

Caroline Ribeiro de Borja Oliveira

ESTUDO COMPARATIVO DA
NEUROTOXICIDADE DE VENENOS DE
Bothrops neuwiedi DE DIFERENTES
PROCEDÊNCIAS E ISOLAMENTO PARCIAL DE
UM COMPONENTE NEUROTÓXICO DO
VENENO MAIS ATIVO

UNICAMP

Campinas

1998

Caroline Ribeiro de Borja Oliveira

**ESTUDO COMPARATIVO DA NEUROTOXICIDADE DE
VENENOS DE *Bothrops neuwiedi* DE DIFERENTES
PROCEDÊNCIAS E ISOLAMENTO PARCIAL DE UM
COMPONENTE NEUROTÓXICO DO VENENO MAIS
ATIVO**

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

Orientador: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Co-orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

UNICAMP

Campinas

1998



UNICAMP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

PROF. DRA. LÉA RODRIGUES SIMIONI

Membros:

1. PROF. DRA. LÉA RODRIGUES SIMIONI

2. PROF. DR. MARCOS DIAS FONTANA

3. PROF. DR. JOSÉ ROBERTO GIGLIO

Simioni
Fontana
J.R. Giglio

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

Data:

16/12/98

Dedicatória

*A meus queridos pais, Edson e Celina, e
à doce Terezinha, por toda a ajuda que
possibilitou a concretização deste
trabalho.*

A minha preciosa irmã, Pauline.

*A meu marido e companheiro de todas
as horas, Alberto, pelo infinito amor,
incentivo e compreensão.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, pela valiosa orientação, paciência marcante, apoio moral, dedicação, calorosa simpatia e incentivo constante e, acima de tudo, pela confiança. Muito obrigada por tudo !

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela orientação, seriedade e importante ajuda.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite, pela amizade sincera, indispensável ajuda, invejável paciência e pelos sábios ensinamentos que utilizarei durante toda a vida.

À Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi, pelo grande auxílio e orientação, entusiasmo, intenso afeto, e pela grande disposição em todos os momentos que necessitei.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio, pela simpatia e pela valiosa contribuição para o engrandecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pela alegria contagiante, bom humor, amizade e grande colaboração prestada.

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, por toda a ajuda e pelas preciosas sugestões que enobreceram esta tese.

A minha grande amiga Yoko Oshima Franco, por apontar e iluminar os caminhos do estudo científico e da vida, poupando-me de muitos tropeços, por toda a ajuda e pelo carinho.

A Beike H. Kassab, pela amizade, empenho e disposição no complexo estudo bioquímico e pela realização da cromatografia.

A Andreimar Martins Soares, pela eletroforese, de extrema importância para o enriquecimento deste trabalho.

Aos amigos André, Chariston, Stella, Patrícia, Marta, Simone e Edson, pela preciosa colaboração, solidariedade e amizade.

Aos amigos Wanderley (a quem agradeço por tanta compreensão), Gislaine, Rita e Andressa, pela boa disposição nas etapas burocráticas.

Ao Apoio Didático, pelos bons serviços prestados.

Às colegas do CCI, pela já famosa disposição em prestar ajuda.

Ao Instituto Butantan, Cevap, Instituto de Biologia da UNICAMP e Instituto Eva, pelo fornecimento dos venenos utilizados neste trabalho.

Ao CNPq e Faep, pelo imprescindível suporte financeiro.

*A DEUS, sem o qual não sou nada,
meu especial agradecimento.*

Lista de Abreviaturas

ACh	acetilcolina
d-tc	d-tubocurarina
DL	dose letal
Fig	figura
K⁺	potássio
KCl	cloreto de potássio
P2	fração correspondente ao pico 2
P3	fração correspondente ao pico 3
Tab	tabela

Lista de Tabelas e Figuras

LISTA DE TABELAS

<i>Tab.</i>	<i>Pág.</i>	<i>Título</i>
<i>1</i>	<i>19</i>	<i>Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta, incubada com os lotes de veneno procedentes do Estado de São Paulo.</i>
<i>2</i>	<i>20</i>	<i>Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, incubada com os lotes de veneno oriundos do Rio Grande do Sul.</i>
<i>3</i>	<i>20</i>	<i>Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta, incubada com o lote de veneno procedente de Minas Gerais.</i>
<i>4</i>	<i>21</i>	<i>Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina e ao potássio, obtida após 120 minutos de incubação com os diferentes lotes de veneno em músculo de pintainho.</i>

LISTA DE FIGURAS

Fig	Pág	Título
1	22	<i>Comparação da atividade bloqueadora induzida por todas as amostras estudadas sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta, em 120 min de incubação.</i>
2	23	<i>Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil induzido pelas amostras procedentes de Minas Gerais e de São Paulo sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta.</i>
3	24	<i>Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil induzido pelas amostras procedentes do Rio Grande do Sul sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta.</i>
4	25	<i>Curva dose-resposta do efeito bloqueador do lote de veneno (SP7) sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta.</i>
5	26	<i>Registro miográfico do efeito do lote SP7 (V) sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta.</i>
6	27	<i>Registro miográfico do efeito do lote SP7 (V) sobre a preparação biventer cervicis de pintainho curarizada.</i>
7	28	<i>Representação gráfica do efeito do lote SP7 sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estímulo indireto, a 24°C, e sua atividade a 37°C.</i>

- 8 30 *Curva dose-resposta do efeito bloqueador da amostra SP7 sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta.*
- 9 30 *Registro miográfico do efeito do lote mais ativo, SP7 (V), sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, na dose de 20 µg/ml.*
- 10 31 *Registro miográfico do efeito do lote SP7 (V) sobre a preparação de camundongo submetida a estímulo direto (D), a 50 µg/ml.*
- 11 31 *Representação gráfica do efeito bloqueador do lote de veneno SP7 sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta e na ausência de cálcio.*
- 12 33 *Perfil eletroforético dos diversos venenos estudados.*
- 13 36 *Perfil de eluição resultante da cromatografia de SP7.*
- 14 36 *Representação gráfica do bloqueio induzido pelas frações mais ativas obtidas do fracionamento do lote SP7, sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, submetida a estimulação indireta.*
- 15 37 *Registro miográfico do bloqueio induzido pelas frações mais ativas, sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta.*
- 16 38 *Representação gráfica do efeito induzido pela fração P2, sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, submetida a estimulação indireta à temperatura ambiente, e sua atividade a 37 °C.*

- 17 38 *Representação gráfica do efeito induzido pela fração P3, sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, submetida a estimulação indireta à temperatura ambiente, e sua atividade a 37 °C.*
- 18 39 *Registro miográfico do efeito induzido pelas frações ativas sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta e a 24 °C.*

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi comparar a neurotoxicidade de dezesseis lotes de venenos de *B. neuwiedi*, sendo sete procedentes de São Paulo, oito do Rio Grande do Sul e um de Minas Gerais, visando verificar a existência de um lote de veneno mais ativo, do qual se isolaria parcialmente o componente neurotóxico.

Para avaliar a atividade neurotóxica dos vários venenos estudados, foi realizado um 'screening', utilizando-se a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta. Avaliou-se também o efeito do veneno mais ativo sobre o músculo de ave sob estimulação elétrica direta, bem como sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo submetida a estimulação direta e indireta. Nesses casos a preparação foi previamente curarizada. Os diversos lotes de veneno foram comparados também por meio de eletroforese (PAGE-básica). O lote que apresentou efeito neuromuscular mais acentuado foi fracionado por meio de cromatografia líquida. Realizou-se, em seguida, o ensaio das frações resultantes nas preparações neuromusculares de ave e camundongo.

Os venenos de *B. neuwiedi* exibiram diferenças notáveis quanto a sua atividade bloqueadora neuromuscular e, de modo geral, os venenos procedentes do Estado de São Paulo e o de Minas Gerais mostraram-se mais ativos que as amostras oriundas do Rio Grande do Sul. Apesar da diversidade demonstrada (2

a 90% de bloqueio, na dose de 20 $\mu\text{g/ml}$), todos os venenos induziram bloqueio dose-dependente e irreversível, além de contraturas, e inibiram a resposta ao K^+ , o que indicou sua miotoxicidade. Quatorze entre os dezesseis lotes preservaram a resposta contraturante à ACh em doses inferiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$), ainda que na eminência do bloqueio, indicando a integridade dos receptores nicotínicos pós-sinápticos. Os padrões eletroforéticos de 5 entre os 6 venenos mais ativos apresentaram uma banda de caráter básico que não estava presente nos demais venenos.

O veneno mais potente também foi eficaz em inibir a resposta contrátil a estímulo elétrico direto e indireto do músculo de camundongo, bem como a contração a estímulo elétrico direto em músculo de ave. Seu efeito bloqueador foi significativamente diminuído a 24°C ou na ausência de cálcio; nessa condição, não houve inibição da resposta ao K^+ . Sob estimulação indireta, a preparação de pintainho foi mais sensível à ação do veneno do que a de camundongo; na exposição à estimulação direta, observou-se o inverso.

Após o fracionamento, a atividade neuromuscular foi recuperada nos picos 2 e 3 do perfil cromatográfico. Essas frações causaram bloqueio mais intenso do que o produzido pelo veneno bruto, com total manutenção da resposta ao agonista. Enquanto o pico 2 bloqueou totalmente a contração à adição de K^+ , o pico 3 causou somente uma inibição parcial da mesma, sugerindo que a miotoxicidade esteja mais concentrada no pico 2. Em temperatura ambiente

(24°C), a atividade neuromuscular de ambas as frações ativas foi reduzida e seu efeito inibidor sobre a resposta ao K^+ foi abolida.

Os resultados apresentados corroboram as suposições de que o veneno de *B. neuwiedi* age preferencialmente em sítios pré-sinápticos, além de possuir atividade sobre a membrana muscular, e que essas ações estão relacionadas com sua atividade enzimática. Sugere-se ainda que essas ações podem variar de acordo com a procedência do veneno e que são devidas a componente(s) neurotóxico(s) e/ou miotóxico(s).



Bothrops neuwiedi pauloensis. Jaguariúna-SP

1. Introdução

1.1. As peçonhas e seus efeitos farmacológicos

O estudo farmacológico dos venenos animais e de suas toxinas é de extrema importância, pois somente através dele é possível a aquisição de conhecimento adequado da fisiopatologia dos envenenamentos e a instituição de medidas racionais e eficientes em seu tratamento. Além disso, auxilia no esclarecimento de vários fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos do organismo, no estudo dos quais as toxinas atuam como valiosos instrumentos de pesquisa, bem como das relações taxonômicas entre animais peçonhentos (MACCONNEL *et al.*, 1976; MYERS & DALY, 1976).

Os ofídios peçonhentos brasileiros são os integrantes da família Elapidae, às quais pertence o gênero *Micrurus* (corais), e à família Viperidae que incluem os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Lachesis* (surucucus) e *Bothrops* (jararacas). O gênero *Bothrops* se destaca por sua ampla distribuição geográfica e pela grande incidência em acidentes provocados (ROSENFELD, 1971). Seus representantes secretam peçonhas capazes de causar notáveis efeitos locais, caracterizados por hemorragia, necrose e edema, além dos efeitos sistêmicos que podem levar as

vítimas a óbito (MANDELBAUM, ASSAKURA, REICHL, 1984), sendo portanto diferentes dos gêneros *Micrurus* e *Crotalus* que são predominantemente neurotóxicos.

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos na América do Sul e 88-89% no Brasil. Vivem em áreas úmidas, plantações, pastos e em lugares inabitados por humanos e alimentam-se principalmente de roedores (SOERENSEN, 1990; GRUNERT & GRUNERT, 1969). Possuem hábitos noturnos e são consideradas as serpentes mais agressivas encontradas no Brasil (FRANÇA & FAN, 1992).

Os sinais e sintomas do envenenamento botrópico se manifestam por meio de dor intensa, edema acentuado e progressivo no local da picada, hemorragia, necrose e alterações do sistema coagulante. A hemorragia e a necrose são consideradas, até os dias atuais, sérios problemas clínicos, já que sua ocorrência pode ser prevenida somente se o antiveneno for administrado imediatamente após o envenenamento. Nos acidentes mais graves, podem ocorrer destruição e perda do membro atingido ou até a morte, em 2,4% dos picados. Nos casos em que o antiveneno não é administrado, até 8% destes podem evoluir para êxito letal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981). A morte, em geral, ocorre principalmente devido à insuficiência renal aguda, hemorragia em órgãos vitais e choque (AMARAL *et al.*, 1986; KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1991).

No princípio deste século, VITAL BRAZIL combateu tenazmente o tratamento popular a que eram submetidos os picados por serpentes e orientou a população sobre seus efeitos nocivos, enfatizando a eficácia terapêutica do soro antiofídico (BRAZIL, 1911). Atualmente, os venenos de serpentes e seus efeitos clínicos ainda ocupam grande espaço nas pesquisas científicas do mundo, uma vez que os acidentes ofídicos são freqüentes e graves. Além disso, esses venenos e, mais particularmente, as toxinas deles isoladas têm sido úteis também como instrumentos de pesquisa no desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da degeneração e regeneração muscular (HARRIS, JOHNSON, MACDONELL, 1980; GUTIÉRREZ, OWNBY, ODELL, 1984).

O modo de ação dos venenos ofídicos e de suas toxinas vem sendo objeto de numerosas pesquisas nestes últimos anos. Os grandes progressos alcançados neste setor são devidos não somente ao emprego dos mais variados métodos e técnicas de investigação farmacológica, mas também à separação dos constituintes das peçonhas em estado de pureza (VITAL BRAZIL, 1982).

Devido à complexidade dos venenos animais, o conhecimento de suas propriedades é ainda limitado. Entretanto, tem-se alcançado grande avanço, resultante das incessantes pesquisas realizadas. De modo geral, os agentes responsáveis pela toxicidade dos venenos são representados por componentes

de natureza protéica, sem ou com atividade enzimática (como as hialuronidases, as proteases e as fosfolipases). Componentes de peso molecular menor e estrutura química variável, como histamina, serotonina, polipeptídeos, lisolecitinas, compostos adenílicos, podem ser relacionadas com outros efeitos dos envenenamentos no homem e nos animais de laboratório (ALMEIDA, 1985).

Os venenos de serpentes são complexas misturas de toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos que variam, em sua composição, conforme sua família, gênero e espécie (LEITE *et al.*, 1992). Essa variação também pode ocorrer entre os venenos das espécies de um mesmo gênero, como tem sido descrito por vários autores a respeito do veneno do gênero *Bothrops* (MEIER, 1986; TABORSKA & KORNALIK, 1985; JIMENEZ-PORRAS, 1967).

Diversos componentes isolados do veneno destas peçonhas, tais como **fatores hemorrágicos** (MANDELBAUM *et al.*, 1984), **enzimas que atuam nos distúrbios de coagulação** (NAHAS, KAMIGUTI, BARROS, 1979; HOFMANN & BON, 1987), **enzimas proteolíticas** (ASSAKURA *et al.*, 1985; TANIZAKI *et al.*, 1989) e **miotoxinas** (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991) são responsáveis pelos sintomas clínicos do envenenamento botrópico. Outros componentes, bem como as **neurotoxinas**, separadas, caracterizadas e

estudadas em preparações biológicas e animais íntegros não parecem desempenhar papel relevante no envenenamento botrópico.

RODRIGUES-SIMIONI, BORGES, CECCARELLI (1983) estudaram a atividade neurotóxica presente no veneno de *Bothrops jararacussu* e de sua fração ativa, utilizando preparações isoladas de músculo peitoral e nervo ciático de rã. Em 1988, HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* fracionaram o veneno, purificaram a fração ativa na junção neuromuscular e a caracterizaram como sendo uma miotoxina, a bothropstoxina-I (BthTX-I), o componente responsável pela atividade neurotóxica do veneno bruto. Estudos subseqüentes demonstraram que a BthTX-I induzia bloqueio da resposta muscular evocada em preparações neuromusculares de camundongos e pintainhos, além de contratura e despolarização (HELUANY *et al.*, 1992).

As **neurotoxinas** (NTXs), presentes nas peconhas, podem agir pré-juncionalmente, interferindo na liberação de acetilcolina, ou pós-juncionalmente, bloqueando os receptores para a acetilcolina. As neurotoxinas pré-sinápticas, caracterizadas por apresentarem estrutura de fosfolipase A₂, são os integrantes mais tóxicos dos venenos ofídicos. A preparação *biventer cervicis* de pintainho, em experimentos *in vivo*, permite diferenciar o mecanismo de ação de uma neurotoxina como pré ou pós-sináptico, enquanto a preparação nervo frênico-diafragma necessita de prévia desnervação para desempenhar tal papel. A

presença de contratura à adição de agonistas colinérgicos, após bloqueio da resposta contrátil evocada, pode indicar atividade em sítios pré-sinápticos. A atividade pós-sináptica pode ser identificada pela ausência de resposta aos agonistas colinérgicos e à estimulação indireta sem afetar as respostas ao aumento da concentração de potássio ou a estímulo direto (BARRET & HARVEY, 1979).

Algumas neurotoxinas apresentam, geralmente em doses maiores, ação miotóxica, inibindo a excitabilidade da membrana das fibras musculares (VITAL BRAZIL, 1982). A ação miotóxica pode ocorrer diretamente sobre a fibra muscular, danificando-a (HARRIS *et al.*, 1980; GUTIÉRREZ *et al.*, 1984), ou indiretamente, ocasionando isquemia e levando o tecido à necrose (OWNBY *et al.*, 1982; GUTIÉRREZ *et al.*, 1984). Muitas miotoxinas, ou seja, toxinas capazes de atuar especificamente nas fibras musculares sem afetar outros tecidos, têm sido isoladas dos venenos de *Bothrops*. GUTIÉRREZ *et al.* (1984) isolaram do veneno de *B. asper* uma miotoxina que supostamente devia parte de seu efeito a sua atividade fosfolipásica. O mesmo mecanismo foi proposto para a notexina (HARRIS & MACDONNEL, 1981), a crotoxina (HAWGOOD & SMITH, 1989) e a taipoxina (HARRIS & MALTIN, 1982). A crotoxina e a taipoxina atuam seletivamente sobre a junção neuromuscular, inibindo a transmissão nervosa pré-sinápticamente. Produzem uma alteração trifásica na liberação evocada do neurotransmissor (LEE & HO, 1982; CHANG, 1985; STRONG, 1987; HAWGOOD

& SMITH, 1989), que se caracteriza por uma inibição inicial (atribuída à ligação da toxina ao sítio pré-sináptico específico), seguida por uma facilitação (devido ao aumento da liberação de acetilcolina) e uma progressiva inibição da resposta muscular até bloqueio total e irreversível.

1.2. *Bothrops neuwiedi*

Várias são as espécies de *Bothrops* existentes no território nacional. Dentre elas, a *B. neuwiedi*, popularmente conhecida como jararaca-pintada, jararaca do rabo branco ou boca-de-sapo, apresenta ampla distribuição geográfica e exibe várias subespécies. A *B. neuwiedi pauloensis* é a representante dessa espécie que ocorre em regiões abertas, como campos e cerrados, nas zonas central e sul-ocidental do Estado de São Paulo. Assim como todas as outras espécies de *Bothrops*, são solenóglifas, isto é, possuem presas, providas de canal central por onde passa o veneno, que se localizam anteriormente no maxilar superior. O canal central situa-se a certa distância da extremidade da presa, o que possibilita o escoamento do veneno, ainda que a ponta penetre em uma estrutura resistente como osso ou tendão (FONSECA, 1949).

Vários estudos têm sido realizados com o veneno de *B. neuwiedi*, visando conhecer suas propriedades e composição. Em 1971, VIDAL e STOPPANI purificaram desse veneno duas proteínas com atividade fosfolipásica (P-1 e P-2), correspondentes ao segundo e terceiro picos do perfil de eluição. NAHAS, KAMIGUTI, BARROS (1979) verificaram que a peçonha desencadeava coagulação *in vitro*, através de atividade similar à da trombina, ativação do fator X e da protombina. Em 1984, MANDELBAUM *et al.* isolaram do veneno de *B. neuwiedi* uma fração designada "neuwiedi hemorrhagic factor" (NFH), composto de duas proteínas, NHFa e NHFb, com peso molecular de 46,000 e 58,000, respectivamente. Em seguida, QUEIROZ *et al.* (1985) averiguaram que essa fração (NFH) produzia, além de hemorragia, uma série de lesões locais (hemorragia, mionecrose e necrose), de forma indireta, causadas pelo veneno total, como já anteriormente mencionado. Em 1991, MORENO & PRADO-FRANCESCHI verificaram a atividade bloqueadora e contraturante do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre o músculo *biventer cervicis* de ave.

Recentemente, ZAMUNÉR, PRADO-FRANCESCHI, RODRIGUES-SIMIONI (1997), ao avaliarem as diferenças interespecíficas dos efeitos neurotóxico e miotóxico de alguns venenos botrópicos, estudaram os efeitos causados pela peçonha de *B. neuwiedi* na junção neuromuscular de pintainhos, observando ser a intensidade do bloqueio dose-dependente e sugerindo que o mesmo ocorria por um mecanismo pré-sináptico, já que mantinha a resposta ao agonista acetilcolina.

1.3. Objetivos

No presente trabalho, foram estudados 16 lotes de veneno bruto de *B. neuwiedi*, visando-se: **(1)** comparar seus padrões eletroforéticos com suas atividades neurotóxicas, **(2)** determinar o lote mais ativo, **(3)** isolar parcialmente os constituintes do lote mais ativo e **(4)** encontrar a subfração ativa sobre a junção neuromuscular.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4 a 8 dias), fornecidos pela Granja Ito S/A, e camundongos da linhagem SWISS, com peso entre 18 e 30 g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

2.2. Venenos

Os venenos de *B. neuwiedi* foram gentilmente fornecidos pelo Instituto Butantan, Instituto Eva e Cevap. Os identificados como SP1, SP3, SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 e SP9 são procedentes do Estado de São Paulo, os denominados RS1, RS2, RS3, RS4, RS5, RS6, RS7 e RS8 são oriundos do Rio Grande do Sul e o lote chamado de MG1 é originário de Minas Gerais. SP6 foi utilizado neste trabalho somente no estudo dos padrões eletroforéticos, pois o mesmo já foi estudado quanto a sua atividade neurotóxica por ZAMUNÉR *et al.* (1997).

2.3. Ensaio biológicos

2.3.1. Preparação músculo biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de GINSBORG & WARRINER (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 25,0 e C₆H₁₂O₆ 11,65. A solução foi arejada de modo constante com carbogênio (mistura 95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 0,5 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximos e as contraturas em resposta à adição de KCl (13,4 mM) e ACh (120 µM) foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM. O registro das contraturas para K⁺ e ACh foram realizados com ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição de veneno) e no final do experimento (após 120 min de incubação com o veneno).

Na preparação de ave, as concentrações de veneno bruto utilizadas foram 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/ml, para o veneno mais potente, e 10, 20, 50 e 100 µg/ml para os venenos menos ativos. No estudo do veneno mais ativo,

utilizou-se também, em alguns experimentos, d-tubocurarina na concentração de 5 a 8 µg/ml (até total curarização) e, em outros, a temperatura foi mantida a 24°C, durante a incubação com o veneno.

2.3.2. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946). Os animais foram sacrificados por meio de secção e sangria dos vasos do pescoço, depois de serem anestesiados com éter etílico. Após a retirada do diafragma, juntamente com o nervo frênico correspondente, o mesmo foi fixado em cuba contendo 5 ml da solução nutritiva Tyrode, com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9; C₆H₁₂O₆ 11,1. A solução foi aerada constantemente com carbogênio e mantida a 37°C. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 2 g/cm. A preparação foi exposta a estimulação (estimulador Grass S48) indireta (nervo frênico), com pulsos supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, ou direta, por meio de eletrodo conectado ao músculo diafragma previamente curarizado (d-tc 5 µg/ml), com pulsos supramaximais de 2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência. As contrações musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutor isométrico Load Cell BG-10 GM.

Para a preparação de camundongo, utilizaram-se concentrações de 20 e 50 µg/ml de veneno bruto (somente o lote mais ativo). A d-tubocurarina foi

utilizada em alguns experimentos na concentração de 5 µg/ml. Foram realizados alguns ensaios com ausência de cálcio na solução nutritiva e presença de estrôncio durante a incubação com o veneno mais ativo.

2.4. Ensaio bioquímicos

2.4.1. Eletroforese (PAGE-Básica)

A eletroforese para proteínas básicas foi realizada de acordo com o método descrito por REISFELD, LEWIS, WILLIAMS (1962) com algumas modificações, por Andreimar Martins Soares, do Departamento de Bioquímica da USP (Ribeirão Preto). Utilizou-se PAGE a 10% (w/v), eliminando-se, porém, o gel de concentração e executando-se uma pré-corrída (sem amostra) por 1 h a 15 mA. A eletroforese foi feita em tampão beta-alanina: ácido acético 0,03 M, pH 4,5. As amostras (os vários lotes de veneno bruto), com cerca de 5 a 50 µg de proteínas, foram dissolvidas no tampão do eletrodo, contendo glicerol a 50% (v/v). A corrida teve um tempo de duração de 1h10 min a 10 mA constante e voltagem variável de 120-170 V.

O gel foi corado por 15 min em Coomassie Blue G-250 0,1% (w/v), descorado em ácido acético 7% (v/v) e seco em papéis celofanes.

2.4.2. Fracionamento por cromatografia líquida

O fracionamento do veneno de *B. neuwiedi* foi realizado através de cromatografia líquida em Equipamento Waters LC modelo 650E, Advanced Protein Purification System, acoplado ao monitor Waters 600E, em coluna Superdex - G75 AD₁ (1 cm x 60 cm), com volume de 47,1 cm³. A coluna foi equilibrada com bicarbonato de amônio (Ambic) 0,05 M, utilizando-se um gradiente isocrático, com fluxo de 0,2 ml/min. À coluna, aplicaram-se 20,0 mg do veneno de *B. neuwiedi*, diluído em 500 µl de Ambic 0,05 M, pH 8,0. O volume coletado de cada fração foi de aproximadamente 2 ml. Em seguida, as frações foram liofilizadas e ensaiadas em preparação *biventer cervicis* de pintainho nas concentrações de 10 e 20 µg/ml.

2.5. Análise estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos ± erro padrão. A significância foi obtida através do teste não-pareado *t*-Student e considerada como $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Estudo miográfico das amostras de veneno bruto

3.1.1. Preparação *biventer cervicis* de pintainho

3.1.1.1. Estimulação indireta

Em experimentos realizados para a determinação do tempo necessário para a obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil do músculo, foram utilizadas quatro diferentes doses de veneno, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$, para todos os lotes de veneno bruto, como ilustrado nas Tabelas 1, 2 e 3, além das doses de 1 e 5 $\mu\text{g/ml}$ para o lote mais ativo, denominado SP7. Quando tentamos estabelecer uma ordem quanto à potência de atividade entre as amostras estudadas, não houve uma sequência semelhante à medida que variávamos a dose escolhida para a comparação. Porém, a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ foi selecionada para tal função por discriminar melhor a atividade neuromuscular de cada amostra. Entre os sete venenos procedentes do Estado de São Paulo e o veneno oriundo de Minas Gerais, cinco (SP7, SP3, SP9, MG1 e SP8, nesta ordem) apresentaram maior atividade bloqueadora neuromuscular sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, em 120 minutos de incubação, que todas as amostras procedentes do Rio Grande do Sul, o que denota que, de modo geral, os venenos paulistas e o de Minas Gerais demonstraram ser mais

ativos que os demais (Figura 4). Contudo, o veneno menos ativo (SP4) entre os 16 lotes ensaiados é procedente de São Paulo. Este lote não induziu bloqueio significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle nem mesmo na concentração de $50 \mu\text{g/ml}$. Apesar de não termos informações sobre a idade das serpentes que forneceram os lotes de veneno estudados, sabe-se que um (RS3) dos dois lotes menos ativos era pertencente a uma serpente jovem e que uma (MG1) das amostras mais ativas foi obtida de serpente adulta.

Apesar da grande variação de potência, o bloqueio neuromuscular mostrou-se invariavelmente irreversível e, em geral, dose-dependente. A partida de veneno identificada como lote SP7 apresentou uma capacidade bloqueadora muito superior à dos demais lotes, ou seja, $10 \mu\text{g/ml}$ determinaram 50% de bloqueio em $46,5 \pm 3,5$ minutos ($n=4$), enquanto que, na incubação com os amostras restantes, esta dose não apresentou uma resposta significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Na concentração de $1 \mu\text{g/ml}$, a inibição da resposta contrátil atingiu somente $43,7\% \pm 7,2$ em 120 min. de incubação.

A Figura 1 representa os diversos níveis de bloqueio obtidos com as diferentes amostras estudadas. As Figuras 2 e 3 apresentam os gráficos do bloqueio induzido pelos diversos lotes nas doses de 20 e $50 \mu\text{g/ml}$ e a Figura 4 ilustra a curva dose-resposta do lote mais ativo (SP7). A Figura 5 representa o registro miográfico da inibição causada pela amostra SP7.

Como foi observado, o veneno em estudo exibe um perfil farmacológico típico de veneno botrópico em doses superiores a $50 \mu\text{g/ml}$ (ZAMUNÉR *et al.*,

1997). Por outro lado, mesmo os venenos pouco ativos causaram contratatura, algum nível de bloqueio e, algumas vezes, contrações espontâneas com doses iguais a 100 µg/ml (Tabela 4). Nesta dose, todos os lotes induziram porcentagens de bloqueio significantes ($p < 0,05$).

Realizaram-se também experimentos com o veneno mais ativo (SP7), em temperatura ambiente (24°C), na dose de 50 µg/ml, nos quais o efeito do veneno mostrou-se significativamente reduzido ($p < 0,05$ em t_{40} - t_{120}). Nestas condições, o bloqueio alcançou somente $30,7 \pm 8,0$ em 120 minutos de incubação. Esses resultados foram apresentados na Figura 7.

Nos experimentos-controle, o registro das contrações permaneceu estável (99,5% de resposta durante 120 minutos em Krebs; $n=4$).

3.1.1.2 - Resposta contraturante à adição de ACh e K^+

A incubação da preparação com todos os lotes de veneno de *B. neuwiedi*, de modo geral, reduziu visivelmente a resposta contraturante ao potássio, mantendo total ou parcialmente a resposta à adição da acetilcolina, sempre que a dose do veneno utilizada fosse igual ou inferior a 20 µg/ml (Tabela 4). No entanto, nas doses do veneno superiores a 20 µg/ml, ou seja, 50 e 100 µg/ml, a contratatura induzida pela ACh mostrou-se, com frequência, parcialmente inibida e, poucas vezes abolida. Somente as amostras SP3 e RS8 promoveram bloqueio da resposta à adição de ACh na concentração de 20 µg/ml.

Nos ensaios realizados a 24°C com o veneno mais ativo (SP7), o bloqueio da resposta contraturante de ACh na dose de 50 µg/ml foi significativamente menos intenso ($31,3 \pm 14,4$). Já a resposta à adição de potássio, apesar de estar visivelmente inibida pela baixa temperatura, permaneceu presente (e com intensidade semelhante) ao final do experimento.

Nos experimentos controle, a resposta à ACh permaneceu inalterada, porém a resposta ao K⁺ foi inibida em cerca de 40%.

3.1.1.3. Tratamento com d-tubocurarina

Preparações de pintainho (n=3) foram curarizadas (d-tc 5 µg/ml) e incubadas com o lote de veneno mais ativo (SP7 - 20 µg/ml), durante 90 min. Sucessivas lavagens não reestabeleceram (em 20 min) a resposta à estimulação elétrica indireta, embora a contração em resposta à adição ao banho de ACh (20 µg/ml) estivesse presente e fosse de amplitude semelhante à do controle (Figura 6).

3.1.1.4. Estimulação direta

Somente SP7 foi utilizado nos experimentos para obtenção de bloqueio das contrações em resposta a estímulo elétrico indireto e direto, devido a sua elevada potência. A preparação *biventer cervicis* de pintainho foi previamente tratada com d-tubocurarina na dose de 8 µg/ml (dose que foi, neste caso, necessária para a curarização total) e submetida à estimulação direta antes e

120 minutos depois da incubação com o veneno. O bloqueio em presença do veneno somente ocorreu quando se utilizou a dose de 50 µg/ml (60% de bloqueio em 120 min; n=3) (não ilustrado em Figura).

Tab. 1 - Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta, incubada com os lotes de veneno procedentes do Estado de São Paulo. Não estão relacionadas as doses que não induziram tal margem de bloqueio.

<i>Lote</i>	<i>Dose (µg/ml)</i>	<i>Tempo para 50% de bloqueio (min)</i>	<i>n</i>
<i>SP1</i>	100	80,0 ± 10,7	3
<i>SP3</i>	20	120,0 ± 7,2	5
	50	69,5 ± 7,7	6
	100	60,0 ± 9,1	7
<i>SP4</i>	100	110 ± 13,9	3
<i>SP5</i>	50	120,0 ± 7,0	3
	100	100,0 ± 20,7	3
<i>SP7</i>	5	64,5 ± 4,3	4
	10	46,5 ± 3,5	4
	20	49,5 ± 7,4	6
	50	30,7 ± 3,0	3
	100	24,0 ± 4,2	3
<i>SP8</i>	50	93,7 ± 12,0	3
	100	78,3 ± 5,2	3
<i>SP9</i>	20	65,5 ± 4,9	5
	50	84,4 ± 17,2	5
	100	50,0 ± 14,3	5

Os resultados estão expressos pela média de experimentos ± erro padrão.

Tab. 2 - Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação indireta, incubada com os lotes de veneno oriundos do Rio Grande do Sul. Não estão relacionadas as doses que não induziram tal margem de bloqueio.

<i>Lote</i>	<i>Dose (µg/ml)</i>	<i>Tempo para 50% de bloqueio (min)</i>	<i>n</i>
<i>RS1</i>	<i>100</i>	<i>108,3 ± 4,4</i>	<i>3</i>
<i>RS2</i>	<i>100</i>	<i>125,0 ± 13,2</i>	<i>3</i>
<i>RS4</i>	<i>50</i>	<i>125,0 ± 12,7</i>	<i>3</i>
	<i>100</i>	<i>120,0 ± 2,9</i>	<i>3</i>
<i>RS5</i>	<i>50</i>	<i>104,0 ± 13,4</i>	<i>3</i>
	<i>100</i>	<i>120,0 ± 16,8</i>	<i>3</i>
<i>RS6</i>	<i>100</i>	<i>123,4 ± 12,0</i>	<i>3</i>
<i>RS7</i>	<i>50</i>	<i>108,3 ± 16,9</i>	<i>3</i>
	<i>100</i>	<i>80 ± 1,7</i>	<i>3</i>
<i>RS8</i>	<i>50</i>	<i>120,0 ± 12,0</i>	<i>3</i>
	<i>100</i>	<i>107,3 ± 5,4</i>	<i>3</i>

Tab. 3 - Tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil em preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta, incubada com o lote de veneno procedente de Minas Gerais.

<i>Lote</i>	<i>Dose (µg/ml)</i>	<i>Tempo para 50% de bloqueio (min)</i>	<i>n</i>
<i>MG1</i>	<i>20</i>	<i>105,0 ± 14,0</i>	<i>3</i>
	<i>50</i>	<i>78,3 ± 4,4</i>	<i>3</i>
	<i>100</i>	<i>35,3 ± 13,5</i>	<i>3</i>

Os resultados estão expressos pela média de experimentos ± erro padrão.

Tab. 4 - Porcentagem de bloqueio da resposta contraturante à acetilcolina e ao potássio, obtida após 120 minutos de incubação com os diferentes lotes de veneno em músculo de pintainho.

<i>Lote</i>	<i>Dose (µg/ml)</i>	<i>ACh (120 µM) % bloqueio</i>	<i>KCl (13,4 mM) % bloqueio</i>	<i>n</i>
<i>SP1</i>	20	25,0 ± 20,1	90,8 ± 8,0	3
	50	85,0 ± 15,0	94,9 ± 5,1	3
<i>SP3</i>	20	77,5 ± 10,3	95,0 ± 3,0	4
	50	91,7 ± 8,3	98,1 ± 1,2	4
<i>SP4</i>	20	11,1 ± 11,1	100,0	3
	50	51,8 ± 9,2	100,0	3
<i>SP5</i>	20	41,0 ± 20,5	100,0	3
	50	76,0 ± 5,7	100,0	3
<i>SP7</i>	20	22,2 ± 12,1	98,2 ± 1,8	3
	50	90,2 ± 5,5	94,7 ± 5,3	3
<i>SP8</i>	20	38,9 ± 20,0	94,6 ± 5,4	3
	50	63,3 ± 31,8	100,0	3
<i>SP9</i>	20	60,4 ± 21,3	100,0	4
	50	100,0	97,7 ± 2,3	4
<i>RS1</i>	20	46,1 ± 8,4	100,0	3
	50	100,0	100,0	3
<i>RS2</i>	20	53,3 ± 3,3	100,0	3
	50	88,6 ± 5,9	94,4 ± 2,9	3
<i>RS3</i>	20	22,2 ± 22,0	100,0	3
	50	100,0	100,0	3
<i>RS4</i>	20	58,6 ± 17,9	100,0	3
	50	91,7 ± 8,3	100,0	3
<i>RS5</i>	20	0	100,0	3
	50	54,7 ± 16,0	100,0	3
<i>RS6</i>	20	37,9 ± 14,0	100,0	3
	50	70,9 ± 5,8	100,0	3
<i>RS7</i>	20	60,0 ± 20,5	100,0	3
	50	86,1 ± 10,0	100,0	3
<i>RS8</i>	20	78,3 ± 11,7	100,0	3
	50	100,0	100,0	3
<i>MGI</i>	20	58,0 ± 4,2	100,0	3
	50	51,7 ± 5,7	100,0	3

Os resultados estão expressos pela média de experimentos ± erro padrão.

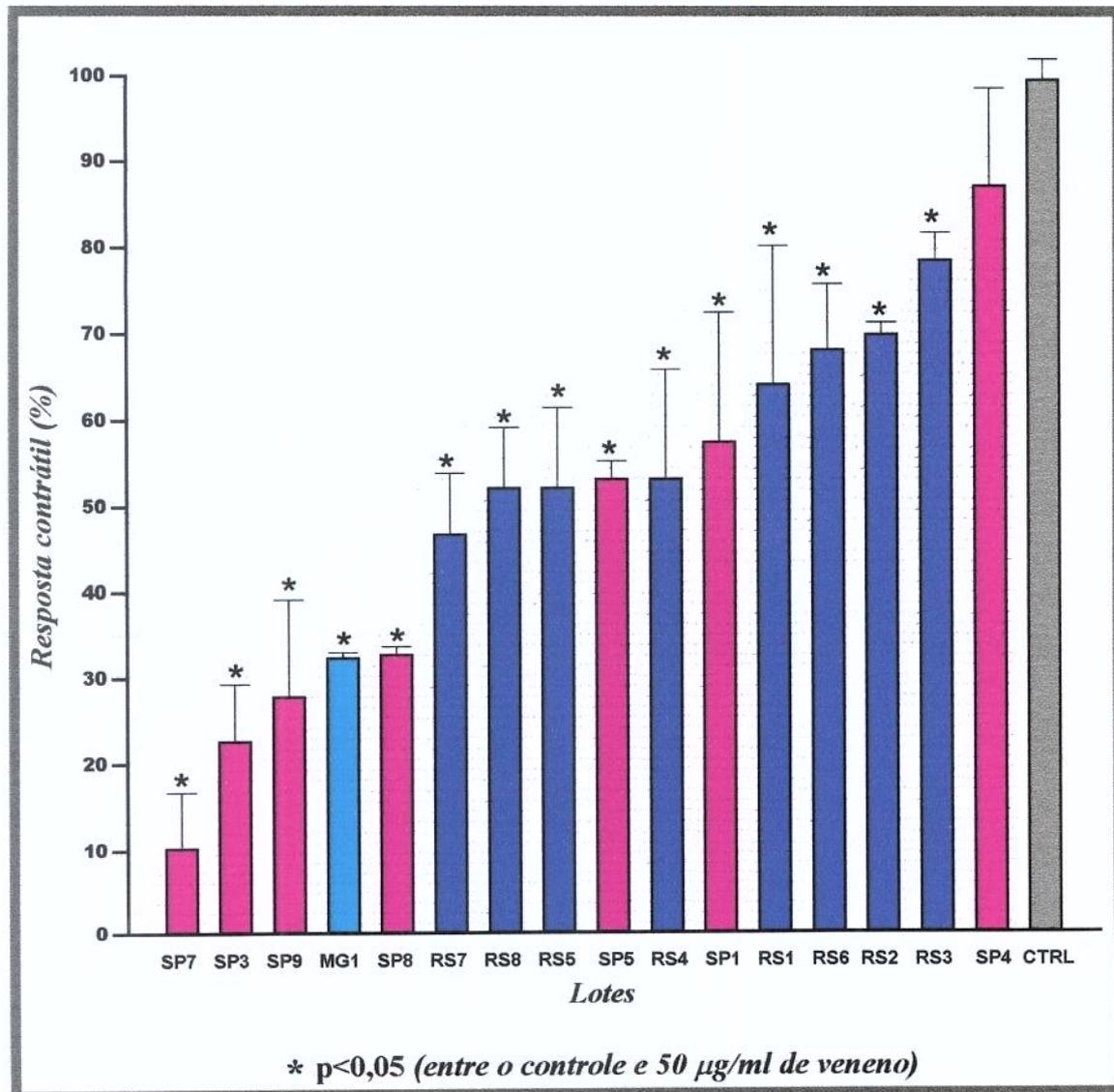


Fig. 1 - Comparação da atividade bloqueadora induzida por todas as amostras estudadas sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, sob estimulação indireta, em 120 min de incubação. A dose parâmetro foi 50 $\mu\text{g/ml}$. Para melhor visualização, as barras de cor rosa são referentes aos lotes de São Paulo, as de cor azul escuro são correspondentes às amostras do Rio Grande do Sul e a de cor azul claro refere-se ao lote oriundo de Minas Gerais. A barra de cor cinza (CTRL) representa o controle realizado com Krebs. Cada barra representa a média de 3 a 6 experimentos \pm erro padrão.

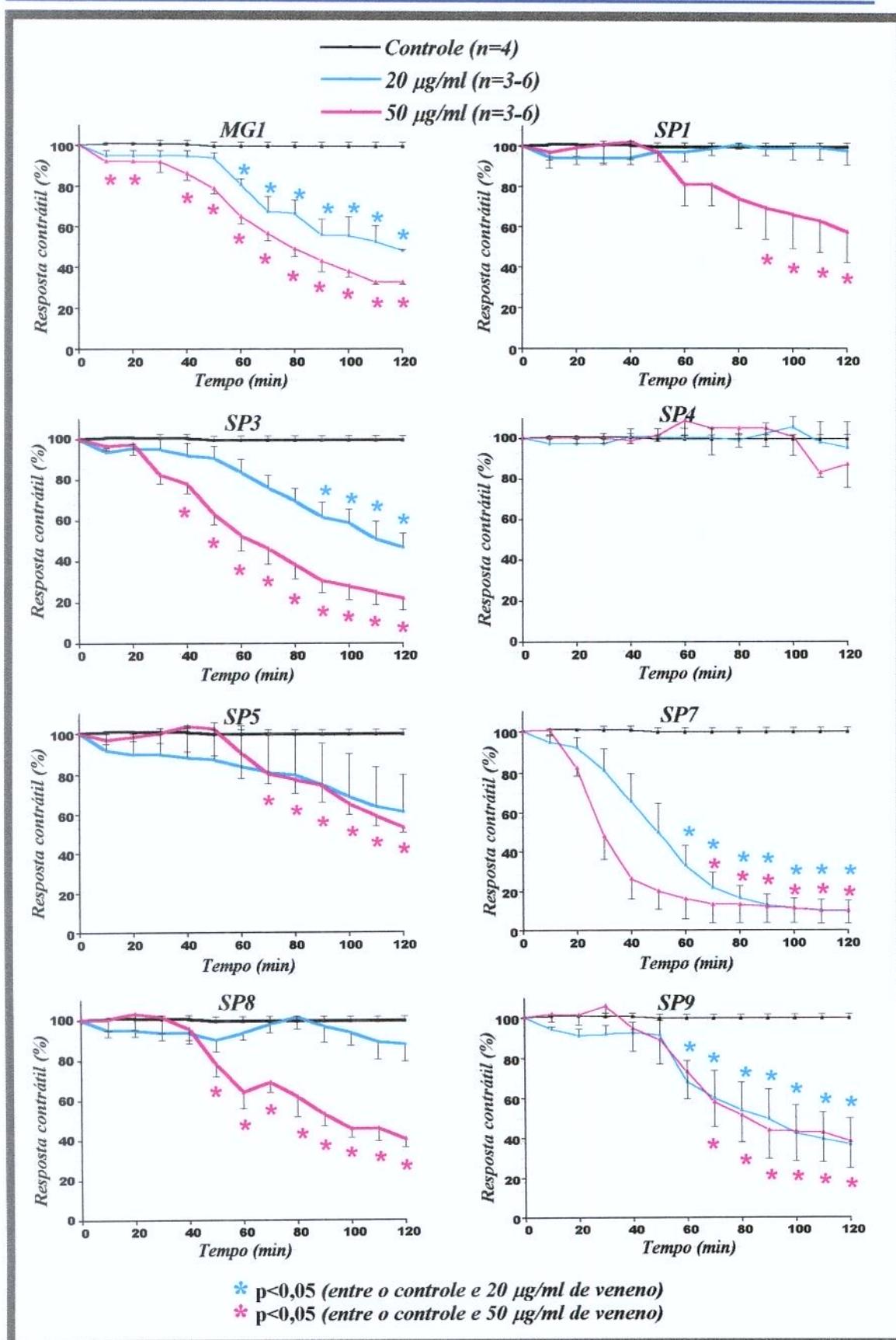


Fig. 2 - Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil induzido pelas amostras procedentes de Minas Gerais e de São Paulo sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro padrão.

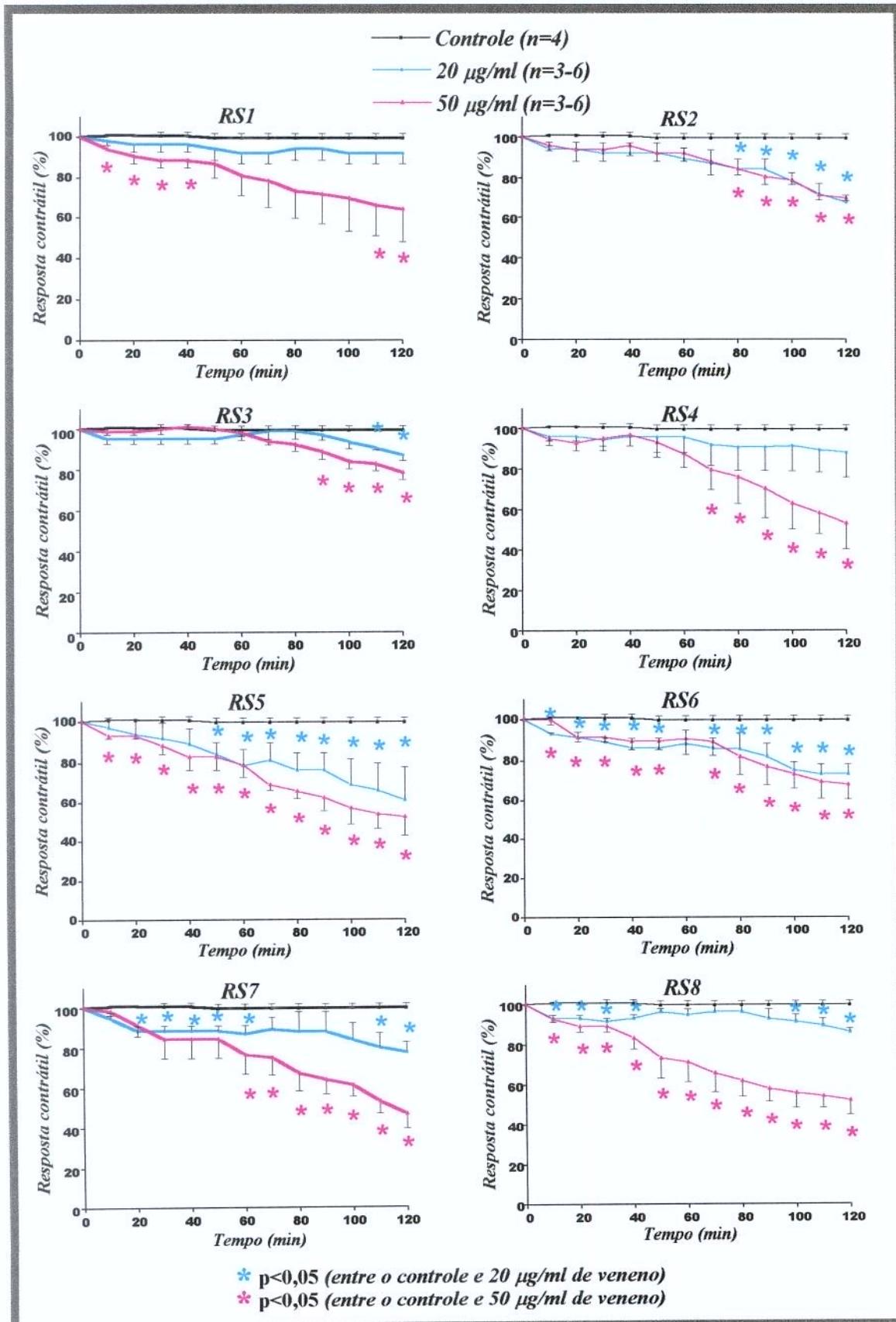


Fig. 3 - Representação gráfica do bloqueio da resposta contrátil induzido pelas amostras procedentes do Rio Grande do Sul sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro padrão.

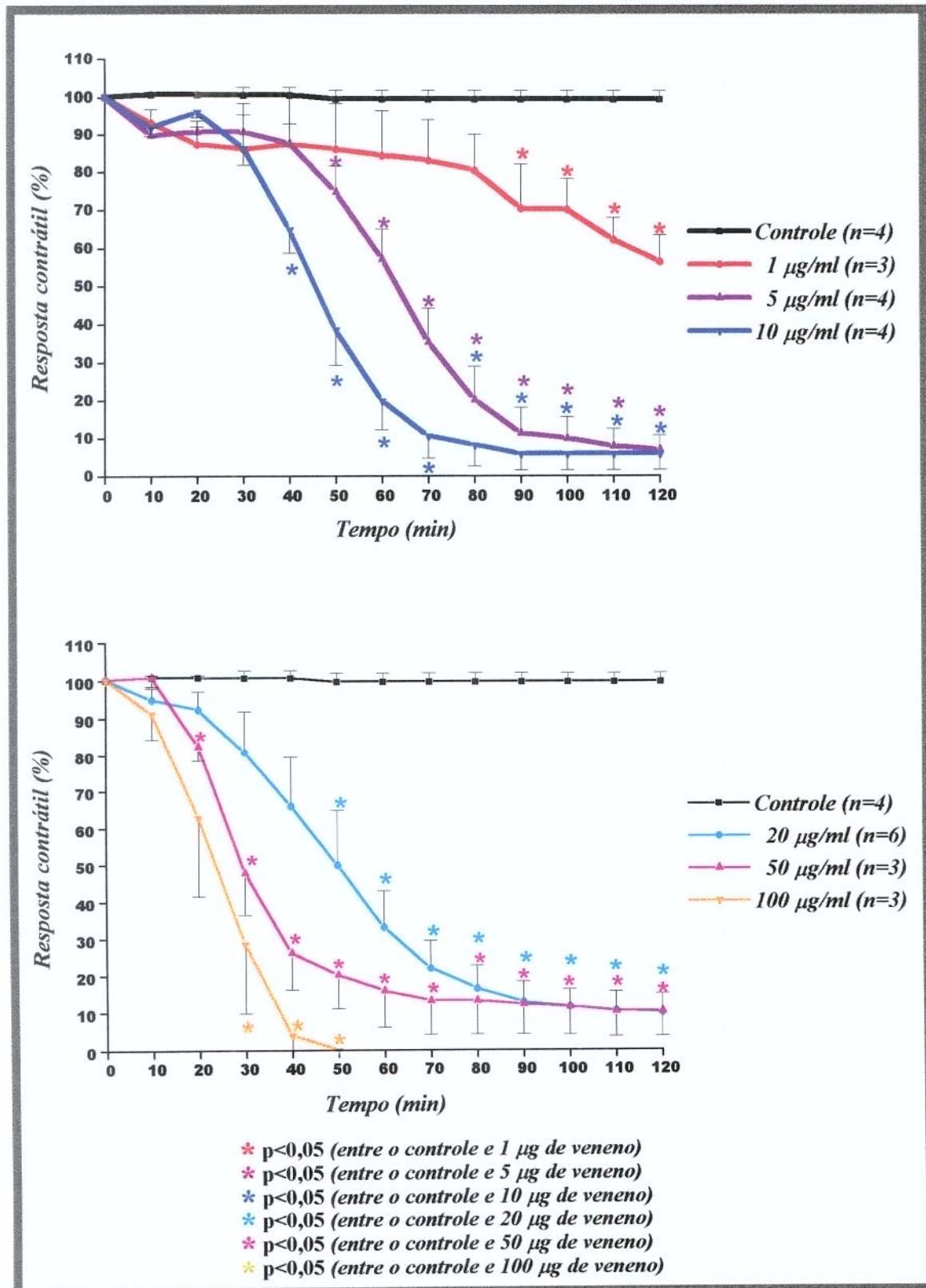


Fig. 4 - Curva dose-resposta do efeito bloqueador do lote mais ativo (SP7) sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro padrão.

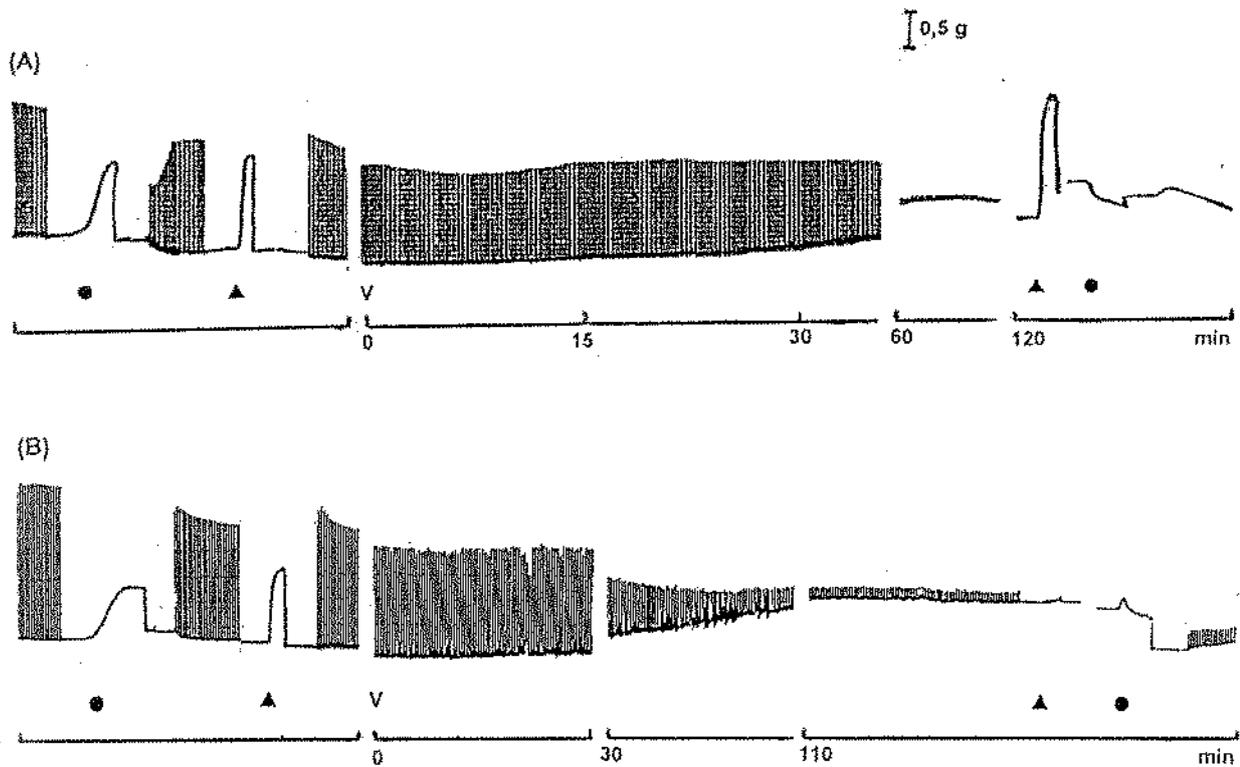


Fig. 5 - Registro miográfico do efeito do lote SP7 (V) sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta. Em (A), o veneno foi adicionado ao banho na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$. As contraturas resultantes da adição de KCl (● 13,4 mM) e ACh (▲ 120 μM) foram registradas antes e após a incubação com o veneno. Em (B), o efeito do veneno na dose de 50 $\mu\text{g/ml}$.

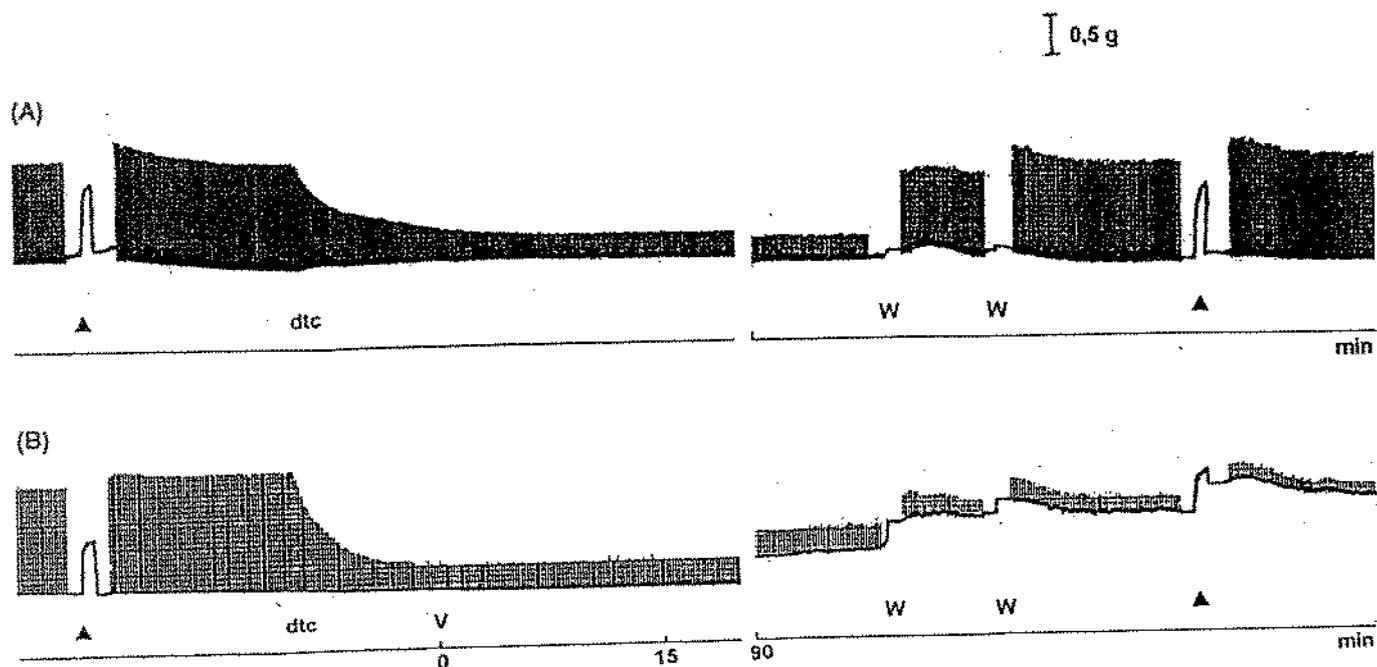


Fig. 6 - Registro miográfico do efeito do lote SP7 (V) sobre a preparação biventer cervicis de pintainho curarizada. Em (A), controle com d-tc (8 µg/ml). Ao final do experimento, foram feitas sucessivas lavagens para remoção do curare. A resposta à adição de ACh (▲ 120 µM) foi obtida no início e no fim do experimento. Em (B), após a curarização com a mesma dose de d-tc, o veneno (V) foi adicionado na concentração de 10 µg/ml.

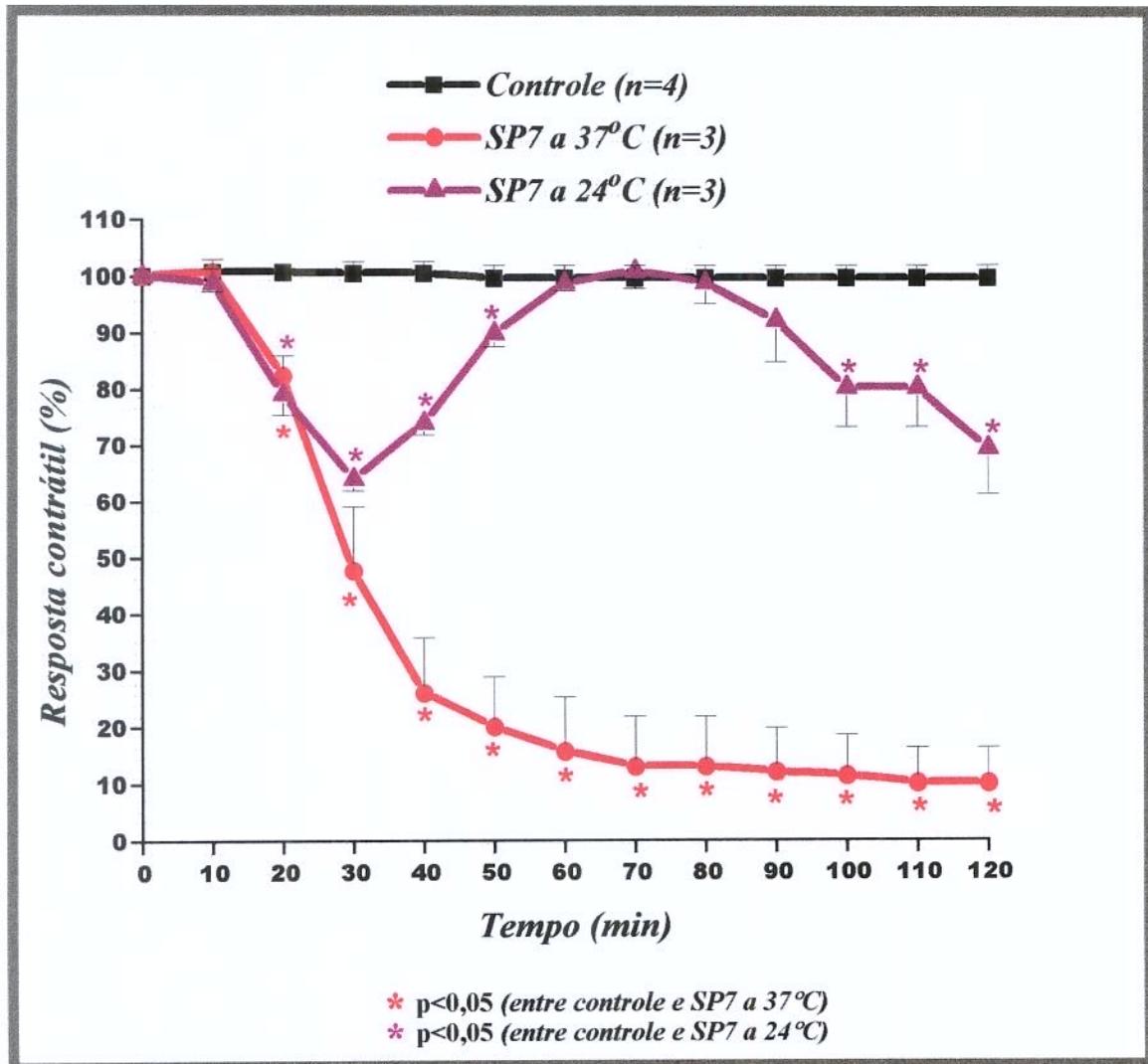


Fig. 7 - Representação gráfica do efeito do lote SP7 sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estímulo indireto, a 24°C, e sua atividade a 37°C. Em ambas as temperaturas, foi utilizada a dose de 50 µg/ml de veneno. Cada ponto representa a média de experimentos ± erro padrão.

3.1.2 - Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo

3.1.2.1 - Estimulação indireta

A preparação nervo-músculo de camundongo mostrou-se menos sensível à ação bloqueadora neuromuscular do lote SP7, quando submetida a estímulo elétrico indireto. Na dose de 20 $\mu\text{g/ml}$, em 5 de 6 experimentos realizados, o tempo necessário para 50% de bloqueio foi $55,8 \pm 16,8\%$; no entanto, em apenas um desses 6 experimentos o bloqueio das respostas não atingiu 50% após 120 minutos de incubação. Na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, o bloqueio de 50% ocorreu aos $80,2 \pm 14,8$ min ($n=5$). Para ambas as doses, o bloqueio foi irreversível.

Realizaram-se também experimentos na ausência de cálcio e presença de estrôncio, em que se obteve uma inibição significativa ($p<0,05$ em $t_{40-t_{120}}$) em relação aos experimentos ensaiados com cálcio. A margem de bloqueio, nessas condições, foi de $40,3 \pm 7,8\%$, após 120 min de incubação com o veneno, na dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 11).

Nos experimentos-controle, a resposta contrátil manteve-se estável (99,6% de resposta, $n=3$), durante 120 minutos, com incubação em Tyrode.

3.1.2.2 - Estimulação direta

À semelhança do que ocorre com a preparação de ave, observou-se também bloqueio da contração muscular em resposta a estimulação elétrica direta na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Este efeito foi

observado somente a partir da dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ ($74 \pm 18,4\%$ de bloqueio em 120 minutos) e ilustrado na Figura 10.

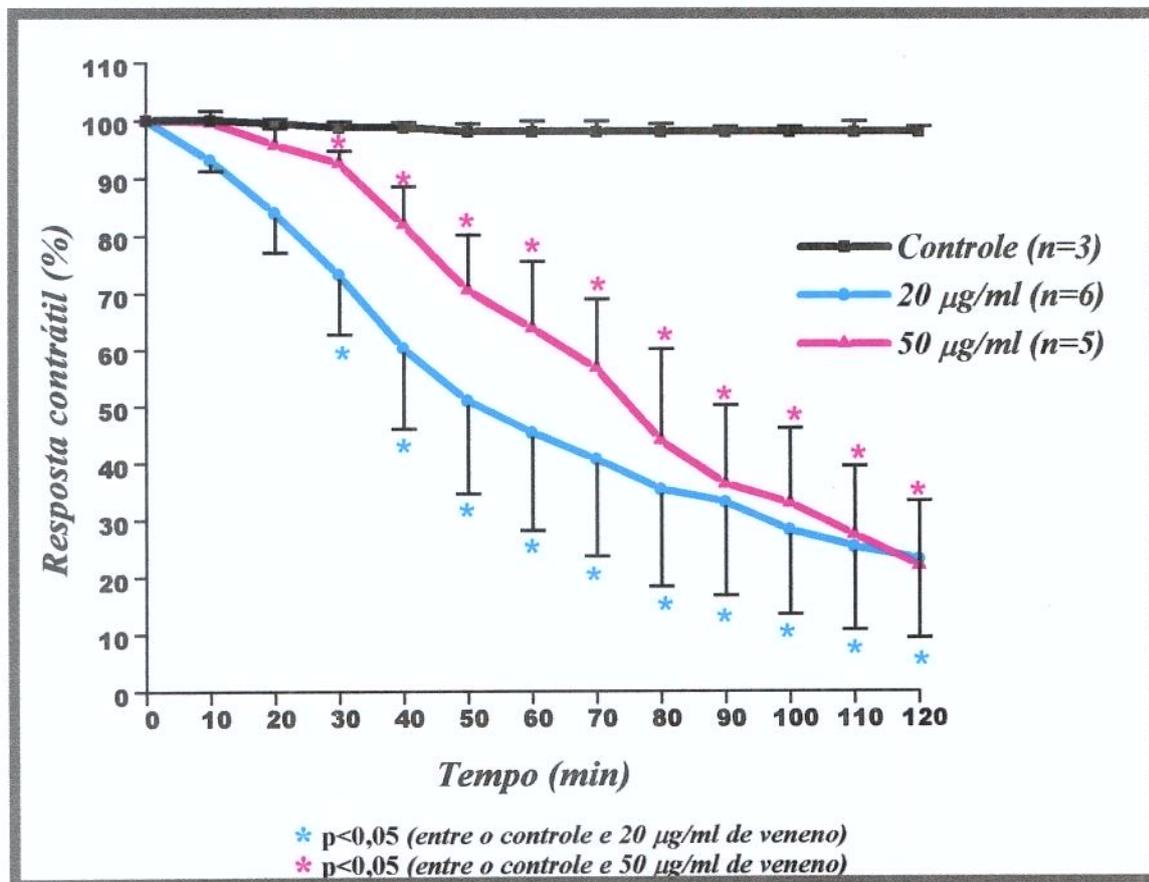


Fig. 8 - Curva dose-resposta do efeito bloqueador da amostra SP7 sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro padrão.

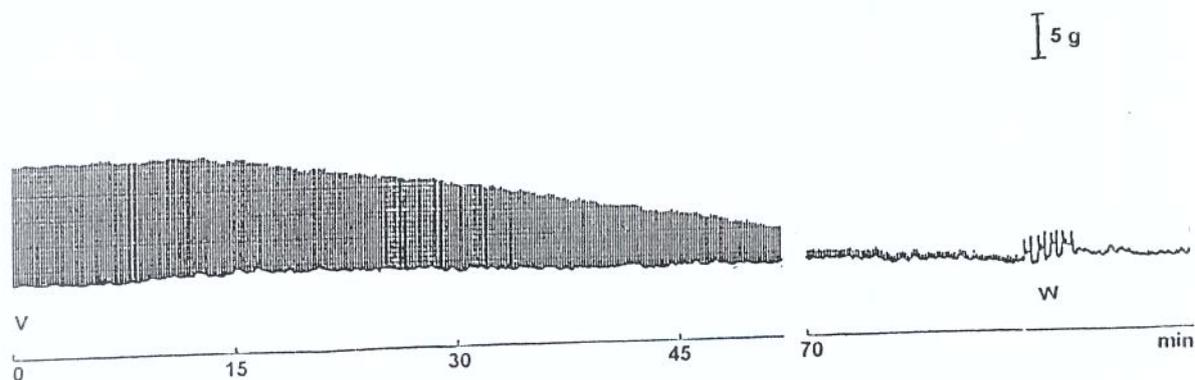


Fig. 9 - Registro miográfico do efeito do lote mais ativo, SP7 (V), sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, na dose de 20 $\mu\text{g/ml}$.

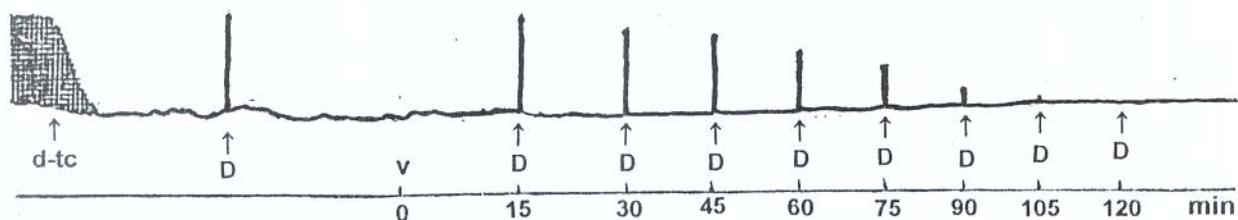


Fig. 10 - Registro miográfico do efeito do lote SP7 (V) sobre a preparação de camundongo submetida a estímulo direto (D), a 50 µg/ml.

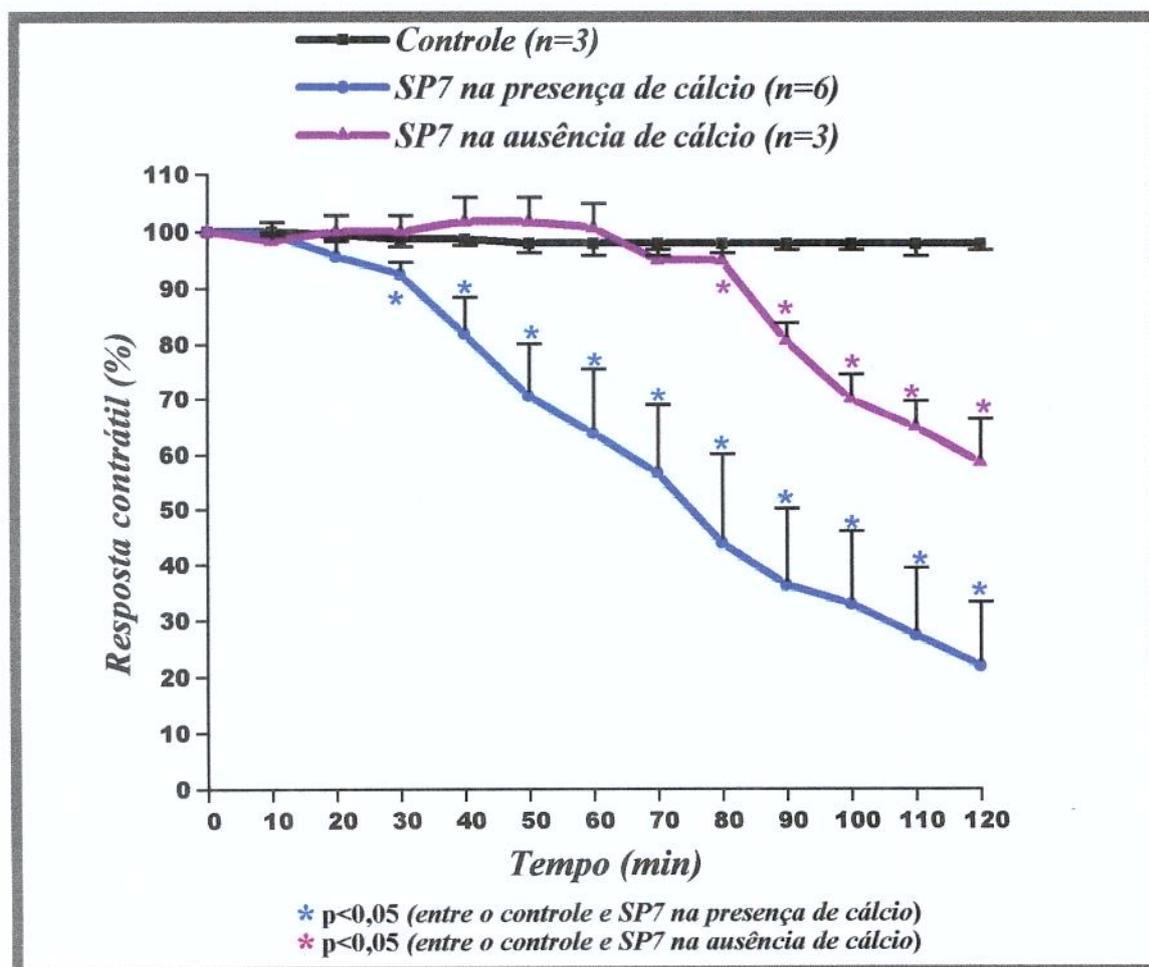


Fig. 11 - Representação gráfica do efeito bloqueador do lote de veneno SP7 sobre a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, sob estimulação indireta e na ausência de cálcio. A dose utilizada em ambos os casos foi de 20 µg/ml. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro padrão.

3.2 - Padrões eletroforéticos das amostras de veneno bruto

Observou-se uma grande variação de proteínas entre as diferentes amostras de veneno de *B. neuwiedi*, principalmente em relação às últimas bandas que mais migraram no gel, ou seja, de caráter básico mais acentuado, como demonstrado na Figura 12. As amostras de veneno de maior atividade bloqueadora neuromuscular (MG1, SP7, SP8 e SP9) exibiram uma banda (indicada pelas setas, na Figura 12) de caráter básico em diferentes intensidades de coloração (com intensidade menor na amostra SP8). A amostra identificada como SP6, que também apresenta a mesma banda, foi estudada por ZAMUNÉR *et al.* (1997), demonstrando ter uma atividade bloqueadora neuromuscular superior à do veneno mais ativo apresentado neste trabalho (100% de bloqueio em 50 minutos na dose de 10 µg/ml). Não foram observadas diferenças entre as amostras de venenos, provenientes do Estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais que pudessem ser atribuídas às procedências.

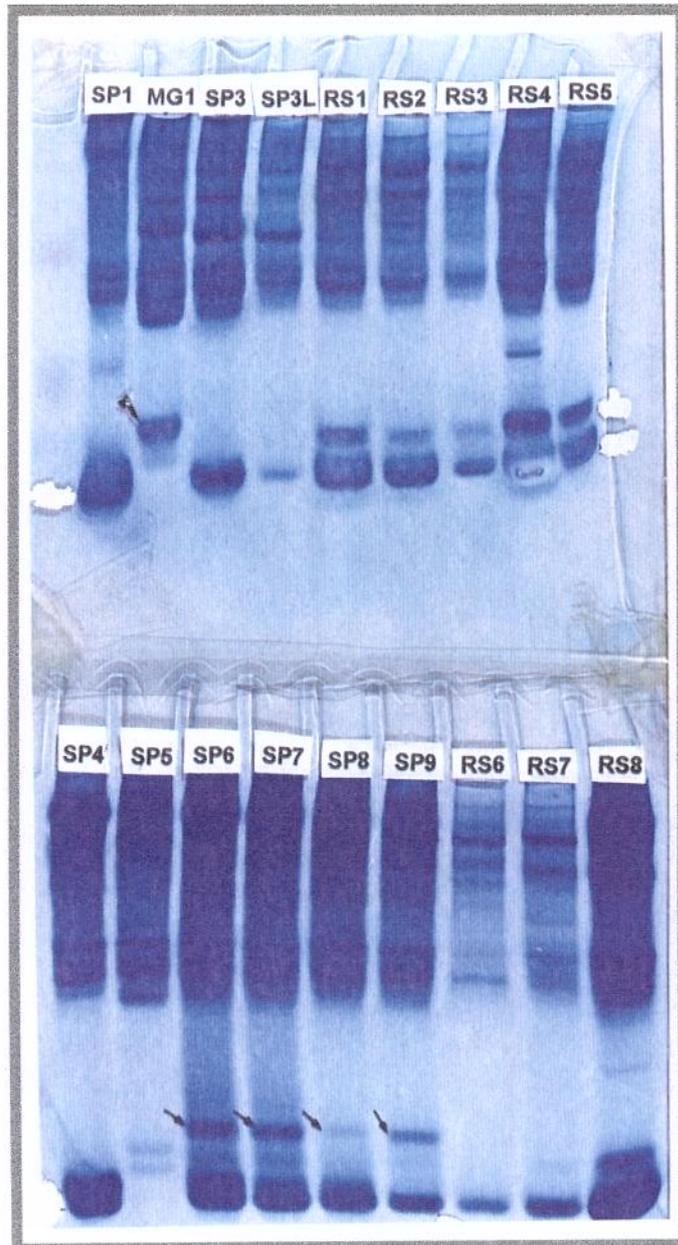


Fig. 12 - Perfil eletroforético dos diversos lotes de veneno estudados. As setas indicam uma banda presente somente em alguns dos lotes. SP3L se refere à amostra SP3 após sua liofilização.

3.3 - Estudo miográfico das frações isoladas do veneno total

3.3.1. Preparação biventer cervicis de pintainho

3.3.1.1. Estimulação indireta

Utilizou-se o lote de veneno mais ativo entre os estudados (SP7) para investigar a presença de componente neurotóxico no veneno de *B. neuwiedi*. Após a cromatografia, as frações foram aplicadas à preparação *biventer cervicis* de pintainho. Somente P2 e P3 (frações correspondentes aos picos 2 e 3; Figura 14) reproduziram a atividade neurotóxica do veneno bruto. A fração mais ativa (P3, ilustrada nas Figuras 14 e 15) induziu bloqueio total em $80 \pm 1,7$ min ($10 \mu\text{g/ml}$; $n=3$), além de contratura. Imediatamente após sua adição, P3 causou uma discreta diminuição (2,3%) na amplitude, da contração muscular e, posteriormente, um aumento (4%) dessa amplitude que foi seguido de bloqueio progressivo e total. A fração P2 (Figuras 14 e 15) determinou 80% de bloqueio em aproximadamente $120 \pm 11,8$ min ($10 \mu\text{g/ml}$; $n=3$) e aumento da amplitude ($20 \mu\text{g/ml}$; $n=3$). A fração referente ao pico 1 demonstrou uma atividade bloqueadora razoável (64,5% de bloqueio) na concentração de $50 \mu\text{g/ml}$. As frações correspondentes aos picos 4 e 5 não apresentaram efeito neurotóxico.

O perfil cromatográfico resultante do fracionamento é demonstrado na Figura 13.

Estudou-se também o efeito das frações mais ativas em temperatura ambiente (24°C). Nessa condição, sua atividade inibidora neuromuscular foi significativamente reduzida. P3 promoveu um bloqueio de apenas $12 \pm 2,8\%$ na dose de 10 µg/ml, em 120 min (Figura 17). Já P2, em temperatura ambiente, produziu $44 \pm 2,6\%$ de bloqueio na mesma dose em que promoveu $79,7 \pm 10,6\%$ à 37°C (20 µg/ml; Figura 16).

3.3.1.2 - Resposta contraturante à adição de ACh e K⁺

Quanto à resposta contraturante à adição de ACh, tanto P2 como o P3 causaram aumento da amplitude da resposta (124,3% e 10,7%, respectivamente) na vigência de bloqueio completo das contrações musculares em resposta à estimulação indireta (Figura 15). Já a resposta à adição de K⁺ mostrou-se inibida (90% de bloqueio), após o bloqueio promovido por P2, e diminuída (50% de bloqueio), após o bloqueio produzido pela fração P3. A fração referente ao pico 1 induziu bloqueio total da resposta à adição de K⁺, além de bloquear em 70% a contratura à ACh. As respostas para a ACh e K⁺ produzidas pelas frações correspondentes aos picos 4 e 5 não foram afetadas.

À temperatura ambiente (24°C), as respostas à ACh e ao K⁺ mantiveram-se inalteradas, após 120 min de incubação com P3 (10 µg/ml). P2, porém, induziu um significativo ($p < 0,05$) aumento da resposta à adição de K⁺, após 120 min de incubação, que estava parcialmente inibida, antes da adição da fração, devido provavelmente à baixa temperatura (Figura 18).

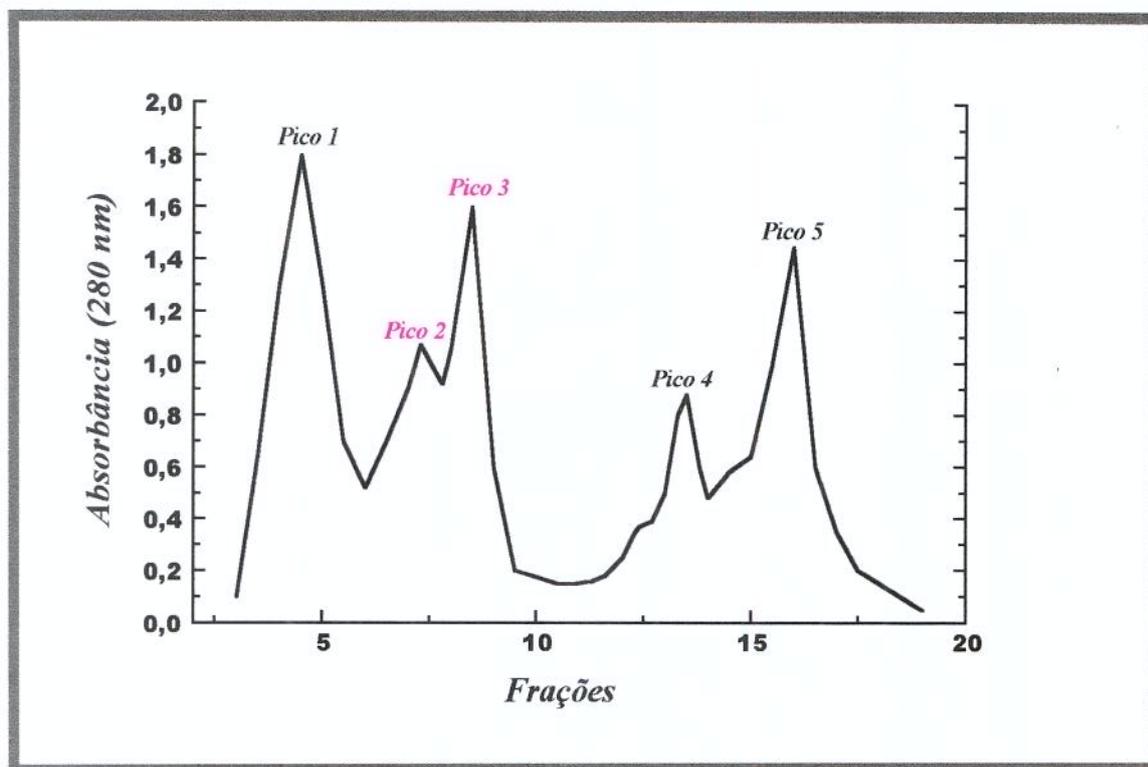


Fig. 13 - Perfil de eluição resultante da cromatografia de SP7.

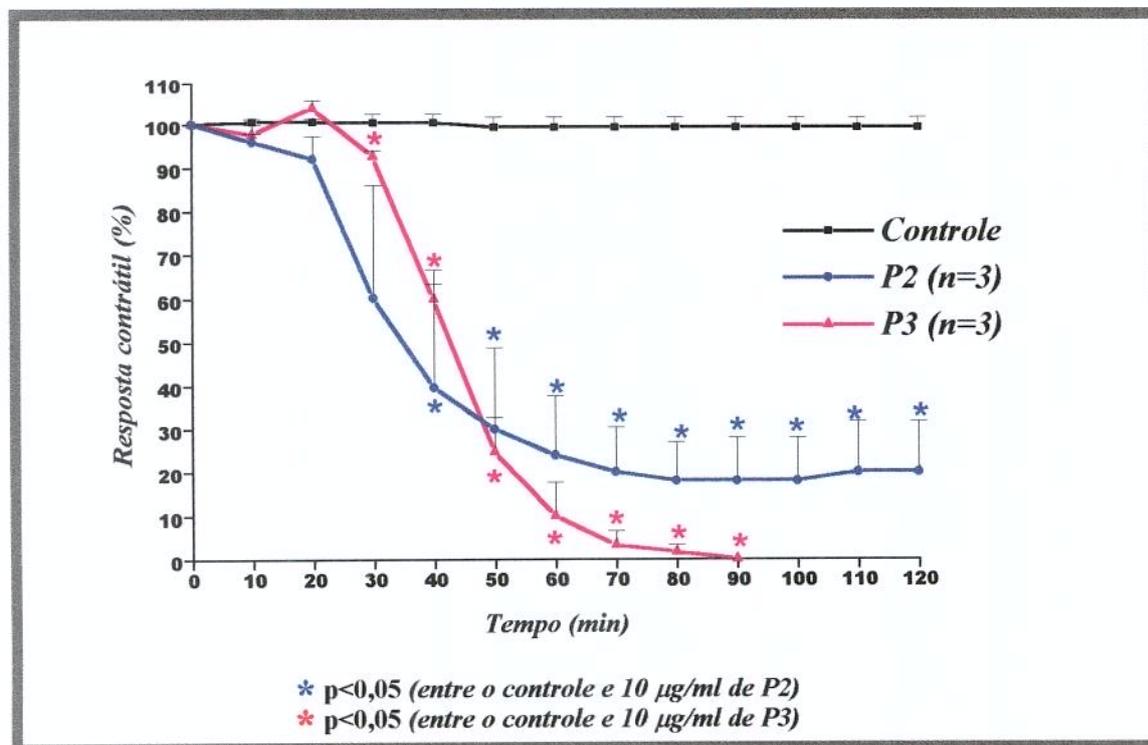


Fig. 14 - Representação gráfica do bloqueio induzido pelas frações mais ativas obtidas do fracionamento do lote SP7, sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, submetida a estimulação indireta. Cada ponto representa a média de experimentos \pm erro padrão.

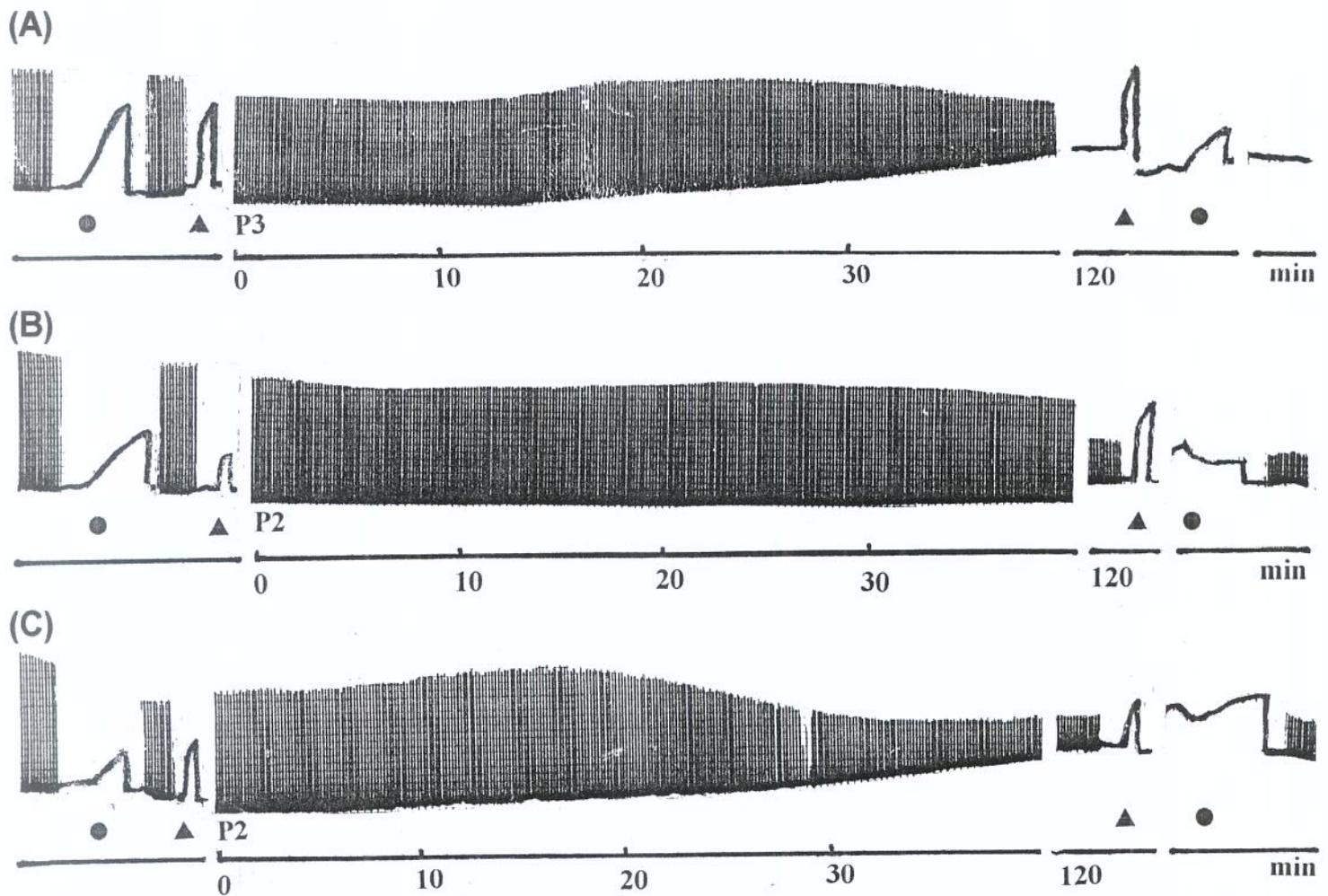


Fig. 15 - Registro miográfico do bloqueio induzido pelas frações mais ativas sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, sob estimulação indireta: em (A), o efeito da fração P3, a fração mais ativa, na concentração de 10 µg/ml; em (B) e (C), o efeito da fração P2 nas doses de 10 e 20 µg/ml, respectivamente. As respostas contraturantes à adição de KCl (● 13,4 mM) e ACh (▲ 120 µM) foram registradas no início e ao final do experimento.

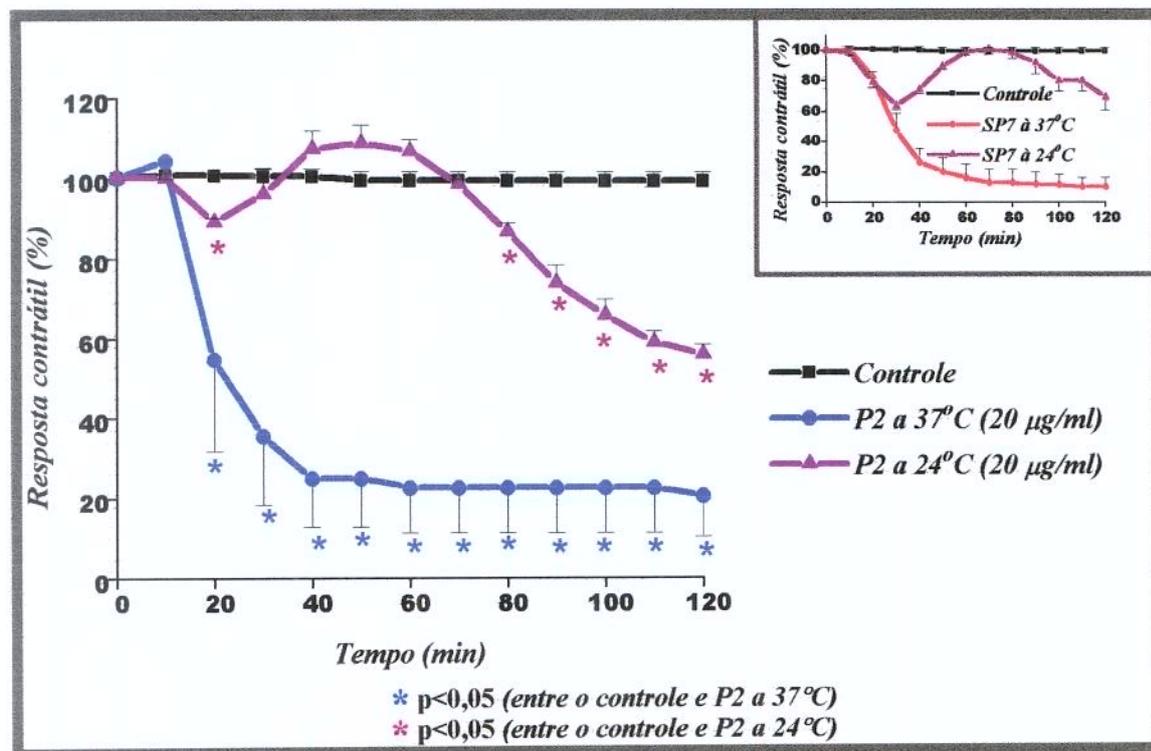


Fig. 16 - Representação gráfica do efeito induzido pela fração P2 sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, submetida a estimulação indireta à temperatura ambiente, e sua atividade a 37°C. A Figura do canto superior, à direita (já ilustrada anteriormente), demonstra o efeito induzido pelo veneno bruto (SP7) em condições iguais. Cada ponto representa a média de 3 experimentos \pm erro padrão.

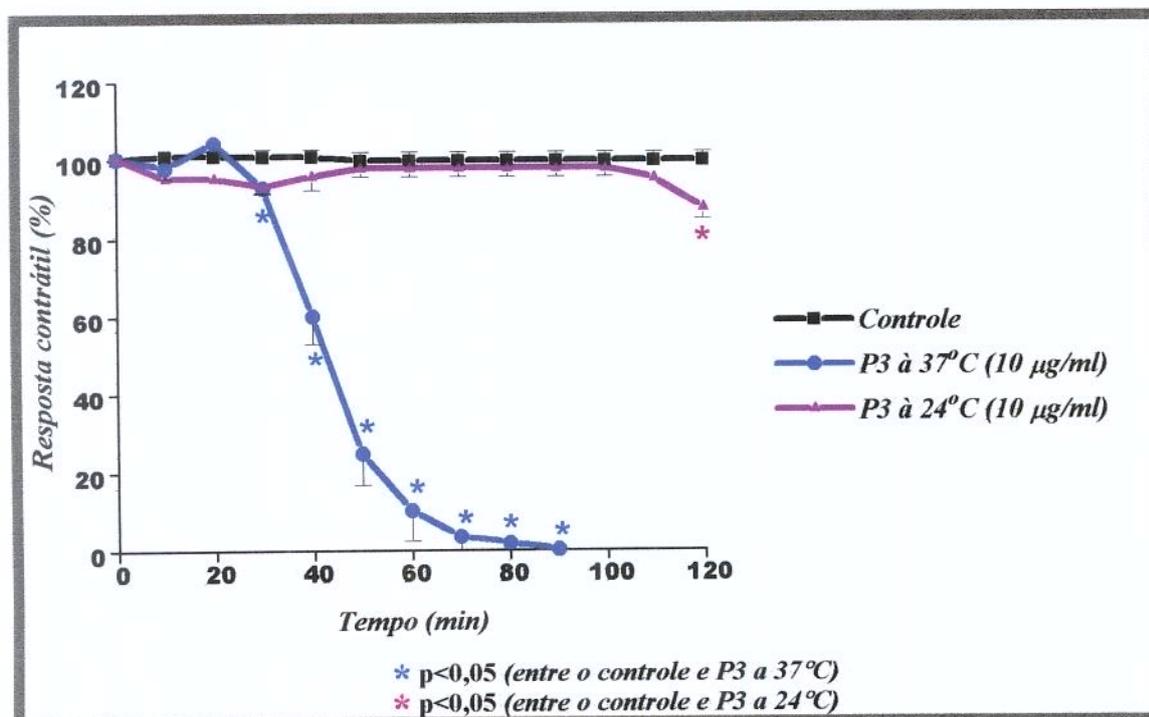


Fig. 17 - Representação gráfica do efeito induzido pela fração P3 sobre a preparação biventer cervicis de pintainho, submetida a estimulação indireta à temperatura ambiente, e sua atividade a 37°C. Cada ponto representa a média de 3 experimentos \pm erro padrão.

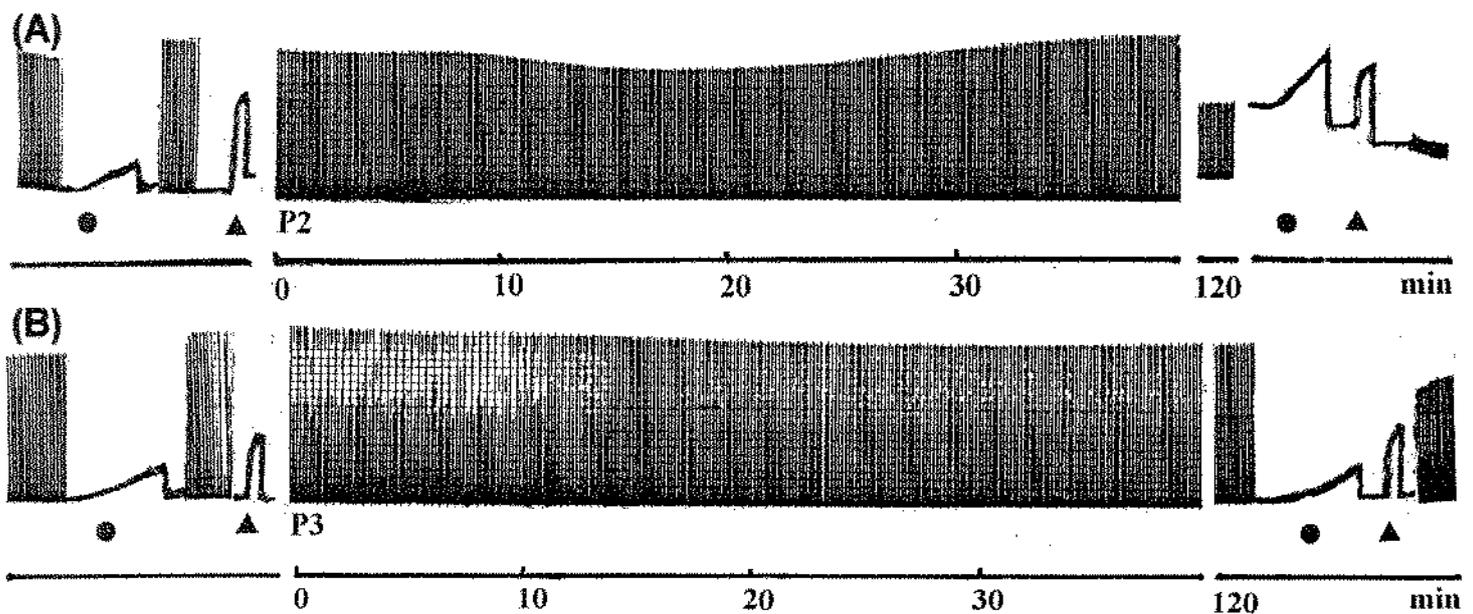


Fig. 18 - Registro miográfico do efeito induzido pelas frações ativas sobre a preparação biverter cervicis de pintainho, sob estimulação indireta e a 24°C. Em (A), observa-se P2 a 20 µg/ml e, em (B), P3 a 10 µg/ml. As respostas contraturantes à adição de KCl (● 13,4 mM) e ACh (▲ 120 µM) foram registradas no início e ao final do experimento.

4. Discussão dos Resultados

Nossos resultados comprovam que os objetivos propostos foram atingidos: foi determinada a ordem de potência entre os vários lotes de veneno e a possível relação entre essa potência e os perfis eletroforéticos e, do lote mais ativo, foram isolados parcialmente componentes capazes de exibir neurotoxicidade.

O bloqueio da contratura em resposta ao potássio, observado na maioria dos experimentos, pode ser justificado pela provável atividade miotóxica do veneno, que tem sido investigada através do estudo morfológico e da determinação da liberação de creatino quinase (CK) liberada na solução nutritiva que permeia a preparação, durante experimentos realizados usando-se a preparação *biventer cervicis* de pintainho. De fato, nas condições descritas, o veneno de *B. neuwiedi* promove uma considerável liberação de CK somente em doses superiores a 100 µg/ml com correspondente miotoxicidade (ZAMUNÉR *et al.*, 1997). Por outro lado, DANIELLE, BIANCO, FIDELIO (1995) demonstraram que as fosfolipases A₂ P-1 e P-2, isoladas do veneno de *B. neuwiedi* por VIDAL & STOPPANI (1971), somente promoveram miotoxicidade em doses acima de 40 µg/ml, enquanto que o veneno bruto causou uma importante miotoxicidade a 10 µg/ml. Sendo essas fosfolipases 5% do total protéico do veneno total, os

autores sugerem que elas não sejam os principais componentes responsáveis pela miotoxicidade do veneno bruto. Fato semelhante é observado com a fosfolipase A_2 e o veneno total de *Crotalus durissus terrificus*: a DL_{50} para o veneno total é de 160 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, enquanto que para a fosfolipase A_2 isolada do veneno é de 5.000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Entretanto, após a associação entre fosfolipase A_2 e a crotapotina (uma subunidade da crotoxina, outro componente isolado do veneno crotálico) a DL_{50} passa a ser 80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938; KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986).

A neutralização do efeito bloqueador do veneno de *B. neuwiedi*, em concentrações de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em temperatura ambiente bem como na ausência de cálcio (e presença de estrôncio), sugere a influência de atividade enzimática relacionada com a neurotoxicidade do veneno, uma vez que a redução da temperatura e a falta de cálcio na solução nutritiva inibem a atividade enzimática; o estrôncio desempenha o papel do cálcio na transmissão neuromuscular porém não o substitui no exercício da ação enzimática.

A inibição da resposta à estimulação direta somente em doses superiores a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, nas preparações nervo-músculo de pintainho e camundongo, também corrobora as indicação de que o veneno de *B. neuwiedi* é miotóxico. Esse efeito tem sido relatado para venenos botrópicos, como os de *B. jararacussu* (RODRIGUES-SIMIONI, BORGESE, CECCARELLI, 1983), *B.*

insularis (COGO *et al.*, 1993) e *B. pirajai* (COSTA *et al.*, 1998). O veneno de *B. insularis* induziu redução nos valores de potencial de repouso (RP) principalmente através de sua ação diretamente no sarcolema; esta conclusão é derivada do fato de que a d-tubocurarina antagonizou somente a redução do RP causada por baixas doses de veneno (COGO *et al.*, 1993).

As diferenças encontradas entre os vários lotes estudados quanto a sua atividade bloqueadora neuromuscular justificam-se, provavelmente, pela variação na quantidade de toxinas presentes nos venenos; esse teor é dependente de vários fatores, como idade, sexo, alimentação e/ou ambiente onde vive, além da diversidade quanto aos procedimentos de secagem e/ou estocagem do veneno. Um dos dois venenos menos ativos (RS3), entre os estudados neste trabalho foi extraído de uma serpente jovem, o que poderia levantar a suposição de que a atividade neurotóxica presente no veneno de *B. newiedi* seja uma característica tardia. Além disso, a amostra MG1, uma das mais ativas, obtida de serpentes adultas, reforçaria esta sugestão. MEIER, em 1986, ao estudar o veneno de *B. atrox*, verificou consideráveis diferenças nos padrões eletroforéticos de serpentes de diversas idades, no que se referia à quantidade de bandas presentes: à medida que aumentava a idade da serpente, observava-se uma significativa queda no número de bandas. Por outro lado, muitos autores têm demonstrado que, em geral, os indivíduos recém-nascidos e jovens da família Crotalidae possuem venenos mais ativos que os adultos

(MINTON, 1967; FIERO *et al.*, 1972; REID & THEAKSTON, 1978; GUTIÉRREZ, CHAVES, BOLAÑOS, 1980; MEIER & FREIVOGEL, 1980).

A variação geográfica também pode ter sido componente importante na desigualdade dos resultados apresentados, já que, pelo menos de modo geral, as amostras de veneno procedentes de serpentes do Rio Grande do Sul mostraram-se menos ativas que as oriundas do Estado de São Paulo. RODRIGUES *et al.* (1998) verificaram variações nos perfis eletroforéticos quanto a proteínas de caráter básico entre venenos de *B. neuwiedi* procedentes de São Paulo e de Minas Gerais.

É possível supor que haja um componente presente em alguns venenos de *B. neuwiedi* responsável pela variação na intensidade de sua atividade neurotóxica, pois, entre os 17 venenos estudados, somente os padrões eletroforéticos das amostras correspondentes a alguns dos venenos mais ativos (SP2, SP6, SP7, SP8 e SP9) exibiram uma banda que se apresentou com coloração menos intensa no veneno menos ativo entre estes cinco (SP8). Somente um entre os lotes mais ativos (SP3) não exibiu esta banda; o mesmo lote foi um dos dois únicos que exibiram intensa atividade pós-sináptica em baixas doses, entre todos os estudados. No entanto, observando o perfil eletroforético dos vários lotes, não identificamos características, que pudessem

ser responsabilizadas pela variação geográfica existente entre os venenos procedentes dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais.

Apesar das diferenças na sua intensidade de efeito, alguns lotes de veneno apresentaram um aumento inicial da amplitude das contrações em resposta à estimulação elétrica isolada indireta, precedendo o bloqueio, o que, aliado a outras evidências, poderia ser interpretado como mais um indicativo de uma ação pré-sináptica, relacionado à facilitação da liberação de ACh, induzida pelo veneno. Esses resultados corroboram os recentes estudos sobre o veneno de *Bothrops neuwiedi*, que demonstraram sua atividade neurotóxica pré-sináptica, quando aplicado em baixas doses (5, 10 e 20 µg/ml), sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho (ZAMUNÉR *et al.*, 1997). Mais recentemente, DURIGON *et al.* (1998) observaram que a peçonha de *B. neuwiedi* também induz despolarização e aumento (5,5 vezes o registro controle) da frequência dos potenciais em miniatura (MEPPs), além de potenciais gigantes (3 vezes a amplitude de MEPPs controle). Outra característica comum a todas as amostras estudadas no presente trabalho foi a irreversibilidade do bloqueio, que já havia sido apontada, por ZAMUNÉR *et al.* (1997), como característica da atividade neuromuscular do veneno de *B. neuwiedi*. Além disso, nossa observação de que o bloqueio produzido também é irreversível em preparações previamente curarizadas, de certa forma, reforça estas observações. Esses dados apontam para a presença, no veneno, de

componente ativo na junção neuromuscular não relacionado a sua interação com receptores colinérgicos. RODRIGUES-SIMIONI *et al.* (1983) demonstraram o intenso efeito despolarizante da fração ativa isolada do veneno de *B. jararacussu*, que induzia inibição do potencial de ação composto. A mesma fração produziu elevação inicial na frequência de MEPPs. Em 1993, COGO *et al.* relataram também o efeito pré-sináptico do veneno de *B. insularis*, verificado pela indução de aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (MEPP) e de discreto aumento na amplitude da resposta contrátil em preparações de ave e camundongo.

A maior sensibilidade da preparação *biventer cervicis* de pintainho, quando comparada à preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, evidenciou-se principalmente em experimentos em que foi utilizada estimulação indireta. Por outro lado, sob estimulação direta, a preparação de camundongo apresentou-se mais sensível. Esta divergência, dependente do tipo de estimulação, pode estar relacionada com a população diferenciada de fibras glicolíticas e oxidativas presentes nestes venenos, como foi sugerido por FRANCO *et al.* (1998) que verificaram diferenças de respostas musculares ao avaliar a atividade neurotóxica e miotóxica das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu* e de suas principais toxinas (crotoxina e bothropstoxina), em preparações nervo frênico-diafragma e extensor *digitorum longus* de camundongo.

Após o fracionamento, a atividade bloqueadora do veneno foi recuperada nas frações correspondentes aos picos 2 e 3 (P2 e P3), que foram mais potentes que o veneno total em bloquear a contração muscular, na preparação nervo-músculo de pintainho, sem abolir a resposta contraturante da ACh, confirmando novamente a atividade pré-sináptica do veneno de *B. neuwiedi* (ZAMUNÉR *et al.*, 1997), à semelhança do veneno crotálico e da própria crotoxina (VITAL BRAZIL, FONTANA, HELUANY, 1979). A fração P3 pareceu ser o principal responsável pela atividade neurotóxica da peçonha em preparação de ave, por apresentar bloqueio total e irreversível com manutenção da resposta à ACh. DURIGON *et al.* (1998) têm observado que a fração P3 reproduz as características do veneno total como despolarização e aumento da frequência dos potenciais em miniatura (MEPPs), em diafragma de camundongo. Com essas características, podemos comparar este componente parcialmente purificado do veneno de *B. neuwiedi* mais uma vez com o veneno de cascavel ou com a própria crotoxina, que induz bloqueio precedido pela facilitação da liberação do neurotransmissor (VITAL BRAZIL *et al.*, 1979).

O fato de que as frações correspondentes aos picos 1 e 2 tenham sido mais eficientes em bloquear a resposta à adição de K^+ do que as frações referentes aos picos 3, 4 e 5 sugere que a miotoxicidade do veneno pode estar mais concentrada nos picos 1 e 2. Porém, o efeito miotóxico dessas frações

(assim como do veneno total) pareceu estar inibido a 24°C. Esse dado pode indicar que a miotoxidade seja induzida por uma substância enzimática.

A redução significativa do efeito bloqueador dos picos 2 e 3 à temperatura ambiente, demonstrada neste estudo, já era esperada devido ao relato de VIDAL & STOPPANI (1971), que caracterizaram duas fosfolipases A₂ (P-1 e P-2) no segundo e no terceiro picos do perfil cromatográfico, e pelo fato de que o veneno total também ter exibido o mesmo comportamento.

Neste estudo, a fração P3 induziu também aumento inicial da amplitude (ainda que discreto) da contração muscular evocada. Esta característica é mais comumente descrita para venenos crotálicos e elapídicos. A β -bungarotoxina, a crotoxina e a taipoxina agem pré-sinápticamente, interferindo na terminação nervosa motora (revisão de HOWARD & GUNDERSEN, 1980). Esse efeito é precedido por uma fase facilitatória, na qual a amplitude dos potenciais de placa evocados é aumentada (ABE, ALEMÀ & MILEDI, 1977; LIVENGOOD *et al.*, 1978). Essas toxinas possuem atividade fosfolipásica. A dendrotoxina também facilita a liberação evocada do neurotransmissor, porém é destituída de atividade fosfolipásica. DREYER & PENNER (1987) demonstraram que a β -bungarotoxina, a crotoxina, a taipoxina e a dendrotoxina possuem um mecanismo de ação pré-sináptico comum, ou seja, todas aumentam o influxo de

cálcio no terminal nervoso. Os mesmos autores sugeriram que esse mecanismo ocorria através da inibição dos canais de potássio.

Os venenos de serpentes contêm uma variedade de polipeptídeos farmacologicamente ativos. Dessa forma, e pelos resultados apresentados, pode-se sugerir que o veneno de *B. neuwiedi* possua mais de um componente responsável pelos efeitos no músculo e na placa motora. Ficou evidente que os efeitos do veneno nessa região estão relacionados com atividade enzimática; porém a redução da temperatura não aboliu todos esses efeitos, como no caso da fração correspondente ao pico 2, P2, que apresentou um intenso efeito facilitador a 24°C. Esse dado sugere que um componente não-enzimático também esteja envolvido na atividade neuromuscular do veneno, como no exemplo acima descrito, sobre a dendrotoxina, a β -bungarotoxina, a crotoxina e a taipoxina. Entretanto, somente através do isolamento e da caracterização de cada componente encontrado com atividade neuromuscular, seria possível alcançar a resposta para tais questões.

5. Conclusão

- Venenos de *Bothrops neuwiedi* extraídos de serpentes diferentes podem apresentar divergências marcantes quanto a sua atividade neurotóxica, porém parecem manter algumas características que os distinguem de outros venenos de serpentes, como contratura, facilitação precedendo o bloqueio, manutenção da resposta à adição de acetilcolina em baixas doses e inibição da resposta à adição de potássio.
 - O veneno bruto apresenta características que sugerem que o mesmo atue preferencialmente em sítios pré-sinápticos, como manutenção da resposta à ACh em baixas doses e bloqueio irreversível de preparações curarizadas, apesar de apresentar também um efeito pós-sináptico menos intenso e mais tardio.
 - O efeito neurotóxico do veneno e de suas frações ativas parece estar relacionado a sua atividade enzimática, uma vez que o mesmo é inibido na ausência de cálcio e em temperatura ambiente.
 - O veneno total demonstra possuir miotoxicidade, considerando-se a inibição da resposta contraturante ao potássio e à estimulação direta.
-

◆ A peçonha de *B. neuwiedi* demonstrou possuir um componente neurotóxico que, parcialmente isolado, possui atividade bloqueadora superior ao veneno total e menor intensidade de efeito sobre a membrana muscular, preservando a resposta dos receptores pós-sinápticos à adição da ACh.

Suporte Financeiro: CNPq / Faep

6. Summary

The objective of this research was to compare the neurotoxicity of *B. neuwiedi* venoms from São Paulo, Rio Grande do Sul and Minas Gerais States, aiming to the partial isolation of the neurotoxic component from the more active crude venom.

To evaluate the neurotoxic activity of the studied venoms we carried out a screening using the indirectly stimulated chick biventer cervicis preparation. We evaluated also the effect of the more active venom on directly stimulated chick muscle and on the directly and indirectly stimulated mouse phrenic nerve-diaphragm preparation. In these cases, the muscle was previously curarized. The various crude venoms were also compared by electrophoresis. The more active venom was fractionated by molecular exclusion. Afterwards, we carried out the assay of the resulting fractions in chick biventer cervicis preparation.

The venoms showed notable differences regarding their neuromuscular blocking activity and the venoms from São Paulo and Minas Gerais States were more active than those from Rio Grande do Sul. In spite of the evident diversity (2-90% of blockade at 20 $\mu\text{g/ml}$), all the venoms induced dose-dependent and irreversible blockade, besides contractures, and inhibited the response to KCl. Fourteen out of sixteen venoms preserved ACh response at concentrations up to 20 $\mu\text{g/ml}$, after 120 min of incubation, even when blockade persisted. The

electrophoretic patterns showed a band that was present only in some of the six more active crude venoms. The other venoms didn't showed that band.

The more potent venom inhibited the directly and indirectly stimulated mouse muscle as well as the directly stimulated chick muscle. At room temperature or in the absence of Ca^{++} , the effect on evoked twitch-tension and KCl response was significantly reduced. Under indirect stimulation, chick muscles were more sensitive to venom activity than mouse preparations; under direct stimulation, mouse muscle was more sensitive.

After fractionation, the neuromuscular activity was recovered in fractions P2 and P3, corresponding to peaks 2 and 3 of the elution profile. These fractions induced a higher and faster twitch-tension blockade than crude venom, with total maintenance of ACh response. While P2 blocked totally the contracture to K^+ , P3 caused a partial blockade. At room temperature, the effect of both active fractions on twitch-tension and KCl response were reduced.

Our results confirm the previous assumption that *B. neuwiedi* venom acts preferably at presynaptic sites, and at muscle cells. These actions are probably related to its enzymatic activity and they can vary according to the venom origin. The venom neuromuscular activity is presumably due to one or more neurotoxic components that correspond to peaks 2 and 3 of the elution profile.

6. Referências Bibliográficas

ABE, T.; ALEMÀ, S.; MILEDI, R. - Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of *Bungarus* snakes. **European Journal of Biochemistry**, **80**: 1-12, 1977.

ALMEIDA, A. R. P. - Farmacologia dos venenos animais. In: Penildon Silva, **Farmacologia**, 2. ed., 1985.

AMARAL, C. F.; 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.

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

BARRET, J. C. & HARVEY, A. L. - Effects of the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* on skeletal muscle and neuromuscular transmission. **Br. J. Pharmac.**, **67**: 199-205, 1979.

BRAZIL, V. - **La défense contre l'ophidisme**. São Paulo: Pocaí-Weiss And C., p.152, 1911.

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

CHANG, C. C. - Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. **Proc. Nat. Sci. Council. (R.O.C.)**, **B9**:126-142, 1985.

CHANG, C. C. & LEE, C. V. - Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. **Arch. Inst. Pharmac.**, **144**: 241, 1963.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, **31**: 1237-1247, 1993.

COSTA, P. D.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Isolation of a myotoxin from *Bothrops pirajai* venom and its effects on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation. **Toxicon** (in press), 1998.

DANIELE, J. J.; BIANCO, I. D.; FIDELIO, G. D. - Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, 318: 65-70, 1995.

DREYER, F. & PENNER, R. The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals. **J. Physiol.**, 386: 455-463, 1987.

DURIGON, A. M.; LEITE, G. B.; VALLIN, A. C.; COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J. SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Efeitos da peçonha de *Bothrops neuwiedi* na transmissão neuromuscular de mamífero e ave. **Toxicon** (in press), 1998.

FIERO, M. K.; SEIFERT, M. W.; WEAVER, T. J.; BONILLA, C. A. - Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus v. viridis*) venoms. **Toxicon**, 10: 81-82, 1972.

FONSECA, F. - **Animais peçonhentos**. São Paulo. Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, 1949.

FRANÇA, F. O. S. & FAN, H. W. - Acidente botrópico. In: **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. Schwartsman, S. Ed. Sarvier, 1992.

FRANCO, Y. O.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its mains toxin, crotoxin. **Toxicon** (in press), 1998.

GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. - The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. **Brit. J. Pharmacol.**, **15**: 410-411, 1960.

GRUNERT, E. & GRUNERT, D. -Observaciones de lesiones por mordedura de serpientes "*Bothrops*" en los bovidos y caballos en Rio Grande do Sul/Brasil. **Not. Med. Vet.**, **3**: 213-227, 1969.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R. - Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. **Rev. Biol. Trop.**, **28**: 341, 1980.

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, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. - Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, **51**: 211-233, 1989.

HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A.; MACDONELL, C. A. - Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins. In: **Natural Toxins** (EAKER, D. & WADSTROM, T., Eds.), pp. 569-578, Oxford, Pergamon Press, 1980.

HARRIS, J. B. & MACDONNEL, C. A. - Phospholipase A₂ activity of notexin and its role in muscle damage. **Toxicon**, **19**: 419-430, 1981.

HARRIS, J. B. & MALTIN, C. A. - Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin, of the Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*. **Br. J. Pharmac.**, **76**: 61, 1982.

HARVEY, A. L., BARFARAZ, A., THOMPSON, E., FAIZ, A., PRESTON, S. and HARRIS, J. B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. **Toxicon**, **32**: 257-265, 1994.

HAWGOOD, B. J. & SMITH, C. H. - The importance of phospholipase A₂ in the early induction by crotoxin of biphasic changes in endplate potentials at frog neuromuscular junction. **Toxicon**, **27**: 272-276, 1989.

HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDERBURGO, 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 preparation. **Toxicon**, **30**: 1203-1210, 1992.

HOFMANN, H. & BON, C. - Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. Identification, purification and properties of two factor X activators. **Biochem.**, **26**: 780-787, 1987.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. - Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization of bothropstoxin. **Toxicon**, **26**: 615-627, 1988.

HOWARD, B. D. & GUNDERSEN, C. B. - Effects and mechanism of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, **20**: 307-336, 1980.

KOUYOUMDJIAN, J. A. - Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin.

Toxicon, **24**: 575, 1986.

JIMENEZ-PORRAS, J. M. - Differentiation between *Bothrops numnifer* and

Bothrops picadoi by means of the biochemical properties of their venoms. In:

Animal Toxins (RUSSEL, F. E. & SAUNDERS, P. R., Eds.), pp. 307-321.

Pergamom Press, Oxford, 1967.

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.

LEE, C. Y. & HO, C. L. - The pharmacology of phospholipases A₂ isolated from

snakes venoms, with particular reference to their effects on neuromuscular

transmission. In: **Advances in Pharmacology and Therapeutics I**

(YOSHIDA, H. & Ebashi, S., eds.), vol. 4, Pergamon Press, Oxford, N. Y., pp.

37-52, 1982.

LEITE, L. C. C.; FURTADO F. D.; CORREA, T. C.; RAW, I. - Characterization of

the snake venoms from seven brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion-

exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102B**: 515-520,

1992.

LIVENGOOD, D. R.; MANALIS, R. S.; DONLON, M. A.; MASUKAWA, L. M.; TOBIAS, G. S.; SHAIN, W. - Blockade of neuromuscular transmission by enzymatically active and inactive β -bungarotoxin. **Proceed. Nat. Academ. Sciences U.S.A.**, **75**: 1029-1033, 1978.

MACCONNEL, J. G.; BLUM, M. S.; BUREN, W. F.; WILLIAMS, R. N.; FALES, H. M. - Fire ants venoms: chemotaxonomic correlations with alkaloidal compositions. **Toxicon**, **14**: 69, 1976.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. - Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca-pintada). **Toxicon**, **22**: 193-206, 1984.

MEIER, J. - Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). **Toxicon**, **24**: 41-46, 1986.

MEIER, J. & FREYVOGEL, T. A. - Comparative studies on the venoms of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*), carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricollis*) snakes at different ages. **Toxicon**, **18**: 661, 1980.

MINTON, S. A. - Observations on toxicity and antigenic make-up of venoms from juvenile snakes. In: **Animal Toxins** (RUSSEL, F. E. & SAUNDER, R. R., Eds), pp. 211-222. Oxford, Pergamon press, 1967.

MORENO, R. A. & PRADO-FRANCESCHI, J. - **Estudo dos efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada. Neutralização de efeitos pelo soro anti-botrópico comercial, 1991 (Tese de Mestrado - UNICAMP).**

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. - Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, **29**: 713-723, 1991.

MYERS, C. W. & DALY, J. W. - Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolution by studies of poison-dart frogs (*Dendrobatidae*). **Bull. Amer. Museum Nat. Hist.**, **153**: 175, 1976.

NAHAS, L. - Effect of heparin on the coagulant action of snake venoms. **Toxicon**, **13**: 457, 1975.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. - Thrombin-like and factor X activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost.**, **41**: 314-328, 1979.

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.

QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL A. P.; MANDELBAUM, F. R. - Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **18**: 337-340, 1985.

REID, H. A. & THEAKSTON, R. D. G. - Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snakes age. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **27**: 1053, 1978.

REISFELD, R. A.; LEWIS, W. J.; WILLIAMS, D. F. - Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, **195**: 281-283, 1962.

RODRIGUES, V. M.; SOARES A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J.R. - Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry Physiology** (in press), 1998.

RODRIGUES-SIMIONI, L., BORGESE, N.; CECCARELLI, B. - The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its componentes on frog nerve muscle preparation. **Neuroscience**, 2: 475-489, 1983.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous Animals and their Venoms** (BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E.E., Eds), vol. 2, pp. 395-362, Academic Press, New York, 1971.

SLOTTA, K. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, 12: 505, 1938.

SOERENSEN, B. - **Animais peçonhentos**. Livraria Atheneu Editora, São Paulo, 1990.

STRONG, P. N. - Presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins: relationship between biochemical and eletrophysiological approaches to the mechanism of toxin action. In: **The Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function** (Dowdall, M. J. and Hawthorne, J. N., Eds.), Chichester: Ellis Hirwood, pp. 534-549, 1987.

TABORSKA, E. & KORNALIK, F. - Individual variability of *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, **23**: 612, 1985.

TANIZAKI, M. M.; ZINGALI, R. B.; KAWAZAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S.; SUZUKI, K. - Purification and some characteristics of a zinc metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, **27**: 747-755, 1989.

VIDAL, J. C. & STOPPANI, A. O. M. - Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch. Biochem. Biophys.**, **145**: 543-556, 1971.

VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: **Farmacodinâmica** (CORBETT, C., Ed.), 6. ed., Guanabara Koogan, p. 1044-1074, Rio de Janeiro, 1982.

VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of cristalline crotoxin. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, **33**: 973, 1966.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; HELUANY, N. F. - Mode of action of crotoxin at the guinea-pig neuromuscular junction. **Toxicon**, **17** (Suppl. nº 1): 17, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Progress in characterization of venoms and standardization of antivenoms. **Publication off set n. 58**, 1981.

ZAMUNÉR, S. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - **Capacidade neutralizante de antiveneno comercial sobre as atividades neurotóxica e miotóxica de venenos botrópicos**, 1997 (Tese de Mestrado - UNICAMP).
