâmetros miográfico e miotóxico, mostrando que a neutralização por AV produzido a partir de fração purificada, pode constituir um modelo útil para relacionar ou dissociar o efeito do bloqueio neuromuscular do miotóxico.

No caso da Bjssu, a melhor proteção contra a mionecrose foi obtida com AntiBjssu e esse resultado também foi verificado na proteção contra o bloqueio neuromuscular. É muito provável que o processo de imunização tenha tido uma influência direta nesse resultado, pois o AV comercial é obtido após imunização de uma mistura de venenos das espécies *B. jararaca*; *B. alternatus* (nome vulgar: urutu); *B. moojeni* (nome vulgar: caissaca); *B. cotiara*; *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*, enquanto que o AV específico foi produto de imunização apenas com Bjssu. A produção de anticorpos contra uma única espécie e, ainda, quando em mistura com o mesmo antígeno que gerou esta produção, melhorou, em muito, o grau de proteção. Através desse procedimento, ficou evidenciada, uma vez mais, a especificidade da reação antígeno-anticorpo.

Para BthTX, ambos os AV protegeram contra a ação miotóxica. Aparentemente o SABC foi mais eficiente em proteger contra a liberação de CK e o bloqueio neuromuscular

(para este último, estatisticamente não houve diferença significativa entre os AV). No entanto, histologicamente o AntiBjssu foi superior em proteger contra os efeitos mitotóxicos da BthTX. Submeter o mesmo protocolo a AV AntiBthTX seria interessante, até para atribuir (ou não) à BthTX as principais ações do Vb de Bjssu, como verificado para CrTX.

5. CONCLUSÃO

- As preparações neuromusculares utilizadas comportaram-se de modo divergente, quanto a sua sensibilidade aos venenos e toxinas, sugerindo diferenças, provavelmente devidas à população de fibras glicolíticas e oxidativas presentes nestes músculos.
- Os antivenenos específicos mostraram-se eficientes em neutralizar o efeito letal, a miotoxicidade e o bloqueio neuromuscular característico das peçonhas e toxinas estudadas.
- O controle realizado com AV mostrou que a quantidade de proteínas presente na cuba, durante a incubação, interfere proporcionalmente no efeito liberador de CK, também alterando a aparência normal das células musculares, sem, contudo, causar mionecrose. Isso sugere que a liberação de CK pode ocorrer na ausência de lesão celular.
- AntiCrTX neutralizou tanto a mionecrose, como o bloqueio neuromuscular causados pela CrTX, evidenciando a ligação de anticorpos ao mesmo sítio responsável pelas atividades neuro e miotóxica.
- O estudo com AV produzidos de frações purificadas, associado às técnicas miográficas e histológicas, pode ser um modelo útil na dissociação dos efeitos neurotóxicos daqueles miotóxicos, das toxinas presentes nos venenos de serpentes peçonhentas.

6. SUMMARY

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

This thesis evaluates the neurotoxic and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* (Cdt, 10 µg/ml) and *Bothrops jararacussu* (Bjssu, 50 µg/ml) venoms and their major toxins, crotoxin (CrTX, 10 µg/ml) and bothropstoxin-I (BthTX-I, 20 µg/ml), respectively, and the ability of commercial and specific antivenoms to neutralize these activities.

Neurotoxic activity was studied *in vitro* using the phrenic nerve-diaphragm (PND) and *extensor digitorum longus* (EDL) preparations. Myotoxic activity was determined by measuring the release of CK *in vitro* from the EDL preparation as well as by histological analysis.

The commercial equine antivenom employed was produced by the Instituto Vital Brazil. The specific antiCdt, antiBjssu and antiCrTX antivenoms were raised in rabbits by successive inoculations over a two month period. The antibody production was determined by both immunodiffusion and by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Both of the venoms and their respective toxins produced a dose-dependent neuromuscular blockade as well as differing degrees of necrosis. The variation in sensitivity between the two preparations may reflect the presence of predominantly fast fibers in the EDL and slow fibers in the PND. Neutralization of the neuromuscular blockade was dose-dependent in the PND and, at elevated concentrations, the antisera produced facilitation of the preparation.

Bjssu venom was more potent than Cdt venom in producing skeletal muscle damage under the conditions employed here. The specific antivenoms had a greater neutralization capacity than the commercial antivenoms.

Concomitant studies on the neutralization of both neurotoxic and myotoxic activities may provide a useful model for dissociating these two activities.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. - A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.** **249**:296-300, 1986.
- AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. - Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. **Biochemistry** **24**:7054-7058, 1985.
- AIRD, S. D.; YATES III, J. R.; MARTINO, P. A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; KAISER, I. I. - The amino acid sequence of the acid subunit B-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta** **1040**:217-224, 1990.
- ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. - Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon** **26**:953-960, 1988.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; PENAFORTE, C. L.; DINIZ, C. R. - Venom-antivenom interaction in patients envenomed by *Crotalus durissus* snakebite. In: **Caderno de resumos do IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia**. Recife, 1996. p.128.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; 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.
- AMARAL, C. F. S.; SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. - Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon** **23**:877-885, 1985.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R. - Crystallization and preliminary diffraction data of BthTX-I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon** **33**:383-386, 1995.

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

- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. - Myonecrosis, myoglobinuria and acute 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 humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon** 25:1163-1168, 1987.
- BAKER, B.; TU, A. T.; MIDDLEBROOK, J. L. - Binding of myotoxin a to cultured muscle cells. **Toxicon** 31:271-284, 1993.
- BAKER, B.; UTAISINCHAROEN, P.; TU, A. T. - Structure-function relationship of myotoxin a using peptide fragments. **Archs. Biochem. Biophys.** 298:325-331, 1991.
- BARRIO, A. & VITAL-BRAZIL, O. - Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* (Laur.) poisons. **Acta Physiol. Latinoamericana** 1:291-308, 1951.
- BERCOVICI, D.; CHUDZINISKI, A. M.; DIAS, W. O.; ESTEVES, M. I.; HIRAICHI, E.; OISHI, N. Y.; PICARELLI, Z. P.; ROCHA, M. C.; UEDA, C. M. P. M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan** 49:69-78, 1987.
- BRAZIL, V. - Contribuição ao estudo do veneno ophidico III. Tratamento das mordeduras de cobras. **Rev. Med. de São Paulo** 6:265, 1903.
- BRAZIL, V. - *La défense contre l'ophidisme*. 2ed., Pocaí & Weiss, São Paulo, 1911. p.48.
- BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA - Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. **Rev. Med. de São Paulo** 19, 21 e 22, 1909.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. - Crotoxin, half-century of investigations of a PLA₂ neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamer.** 39: 439-448, 1989.
- BON, C.; CHANGEAUX, J-P.; JENG, T-W.; FRAENKEL-CONRAT, H. - Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.** 99:471-481, 1979.

- BREITHAUPT, H. - Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase A and its complex with crotafotin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.** **292**:271-278, 1976.
- BRENES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. - Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. **Toxicon** **25**:574-577, 1987.
- BRUSÉS, J. L.; CAPASO, J.; KATZ, E.; PILAR, G. - Specific *in vitro* biological activity of snake venom myotoxins. **J. Neurochem.** **60**:1030-1042, 1993.
- BÜLBRING, E. - Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmac.** **1**:38-61, 1946.
- BULTRÓN, E.; GUTIÉRREZ, J. M.; THELESTAM, M. - Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic PLA₂, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon** **31**:217-222, 1993a.
- BULTRÓN, E.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J. M. - Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a PLA₂ isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Biochim. Biophys. Acta** **1179**:253-259, 1993b.
- CALICH, V. L. G. & VAZ, C. A. C. - **Imunologia Básica**. 1ed.. São Paulo, Livraria Editora Artes Médicas Ltda., 1989. 376 p.
- CALMETTE, A. - Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Ann. Inst. Pasteur** **8**:275-291, 1894.
- CHANG, C. C. - Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. **Proc. Natn. Sci. Council, R.O.C.** **B9**:126-142, 1985.
- CHANG, C. & TSENG, K. - Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.** **63**:551-559, 1978.
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; SILVA LOPES, C.; DRUMOND CORDEIRO, F.; GRANIER, C.; DINIZ, C. R. - An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venoms. **Toxicon** **31**:417-425, 1993.

- CHWETZOFF, S. - On the mode of action of basic PLA₂ from *Naja nigricollis* venom. **Biochim. Biophys. Acta** **1045**:285-290, 1990.
- CHWETZOFF, S.; TSUNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; MÉNEZ, A. Nigexine, a PLA₂ from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. **J. Biol. Chem.** **264**:13289-13297, 1989.
- CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. - Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Prot. Chem.** **12**:57-64, 1993.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. - Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **82**:924-929, 1988.
- d'ALBIS, A.; COUTEAUX, R.; JANMOT, C.; ROULET, A.; MIRA, J. C. - Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals: myosin isoform analysis. **Eur. J. Biochem.** **174**: 103-110, 1988.
- DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. - Isolation and characterization of basic myotoxic PLA₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Archs. Biochem. Biophys.** **298**:135-142, 1992.
- DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A. - The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta** **1070**:455-460, 1991.
- DONATO, N. J.; MARTIN, C. A.; PEREZ, M.; NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; ETCHVERRY, M. - Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A₂ toxin. A novel growth inhibitory mechanism. **Biochem. Pharmacol.** **51**:1535-1543, 1996.
- DUCHEN, L. W.; EXCELL, B. J.; PATEL, R.; SMITH, B. - Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre necrosis and regeneration. **J. Neurol. Sci.** **21**:391-417, 1974.
- DUFTON, M. J. & HIDER, R.C. - The structure and pharmacology of elapid cytotoxins. In: (HARVEY, A. L., ed.) **Snake toxins**. New York, Pergamon Press, 1991. p. 259-302.

- EDWARDS, K.; HAWGOOD, B. J.; SMITH, C. H. - The effects of inhibitors of arachidonate metabolism on spontaneous and evoked endplate potentials at normal and crotoxin-treated frog neuromuscular junctions. **Toxicon** 28:985-988, 1990.
- FABIANO, R. J. & TU, A. T. - Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from prairie rattlesnake venom. **Biochemistry** 20:21-27, 1981.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T. W.; HSIANG, H. - Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In: (EAKER, D. & WADSTROM, T., eds.) **Natural Toxins**. Oxford, Pergamon Press, 1980. p.561-567.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. & HAWGOOD, B. J. - Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon** 22:791-804, 1984.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D. W.; HAWGOOD, B. J.; ELDER, H. Y. - Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon** 22, 85-98, 1984.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J.; HOLBROOKE, S. E.; MARSH, N. A.; SANTANA DE SA, S.; TU, A. T. - Sites of action of Mojave toxin isolated from the venom of the Mojave rattlesnake. **Br. J. Pharmac.** 69: 421-431, 1980.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J.; THEAKSTON, R. D. G. - Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. **Toxicon** 19:131-139, 1981.
- GONÇALVES, J. M. - Purification and properties of crotoxin. In: (BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V., eds.) **Venomous Animals and their Venoms**. Vol. 1. Academic Press, New York, 1956. p.261-274.
- GUTIÉRREZ, J. M. & CERDAS, L. - Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Rev. Biol. Trop.** 32:213-222., 1984.

- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENÉ, J. A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. - Myonecrosis induced by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon** 27:735-746, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. - Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon** 24: 885-894, 1986.
- GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; DÍAZ, C.; CINTRA, A. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. - Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a PLA₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Molec. Pathol.** 55:217-229, 1991.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. - Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** 22:115-128, 1984a.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G.V. - Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Molec. Pathol.** 40:367-379, 1984b.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CHAVES, F. - **La evaluación de la capacidad neutralizante de los antivenenos en America**. Publicacion del Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, 1990. 20 p.
- HANASHIRO, M. A.; DA SILVA, M. H.; BIER, O. G. - Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to *Crotalus phospholipase A*. **Immunochemistry** 15:745-750, 1978.
- HARRIS, J. B. & CULLEN, M. J. - Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc. Rev.** 3:183-211, 1990.
- HARRIS, J. B. & MACDONELL, C.A. - Phospholipase A₂ activity of notexin and its role in muscle damage. **Toxicon** 19:419-430, 1981.
- HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A.; MACDONELL, C. A. - Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins. In: (EAKER, D. & WADSTRÖM, T., eds.) **Natural Toxins**. Oxford, Pergamon Press, 1980. p.569-578.

- HARVEY, A. L. - Cytolytic toxins. In: (SHIER, W. T. & MEBS, D., eds.) **Handbook of Toxinology**. New York, Marcel Dekker, 1990. p. 1-66.
- HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon** **30**:1203-1210, 1992.
- HENDON, R. A. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Biological role of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **68**:1560-1563, 1971.
- HODGES, S. J.; AGBAJI, A. S.; HARVEY, A. L.; HIDER, R.C. - Cobra cardiotoxins: purification, effects on skeletal muscle and structure/activity relationships. **Eur. J. Biochem.** **165**:373-383, 1987.
- HOGUE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. - Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem. Inst. Butantan** **36**:109-208, 1972.
- HOMMA, M. & TU, A. T. - Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br. J. Exp. Path.** **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 and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** **26**:615-627, 1988.
- HONG, S. & CHANG, C. - Electrophysiological studies of myotoxin a, isolated from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom, on murine skeletal muscles. **Toxicon** **23**:927-937, 1985.
- JECKEL-NETO, E. A.; ROSA, A. L.; BERMUDEZ, A. L.; ITO, Y.; SATO, T.; TAUCHI, H. - Age changes in the fast-and slow-twitch muscle fibers of the rat diaphragm. **Braz. J. Morphol. Sci.** **13**: 85, 1996.

- JIANG, M.; HÄGGBLAD, J.; HEILBRONN, E.; RYDQVIST, B.; EAKER, D. - Some biochemical characteristics and cell membrane actions of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the pit viper *Agkistrodon halys* (Pallas). **Toxicon** 25:785-792, 1987.
- JOHNSON, E. K. & OWNBY, C. L. - Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. **Toxicon** 31:243-255, 1993.
- JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. - Acidentes por animais peçonhentos. In: (AMATO NETO, V. & BALDY, J. L. S., eds) **Doenças transmissíveis**, 3ª ed., São Paulo, Sarvier, 1989. p. 133-141.
- JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. - Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Med. Brasil**. 36:66-77, 1990.
- JORGE, M. T.; CARDOSO, J. L. C.; CASTRO, S. C. B. A.; RIBEIRO, L. A.; FRANCA, F. O. S.; de ALMEIDA, M. E.; KAMIGUTI, A. S.; SANTO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L.; MANCAU, J. E. C.; SBROGIO, M. L.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. - A randomised blinded comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 89:111-114, 1995.
- KAISER, I. I. & MIDDLEBROOK, J. L. - Preparation of a crotoxin neutralizing monoclonal antibody. **Toxicon** 26:855-865, 1988.
- KAISER, I. I.; MIDDLEBROOK, J. L.; CRUMINE, M. H.; STEVENSON, W. W. - Cross-reactivity and neutralization by rabbit antisera raised against crotoxin, its subunits and two related toxins. **Toxicon** 24:669-678, 1986.
- KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; DESMOND, H.; HUTTON, R. A. - Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** 29:1097-1105, 1991.
- KASTURI, S. & GOWDA, T. V. - Detection, using antibodies, of pharmacologically active sites, apart from the catalytic site, on venom phospholipase A₂. **Toxicon** 28:91-99, 1990.

- KIHARA, H.; UCHIKAWA, R.; HATTORI, S.; OHNO, M. - Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* PLA₂. **Biochem. Int.** 28:895-903, 1992.
- KINI, R. M. & EVANS, H. J. - A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon** 27:613-635, 1989.
- KOMORI, Y. & SUGIHARA, H. - Biological study of muscle degenerating hemorrhagic factors from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). **Int. J. Biochem.** 20:1417-1423, 1988.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. - Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon** 24:575-583, 1986.
- 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.
- LANDUCCI, E. C. T.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A. C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. - Crotoxin induces aggregation of human washed platelets. **Toxicon** 32:217-226, 1994.
- LEE, C. Y. & HO, C. L. - The pharmacology of phospholipases A₂ isolated from snake venoms with particular reference to their effects on neuromuscular transmission. In: (YOSHIDA, H., HAGIHARA, Y.; EBASHI, S, eds.) **Advances in Pharmacology and Therapeutics**. vol. 4. Oxford, Pergamon Press, 1982. p.37-52.
- LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J. M. - A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** 27:725-733, 1989.
- LOMONTE, B. & KAHAN, L. - Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *B. asper* (terciopelo) myotoxin. **Toxicon** 26:675-689, 1988.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. - Equine antibodies to *Bothrops asper* myotoxin II: isolation from polyvalent antivenom and neutralizing ability. **Toxicon** 28: 379-384, 1990.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MORENO, E.; CERDAS, L. - Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *B. asper* (terciopelo). **Toxicon** 25:443-449, 1987a.

- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; RAMIREZ, M.; DÍAZ, C. - Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. **Toxicon** 30:239-245, 1992.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.; ROJAS, G.; CALDERÓN, L. - Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. **Toxicon** 29:695-702, 1991.
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J. M. - Detection of proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxin in crotaline snake venoms. **Toxicon** 25:947-955, 1987b.
- MAGALHÃES, R. A.; RIBEIRO, M. M. F.; REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S. - Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 28:228-233, 1986.
- MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - **Acidentes por animais peçonhentos. Identificação, diagnóstico e tratamento.** Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993.
- McLOON, L. K.; BAUER, G.; WIRTSCHAFTER, J. - Quantification of muscle loss in the doxorubicin-treated orbicularis oculi of the monkey. Effect of local injection of doxorubicin into the eyelid. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.** 32:1667-1673, 1991.
- MEBS, D. & OWNBY, C. L. - Mytoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.** 48:223-236, 1990.
- MEBS, D. & SAMEJIMA, Y. - Isolation and characterization of myotoxic PLA₂ from crotalid venoms. **Toxicon** 24:161-168, 1986.
- 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.
- MELO, P. A. & OWNBY, C. L. - Different sensitivity of fast-and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. **Toxicon** 34:653-669, 1996.

- MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. - Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon** 31:285-291, 1993.
- MÉNEZ, A. - Molecular immunology of snake toxins. **Pharmac. Ther.** 30:91-113, 1985.
- MIDDLEBROOK, J. L. & KAISER, I. I. - Immunological relationships of phospholipase A₂ neurotoxins from snake venoms. **Toxicon** 27:965-977, 1989.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE - **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, D.F., 1997. (No prelo).
- MOLLIER, P.; CHWETZOFF, S.; FRACHON, P.; MÉNEZ, A. - Immunological properties of notexin, a potent presynaptic and myotoxic component from venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. **FEBS LETT.** 250:479-482, 1989.
- MOLLIER, P.; CHWETZOFF, S.; MÉNEZ, A. - A monoclonal antibody recognizing a conserved epitope in a group of phospholipases A₂. **Molec. Immunol.** 27:7-15, 1990.
- MOREIRA, E. G.; VASSILIEFF, V. S.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N.; ROSA, G. I. M. - Effects of crotoxin on rat's anxiety measured in elevated plus-maze. In: **Caderno de Resumos da X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Serra Negra, 1995. p.60.
- MOURA-DA-SILVA, A. M.; PAINE, M. J.; DINIZ, M. R.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. - The molecular cloning of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II PLA₂'s may imply gene duplications. **J. Mol. Evol.** 41:174-179, 1995.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. - Thrombin-line and factor X-activator componentes of *Bothrops* venom. **Thromb. Haemost.** 41:314-328, 1979.
- NAKADA, K.; NAKADA, F.; ITO, E.; INOUE, F. - Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. **Toxicon** 22:921-930, 1984.

- NASCIMENTO, N.; SEEBART, C. S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J. R.; KAISER, I. I. - Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon** 34:123-131, 1996.
- OUCHTERLONY, O. - Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Path. Microbiol. Scand.** 26:507-515, 1949.
- OWNBY, C. L. - Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: (SHIER, W. T. & MEBS, D., eds.) **Handbook of Toxinology**. New York, Marcel Dekker, 1990. p.602-654.
- OWNBY, C. L. - Pathology of rattlesnake envenomation. In: (TU, A.T., ed..) **Rattlesnake Venoms**. Marcel Dekker Inc., New York, 1982. p.163-209.
- OWNBY, C. L. & COLBERG, T. R. - Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). **Toxicon** 26:459-474, 1988.
- 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.; BJARNASON, J. W.; TU, A. T. - Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Am. J. Pathol.** 93:201-218, 1978.
- OWNBY, C. L.; CAMERON, D.; TU, A. T. - Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. **Am. J. Pathol.** 85:149-166, 1976.
- OWNBY, C. L.; FLETCHER, J. E.; COLBERG, T. - Cardiotoxin I from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle *in vivo*. **Toxicon** 31:697-709, 1993.
- OWNBY, C. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; COLBERG, T.R.; ODELL, G. V. - Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon** 20:877-885, 1982.

- PEDERSEN, J. Z.; CESARONI, P.; RUFINI, S. - Phospholipase-like myotoxins from snake venoms. In: **Abstracts of the XI European Meeting of the International Society on Toxinology**. Arezzo, Italy, 1993.
- PERALES, J.; VILLELA, C.; DOMONT, G. B.; CHOUMET, V.; SALIOU, B.; MOUSSATCHE, H.; BON, C.; FAURE, G. - Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur. J. Biochem.** **227**:19-26, 1995.
- PETERSON, G. L. - A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.** **83**:357-363, 1977.
- PRESTON, S.; 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.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M.; REICHL, A. P. & MANDELBAUM, F. R. - Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **18**:337-340, 1985b.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. - Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon** **23**:341-345, 1985a.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. - Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *B. jararacussu* snake venom. **Toxicon** **22**:339-346, 1984.
- RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. - Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **19**:333-338, 1986.
- RAPHAEL, S. S. - **Lynch's Medical Laboratory Technology**. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1983. 845 p.
- REES, B. & BILWES, A. - Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins. **Chem. Res. Toxicol.** **6**:385-406, 1993.

- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGES, N.; CECCARELLI, B. - The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience** **10**:475-489, 1983.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; JIANG, M. S.; FLETCHER, J. E. - No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a lys49 phospholipase A_2 myotoxin. **Toxicon** **33**:1479-1489, 1995.
- ROSENBERG, P. - Phospholipases. In: (SHIER, W. T. & MEBS, D., eds.) **Handbook of Toxinology**. New York, Marcel Dekker, 1990. p. 67-277.
- ROSENBERG, P. - The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: (HARRIS, J. B., ed.) **Natural Toxins**. Oxford, Clarendon Press, 1986. p. 129-174.
- ROSENFELD, G. - Moléstias por venenos animais. **Pinheiros Terap.** **17**:3-15, 1965.
- ROSENFELD, G. - Acidentes por animais peçonhentos (serpentes, aranhas, escorpiões). In: (VERONESI, R., ed.) **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p.970-983.
- ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snakebites in South America. In: (BÜCHERL, W., BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V., eds.) **Venomous Animals and their venoms**. Vol.2. Academic Press, New York, 1971. p.345-384
- ROWAN, E. G.; HARVEY, A. L.; MÉNEZ, A. - Neuromuscular effects of nigexine, a basic PLA_2 from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon** **29**:371-374, 1991.
- RUBSAMEN, K.; BREIHAUPT, H.; HABERMANN, E. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.** **270**:274-288, 1971.
- RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENSEK, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; ULY, R.; MASSOUD, R.; MORENO, R.; PEDERSON, J. Z. - Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry** **31**:12424-12430, 1992.

- RUSSEL, F. E. - Snake venom immunology: historical and practical considerations. **J. Toxicol. - Toxin. Rev.** 7:1-82, 1988.
- SANTOS, P. E. B.; SOUZA, S. D.; FREIRE-MAIA, L.; ALMEIDA, A. P. - Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. **Toxicon** 28:215-224, 1990.
- SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE-SOUZA, G. E.; GIGLIO, J. R. - Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** 28:261-273, 1990.
- SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R. S.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. - Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. III. Análise dos componentes antigênicos comuns através da dupla difusão em gel de ágar. **Mem. Inst. Butantan** 40/41:241-250, 1976/1977.
- SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R. S. - Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. **Mem. Inst. Butantan** 42/43: 325-336, 1978/1979b.
- SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F. ; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R. S. - Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Mem. Inst. Butantan** 42/43:311-323, 1978, 1979a.
- SILVA, M. A.; SILVA, J. O.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J. - Partial characterization from *Bothrops jararacussu* venom of a protein immunologically similar to crotoxin. **J. Venom. Anim. Toxins** 3(1):159, 1997.
- SJOSTROM, L.; AL-ABDULLA, I. H.; RAWAT, S.; SMITH, D. C.; LANDON, J. - A comparison of ovine and equine antivenoms. **Toxicon** 32:427-433, 1994.
- SLOTTA, K. H. & FRAENKEL-CONRAT. H. - Schlangengifte, III: Mitteilung Reinigung und Krystallization des klapperschlangengiffes. **Ber. Dtch. Chem. Ges.** 71:1076-1081, 1938.

- SMITH, M. - Isolation of hemorrhagic toxin b from *Crotalus atrox* venom, affinity, purification of antibodies and their use in neutralization of hemorrhage. Detection of the toxin in other snake venom, and immunohistochemical localization of Htb in skeletal muscle. Dissertation submitted to the Graduate College. Oklahoma State University, July, 1987.
- STRONG, P. N. - Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: relationship between biochemical and electrophysiological approaches to the mechanism of toxin action. In: (DOWDALL, M. J. & HAWTHORNE, J. N., eds.) **The Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function**. Chichester, Ellis Horwood, 1987. p.534-549.
- SUAREZ-KURTZ, G. - Release of creatine kinase from frog muscle by osmotic changes. **Am. J. Physiol.** **242**:398-403, 1982.
- TAKEKURA, H.; KASUGA, N.; YOSHIOKA, T. - Differences in ultrastructural and metabolic profiles within the same type of fibres in various muscles of young and adult rats. **Acta Physiol. Scand.** **150**:335-344, 1994.
- THEAKSTON, R. D. G.; FAN, H. W.; WARRELL, D. A.; DA-SILVA, W. D.; WARD, S. A.; HIGASHI, H. D. - Use of enzyme immunoassay to compare the effect and assess the dosage regiments of three Brazilian *Bothrops* antivenoms. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **47**:593-604, 1992.
- TRÉMEAU, O.; BOULAIN, J. C.; COURDERC, J.; FROMAGEOT, P.; MÉNEZ, A. - A monoclonal antibody which recognized the functional site of snake neurotoxins and which neutralizes all short-chain variants. **FEBS LETT.** **208**:236-240, 1986.
- TU, A.T. - **Rattlesnake venoms: their actions and treatment**. New York, Marcel Dekker, 1982.
- TU, A. T. - **Venoms: chemistry and molecular biology**. New York, J. Wiley & Sons, 1977. 560p.
- TU, A. T. & MORITA, M. - Attachment of rattlesnake venom myotoxin a to sarcoplasmic reticulum: peroxidase conjugated method. **Br. J. Exp. Pathol.** **64**:633-637, 1983.

- UTASINCHAROEN, P.; BAKER, B.; TU, A. T. - Binding of myotoxin a to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: a structural study. **Biochemistry** **30**:8211-8216, 1991.
- VIDAL, J. C. & STOPPANI, A. O. - Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Archs. Biochem. Biophys.** **145**:543, 1971.
- VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: (CORBETT, C. E., ed.) **Farmacodinâmica**. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p.1044-1074.
- VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan** **33**:981-992, 1966.
- VITAL BRAZIL, O. - Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Med. Brasil.** **26**:212-218, 1980.
- VITAL BRAZIL, O. - Venoms: their inhibitory action on neuromuscular transmission. **Int. Encycl. Pharmacol. Ther.** **14**:145-167, 1972.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; HELUANY, N. F. - Mode of action of crotoxin at the guinea-pig neuromuscular junction. **Toxicon** **17** (Suppl. n° 1):17, 1979.
- VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J.; LAURE, C. J. - Repetitive muscle responses induced by crotoxin. **Toxicon** **17**:61-67, 1979.
- VOLPE, P.; DAMIANI, E.; MAURER, A.; TU, A. T. - Interaction of myotoxin a with the Ca^{2+} -ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Archs. Biochem. Biophys.** **246**:90-97, 1986.
- WARD, R. J.; MONESI, N.; ARNI, R. K.; LARSON, R. E.; PACO-LARSON, M. L. - Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Gene** **156**:305-306, 1995.
- YAGIHASHI, S.; NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H. - Characterization of Ac_3 -proteinase from the venom of *Agkistrodon acutus* (hundred-pace snake). **Int. J. Biochem.** **18**:885-892, 1986.
- YUDKOWSKY, M. L.; BEECH, J.; FLETCHER, J. E. - Myotoxin a reduces the threshold for calcium-induced calcium release in skeletal muscle. **Toxicon** **32**:273-278, 1994.

- ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G. M.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R.; LIMA, M. E. - Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon** **34**:807-819, 1996.
- ZAMUNÉR, S. R., PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - The screening of *Bothrops* venoms for neurotoxic activity using the chick *biventer cervicis* preparation. In: 5th Pan American Symposium, Animal, Plant and Microbial Toxins. Frederick, Maryland, USA, 1995. **Livro de Resumos**. USA, 1995. p. 145.