

MARIANA ACEDO PITOCCO RODRIGUES

“TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* (JARARACUÇU) E
bothropstoxina EM ÁTRIO DIREITO ISOLADO DE RATO”

CAMPINAS

UNICAMP

2010

MARIANA ACEDO PITOCCO RODRIGUES

“TOXICIDADE DA PEÇONHA DE BOTHROPS JARARACUSSU (JARARACUÇU)
EM ÁTRIO DIREITO ISOLADO DE RATO”

Tese de mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas-UNICAMP para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Stephen Hyslop

CAMPINAS

UNICAMP

2010

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

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

R618t Rodrigues, Mariana Acedo Pitocco
 Toxicidade da peçonha de *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) e
 bothropstoxina em átrio direito isolado de rato / Mariana Acedo
 Pitocco Rodrigues. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Stephen Hyslop
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bothrops jararacussu. 2. Farmacologia cardiovascular. 3.
Toxinologia. 4. Peçonhas. 5. Átrio. I. Hyslop, Stephen. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em inglês : Toxicity of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) snake venom and bothropstoxin in rat isolated right atria

Keywords: • *Bothrops jararacussu*
• Cardiovascular pharmacology
• Toxinology
• Venoms
• Atria

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Stephen Hyslop
Prof^a. Dr^a. Regina Célia Spadari Bratfisch
Prof^a. Dr^a. Sisi Marcondes Paschoal
Prof^a. Dr^a. Christiane Aparecida Badin Tarsitano
Prof^o. Dr^o. André Schenka

Data da defesa: 28-01-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Mariana Acedo Pitocco Rodrigues

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Stephen Hyslop

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Regina Célia Spadari

R.C.S.

Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal

Sisi Marcondes Paschoal

Professor (a) Doutor (a) Stephen Hyslop

[Signature]

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/01/2010

Dedico este trabalho ao meu marido Marcelo,
por seu amor, carinho, dedicação e principalmente apoio as minhas realizações
pessoas e por me fazer mais feliz a cada dia que passa.

Você é minha vida.

Aos meus pais Tereza Cristina e Sérgio, por sempre me incentivarem a continuar e
nunca desistir, sempre me mostrando o caminho do bem e principalmente da
honestidade. Vocês são o meu porto seguro e devo tudo que sei a vocês.

Obrigado por acreditarem em mim!

Amo vocês!

Ao meu irmão Leandro por sua amizade, respeito e principalmente por ser o melhor
irmão do mundo. Obrigada por você existir.

Aos meus avós, pela confiança depositada em mim e pelo amor que sempre me
dedicaram. Minha mais profunda gratidão por tudo.

Aos meus sogros Juracy e Madeleine por seu carinho e acolhimento, sempre
dispostos a ajudar e amparar. Vocês são minha segunda família!

A minha cunhada Ana Paula que me apresentou ao mundo da pesquisa e me
incentivou a começar essa jornada. Esse trabalho também é um pouquinho seu.

Obrigada irmã!

AGRADECIMENTOS

A Deus,
por me mostrar o caminho certo a seguir e pela força para concluir mais essa etapa
de minha vida, graças a sua infinita bondade e sabedoria.

Ao prof. Dr. Stephen Hyslop,
pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação e pelos seus
conhecimentos científicos compartilhados durante essa jornada. Sem sua grandiosa
colaboração nada seria possível.

Ao programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, bem como ao coordenador Prof. Dr. Edson Antunes, pelas condições
oferecidas para a realização deste trabalho.

A CAPES,
pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

As amigas Lourdes, Adriana e Raquel, pela amizade e companheirismo conquistados ao longo desta jornada. Sem vocês eu não conseguiria realizar esse trabalho. Obrigada por tudo.

Aos amigos André e Delano, pela valiosa contribuição em alguns experimentos e pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos Igor, Rafael, Norma, Kiara, Elionai, Sueli, Érica, Renata, Cássia, Alessandra, Christiane, Camila, Sandro e Delkia, pela paciência e pelas risadas nos momentos de folga.

Ao José Ilton dos Santos, técnico do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Departamento de Farmacologia, pela grandiosa ajuda em meus experimentos e por sua grande amizade.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Farmacologia, principalmente ao Miguel e a Denise, pelo cuidado e dedicação dispensado aos animais.

Aos colegas de curso de pós-graduação, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos animais que cederam suas vidas em benefício da pesquisa científica.
Meu mais sincero respeito.

*“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.
Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

Lista de drogas	xiii
Lista de siglas e abreviaturas	Xv
Lista de figuras	xvii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
1 - INTRODUÇÃO	24
1.1 - Envenenamento botrópico	25
1.2 - <i>Bothrops jararacussu</i>	27
1.2.1 -Principais componentes da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	29
1.2.2 - Antiveneno botrópico	34
2 – OBJETIVOS	36
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 – Animais	39
3.2 – Peçonha e antivenenos	39
3.3 – Tratamento da peçonha.....	40
3.3.1 – Diálise	40
3.3.2 – Aquecimento	40
3.3.3 – Fracionamento da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	40
3.3.4 – Atividades enzimáticas da peçonha e frações	42
3.4 – Átrio direito isolado de rato	43
3.4.1 – Incubação com peçonha ou fração	44
3.4.2 – Incubação com antivenenos	45

3.4.3 – Incubação com antagonistas	45
3.5 – Avaliação do dano tecidual	46
3.5.1 – Quantificação de creatinoquinase-MB (CK-MB)	46
3.5.2 – Histologia	47
3.6 – Análise estatística	47
4 – RESULTADOS	49
4.1 – Ação cardíaca da peçonha de <i>B. jararacussu</i> em átrio direito isolado de rato	50
4.2 - Efeito da peçonha aquecida, dialisada e não dialisada em átrio direito isolado de rato	54
4.3 - Fracionamento da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	57
4.3.1 - Cromatografia por exclusão molecular (gel filtração)	57
4.3.2 - Efeitos dos picos da gel filtração em átrio direito isolado de rato	59
4.3.3 - Cromatografia por troca iônica	63
4.3.4 - Efeitos dos picos da troca iônica em átrio direito isolado de rato	64
4.4 - Efeito dos antivenenos comerciais sobre as alterações causadas pela peçonha de <i>B. jararacussu</i> em átrio isolado de rato.....	68
4.5 - Efeito de diferentes antagonistas sobre as alterações causadas pela peçonha de <i>B. jararacussu</i> em átrio isolado de rato	77
5 – DISCUSSÃO.....	79
6 – CONCLUSÕES	87
7 – REFERÊNCIAS	89
8 – ANEXOS	99

LISTA DE DROGAS

DROGAS

DROGAS

PROCEDÊNCIA

Acetilcolina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Ácido ascórbico	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Adrenalina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Atropina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Bradicinina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Cimetidina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Heparina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Histamina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Indometacina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Isoflurano	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brasil)
L-NAME	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Pirilamina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
PLA ₂	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Propranolol	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
bpm	batimentos por minuto
PPB	peptídeos potencializadores de bradicinina
CK	creatinoquinase
CK-MB	creatinoquinase (isoforma cardíaca)
ECA	enzima conversora de angiotnsina
ECG	eletrocardiograma
EPM	erro padrão da média
FC	freqüência cardíaca
g	unidade de medida da força centrífuga
GMPc	guanosina 5'-monofosfato ciclíco
HE	hematoxilina – eosina
IRA	insuficiência renal aguda
i.v.	intravascular
NO	óxido nítrico
PA	pressão arterial
PLA ₂	fosfolipase A ₂
TAME	N α -p-Tosyl-L-arginina metil éster
U	unidade
UI	unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Principais componentes e mecanismos das peçonhas botrópicas	27
FIGURA 2	Distribuição de <i>B. jararacussu</i> na América do Sul e no Brasil	28
FIGURA 3	Principais componentes da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	30
FIGURA 4	Esquema dos protocolos realizados no átrio direito isolado de rato	44
FIGURA 5	Efeito da peçonha de <i>B. jararacussu</i> em átrio direito isolado de rato	51
FIGURA 6	Ação da peçonha de <i>B. jararacussu</i> sobre a força contrátil, freqüências atrial e liberação de CK-MB em átrio direito isolado de rato	52
FIGURA 7	Alterações histológicas causada pela peçonha de <i>B. jararacussu</i> em átrio direito isolado de rato incubado por 60 min	53
FIGURA 8	Ação da peçonha de <i>B. jararacussu</i> sob diálise, sem diálise e aquecimento sobre a força contrátil, freqüência atrial e atividade CK-MB	55
FIGURA 9	Alterações histológicas de átrio isolado de rato incubado com a peçonha de <i>B. jararacussu</i> dialisada, não dialisada e aquecida	56
FIGURA 10	Perfil de eluição da peçonha de <i>B. jararacussu</i> fracionada por gel filtração	57
FIGURA 11	Atividade enzimática dos picos cromatográficos por gel filtração	58
FIGURA 12	SDS-PAGE dos picos cromatográficos da gel filtração	59
FIGURA 13	Ação da fração III da peçonha de <i>B. jararacussu</i> sobre a força contrátil, freqüência atrial e atividade CK-MB	61

FIGURA 14	Alterações histológicas causadas pela fração III da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	62
FIGURA 15	Perfil de eluição da fração III da peçonha de <i>B. jararacussu</i> por troca iônica	63
FIGURA 16	SDS-PAGE dos picos cromatográficos por troca iônica	64
FIGURA 17	Ação da fração III3 da peçonha de <i>B. jararacussu</i> sobre a força contrátil, freqüência atrial e atividade CK-MB	66
FIGURA 18	Alterações histológicas causadas pela fração III3 da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	67
FIGURA 19	Ação da peçonha de <i>B. jararacussu</i> incubado com o antiveneno botrópico sobre a força contrátil e freqüência atrial	70
FIGURA 20	Ação da peçonha de <i>B. jararacussu</i> incubado com o antiveneno botrópico sobre a atividade de CK-MB	71
FIGURA 21	Alterações histológicas causadas pela peçonha de <i>B. jararacussu</i> na presença do antiveneno botrópico	72
FIGURA 22	Ação da peçonha de <i>B. jararacussu</i> incubado com o antiveneno botrópico/crotálico sobre a força contrátil e freqüência atrial	74
FIGURA 23	Ação da peçonha de <i>B. jararacussu</i> incubado com o antiveneno botrópico/crotálico sobre a atividade de CK-MB	75
FIGURA 24	Alterações histológicas causadas pela peçonha de <i>B. jararacussu</i> na presença do antiveneno botrópico/crotálico	76
FIGURA 25	Efeito da cimetidina na ação da peçonha de <i>B. jararacussu</i> em átrio direito isolado de rato	78

RESUMO

Serpentes do gênero *Bothrops* são a principal causa de acidentes ofídicos no Brasil. Acidentes envolvendo a *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) resultam em envenenamento moderado e grave, devido principalmente à grande quantidade de peçonha injetada por esta espécie. Entre os efeitos observados, o quadro de hipotensão e de choque são fatores importantes a serem considerados. Neste trabalho, avaliamos as alterações cardíacas causadas pela peçonha de *B. jararacussu* em átrio direito isolado de rato. A incubação das preparações com peçonha (0,025, 0,050, 0,1 e 0,2 mg/ml) resultou em uma marcada contratura atrial em altas concentrações que levou a uma redução progressiva da força contrátil e a frequência atrial, especialmente na maior concentração utilizada (0,2 mg/ml). A maior concentração da peçonha também causou uma marcada liberação de CK-BM e desorganização das fibras musculares atriais. A peçonha aquecida (100°C, 20 min) aboliu esta atividade enquanto a diálise não alterou significativamente essas respostas. O fracionamento da peçonha de *B. jararacussu* em cromatografia por gel filtração e troca iônica nos forneceu a fração (III3) que reproduziu todas as alterações funcionais e morfológicas vistas com a peçonha bruta. SDS-PAGE da fração III3, na presença e ausência de ditioneitol e β -mercaptoetanol revelaram uma massa molecular de ~28 KDa e 14 KDa, respectivamente, semelhantes às bothropstoxinas, as principais PLA₂ miotóxicas desta peçonha. Os antivenenos comerciais utilizados (botrópico e botrópico/crotálico) se mostraram eficientes em neutralizar os efeitos produzidos pela peçonha bruta tanto na força e frequência atriais como na liberação de CK-MB e nas alterações histológicas. A pré-incubação com antagonistas farmacológicos (bloqueadores de receptores adrenérgicos, histaminérgicos, muscarínicos, e inibidores da ciclooxigenase e óxido nítrico sintase) não afetou significativamente as alterações induzidas pela peçonha. Estes resultados indicam que as alterações induzidas pela peçonha de *B. jararacussu* estão envolvidas diretamente com o dano a fibra muscular atrial mediada provavelmente através da atividade das PLA₂ miotóxicas.

ABSTRACT

The genus *Bothrops* is the principal cause of snakebite in Brazil. Bites by *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) result in moderate to severe envenoming partly because of the large amount of venom injected by this species. Hypotension and circulatory shock are important systemic manifestations associated with bites by this species. In this work, we examined the cardiac alterations caused by *B. jararacussu* venom in rat isolated right atria. Incubation of atria with venom (0.025, 0.050, 0.1 and 0.2 mg/ml) resulted in marked muscle contracture at high concentrations that led to a progressive decrease in contractile force and beating rate, especially at the highest concentration (0.2 mg/ml). The highest venom concentrations also caused a marked release of CK-MB and disorganization of atrial muscle fibers. Heating the venom (100°C, 20 min) abolished this activity whereas dialysis did not significantly alter the responses. Fractionation of *B. jararacussu* venom by gel filtration and ion exchange chromatographies yielded a peak (III-3) that reproduced all of the morphological and functional changes seen with the venom. SDS-PAGE of the peak III-3 protein in the absence and presence of dithioereitol or β -mercaptoethanol revealed a molecular mass of ~28 KDa and 14 KDa, respectively, similar to bothropstoxins, the main myotoxic PLA₂ of this venom. Bothropic and bothropic/crotalic antivenoms prevented the venom (0.2 mg/ml)-induced decrease in contractile force and atrial rate, as well as the tissue damage (CK-MB release and histological alterations). Pre-incubation with adrenergic, histaminergic and muscarinic receptor antagonists, or with cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors, did not significantly affect the venom-induced changes. These results indicate that the *B. jararacussu* venom-induced alterations probably involve direct damage to atrial muscle fibers mediated by venom myotoxic PLA₂.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Envenenamento botrópico

Os acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública nos países tropicais pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam, excedendo a 2,5 milhões de acidentes por ano no mundo (1). Existem no Brasil quatro gêneros de serpentes peçonhentas, sendo três (*Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) pertencentes à família Viperidae, subfamília Crotalinae, e uma (*Micrurus*) da família Elapidae, subfamília Elapinae (2). O gênero *Bothrops* (jararacas) é o principal causador de acidentes ofídicos (90,5%), seguido dos gêneros *Crotalus* (cascavéis) (7,7%), *Lachesis* (surucucu) (1,4%) e *Micrurus* (corais) (0,4%), conferindo uma média de incidência de aproximadamente 20.000 acidentes/ano (3,4,5,6).

A prevalência dos acidentes ofídicos varia para cada região do país, sendo as regiões Sudeste e Sul as que registram um maior número de acidentes, talvez devido à maior densidade populacional e o acesso a serviços de saúde e sistemas de informações (5). A letalidade do acidente ofídico está diretamente ligada ao tempo de atendimento médico após o acidente e ao tipo de envenenamento, podendo aumentar em até oito vezes essa taxa se o tempo de atendimento for maior que seis horas decorridas após a picada (6).

A ocorrência dos acidentes ofídicos está diretamente relacionada a fatores climáticos como períodos de calor e chuva, quando há um aumento do trabalho na zona rural devido ao preparo da terra, plantio e colheita e à ocorrência de várias espécies do gênero *Bothrops* em regiões com elevada população humana (7,8,9).

Os acidentes ofídicos acometem mais adultos jovens do sexo masculino (cerca de 70% na faixa etária de 15-49 anos), sendo os pés e as pernas os locais mais atingidos, seguidos de mãos e antebraços.

As peçonhas botrópicas são misturas complexas de enzimas, peptídeos e compostos não enzimáticos com diferentes atividades biológicas (10,11,12) que servem para imobilizar e matar a presa, além de contribuir para a posterior digestão da mesma. A peçonha botrópica exerce três atividades principais (Fig. 1): 1) atividade edematogênica e inflamatória, mediada por fosfolipases A_2 e proteases, 2) atividade coagulante, mediada por enzimas trombina-símile (semelhante à ação da trombina) e ativadoras de protrombina e do fator X que promovem o consumo dos fatores de coagulação com conseqüente alteração da coagulação sangüínea, e 3) atividade hemorrágica, mediada por metaloproteinases que atuam no endotélio vascular local e sistêmica levando ao extravasamento de sangue e sangramento sistêmico (11,13,14,15,16,17,18).

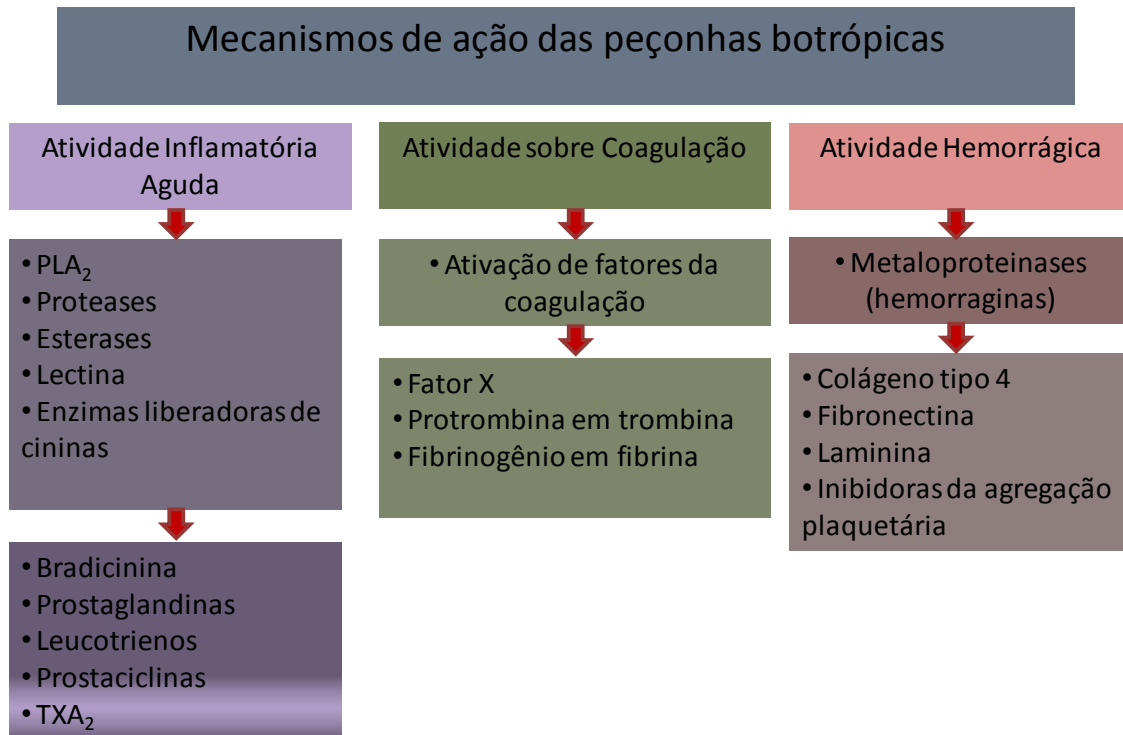


Figura 1. Principais componentes e mecanismo de ação das peçonhas botrópicas.

Os pacientes picados por *Bothrops* normalmente mostram efeitos locais e sistêmicos. As ações locais incluem dor, abscessos, edema com formação de bolhas contendo líquido seroso, hemorragia e necrose, sinais estes que podem ser agravados pela presença de fatores coagulantes na peçonha (17). Já os efeitos sistêmicos consistem principalmente de sangramento, choque cardiovascular, processo de coagulação intravascular disseminada, septicemia, insuficiência respiratória e insuficiência renal aguda (IRA) podendo levar à morte nos casos mais graves (17,18).

1.2 – *Bothrops jararacussu*

O nome jararacuçu vem do tupi yararakusu, significando grande jararaca. Dentre as serpentes desse gênero, a *Bothrops jararacussu* pode alcançar 2,2 m de comprimento (2,8,19) e injetar até 4 ml de peçonha bruta, correspondendo a 1 g da peçonha em peso seco (20). Esta espécie é encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil, no sudeste da Bolívia e Paraguai e nordeste da Argentina (Fig. 2).



Figura 2. Distribuição de *B. jararacussu* na América do Sul e no Brasil.

O envenenamento por *B. jararacussu* produz sinais e sintomas semelhantes a outras espécies botrópicas, com hemorragia, edema e necrose marcantes (19,21,22,23). A mionecrose é o efeito mais proeminente em curto prazo nos

acidentes causados por *B. jararacussu* e, a perda de massa muscular relacionada à pobre regeneração muscular é uma seqüela comum que pode levar à disfunção permanente do membro afetado e até mesmo a necessidade de amputação (22,24,25). Esta mionecrose pode ser devida à degeneração vascular e isquemia causada por metaloproteinases, ou devida à ação direta das miotoxinas da peçonha sobre a membrana plasmática de células musculares (11,16,26,27,28, 29).

A peçonha de *B. jararacussu* tem maior atividade miotóxica que outras peçonhas botrópicas, causando necrose de fibras musculares e liberação de creatinoquinase na circulação (19). A miotoxicidade das peçonhas ofídicas pode ser monitorada pelo aumento da atividade de creatinoquinase (CK) no plasma; este aumento resulta do dano ao sarcolema.

1.2.1 – Principais componentes da peçonha de *B. jararacussu*

A peçonha de *B. jararacussu* produz efeitos locais e sistêmicos que resultam principalmente da ação concomitante de fosfolipases A₂ (PLA₂), proteases (metaloproteinases e serinoproteinases), lectinas e peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) (Fig. 3).

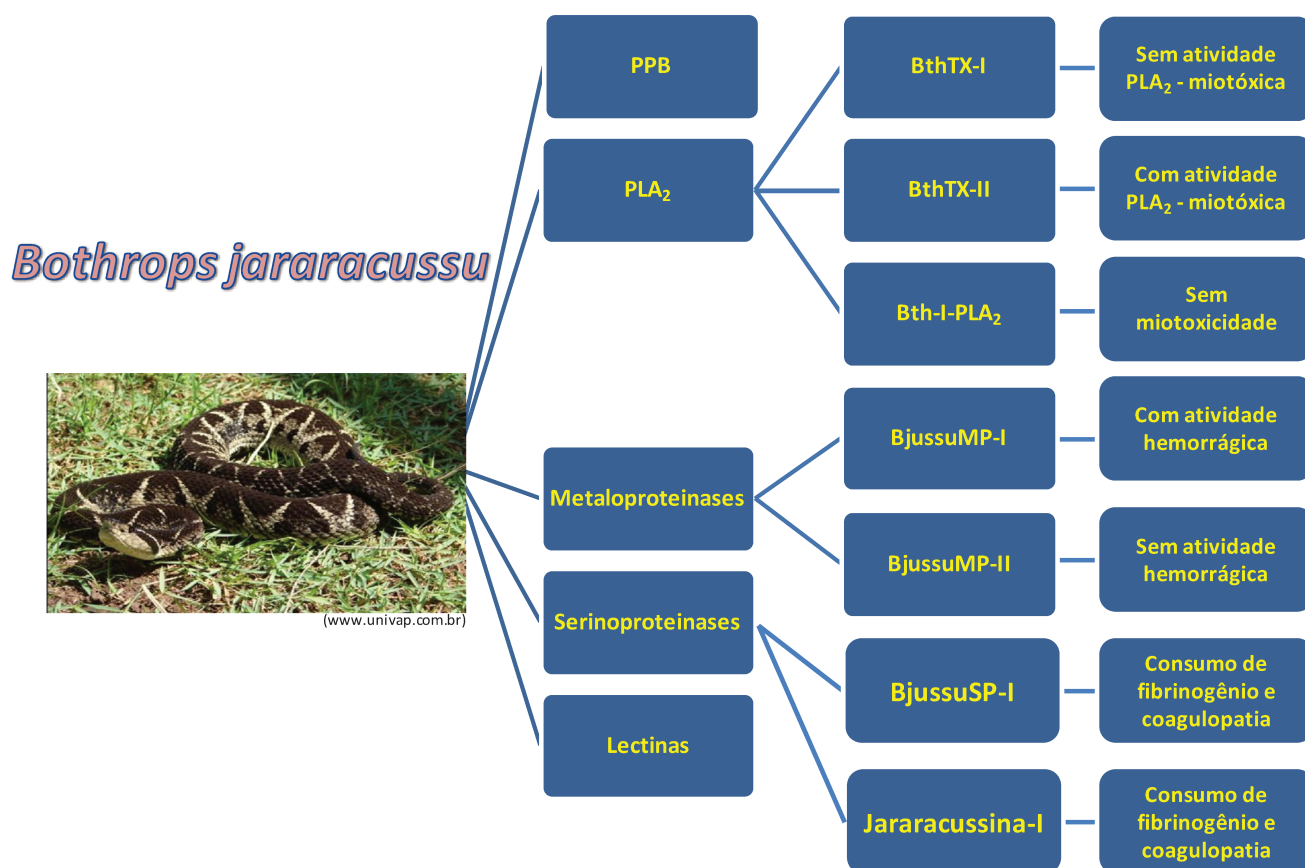


Figura 3. Principais componentes da peçonha de *B. jararacussu*.

PLA₂ – fosfolipase A₂; PPB – peptídeos potencializadores da bradicina.

Para definição das toxinas, ver texto.

Fosfolipases A₂

As PLA₂, principais miotoxinas das peçonhas botrópicas, apresentam importantes efeitos como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, atividade hemolítica, anticoagulante, inibição da agregação plaquetária e indução de edema (30). Já foram isoladas e caracterizadas algumas PLA₂ da peçonha de *B. jararacussu* como as PLA₂ básicas bothropstoxina-I (BthTX-I) (26), uma Lys49, desprovida de atividade enzimática, e a bothropstoxina-II (BthTX-II) (31), uma Asp 49 com

atividade enzimática. Ambas possuem massa molecular de aproximadamente 14 KDa e são miotóxicas. Algumas PLA₂ ácidas também já foram isoladas porém possuem pouca ou nenhuma atividade miotóxica. A BthA-I-PLA₂ possui atividade antiplaquetária e hipotensora (30). Já Ketelhut *et al.* (32) isolaram quatro PLA₂ ácidas sendo elas SIIISPIIA, SIIISPIIB e SIIISPIIIA, com atividade anticoagulante e, SIIISPIIIB, inibidora da agregação plaquetária, com massa molecular de aproximadamente 15 KDa.

Proteases

As peçonhas ofídicas, inclusive as botrópicas, são fontes ricas de metaloproteinases e serinoproteinases (33). As metaloproteinases, que são dependentes de zinco, são capazes de hidrolisarem as proteínas da lâmina basal de vasos sangüíneos, incluindo fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, levando ao extravasamento de sangue e o quadro de hemorragia; podem também apresentar atividade fibrinogenolítica (11,34).

Mazzi *et al.* (35) purificaram a metaloproteinase BjussuMP-I da peçonha de *B. jararacussu* e mostraram que esta proteína de 60 KDa é hemorrágica mas não miotóxica, quando comparada com à BthTX-I isolada da mesma peçonha. Também foi isolada a BjussuMP-II, uma metaloproteinase fibrinogenolítica não hemorrágica de 24 KDa (36).

Tem sido sugerido que os domínios tipo disintegrina e rico em cisteína, presentes em grandes metaloproteinases, contribuam para a sua atividade hemorrágica, tornando possível que a ausência dos domínios disintegrina e rico em cisteína determinem a falta de atividade hemorrágica na BjussuMP-II. Por

outro lado ainda não foi completamente elucidado o mecanismo de ação das metaloproteinases, embora se saiba que a degradação enzimática da membrana basal é o passo inicial para a sua atuação (11,37,38).

As serinoproteinases que contribuem para o quadro de envenenamento por *B. jararacussu* exibem um perfil farmacológico diversificado, incluindo ações sobre a cascata de coagulação, tais como atividade tipo trombina, ativação do fator V, ativação da proteína C, fibrinogenólise, ativação de plasminogênio e indução da agregação plaquetária. Também podem exercer atividade tipo caliceína, liberando bradicinina e, portanto, promovendo um aumento da permeabilidade vascular e hipotensão (39,40).

Várias serinoproteases já foram isoladas e caracterizadas da peçonha de *B. jararacussu*. Zaganelli *et al.* (3) identificaram a FC-Bj, uma enzima com atividade tipo trombina e caliceína. Já a serinoproteinase jararacussina-I apresentou atividade coagulante e conversora de fibrinogênio, assemelhando-se muito com a FC-Bj (41).

A BjussuSP-I, uma serinoproteinase tipo trombina, também isolada da peçonha de *B. jararacussu*, não causou alterações patológicas locais quando aplicadas em camundongos, mas possui potente atividade fibrinogenolítica, sugerindo que seu papel principal no envenenamento está associado ao consumo de fibrinogênio e coagulopatia, num efeito que pode exacerbar a atividade hemorrágica local induzida por metaloproteinases (42).

Lectinas

As lectinas de peçonhas botrópicas correspondem a menos que 1% do peso seco da peçonha e têm massas moleculares em torno de 28 KDa (43). Estas proteínas causam hemoaglutinação, agregação plaquetária (44), indução de edema de pata em camundongo (43,45) e modulação da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético (46), e efeitos renais em rim isolado (47).

Panunto *et al.* (45) estudaram uma lectina (BjcuL) da peçonha de *B. jararacussu* e sugeriram que esta proteína estava relacionada mais aos efeitos locais do envenenamento do que aos efeitos sistêmicos, já que foi capaz de promover edema e aumento da permeabilidade vascular.

Peptídeos potencializadores de bradicinina (PPB)

A peçonha de *B. jararacussu*, assim como a peçonha de *B. jararaca*, possui PPB que atuam na enzima conversora de angiotensina (ECA) inibindo a conversão de angiotensina I em angiotensina II (potente vasoconstritor) e a degradação da bradicinina (potente vasodilatador) (48). A principal consequência desta inibição é vasodilatação levando à hipotensão, característica importante do envenenamento botrópico.

Ferreira *et al.* (49) identificaram seis PPB na peçonha de *B. jararacussu*, sendo que o peptídeo P foi mais ativo que o captopril em inibir a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Havt *et al.* (50) atribuíram aos PPB a intensa diurese promovida pela peçonha de *B. jararacussu* em rins isolados perfundidos de ratos.

1.2.2 – Antiveneno botrópico

O tratamento mais eficaz para o envenenamento botrópico é a terapia com soro anti-botrópico (antiveneno), sendo que a dose de antiveneno administrada é determinada de acordo com a sintomatologia do envenenamento, classificada em leve, moderada ou grave (51). Entretanto, o antiveneno não é capaz de reverter o quadro de necrose, embora experimentalmente pode prevenir seu desenvolvimento se administrado precocemente (52). Esta capacidade limitada de neutralização se deve a rápida manifestação das reações locais e pelo fato de que os antivenenos não são capazes de reverter às lesões já estabelecidas ou desencadeadas (53).

O antisoro pode ser obtido através da inoculação de peçonhas de diferentes espécies do mesmo gênero em animais experimentais ou misturando-se soros de vários animais inoculados com diferentes espécies de serpentes. No Brasil, o soro anti-botrópico é produzido em cavalos imunizados com as peçonhas de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, podendo ocorrer variações nas espécies conforme a instituição que produz esses antisoros (1,54).

No caso de *B. jararacussu*, embora a soroterapia seja feita principalmente com o antiveneno botrópico, há evidências clínicas (55) e experimentais (56) de que a letalidade desta peçonha pode ser neutralizada melhor por uma mistura de antivenenos botrópico e crotálico ou um antiveneno botrópico/crotálico. Queiroz *et al.* (57) atribuíram a pobre neutralização da peçonha de *B. jararacussu* por antiveneno botrópico a diferenças imunológicas entre as proteinases desta peçonha e os anticorpos presentes no antiveneno botrópico.

Conforme indicado acima, a peçonha de *B. jararacussu* pode causar hipotensão e choque cardiovascular, mas ainda pouco se sabe sobre seus efeitos cardíacos diretos (58). Sendo assim, nesse estudo, avaliamos as alterações causadas pela peçonha de *B. jararacussu* em átrio direito isolado de rato, bem como os possíveis mediadores envolvidos nessas respostas. Avaliamos também a capacidade de neutralização por parte dos antivenenos comerciais utilizados no envenenamento por esta espécie.

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

Neste trabalho, usamos o átrio direito isolado de rato para:

1. Investigar a toxicidade da peçonha de *B. jararacussu* e suas frações sobre o cronotropismo e inotropismo atriais.
2. Avaliar as lesões teciduais causadas pela peçonha de *B. jararacussu* e suas frações, através da quantificação da liberação de creatino-quinase-MB e da análise histológica.
3. Avaliar a capacidade de antivenenos comerciais em neutralizar as alterações cardíacas causadas pela peçonha de *B. jararacussu*.
4. Avaliar os possíveis mediadores envolvidos nos efeitos inotrópicos e cronotrópicos do átrio na presença da peçonha de *B. jararacussu*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Ratos machos Wistar (300-400 g) foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, sob ciclo de luz/escuro de 12 h a $23 \pm 2^\circ \text{C}$, com livre acesso à comida e água, até o momento do experimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP, protocolo nº 1433-1), e realizados de acordo com as recomendações éticas da Sociedade Brasileira para a Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL, antigo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal - COBEA).

3.2 – Peçonha e antivenenos

A peçonha de *B. jararacussu* fornecida pelo Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP) foi obtida de exemplares adultos de ambos os sexos, liofilizada e estocada a -20°C até o uso. A peçonha foi diluída, no momento da incubação, em solução de Krebs-Henseleit (200 μl).

Os antivenenos botrópico e botrópico/crotálico produzido pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP) foram cedidos pelo Centro de Controle de Intoxicações (CCI, Hospital das Clínicas, UNICAMP) e foram estocados a 4°C até o uso. A proporção de antiveneno usado nos experimentos foi baseada nas recomendações para o uso terapêutico, onde 1 ml neutraliza 5 mg da peçonha botrópica.

3.3. – Tratamento da peçonha

3.3.1 – Diálise

A peçonha de *B. jararacussu* foi dialisada contra solução de NaCl a 0,9% por 24 h em geladeira (membrana de diálise de celulose, com limite de diálise de 5 KDa). Os átrios, previamente isolados e estabilizados conforme descrito no item 3.4 abaixo, foram incubados por 60 min com a peçonha dialisada (0,2 mg/ml) para a análise do envolvimento de substâncias de baixa massa molecular (≤ 5 KDa). A peçonha não-dialisada mas diluída no mesmo tempo da peçonha dialisada e estocada a 4°C por 24 h foi usado como controle para comparação com a dialisada. Foram coletadas alíquotas (200 μ l) da solução de KH no início (antes da adição de peçonha; basal) e no término (após 60 min de incubação) do experimento para avaliar a liberação de CK-MB no banho.

3.3.2 – Aquecimento

A peçonha de *B. jararacussu* foi aquecida por 20 min a 100°C e em seguida foi diluída em 200 μ l de KH e testada em átrios isolados (item 3.4) para avaliar a influência do calor sobre a atividade da peçonha. Foram coletadas alíquotas (200 μ l) da solução de KH no início (antes da adição de peçonha; basal) e no término (após 60 min de incubação) do experimento para avaliar a liberação de CK-MB no banho.

3.3.3 – Fracionamento da peçonha de *B. jararacussu*

Para identificar o componente responsável pela cardiotoxicidade da peçonha foram realizadas cromatografias de gel filtração e de troca iônica.

Cromatografia por exclusão molecular (gel filtração)

A peçonha de *B. jararacussu* (100 mg), diluída em tampão fosfato de sódio 50 mM, em pH 7,4, foi centrifugada (10.000 *g*, 10 min, 4°C) e o sobrenadante aplicado à uma coluna de Superdex 75 (16 cm x 60 cm) equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 50 mM, em pH 7,4, com fluxo de 1 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado em 280 nm e frações de 1 ml foram coletadas usando um sistema cromatográfico ÄKTApurifier10 (GE Lifesciences, Piscataway, NJ, EUA). O conteúdo protéico dos picos foi quantificado por leitura a 280 nm, onde $A_{280\text{nm}}$ de 1,0 corresponde a uma concentração de 1,0 mg/ml. As frações foram testadas em átrio isolado (item 3.4.1) e a ativa foi usada para a próxima etapa cromatográfica.

Cromatografia por troca iônica

O pico ativo da etapa anterior (pico III, 10 mg) foi cromatografado por troca iônica em uma coluna HiTrap® SP-Sepharose (5 ml). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, em pH 7,0 (fluxo de 0,5 ml/min) e as proteínas foram eluídas em gradiente linear (0-1 M) de NaCl. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e frações de 1 ml foram coletadas e testadas em átrio isolado (item 3.4.1).

Eletroforese por SDS-PAGE

Os picos cromatográficos obtidos nas etapas acima foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida de 15% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) seguido por coloração com azul de Coomassie (59).

3.3.4 – Atividades enzimáticas da peçonha e frações

Atividade proteolítica

Alíquotas de 100 µl de peçonha ou pico cromatográfico foram adicionadas a 1,9 ml de caseína bovina 1% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8. A mistura foi incubada a 37°C por 20 min, seguido pela adição de 2 mL de ácido tricloroacético 5% e incubação em gelo por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (2.500 g, 15 min) e a absorbância do sobrenadante a 280 nm foi determinada. Uma unidade de atividade corresponde a um aumento de absorbância de 0,001 por min.

Atividade esterásica

Alíquotas de 30 µl de peçonha ou pico cromatográfico foram incubadas com substrato TAME (0,5 mM) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 à temperatura ambiente por 10 min e o aumento de absorbância foi monitorado a 253 nm. Uma unidade de atividade corresponde a um aumento de absorbância de 0,001 por min.

Atividade fosfolipásica

Alíquotas de 20 µl de peçonha ou pico cromatográfico foram incubadas com fosfatidilcolina (7,2 mg/ml) e tampão de reação (Triton X-100, Hepes, CaCl₂ e azul de bromotimol) em pH 8,0, por 5 min a 37°C e, em seguida, foi realizada a leitura a 620 nm. Uma unidade de atividade corresponde a um aumento de absorbância de 0,001 por min.

3.4 – Átrio direito isolado de rato

Os ratos foram anestesiados com isoflurano e exsanguinados por secção dos vasos cervicais. Em seguida, foi realizada a toracotomia bilateral e os corações foram rapidamente removidos e mergulhados em solução de Krebs-Henseleit (KH; composição, em mM: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 0,45; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,03; D-glicose 11,1; ácido ascórbico 0,14; pH 7,4) a 25°C. Em seguida, o átrio direito foi isolado do músculo cardíaco e limpo antes de ser montado sob tensão de 1-2 g em um banho de órgão contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit mantida a 37°C e continuamente gaseificada com 5% CO₂ e 95% O₂ (60,61). A frequência e a força contrátil foram registradas continuamente através de um transdutor isométrico de tensão acoplado a um pré-amplificador e computador (ADInstruments, Castle Hill, Austrália), e os registros foram feitos com Software Chart 6 (PowerLab da ADInstruments). Após 40 min de estabilização, os átrios foram lavados três vezes com a solução de KH e, após adição de nova solução, foram incubados por mais 20 min para permitir recuperação de eventuais efeitos das lavagens, antes da incubação com peçonha ou fração.

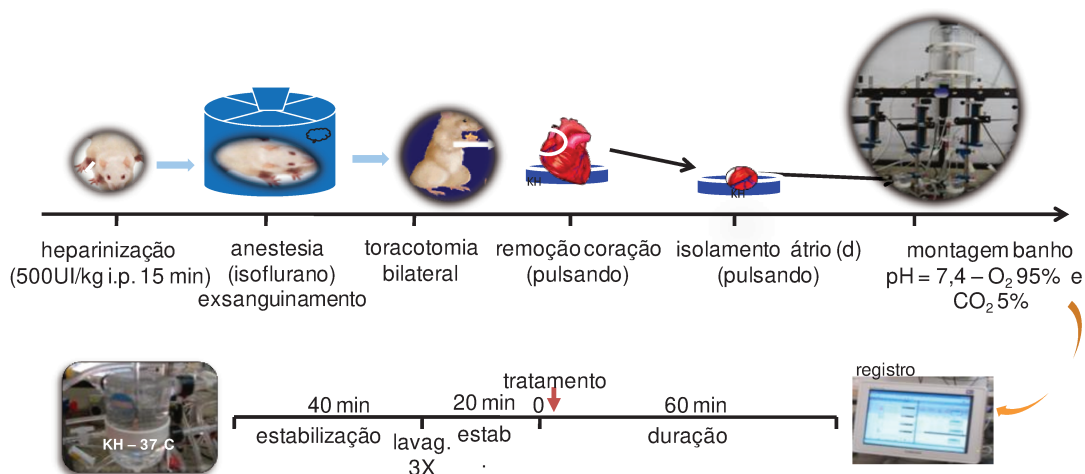


Figura 4. Esquema dos protocolos, realizados com átrio direito isolado de rato.

3.4.1 – Incubação com peçonha ou fração

Os átrios isolados foram incubados com peçonha (0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 mg/ml) diluída em 200 µl de solução KH; nos grupos controles, foram adicionados 200 µl de KH. A frequência e a força contrátil do átrio direito foram monitoradas durante 60 min após a adição de peçonha ou solução KH sozinha. As concentrações da peçonha foram escolhidas baseadas em experimentos preliminares usando concentrações variadas, seguindo uma escala linear.

De modo semelhante ao que foi feito com a peçonha, os átrios foram incubados com as frações cromatográficas por 60 min para identificar a fração ativa responsável pela ação da peçonha. As concentrações das frações variaram de acordo com a proporção que cada fração representava do conteúdo protéico total da peçonha. Sendo assim, as concentrações utilizadas para as frações obtidas a partir da cromatografia por gel filtração foram: fração I = 0,92 mg de proteína, fração II = 0,8 mg de proteína, fração III = 1,24 mg de proteína, fração IV = 0,08 mg de proteína e fração V = 0,28 mg de proteína. Para as frações obtidas

por troca iônica da fração III as concentrações foram: fração III1 = 0,03 mg de proteína, fração III2 = 0,19 mg de proteína e fração III3 = 0,92 mg de proteína. Foram coletadas amostras (200 µl) da solução de KH nos tempos basais e finais para avaliar a liberação de CK-MB.

3.4.2 – Incubação com antivenenos

A peçonha de *B. jararacussu* (0,2 mg/ml) foi incubada com o antiveneno botrópico ou bothrópico/crotálico (37°C por 60 min) na proporção recomendada para o uso terapêutico (1 ml de antiveneno neutraliza 5 mg de peçonha; Instituto Butantan, São Paulo) e testada em seguida em átrios isolados (item 3.4) para avaliar a capacidade neutralizante do antiveneno sobre a ação cardiotóxica da peçonha. Em outro protocolo, o antiveneno (0.8 ml) foi adicionado ao banho 1 min após a adição da peçonha (0,2 mg/ml), sem a pré-incubação inicial. Foram coletadas amostras (200 µl) da solução de KH nos tempos basais e finais para avaliar a liberação de CK-MB.

3.4.3 – Incubação com antagonistas

Para avaliar o envolvimento de possíveis mediadores endógenos na resposta à peçonha, foram realizados experimentos com antagonistas e uma concentração fixa de peçonha (0,2 mg/ml) escolhida baseada na curva concentração-resposta obtida no item 3.4. Nestes experimentos, os átrios foram pré-incubados com os seguintes antagonistas antes da adição da peçonha:

Propranolol (5 µM) – antagonista não seletivo dos receptores β-adrenérgicos (61,62).

Atropina (5,6 μM) – antagonista colinérgico não seletivo dos receptores muscarínicos (63).

Cimetidina (10 μM) – antagonista seletivo dos receptores H_2 histaminérgicos (64).

Indometacina (10 μM) – inibidor da ciclooxigenase (62).

L-NAME (300 μM) – inibidor da enzima óxido nítrico sintase (61).

Pirilamina (1 μM) – antagonista seletivo dos receptores H_1 histaminérgicos (65).

Os antagonistas foram pré-incubados (separadamente) com os átrios por 10 min, exceto para indometacina e L-NAME, para os quais a pré-incubação foi de 20 min. A peçonha foi adicionada logo após a pré-incubação e as respostas foram monitorados por 60 min.

As concentrações dos antagonistas foram escolhidas baseadas em experimentos com os respectivos agonistas para verificar a eficácia da inibição. Esses resultados serviram como controle positivo para os referidos antagonistas versus peçonha e em todos os casos a inibição da resposta ao agonista foi >95% (dados não mostrados).

3.5 – Avaliação de dano tecidual

O dano tecidual produzido pela peçonha e suas frações foi avaliado através da liberação de CK-MB pelo músculo e por análise histológica.

3.5.1 – Quantificação de creatinoquinase-MB (CK-MB)

Imediatamente após a estabilização (medida basal) e no final do experimento, foram coletadas amostras (200 µl) da solução de KH do banho para quantificação de CK-MB. A atividade desta enzima foi determinada usando kits comerciais (LaborLab, São Paulo, SP), por um método cinético UV, seguindo-se as instruções do fabricante. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/Vis (Beckman Coulter DU 800) e os resultados foram expressos em U/ml.

3.5.2 – Histologia

Terminado a incubação de 60 min com peçonha ou fração, os átrios foram fixados em formol tamponado (10%) durante 18 h. Em seguida, foram lavados três vezes por 15 min cada, em água. Para a desidratação dos tecidos foram utilizados gradientes crescentes de alcoóis (etanol), seguido de diafanização em xilol, e embebição e inclusão em parafina (Histosec-Merck). Secções de 5 µm de espessura foram obtidas usando um micrótomo (Leica RM 2245, Alemanha) e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise das alterações histológicas. As lâminas foram examinadas em microscopia de luz (Leica DM 5000B) através de teste duplo cego, em um aumento de 40 vezes. As imagens foram capturadas a partir da região central das lâminas para que não houvesse interferência de áreas de corte cirúrgico do tecido na interpretação dos resultados. As imagens foram processadas e analisadas usando uma câmera CCD Leica DFC 300 FX e softwares de processamento e análises de imagem Leica Q Win Plus v.3.2.0.

3.6 – Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM, e as análises estatísticas foram feitas através do teste *t* de Student ou da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Prism versão 4 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Ação cardíaca da peçonha de *B. jararacussu* em átrio direito isolado de rato

A incubação com a peçonha de *B. jararacussu* (0,025 – 0,2 mg/ml) resultou em um efeito bifásico transitório na força contrátil dos átrios isolados, principalmente nas maiores concentrações, bem como uma contratura (aumento da linha base) do tecido atrial (Fig. 5). Esta contratura refletiu na força contrátil atrial onde, com as menores concentrações (0,025 e 0,05 mg/ml), não foi vista nenhuma redução significativa na contração atrial enquanto que, nas maiores concentrações (0,1 e 0,2 mg/ml), as reduções chegaram a aproximadamente 37% e 62% respectivamente, a partir dos 5 min de experimento e, até 87% e 97% aos 60 min (Fig. 6A). De modo semelhante, as concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 mg/ml não alteraram significativamente a frequência atrial durante o experimento. Já a maior concentração provocou uma redução significativa na frequência atrial em aproximadamente 60% após 30 minutos (Fig. 6B).

Houve aumento significativo na liberação de CK-MB com as concentrações de peçonha testadas (Fig. 6C), sugerindo dano ao tecido muscular, já que esta enzima é um marcador específico de lesão tecidual cardíaca. Em concordância com esses dados, a análise histológica revelou uma discreta desorganização das fibras musculares nos átrios incubados com as menores concentrações da peçonha (Fig. 7B,C) e uma grande alteração nos átrios incubados com as maiores concentrações da peçonha (Fig. 7D,E) quando comparadas ao grupo controle (Fig. 7A).

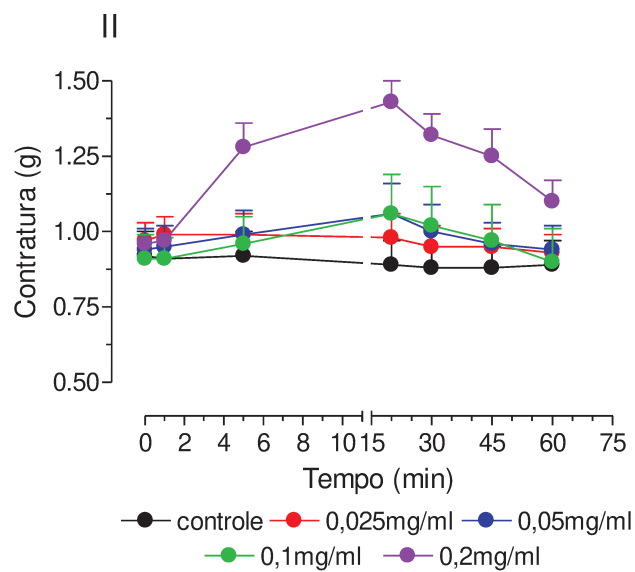
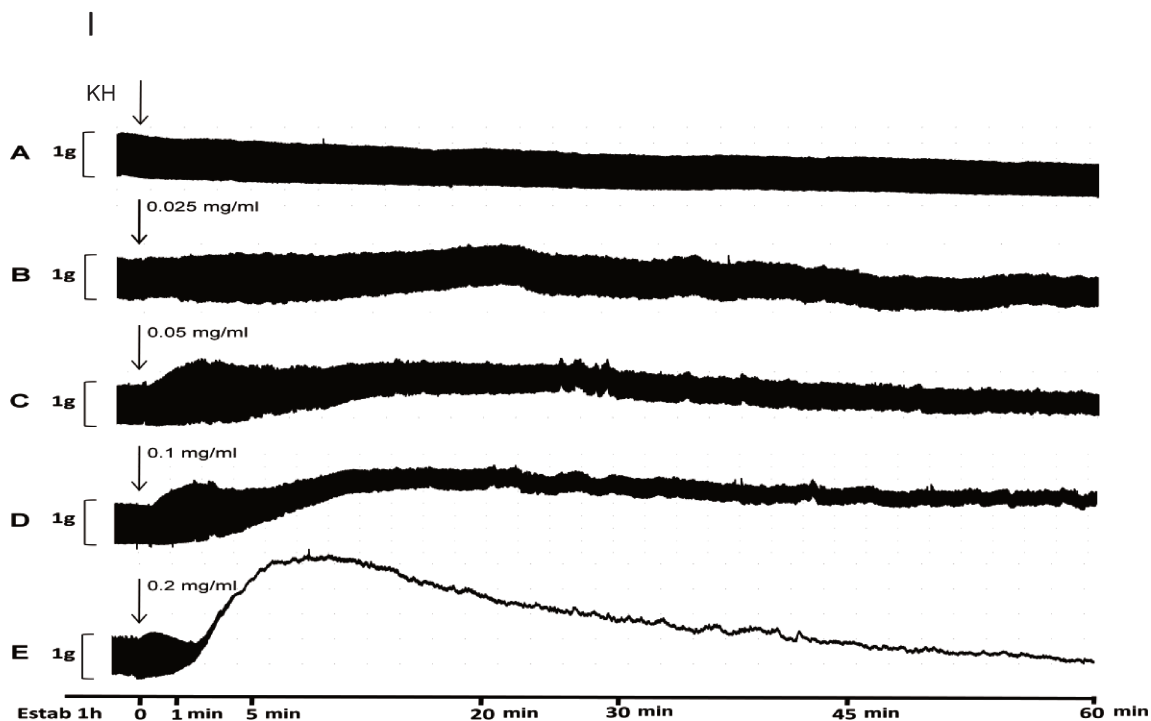


Figura 5. Efeito da peçonha de *B. jararacussu* em átrio isolado de rato. Os traçados do painel I, mostram a resposta inotrópica para (A) controle, (B) 0,025 mg/ml, (C) 0,05 mg/ml, (D) 0,1 mg/ml e (E) 0,2 mg/ml. As setas indicam a adição da solução de Krebs-Henseleit (KH, controle) ou peçonha ao banho. Estab = estabilização durante 1 h. No painel II efeito de contratura do átrio na presença da peçonha de *B. jararacussu* (0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 mg/ml) e KH (controle).

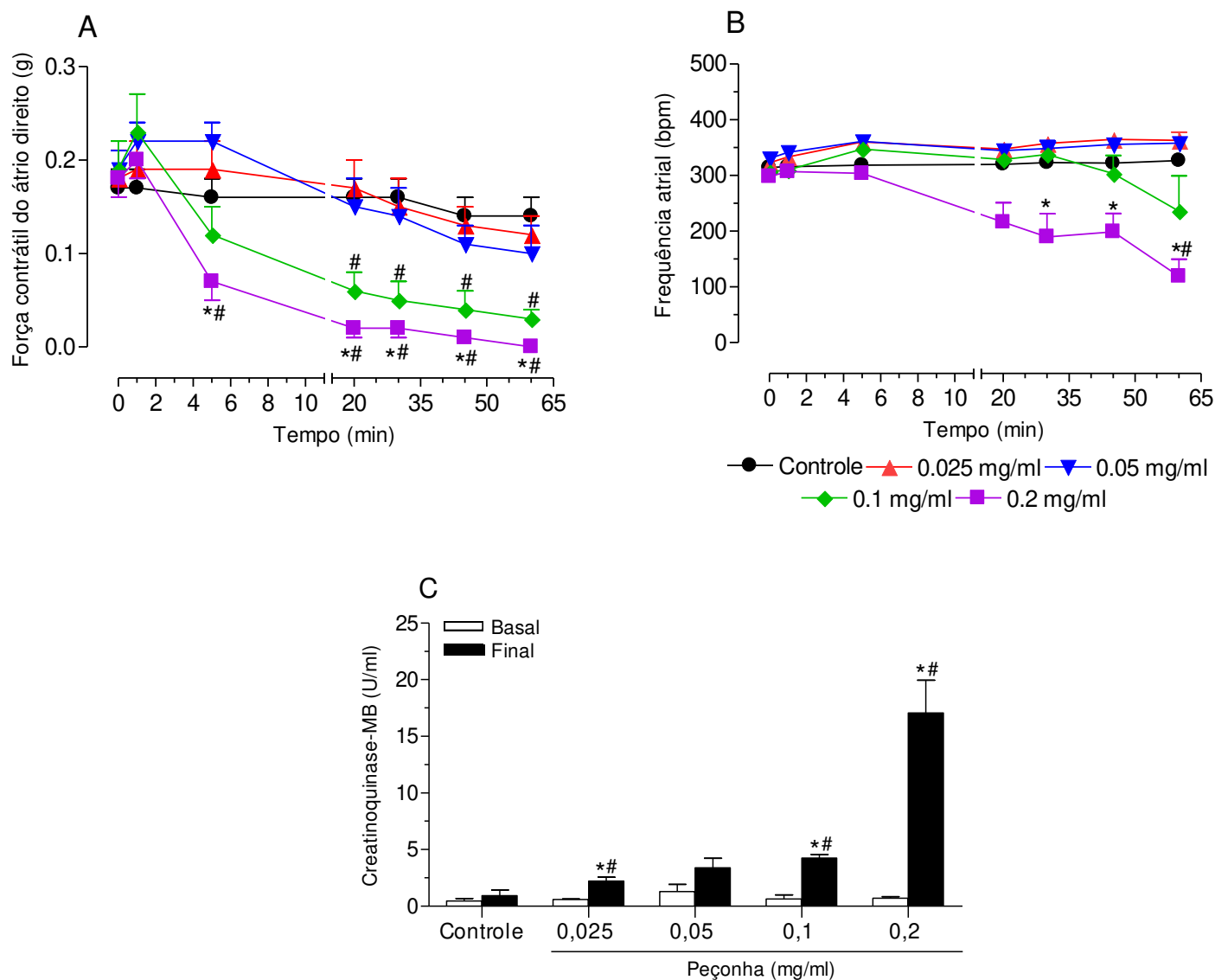


Figura 6. Ação da peçonha de *B. jararacussu* (0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 mg/ml) e solução de KH (controle, n=6) sobre a força contrátil (**A**), freqüência atrial (**B**) e a liberação de creatinoquinase-MB (CK-MB) (**C**) em átrio direito isolado de rato. As colunas e os pontos representam a média $\pm$ EPM, n=5-8. $p < 0,05$ em relação ao basal (#) e em relação ao controle (*) (ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer e teste *t* de Student).

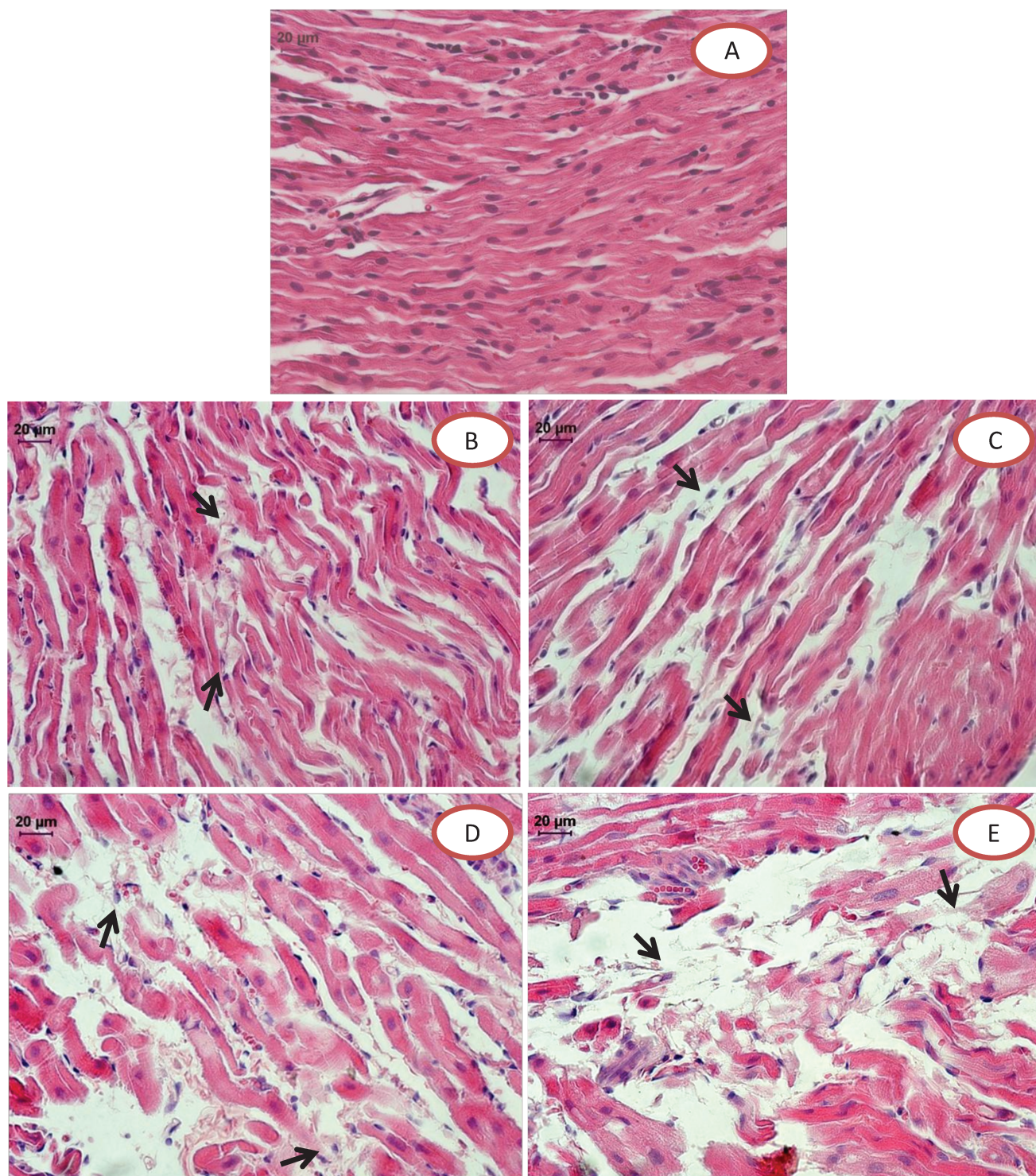


Figura 7. Alterações histológicas causadas pela peçonha de *B. jararacussu* (**B, C, D e E** nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 mg/mL, respectivamente) e grupo controle (**A**). As setas indicam rompimento e lesão das células musculares cardíacas. Cortes longitudinais. Coloração: HE.

4.2 – Efeito da peçonha aquecida, dialisada e não dialisada em átrio direito isolado de rato

O aquecimento da peçonha de *B. jararacussu* (0,2 mg/ml) por 20 min a 100°C para desnaturar suas proteínas aboliu a queda na frequência atrial e na força contrátil (Fig. 8A,B). Já a diálise da peçonha (0,2 mg/ml) contra 0,9% NaCl por 24 h a 4°C para a remoção de substâncias de baixa massa molecular (<2 kDa) reduziu a força contrátil e a frequência significativamente e, o efeito foi similar ao da peçonha não-dialisada (apenas estocada a 4°C por 24 h) e o da peçonha diluída no momento do experimento.

A liberação de CK-MB não foi significativa para a peçonha aquecida – foi semelhante ao grupo controle (Fig. 8C). Já a peçonha dialisada e não-dialisada causaram aumento significativo na liberação de CK-MB, porém em grau menor quando comparado à peçonha diluída no momento do experimento (Fig. 8C). Testes enzimáticos mostraram que a diluição e estocagem da peçonha por 24 h a 4°C (sem diálise) fazem com que a peçonha perca uma pequena porcentagem de sua atividade protolítica e fosfolipásica (dados não mostrados), colaborando assim para um menor aumento na liberação de CK-MB.

Em concordância com esses resultados, a histologia mostrou uma desorganização tecidual tanto nos átrios incubados com a peçonha dialisada quanto com a peçonha não-dialisada, assemelhando-se à desorganização vista com a peçonha diluída na hora do experimento (Fig. 9C,D). Em contrapartida, os átrios incubados com a peçonha aquecida não mostraram nenhuma alteração marcante (Fig. 9B), tendo aparência semelhante ao grupo controle (Fig. 9A).

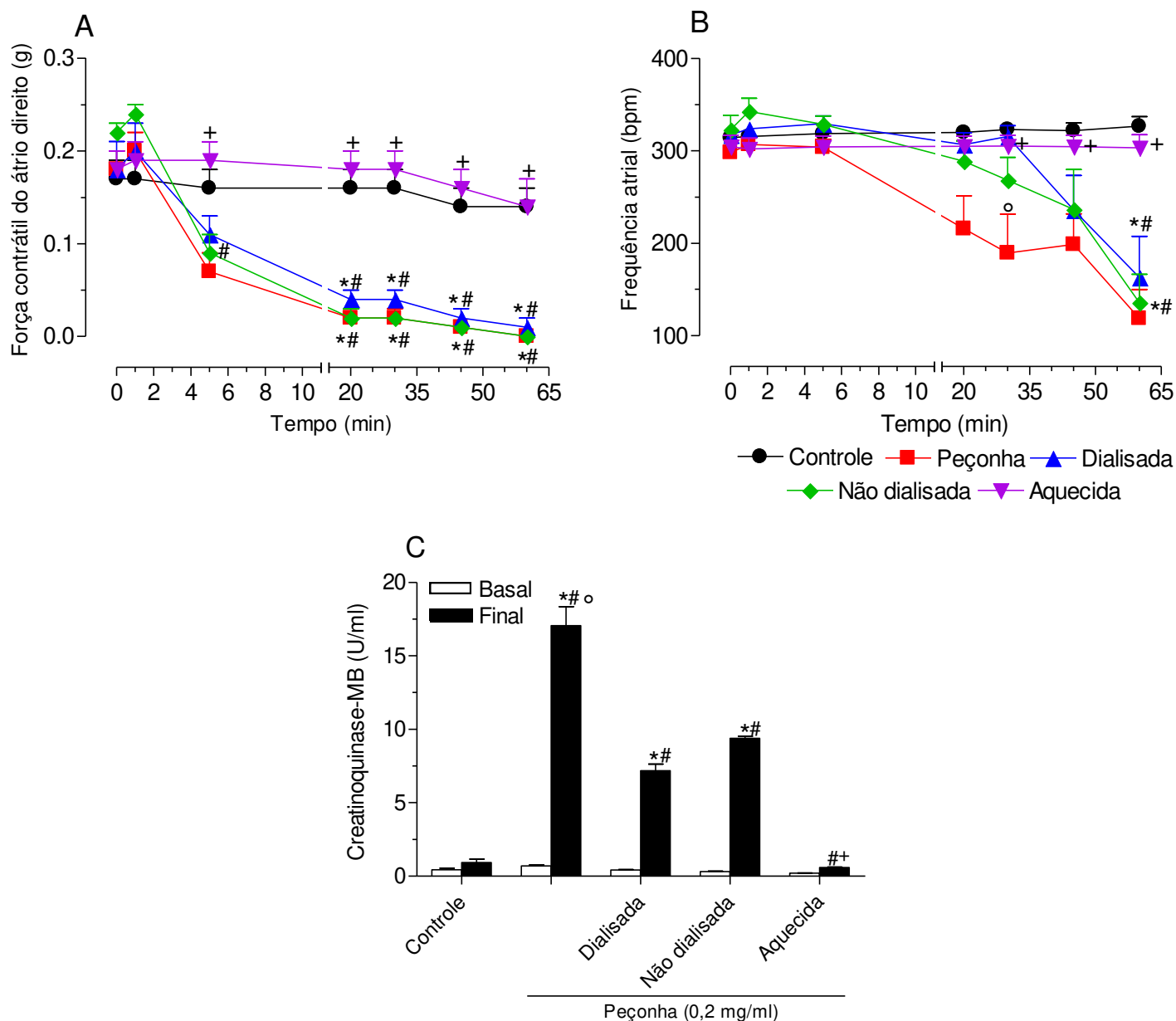


Figura 8. Ação da peçonha de *B. jararacussu* (bruta, dialisada, não-dialisada e aquecida, 0,2 mg/ml) sobre o inotropismo (**A**) e cronotropismo (**B**) atriais e a liberação de CK-MB (**C**) em átrio direito isolado de rato. Média±EPM, n=5-8. p<0,05 em relação ao basal (#), em relação ao controle (*), dialisada em relação à peçonha (°) e aquecida em relação à peçonha (+) (ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer e teste *t* de Student).

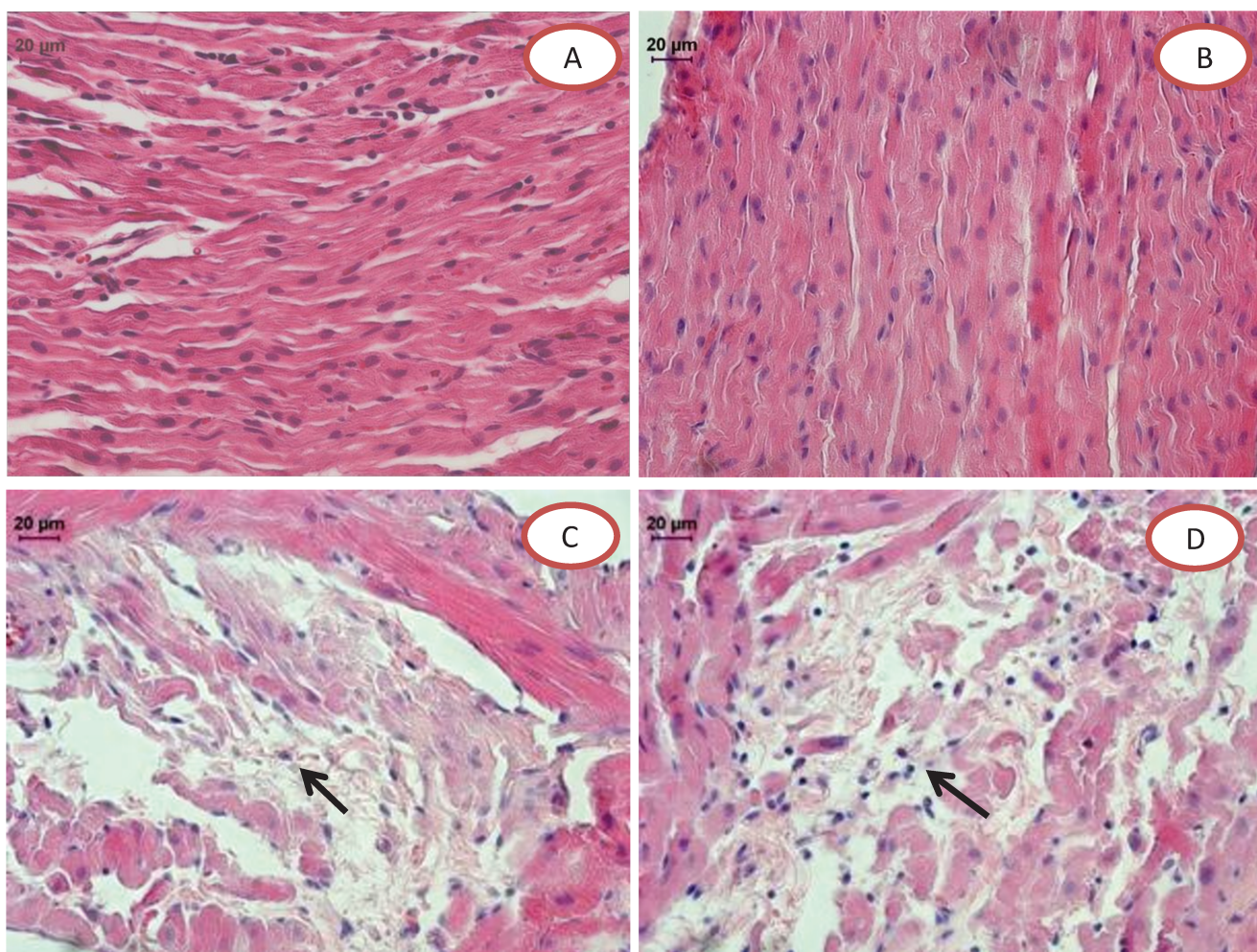


Figura 9. Alterações histológicas causadas pela peçonha de *B. jararacussu* aquecida (**B**), dialisada (**C**), e não dialisada (**D**) comparadas ao grupo controle (solução Krebs-Henseleit) (**A**). As setas indicam rompimento e lesão das células musculares cardíacas. Cortes longitudinais. Coloração: HE.

4.3 – Fracionamento da peçonha de *B. jararacussu*

4.3.1 – Cromatografia por exclusão molecular (gel filtração)

O fracionamento da peçonha de *B. jararacussu* por gel filtração resultou em cinco picos principais (Fig. 10), designadas como pico I, pico II, pico III, pico IV e pico V. Estes picos correspondiam a 22%, 20%, 31%, 2% e 7% respectivamente (a proporção de proteína de cada fração com relação à peçonha bruta), com uma recuperação de 82% de proteínas durante o processo de fracionamento.

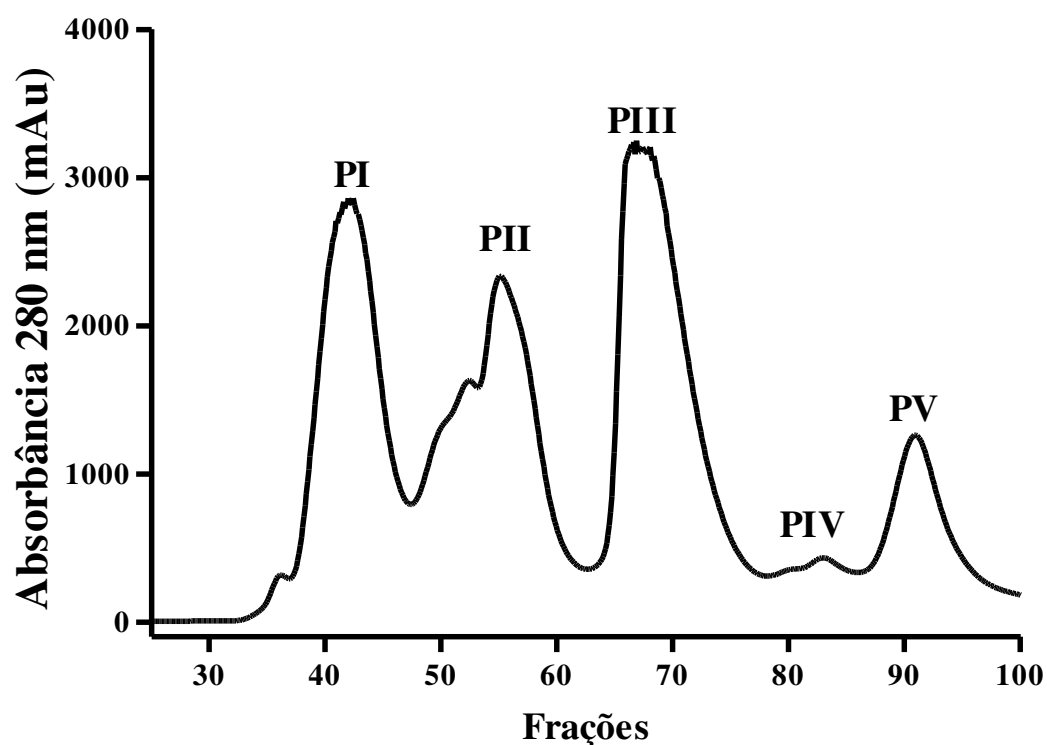


Figura 10. Perfil de eluição da peçonha de *B. jararacussu* (100 mg) fracionada por gel filtração em coluna de Superdex 75, com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. PI–PV: picos cromatográficos.

As atividades enzimáticas (proteolítica, esterásica e fosfolipásica) foram testadas tanto para a peçonha quanto para cada pico: houve maior atividade

proteolítica no pico I, maior atividade esterásica no pico II e maior atividade fosfolipásica no pico III (Fig. 11).

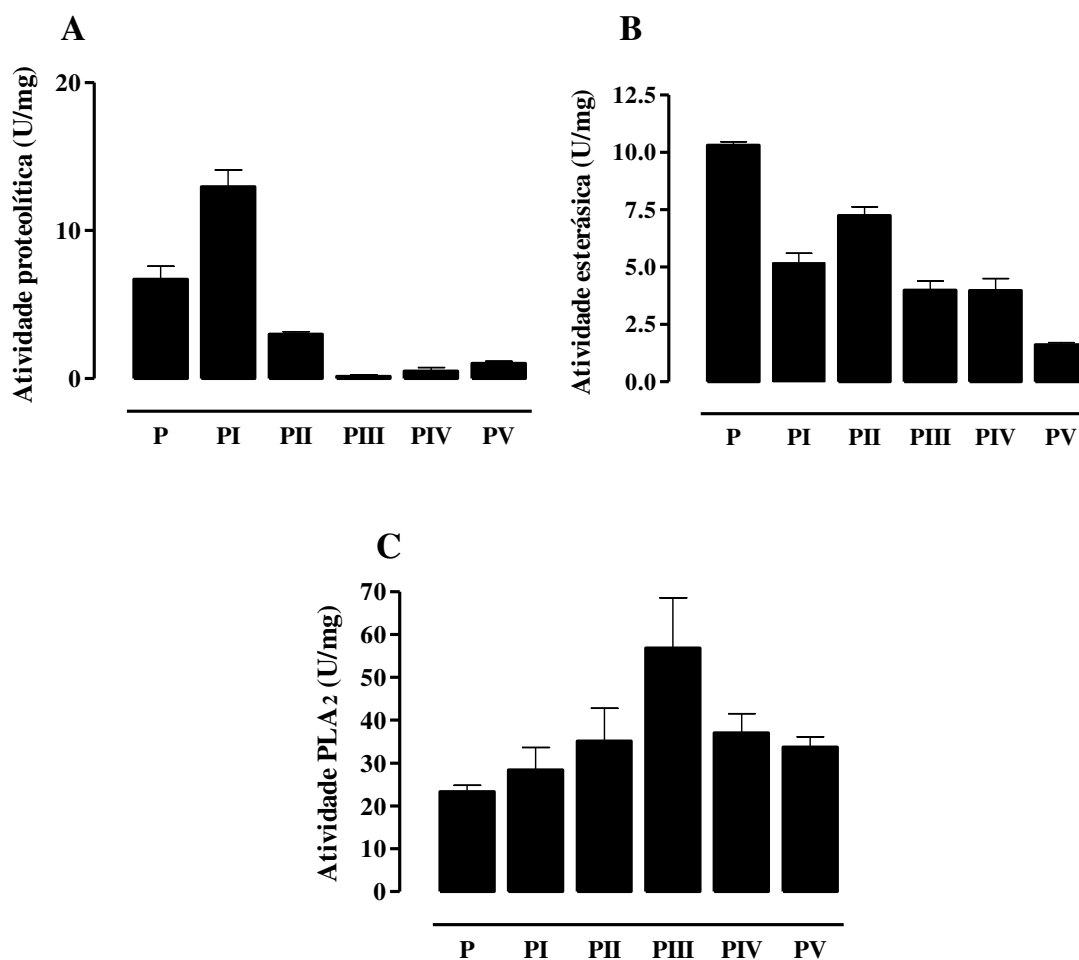


Figura 11. Atividade proteolítica (**A**), esterásica (**B**) e fosfolipásica (**C**) dos picos cromatográficos obtidos por exclusão molecular. P - peçonha e PI a PV – picos cromatográficos. As colunas representam a média $\pm$ EPM de 4 determinações.

Os cinco picos obtidos por gel filtração foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. Como esperado, as proteínas de maior

massa molecular encontraram-se nos primeiros três picos (pico I – de ~35 KDa a >100 KDa, pico II – de ~20 KDa a 97 KDa, e pico III - ~14 KDa a ~50 KDa) e as de menor massa molecular, nos últimos dois picos (PIV e PV - ≤ 45 KDa) (Fig. 12).

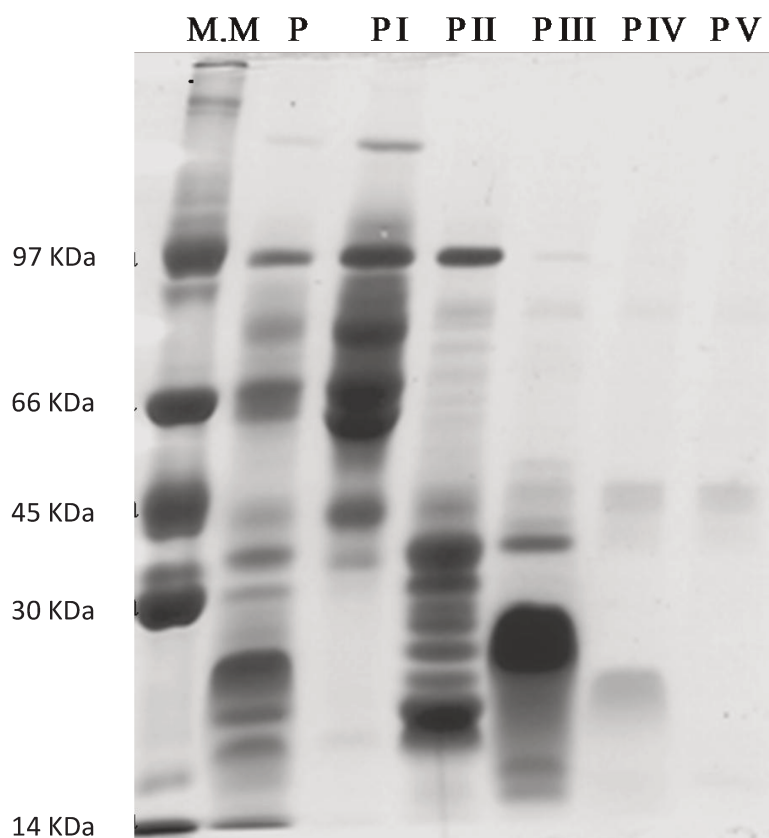


Figura 12. SDS-PAGE dos picos cromatográficos obtidos através da gel filtração. MM – marcador de massa molecular, P - peçonha e PI a PV – picos cromatográficos.

4.3.2 – Efeitos dos picos da gel filtração em átrio direito isolado de rato

A incubação dos átrios com os picos I, II, IV e V da peçonha de *B. jararacussu* não resultou em variações significativas na força contrátil ou na frequência atrial, mostrando muita similaridade ao grupo controle (dados não

mostrados). Em contrapartida, o pico III mostrou uma queda significativa na força contrátil e na frequência atrial em relação ao grupo controle (Fig. 13A,B), muito semelhante aos efeitos da peçonha bruta. Em concordância com isso, apenas o pico III causou um aumento marcante na liberação de CK-MB (Fig. 13C). A análise histológica também mostrou que apenas o pico III produziu desorganização das fibras musculares cardíacas após incubação de 60 min (Fig. 14). As demais frações não causaram nenhuma alteração marcante no tecido cardíaco (dados não mostrados).

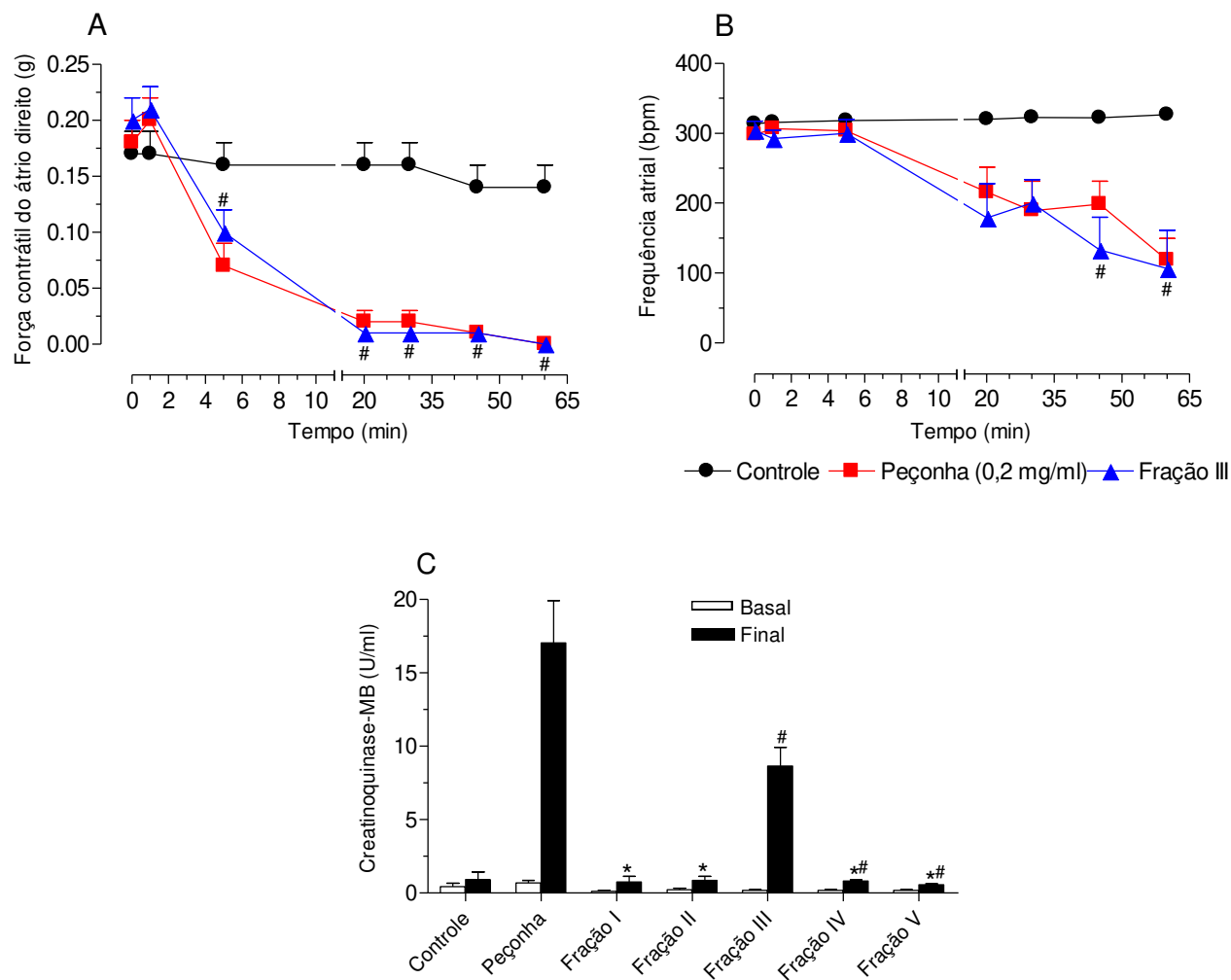


Figura 13. Ação do pico III da peçonha de *B. jararacussu* sobre o inotropismo (**A**) e cronotropismo (**B**) atriais e a liberação de CK-MB (**C**) em átrio direito isolado de rato. Média±EPM, n=6. $p<0,05$ em relação ao basal (#) e frações em relação à peçonha (*) (ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer e teste *t* de Student). Note que as outras frações não causaram alterações significantes no inotropismo e cronotropismo (dados não mostrados).

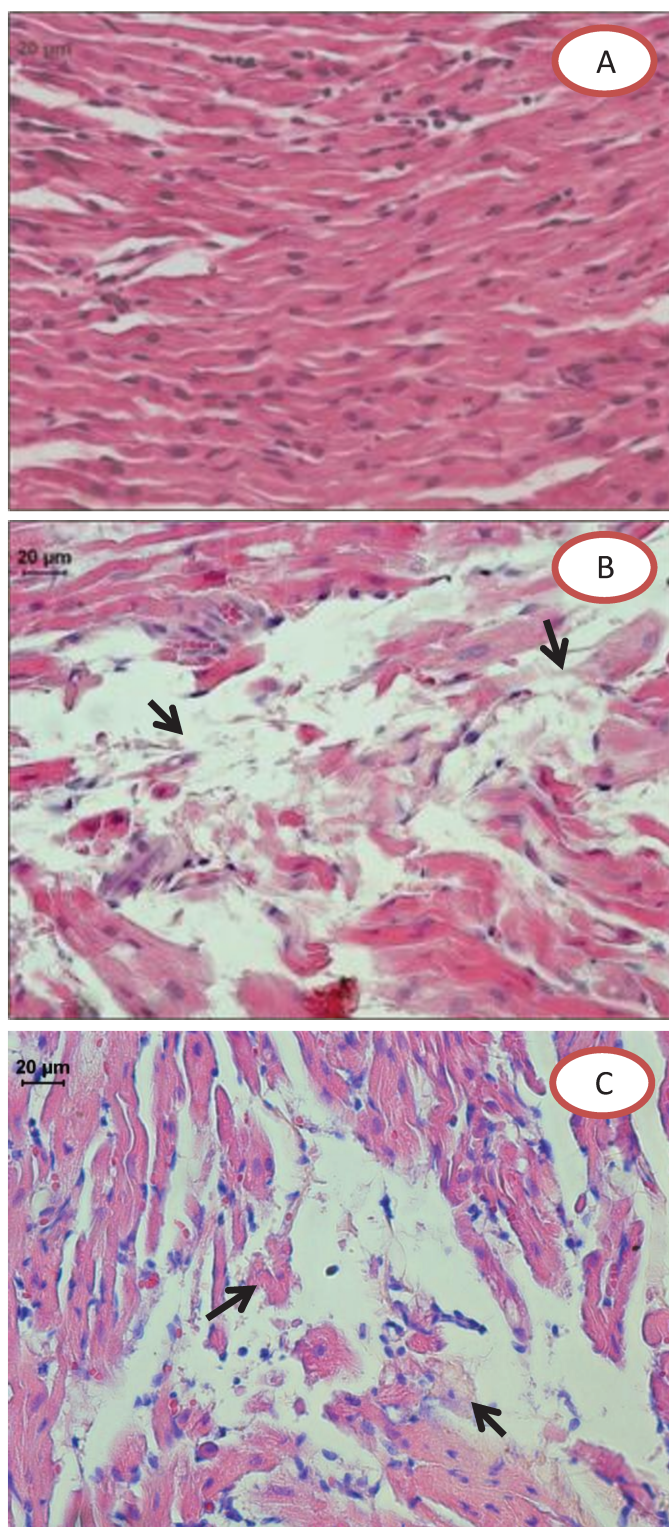


Figura 14. Alterações histológicas causadas pelo pico III da peçonha de *B. jararacussu*. **(A)** átrio controle, **(B)** e **(C)** átrio incubado com peçonha (0,2 mg/ml) e pico III, respectivamente. As setas indicam rompimento e lesão do tecido atrial. Cortes longitudinais. Coloração: HE.

4.3.3 – Cromatografia por troca iônica

O pico III, obtida por gel filtração, foi fracionada por cromatografia por troca iônica conforme descrito no item 3.3.3. Deste fracionamento obtivemos três picos: III-1, III-2 e III-3 (Fig. 15), que correspondiam a 3%, 16% e 75%, respectivamente, de proteína do pico III, com uma recuperação de proteínas de 94% durante o fracionamento.

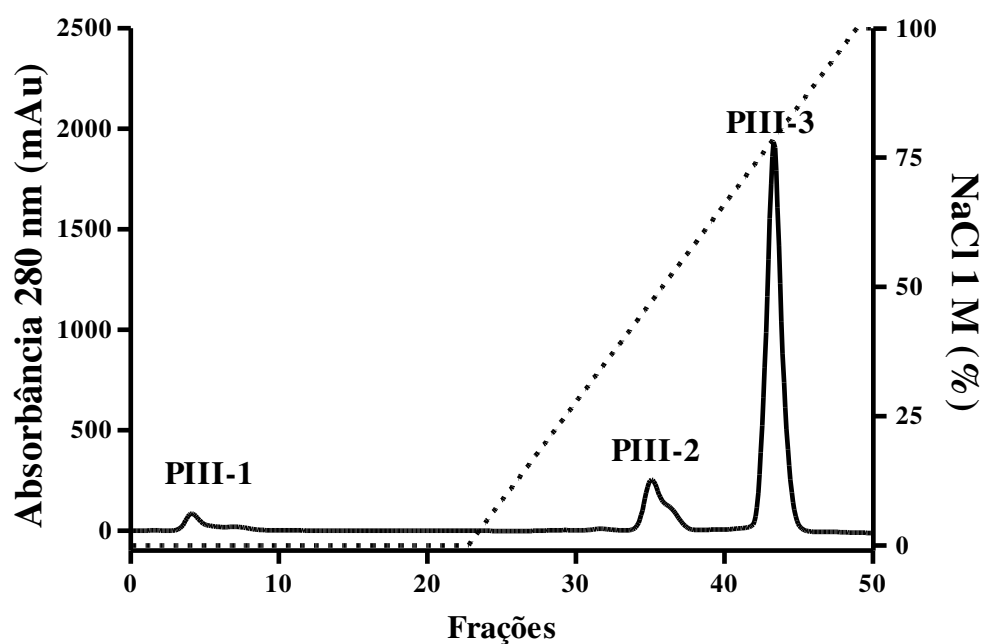


Figura 15. Perfil de eluição do pico III (10 mg) da peçonha de *B. jararacussu* fracionada por troca iônica em coluna HiTrap® SP-Sepharose, com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. PIII-1 a PIII-3: picos cromatográficos.

Os três picos obtidos por troca iônica foram analisados quanto à sua pureza em eletroforese em SDS-PAGE e foi determinado a presença de uma proteína no pico III-3 com massa molecular de aproximadamente 28 KDa que, na presença de

ditiotretitol (DTT) ou β -mecaptoetanol, apresentou-se como monômero com massa molecular de aproximadamente 14 KDa, sugerindo a presença de um dímero (Fig. 16).

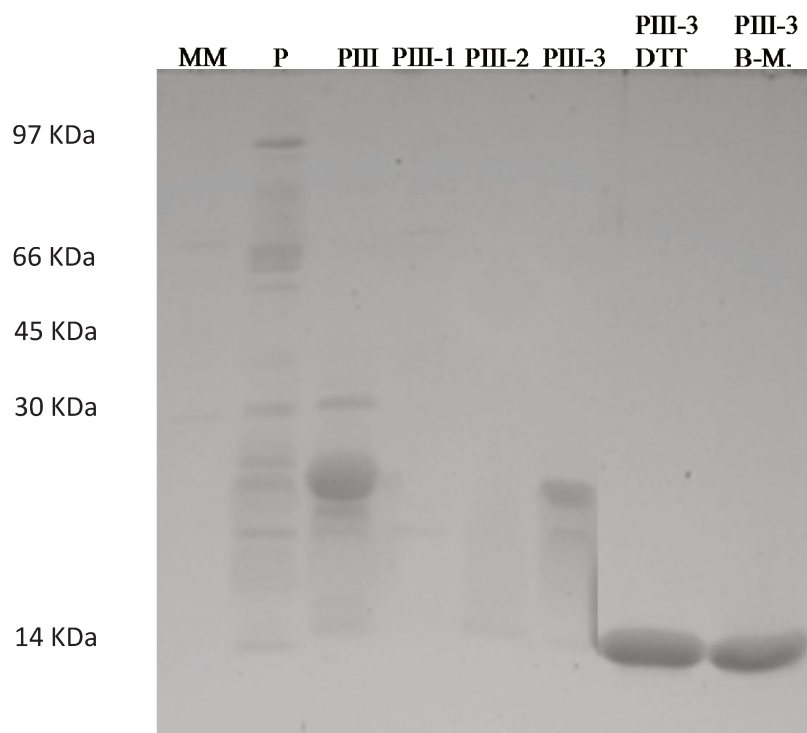


Figura 16. SDS-PAGE dos picos cromatográficos da troca iônica do pico III. M.M. - massa molecular, PIII-1, PIII-2 e PIII-3 – picos cromatográficos. DDT: ditiotretitol, B-M: β -mecaptoetanol.

4.3.4 - Efeitos dos picos da troca iônica em átrio direito isolado de rato

Os picos III-1 e III-2 da etapa de troca iônica não causaram alterações significativas na força contrátil ou na frequência atrial, mostrando muita similaridade ao grupo controle (dados não mostrados). Em contrapartida, o pico III-3 mostrou uma queda na força contrátil e na frequência atrial, significativa em relação ao grupo controle (Fig. 17A,B), muito semelhante aos efeitos da peçonha.

Em concordância com isso o pico III-3 produziu um aumento significativo na liberação de CK-MB comparado aos outros picos, embora houvesse também um aumento com o pico III-2, talvez devido à presença do monômero de ~14 KDa (coloração fraca) visto neste pico em SDS-PAGE. A soma da liberação de CK-MB vista com picos III-2 e III-3 foi semelhante àquela vista com pico III.

A análise histológica mostrou que o pico III-3 causou desorganização das fibras musculares em tecido atrial (Fig. 18) enquanto os demais picos não causaram nenhuma alteração marcante (dados não mostrados). A ação do pico III-3 se assemelhou muito à ação da peçonha e do pico III.

O padrão de lesão tecidual bem como a liberação de CK-MB causados pela peçonha, pelo pico III e pelo pico III-3 se assemelharam muito àquilo visto com PLA₂ miotóxicas de peçonhas botrópicas. Estes resultados, juntos com a massa molecular da proteína do pico III-3 determinado por SDS-PAGE, indicam fortemente que se trata de uma miotoxina, provavelmente uma bothropstoxina, uma vez que as bothropstoxina-I e bothropstoxina-II são as principais PLA₂ miotóxicas desta peçonha.

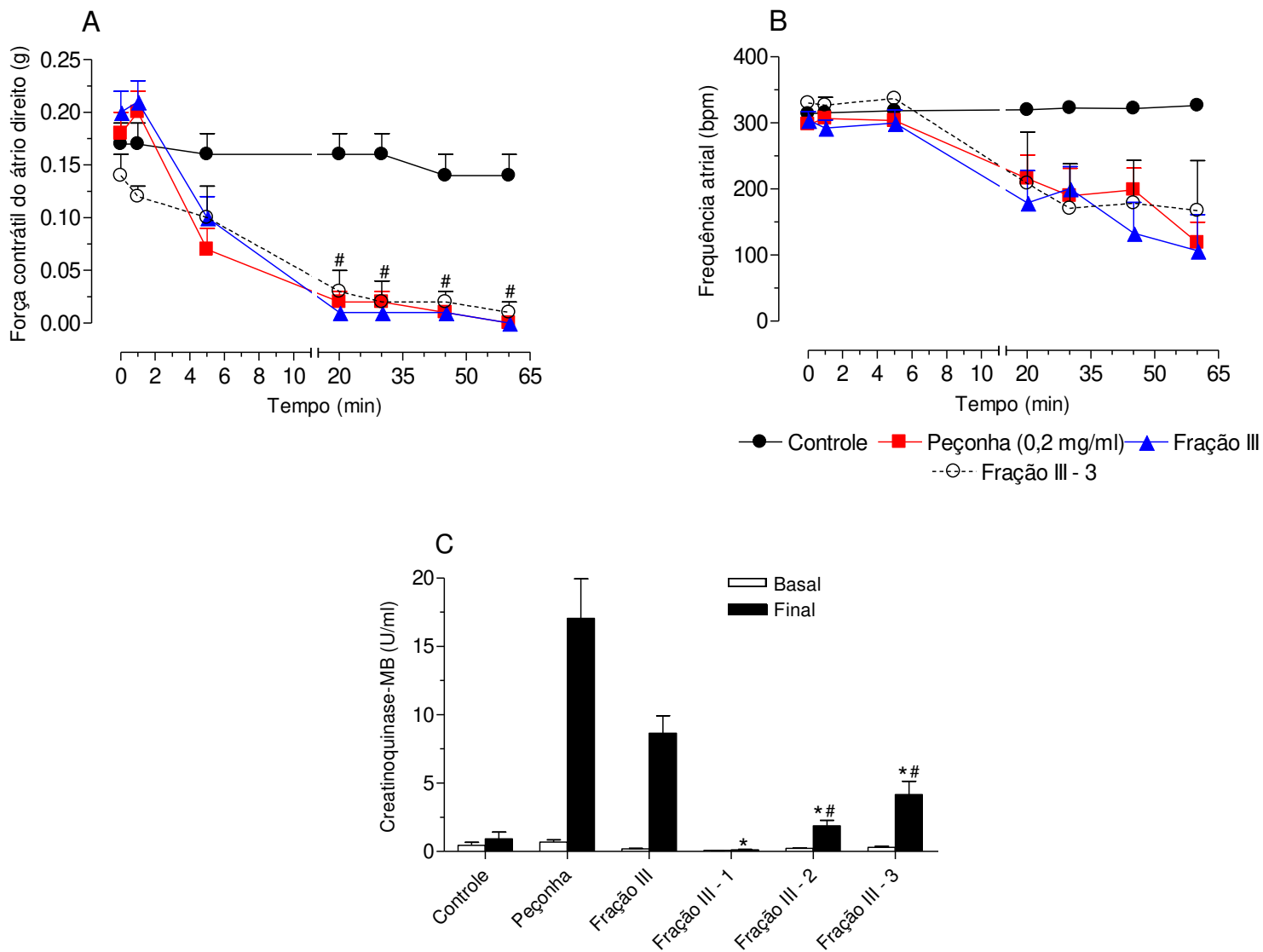


Figura 17. Ação do pico III-3 da peçonha de *B. jararacussu* sobre o inotropismo (A) e cronotropismo (B) atriais e a liberação de CK-MB (C) em átrio direito isolado de rato. Média±EPM, n=6. p<0,05 em relação ao basal (#) e pico III-3 em relação ao pico III (*) (ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer e teste t de Student).

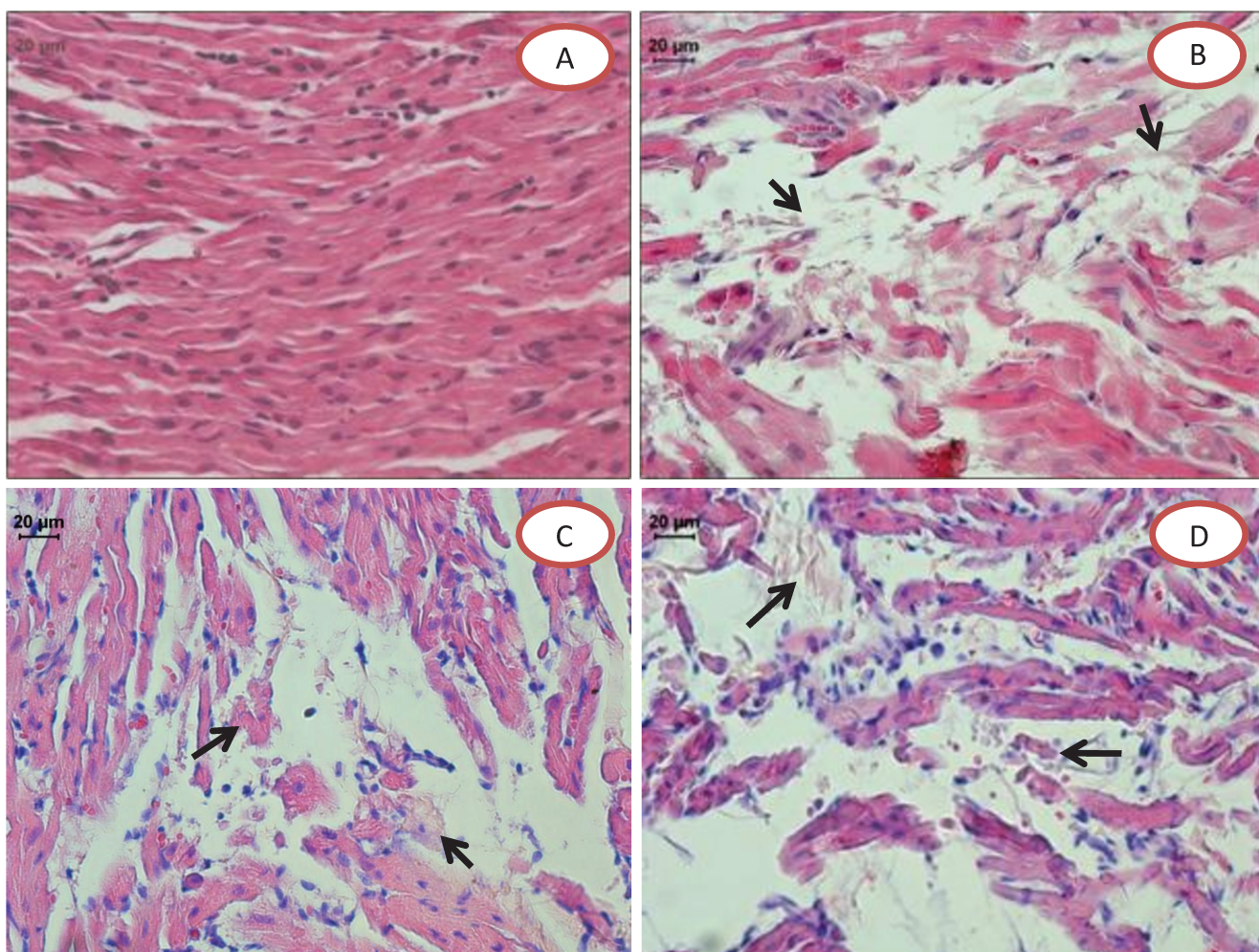


Figura 18. Alterações histológicas causadas pela peçonha de *B. jararacussu* (B), pico III (C) e pico III-3 (D) comparado ao grupo controle (A). As setas indicam rompimento e lesão do tecido cardíaco. Cortes longitudinais. Coloração: HE.

4.4 - Efeito dos antivenenos comerciais sobre as alterações causadas pela peçonha de *B. jararacussu*

Nestes experimentos, avaliamos a eficiência de neutralização de dois antivenenos comerciais disponíveis para o tratamento de envenenamento por *B. jararacussu* em neutralizar a cardiotoxicidade da peçonha. Os antivenenos utilizados foram o botrópico e o botrópico/crotálico.

O antiveneno botrópico foi pré-incubado com a peçonha de *B. jararacussu* (0,2 mg/ml) por 1 h a 37°C e em seguida a mistura foi. Observou-se uma queda na força contrátil semelhante ao da peçonha sozinha até os 20 min de experimento onde, a partir desse ponto, houve um aumento da contração que foi significativa a partir dos 45 min até o final do experimento. Na frequência atrial, o antiveneno impediu a queda gradativa e mostrou uma proteção significativa a partir dos 30 min (Fig. 19A,B).

O antiveneno botrópico também foi adicionado ao átrio 1 min após a adição da peçonha de *B. jararacussu* (0,2 mg/ml) e este resultou em uma proteção significativa a partir dos 30 min, com retorno da força contrátil próximo aos valores basais por volta dos 45 min. Na frequência atrial, o antiveneno se mostrou protetor durante todo o experimento, tornando-se significativo a partir dos 20 min (Fig. 19C,D).

Em relação à liberação da enzima CK-MB, o antiveneno botrópico foi capaz de reduzir a liberação da CK-MB de modo significativo, tanto para o antiveneno pré-incubado quanto para o antiveneno aplicado 1 minuto após a adição da peçonha ao banho (Fig. 20). Em concordância com esses resultados, a análise histológica mostrou pouca ou nenhuma alteração na organização das fibras atriais

após incubação com antiveneno, sugerindo uma proteção contra o efeito mitotóxico da peçonha de *B. jararacussu* (Fig. 21).

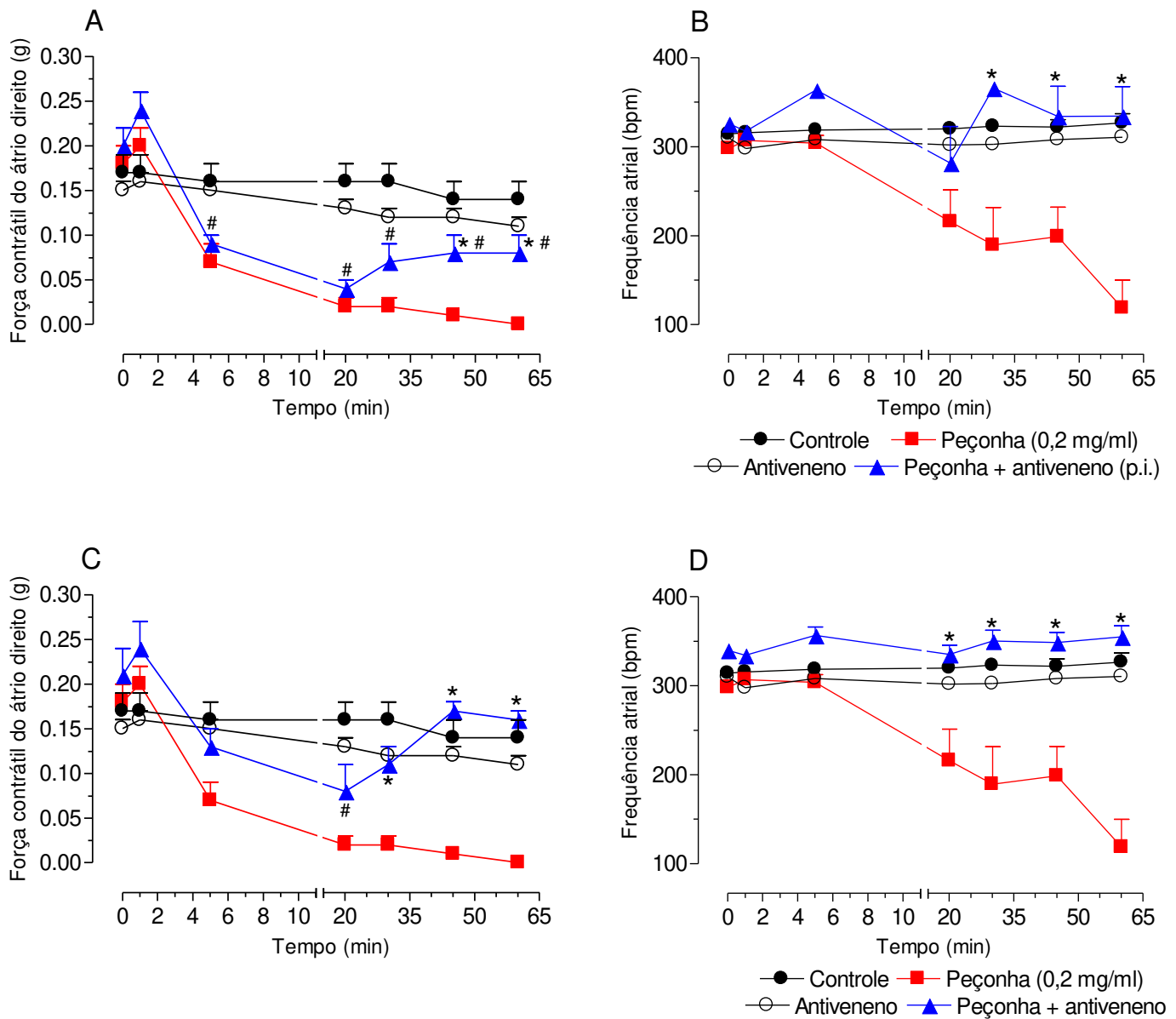


Figura 19. Ação da peçonha de *B. jararacussu* na presença do antiveneno botrópico (800 μ l) sobre o inotropismo (**A,C**) e cronotropismo (**B,D**) atriais em átrio direito isolado de rato. Média $\pm$ EPM, n=6. p<0,05 em relação ao basal (#) e antiveneno em relação à peçonha (*) (ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer). p.i. = pré-incubação (V+AV). Em **C** e **D**, o antiveneno foi adicionado 1 min após a adição da peçonha.

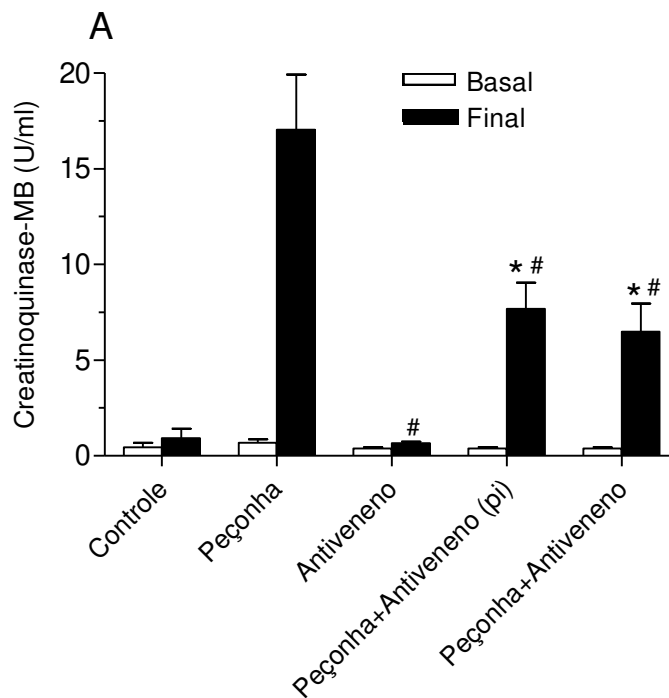


Figura 20. A liberação da enzima CK-MB pela peçonha de *B. jararacussu* na presença do antiveneno botrópico em átrio direito isolado de rato. Média $\pm$ EPM, n=6. $p<0,05$ em relação ao basal (#) e antiveneno em relação à peçonha (*) (teste *t* de Student).

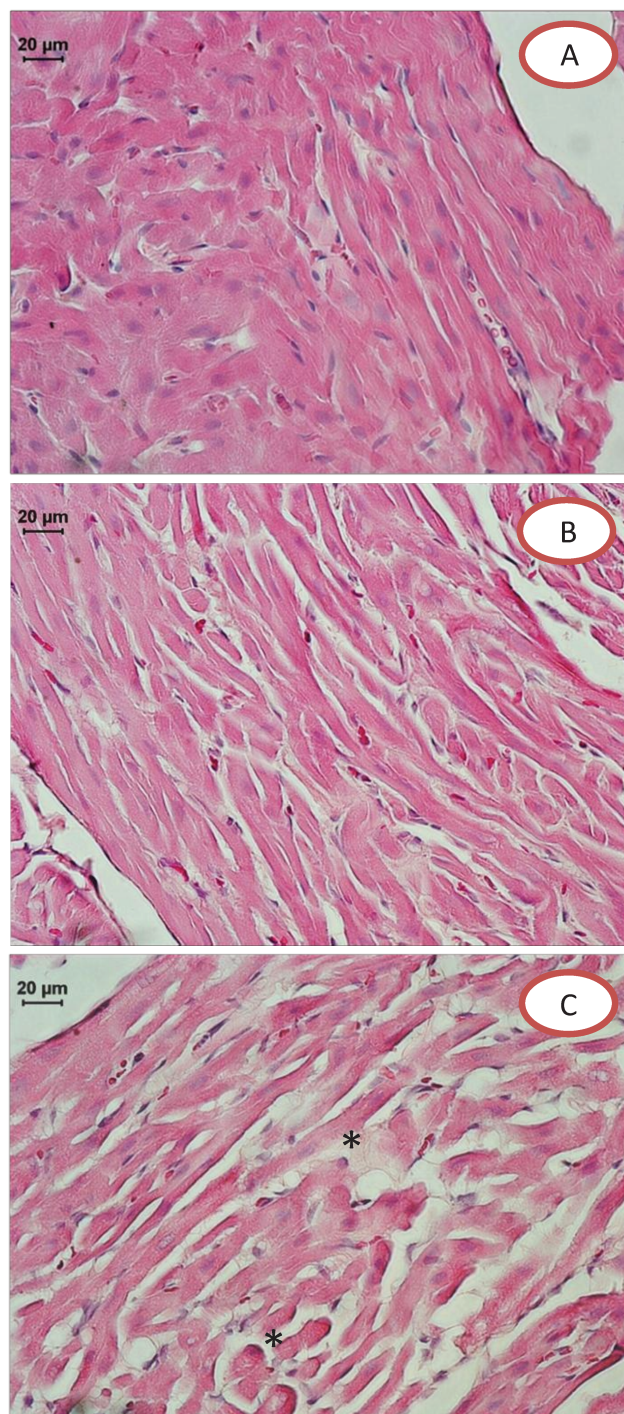


Figura 21. Alterações histológicas causadas pela peçonha de *B. jararacussu* na presença de antiveneno botrópico adicionado diretamente à preparação (**B**) ou após pré-incubação com antiveneno (**C**) comparado ao grupo controle (só antiveneno) (**A**). Os asteriscos (*) indicam pequenos focos de lesão celular. Cortes longitudinais. Coloração: HE.

O antiveneno botrópico/crotálico foi pré-incubado com a peçonha de *B. jararacussu* (0,2 mg/ml) por 1 h a 37°C e, em seguida, adicionada ao banho conforme o protocolo descrito acima, apresentando uma queda na força contrátil semelhante ao da peçonha sozinha até os 20 min de experimento onde, a partir desse ponto, houve um aumento da contração que foi significativa a partir dos 45 min até o final do experimento. Na frequência atrial, o antiveneno se mostrou protetor durante o experimento e apresentou uma proteção significativa a partir dos 45 min (Fig. 22A,B).

O antiveneno botrópico/crotálico também foi incubado com o átrio 1 min após a adição da peçonha de *B. jararacussu* (0,2 mg/ml) da mesma forma que o antiveneno botrópico e, este, evitou a queda progressiva da força contrátil com uma proteção significativa a partir dos 45 min. Na frequência atrial o antiveneno impediu a queda gradativa com uma proteção significativa somente aos 60 min (Fig. 22C,D).

Em relação à liberação da enzima CK-MB, o antiveneno botrópico/crotálico foi capaz de reduzir a liberação da CK-MB de modo significativo, tanto no protocolo de pré-incubação quanto para o antiveneno aplicado 1 minuto após a adição da peçonha ao banho (Fig. 23). Em concordância com estes achados, a análise histológica mostrou que a aplicação do antiveneno botrópico/crotálico em ambos os protocolos protegeu o tecido muscular atrial contra dano pela peçonha (Fig. 24).

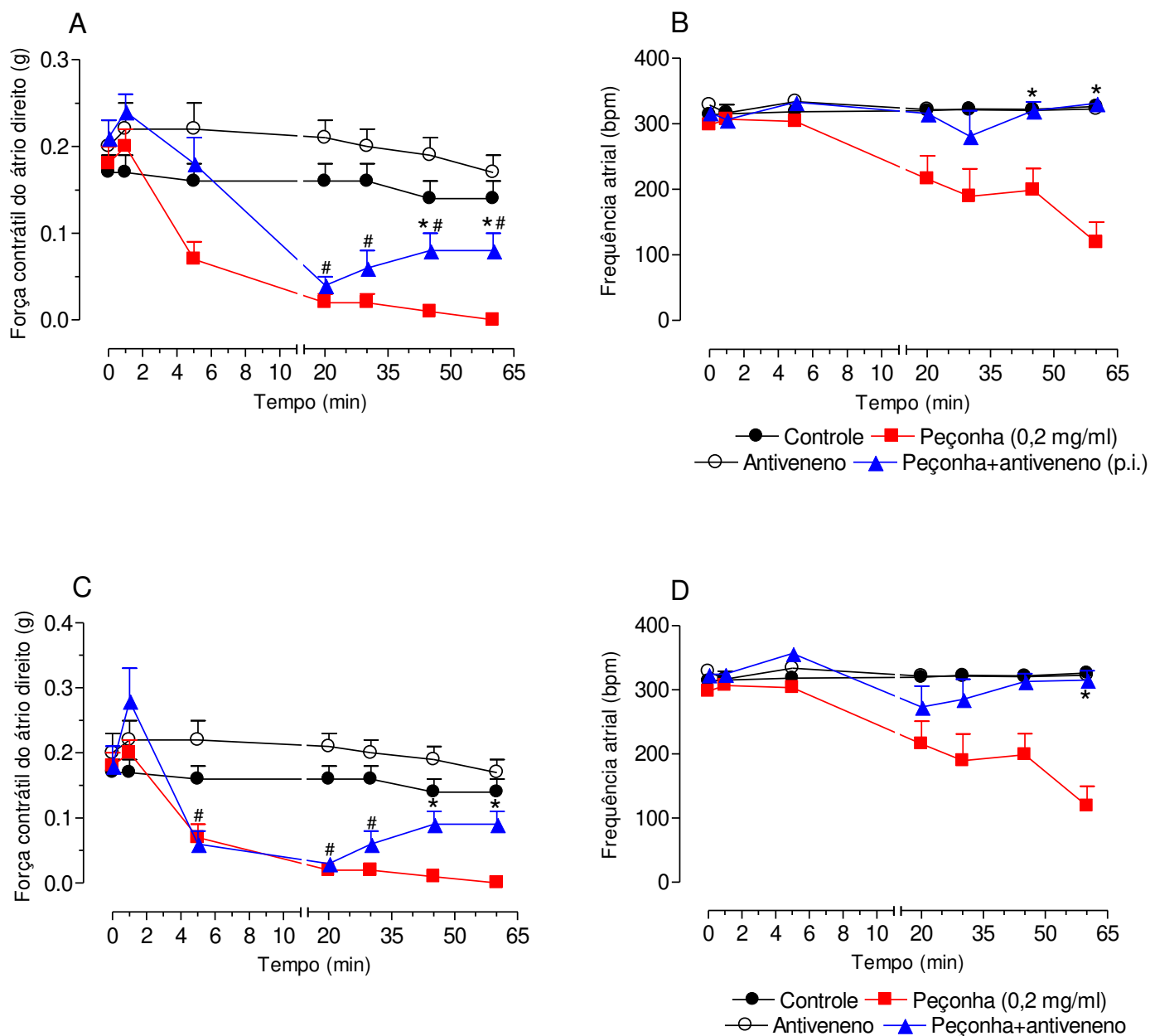


Figura 22. Ação da peçonha de *B. jararacussu* na presença do antiveneno botrópico/crotálico (800 μ l) sobre o inotropismo (A,C) e cronotropismo (B,D) em átrio direito isolado de rato. Média $\pm$ EPM, n=6. $p < 0,05$ em relação ao basal (#) e antiveneno em relação à peçonha (*) (ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer). p.i. = pré-incubação (V+AV). Em C e D, o antiveneno foi adicionado 1 min após a adição da peçonha.

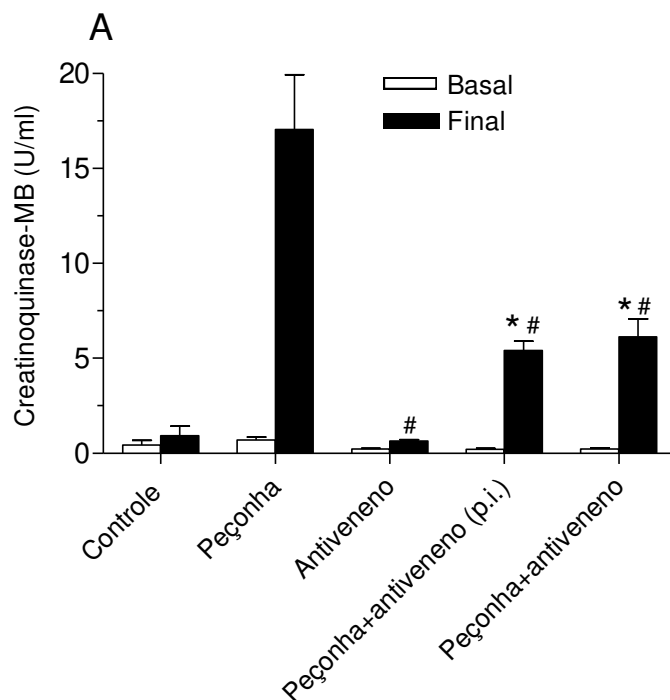


Figura 23. Liberação de CK-MB pela peçonha de *B. jararacussu* na presença do antiveneno botrópico/crotálico em átrio direito isolado de rato. Média±EPM, n=6. $p<0,05$ em relação ao basal (#) e antiveneno em relação à peçonha (*) (teste *t* de Student).

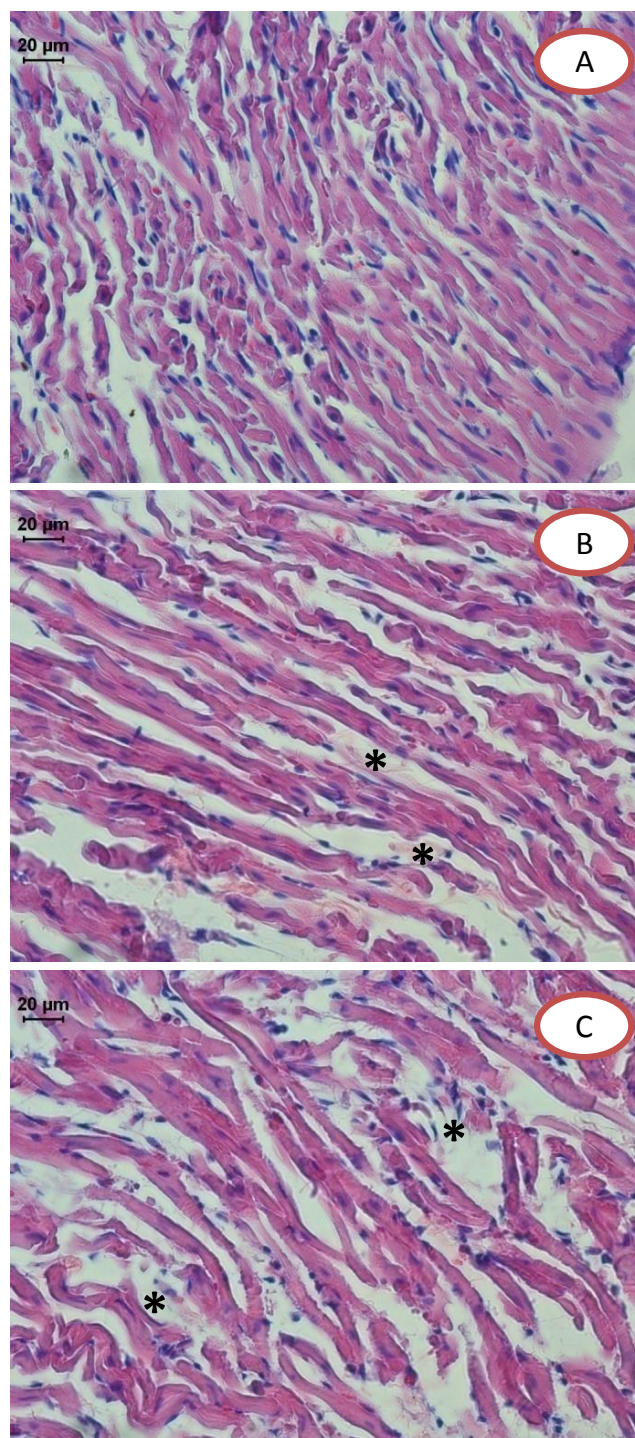


Figura 24. Alterações histológicas causadas pela peçonha de *B. jararacussu* na presença de antiveneno botrópico/crotálico adicionado diretamente à preparação (B) ou após pré-incubação com antiveneno (C), comparado ao grupo controle (só antiveneno) (A). Os asteriscos (*) indicam pequenos focos de lesão celular. Cortes longitudinais. Coloração: HE.

4.5 – Efeitos de diferentes antagonistas sobre as alterações causadas pela peçonha de *B. jararacussu* em átrio direito isolado de rato

A pré-incubação dos átrios com os antagonistas atropina, pirlamina, propranolol, L-NAME e indometacina não alterou as respostas atriais à peçonha (dados não mostrados). Porém, a pré-incubação com cimetidina, um antagonista de receptor H₂ de histamina, resultou em uma proteção significativa da queda da frequência atrial aos 60 min, sem afetar a queda na força contrátil (Fig. 25).

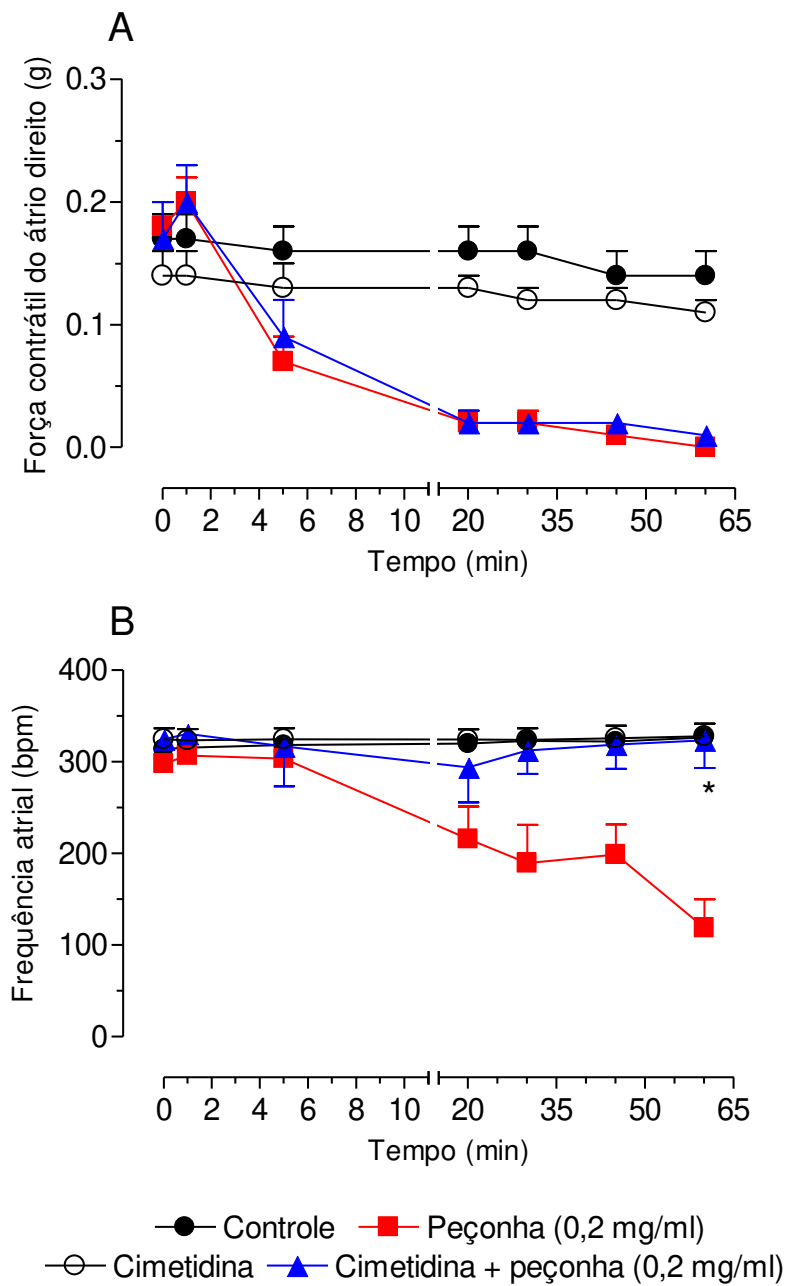


Figura 25. Efeito da cimetidina (10 μ M) sobre as alterações na força contrátil (**A**) e frequência atrial (**B**) de átrio direito isolado de rato incubado com peçonha de *B. jararacussu* (0,2 mg/ml). Média $\pm$ EPM, n=6. p<0,05 em relação à peçonha (*) (ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer).

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a incubação da peçonha de *B. jararacussu* com átrio direito isolado de rato resultou em um efeito bifásico composto de um aumento transitório na contratilidade atrial logo no primeiro minuto de experimento seguido de uma redução progressiva a partir dos 5 minutos nas maiores concentrações, sem recuperação até o final do experimento. Houve também contratura muscular (aumento do tônus basal e da linha base), principalmente nas maiores concentrações da peçonha. Na frequência atrial, houve uma redução gradativa apenas com a concentração de 0,2 mg/ml. Fatehi-Hassanabad e Fatehi (61) relataram que a peçonha de *Vipera libetina* também produziu um efeito bifásico transitório; neste caso, os autores concluíram que o aumento no inotropismo transitório estava relacionado à ativação dos receptores β -adrenérgicos, enquanto que o inotropismo negativo estava relacionado à atividade PLA_2 da peçonha. Já Alzahaby *et al.* (64), ao analisarem a peçonha de *Cerastes vipera* em átrios isolados de ratos, concluíram que o sistema adrenérgico parecia não estar envolvido, mas sugeriram um possível envolvimento dos canais de Na^+ .

A diálise da peçonha não afetou o perfil de ação quando comparado à peçonha não dialisada, o que sugere que substâncias de baixa massa molecular não estejam envolvidas nas alterações inotrópicas e cronotrópicas. O dano muscular causado pela peçonha dialisada foi similar aquela vista com a peçonha não dialisada. Entretanto, a diálise atenuou a liberação de CK-MB de modo semelhante à peçonha não dialisada estocada a 4°C por 24 h sugerindo que essa diminuição possa ser resultado de perda de atividade enzimática durante o

período de incubação e não pela diálise propriamente dita. No entanto, o aquecimento da peçonha aboliu completamente a redução no inotropismo e cronotropismo, bem como a liberação de CK-MD e o dano tecidual, indicando que a ação da peçonha era mediada por enzimas presentes na peçonha, provavelmente proteases e PLA₂.

O fracionamento da peçonha de *B. jararacussu* por gel filtração seguida por troca iônica forneceu o pico III-3, que apresentou em átrio direito isolado de rato o mesmo perfil de atividade observado com a peçonha, tanto no inotropismo e cronotropismo quanto na liberação de CK-MB e no dano tecidual. Estes achados sugerem que este pico contém uma miotoxina PLA₂, provavelmente uma bothropstoxina. Esta conclusão foi reforçada pela massa molecular observada em SDS-PAGE (dímero de ~28 KDa, monômero de ~14 KDa), semelhante à massa dimérica e monomérica da maioria das PLA₂ miotóxicas botrópicas (66,67,68). Considerando que as bothropstoxinas constituem as principais PLA₂ da peçonha de *B. jararacussu* (26,31), é provável que as proteínas do pico III-3 correspondam a estas toxinas. A observação de que o pico III-3 reproduziu a miotoxicidade da peçonha está de acordo com os achados da Oshima-Franco *et al.* (69) que constataram que a BthTX-I também reproduziu a miotoxicidade da peçonha de *B. jararacussu* em nervo frênico-diafragma isolado de camundongos. Embora outras PLA₂ tenham sido caracterizadas da peçonha de *B. jararacussu*, como as PLA₂ ácidas BthA-I-PLA₂ (30) e outras quatro (SIIISPIIA, SIIISPIIB, SIIISPIIIA e SIIISPIIIB) (32), estas não são miotóxicas.

O inotropismo e o cronotropismo negativo da peçonha de *B. jararacussu* provavelmente estão relacionados a uma desestruturação da membrana celular

das células atriais através da ação fosfolipásica da peçonha. As PLA₂ miotóxicas são conhecidas por sua capacidade de desorganizar os fosfolipídios da membrana celular, o que leva a um influxo descontrolado de Ca²⁺ que, por sua vez, resulta na ativação de vias proteolíticas intracelulares e em lesão da célula muscular (necrose) (70). De fato, alguns estudos já demonstraram que as PLA₂ podem ser cardiotoxícas. Assim, Santos *et al.* (62) observaram que a crotoxina, uma PLA₂ isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel sul-americana), diminuiu a força contrátil de coração de cobaia, talvez devido à inibição do influxo de Ca²⁺. Por outro lado, Gomes *et al.* (71) mostraram que a toxina CM55 da peçonha da cobra rei (*Ophiophagus hannah*) sem atividade PLA₂ foi cardiotoxíca e provocou um bloqueio irreversível em átrio isolado de cobaia.

A forte contratura muscular (vista como uma subida na linha de base nas contrações mais altas) foi semelhante àquela observada com outras peçonhas e toxinas ofídicas em coração isolado e átrio isolado (29,71,72,73,74,75,76) e sugere aumento no influxo de Ca²⁺. Por outro lado, alguns estudos sugerem que uma diminuição na contratilidade da musculatura cardíaca pode ser devido à uma redução no influxo de Ca²⁺ (77,78,79).

A extensa mionecrose vista histologicamente, e corroborada pelo aumento na liberação de CK-MB (80), confirmou a presença de lesão tecidual. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Sifuentes *et al.* (58) onde corações isolados de rato perfundidos com a peçonha de *B. jararacussu* apresentaram um aumento na liberação de CK, sugerindo dano ao sarcolema. Os nossos resultados também estão de acordo com outros relatos mostrando que a liberação de CK está relacionada à dose de peçonha usada (81,82).

A observação de que a pré-incubação dos átrios com diversos antagonistas (atropina, propranolol, L-NAME e indometacina) não alterou de forma significativa as respostas à peçonha, sugeriu que mediadores como acetilcolina, catecolaminas, óxido nítrico e produtos da via de ciclooxigenase não estavam envolvidos na ação da peçonha. Outros estudos com peçonhas diferentes também têm investigado a participação destes mediadores nas respostas atriais. Assim, por exemplo, Huang *et al.* (76) relataram que a ação cardíaca da peçonha de *Ophiophagus hannah* não envolveu os sistemas colinérgico e adrenérgico mas era provavelmente mediada pela PLA₂ da mesma. Alzahaby *et al.* (64) também concluíram que não havia participação do sistema adrenérgico na ação da peçonha de *Cerastes vipera* em átrios de rato mas que a ativação de canais de Na⁺ era um fator importante. Ao contrário destes estudos, Fatehi-Hassanabad e Fatehi (61) mostraram que a resposta atrial bifásica à peçonha de *Vipera libetina* envolvia ativação do sistema β-adrenérgico, sendo que o inotropismo negativo foi atribuído à ação fosfolipásica da peçonha. A ausência de efeito da indometacina sobre a ação da peçonha de *B. jararaccusu* sugeriu que, apesar da diversidade de PLA₂ presente nesta peçonha (83) os produtos de ciclooxigenase, e.g., prostaglandinas, não estavam envolvidos. Esta conclusão está de acordo com o mecanismo geral de lesão à membrana proposta para miotoxinas botrópicas (29,70) e com estudos mostrando que a ação atrial de PLA₂ de outras peçonhas não está necessariamente correlacionada à formação de produtos da ciclooxigenase (84).

A exceção entre os antagonistas foi a cimetidina, bloqueador de receptores histaminérgicos H₂, que protegeu contra o cronotropismo negativo na fase tardia

da incubação. Esta proteção é curiosa uma vez que a ativação dos receptores H_2 normalmente produz cronotropismo positivo (85) e um aumento da força contrátil (65), e o bloqueio dos receptores H_2 com ranitidina ou cimetidina tem sido associado à bradicardia (86), i.e., respostas contrárias àquelas observadas aqui. Não temos uma explicação para este fenômeno no momento, mas ele parece não estar relacionado aos receptores H_2 propriamente dito pelos motivos indicados acima. Uma possível explicação poderia ser a interação não específica entre cimetidina e componentes da peçonha ou mecanismos celulares responsáveis pelas respostas à peçonha, independentemente do sistema histaminérgico. Por outro lado, a ausência de proteção do inotropismo pela cimetidina pode ser um reflexo do extenso dano causado pela peçonha que mascararia qualquer efeito benéfico do antagonista uma vez que não haveria fibras normais suficientes para permitir uma recuperação da força contrátil na presença do antagonista.

A administração do antiveneno é o tratamento padrão no envenenamento botrópico e é capaz de reverter as manifestações sistêmicas como a coagulopatia (17) sem, porém, ter muita eficácia contra os efeitos locais como o edema, hemorragia e necrose (1,16). Conforme demonstrado aqui, a pré-incubação com antiveneno botrópico ou cotrópico/crotálico ou a adição de antiveneno 1 min após o início da incubação com peçonha protegeu os átrios contra a ação da peçonha (redução na contratilidade e frequência) em intervalos >20 min, sem afetar o início do dano (durante os primeiros 20 min de incubação); a análise histológica confirmou esta proteção contra o dano induzida pela peçonha. Por outro lado, no segundo destes protocolos, a adição de antiveneno em intervalos ≥ 2 min após o início da incubação com peçonha não protegeu contra os efeitos da peçonha.

Estes achados indicam que embora o antiveneno possa proteger contra o dano atrial, o tempo de administração é importante, com o tratamento tardio oferecendo pouca ou nenhuma proteção, talvez por que na fase tardia de incubação as toxinas estejam fortemente ligadas aos seus sítios de ligação (não podendo ser deslocadas pelos anticorpos) ou por que se encontram em sítios inacessíveis ao antiveneno. Por outro lado, a pouca proteção pode estar relacionada ao fato de que na fase tardia de incubação os processos celulares envolvidos no dano muscular já tenham sido desencadeados e qualquer neutralização de toxinas teria pouca influência sobre o subsequente desenvolvimento do dano. Usando preparações isoladas de nervo frênico-diafragma e extensor digitorum longus de camundongos, Oshima-Franco *et al.* (69) também observaram que o antiveneno botrópico protegeu parcialmente contra o dano causado pela peçonha de *B. jararacussu* e a bothropstoxina I.

No início do século passado, Brazil (87,88,89) sugeriu que o envenenamento por *B. jararacussu* compartilhou certas manifestações (por exemplo, neurotoxicidade) com acidentes envolvendo a cascavel sulamericana, *C. d. terrificus*, e que o uso do antiveneno botrópico/crotálico, ao invés do antiveneno botrópico, poderia ser mais benéfico no tratamento de mordidas por *B. jararacussu*. De fato, alguns estudos experimentais indicam que o antiveneno botrópico/crotálico oferece mais proteção contra a miotoxicidade, atividade coagulante e letalidade da peçonha de *B. jararacussu* que o antiveneno botrópico (56). Além disso, tem sido demonstrada que o antisoro produzido contra crotoxina, a principal neurotoxina da peçonha de *C. d. terrificus*, é capaz de neutralizar o bloqueio neuromuscular da peçonha de *B. jararacussu* e da bothropstoxina-I em

preparações nervo frênico-diafragma de camundongo (69). Entretanto, clinicamente, o antiveneno botrópico continua sendo amplamente usado para envenenamentos por esta espécie (19). Conforme demonstrado aqui, não houve diferença marcante na proteção oferecida pelo antiveneno botrópico/crotálico quando comparado ao antiveneno botrópico nos dois protocolos testados; de fato, a reversão da perda de contratilidade observada com o botrópico/crotálico foi até menor que aquela observada com o antiveneno botrópico quando adicionado 1 min após a peçonha, e a proteção contra dano tecidual foi menos marcante. Estes achados sugerem que, pelo menos neste caso, o antiveneno botrópico/crotálico não oferece vantagem em relação ao botrópico.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

1. A peçonha de *B. jararacussu* (0,025 – 0,2 mg/ml) causa contratura do músculo atrial, refletida em queda progressiva na força contrátil, especialmente nas concentrações maiores, acompanhada de redução na frequência cardíaca na concentração de 0,2 mg/ml.
2. A peçonha causa lesão no tecido atrial, evidenciada pela liberação de CK-MB e alterações histológicas.
3. O pico III-3 reproduz as alterações funcionais e morfológicas vistas com a peçonha. As características bioquímicas da proteína deste pico são semelhantes às da bothropstoxina.
4. As alterações funcionais e morfológicas produzidas pela peçonha não são mediadas pelos sistemas adrenérgico, colinérgico ou histaminérgico, ou pelas vias de ciclooxigenase ou óxido nítrico sintase.
5. A pré-incubação de átrios com antiveneno ou a adição de antiveneno 1 min após a aplicação de peçonha protegeu contra o dano funcional e histológico em intervalos >20 min. Não houve diferença marcante entre a eficácia dos antivenenos botrópico e botrópico/crotálico.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. da Silva NMV, Arruda EZ, Murakami YLB, Moraes RAM, El-Kik CZ, Tomaz MA, Fernandes FFA, Oliveira CZ, Soares AM, Giglio JR, Melo PA. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. *Toxicon*. 2007; 50: 196-205.
2. Melgarejo, AR. Serpentes peçonhentas do Brasil, in: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier/FAPESP, São Paulo. 2003. pp. 33-61.
3. Zaganelli GL, Zaganelli MGM, Magalhães A, Diniz CR, Lima ME. purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon*. 1996; 34 (7): 807-819.
4. Bucarechi F, Herrera SRF, Hyslop S, Baracat EC, Vieira RJ. Snakebites by *Bothrops spp* in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2001; 43: 329-333.
5. Araújo FAA, Santalúcia M, Cabral RF. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V. Ed. Sarvier pp. 6-12., São Paulo; 2003.
6. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. 6º ed. Brasília, DF. 2005.
7. Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo Artigo de revisão. *Rev Ass Med Brasil*. 2001; 47: 24-29.
8. Campbell, JA, Lamar, WW. *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. 2 Vol. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca. 2004.
9. de Moraes KB, Grego KF, Tanaka-Azevedo AM. Identification of proteins similar to *Bothrops jararaca* coagulation inhibitor (BjI) in the plasmas of *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus terrificus* snakes. *Comp Biochem Physiol Part B*. 2008; 149: 236-240.
10. Mebs D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol Ther*. 1990; 48: 223-236.

11. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 2005; 45: 997-1011.
12. Tomaz MA, Fernandes FFA, El-Kik CZ, Moraes RAM, Calil-Elias S, Saturino-Oliveira J, Martinez AMB, Ownby CL, Melo PA. Increase of the cytotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom on mouse *extensor digitorum longus* and soleus by potassium channel blockers and by Na⁺/K⁺- ATPase inhibition. *Toxicon*. 2008; 52: 551-558.
13. Kamiguti AS, Cardoso JL. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. *Toxicon*. 1989; 27: 955-963.
14. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, Warrell DA, Hay CR. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991; 29: 961-972.
15. Ribeiro LA, Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997; 30: 475-480.
16. Gutiérrez, JM, Lomonte, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina, in: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier/FAPESP, São Paulo. 2003. pp. 310-323.
17. França, FOS, Málaque, CMS. Acidente botrópico, in: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier/FAPESP, São Paulo. 2003. pp. 72-86.
18. Warrell, DA. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management, in: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.) *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Vol. 2. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca, 2004. pp. 709-761.
19. Milani R, Jorge MT, Ferraz de Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JLC, Ribeiro LA, Fan HW, França FOS, Sano-Martins IS, Cardoso D, Fernandez ICOF, Fernandes FC, Aldred VL, Sandoval MP, Puerto G, Theakston RDG, Warrell DA. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil *Q J Med*. 1997; 90: 323-334.

20. Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Venomous Animals and their Venoms (Bücherl W, Buckley EE, eds.) 1971; 2: pp. 345-384. Academic Press, New York.
21. Queiroz LS, Santo Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 1984; 22: 339-346.
22. Jorge MT, Ribeiro LA, O'Connell JL. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the genus *Bothrops* (*Viperidae*). *Ann Trop Med Parasitol*. 1999; 93: 401-408.
23. Souza Queiróz L, Marques MJ, Santo Neto H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2002; 40: 1483-1486.
24. Ribeiro LA, Albuquerque MJ, Pires de Campos VAF, Katz G, Takaoka NY, Lebrão ML, Jorge MT. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Rev Ass Med Brasil*. 1998; 44: 312-318.
25. Santo Neto H, Vomero VU, Marques MJ. insights into the loss of muscle mass following *B. jararacussu* venom in mice. *Toxicon*. 2004; 44: 847-850.
26. Homsí-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*. 1988; 26: 615-627.
27. Oliveira M, Cavalcante WLG, Arruda EZ, Melo PA, Silva MDP, Gallacci M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. *Toxicon*. 2003; 42: 373-379.
28. Rodrigues RS, Izidoro LFM, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Selistre-de-Araújo HS, Giglio JR, Fuly AF, Soares AM, Rodrigues VM. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon Art*. 2007; 03.005.
29. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 2003; 42: 915-931.
30. Andrião-Escarso SH, Soares AM, Fontes MRM, Fuly AL, Corrêa FMA, Rosa JC, Greene LJ, Giglio JR. Structural and functional characterization of an acidic

platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64: 723-732.

31. Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Díaz C, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. Myotoxic phospholipase A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie.* 2000; 82: 755-763.

32. Ketelhut DFJ, Homem de Mello M, Veronese ELG, Esmeraldino LE, Murakami MT, Arni RK, Giglio JR, Cintra ACO, Sampaio SV. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochim.* 2003; 85: 983-991.

33. Matsui T, Fugimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477: 146-156.

34. Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RD. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 853-862.

35. Mazzi MV, Marcussi S, Carlos GB, Stabeli RG, Franco JJ, Ticli FK, Cintra AC, Franca SC, Soares AM, Sampaio SV. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon.* 2004; 44: 215-223.

36. Marcussi S, Bernardes CP, Santos-Filho NA, Mazzi MV, Oliveira CZ, Izidoro LFM, Fuly AL, Magro AJ, Braz ASK, Fontes MRM, Giglio JR, Soares AM. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides.* 2007; 28: 2328-2339.

37. Kamiguti AS, Hay CRM, Theakston RDG, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* 1996; 34: 627-642.

38. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie.* 2000; 82: 841-850.

39. Markland FS Jr. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon.* 1998; 36: 1749-1800.

40. Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon.* 2005; 45: 1115-1132.

41. Bortoleto RK, Murakami MT, Watanabe L, Soares AM, Arni RK. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*. 2002; 40: 1307-1312.
42. Pérez AV, Saraiva P, Rucavado A, Sant'Ana CD, Soares AM, Gutiérrez JM. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*. 2007; 49: 1063-1069.
43. Lomonte B, Rojas G, Gutierrez JM, Ramirez G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godman's pit viper). *Toxicon*. 1990; 28: 75-81.
44. Gartner, TK, Stocker, K, Williams, DC. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. *FEBS Lett*. 1980; 117: 13-16.
45. Panunto PC, da Silva MA, Linardi A, Buzin MP, Melo SESFC, Mello SM, Prado-Franceschi J, Hyslop S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2006; 47: 21-31.
46. Hirata Y, Ito M, Nikai T, Kato S, Komori Y, Sugiura H, Ohizumi Y. Himehabu lectin, a novel inducer of Ca_2C - release from the venom of the snake *Trimeresurus okinavensis*, in sarcoplasmic reticulum. *J Pharm Pharmacol*. 1999; 51: 1207-1211.
47. Havt A., Toyama MH, Nascimento NRF, Toyama DO, Nobre ACL, Martins AMC, Barbosa PSF, Novello JC, Boschero AC, Carneiro EM, Fonteles MC, Monteiro HAS. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37: 130-141.
48. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) presents in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol Chemother*. 1965; 24: 163-169.
49. Ferreira LA, Henriques OB, Lebrun I, Batista MB, Prezoto BC, Andreoni AS, Zelnik R, Habermehl G. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacussu tapete, urutu dourado). *Toxicon*. 1992; 30: 33-40.
50. Havt A, Fonteles MC, Monteiro HAS. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA_2 and PAF blockers. *Toxicon*. 2001; 39: 1841-1846.
51. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico de tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional da Saúde, Brasília, 2001.

52. Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2008; 51: 1236-1244.
53. Zychar BC. Interação leucócito-endotélio induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*: papel de proteases, mediação farmacológica e soroneutralização. Tese de Mestrado, USP/Instituto Butantan, 2007; São Paulo. 105p.
54. Cardoso, DF, Yamaguchi, IK, Moura-da-Silva, AM. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular, in: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier/FAPESP, São Paulo. 2003. pp. 367-379.
55. Brazil V. Serumtherapia antiophidica. *Rev. Med. S. Paulo*. 1909; 12: 293-307.
56. Dos Santos MC, Gonçalves LRC, Fortes-Dias CL, Cury Y, Gutiérrez JM, Furtado MFD. A eficácia do antiveneno bothrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1992; 34 (2): 77-83.
57. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado MFD, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*. 2008; 52: 842-851.
58. Sifuentes DN, El-Kik CZ, Ricardo HD, Tomaz MA, Strauch MA, Calil-Elias S, Arruda EZ, Schwartz EF, Melo PA. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*. 2008; 51: 28-36.
59. Hames BD. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis of Proteins – a Practical Approach*. 2nd ed. (Hames B. D., Rickwood D. Eds.). pp 1-147. IRL Press, Oxford. 1990.
60. Gasparetti AL, Hyslop S, Costa SKP, Priviero FBM, De Nucci G, Antunes E, Zanesco A. Chronotropic response of β -adrenergic-, muscarinic-, and calcitonin gene-related peptide receptor agonists in right atria from neonatal capsaicin-treated rats. *Neuroscience Letters*. 2002; 325: 147-150.
61. Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. Characterisation of some pharmacological effects of the venom of *Vipera lebetina*. *Toxicon*. 2004; 43: 385-391.

62. Santos PEB, Souza L, Freire-Maia L, Almeida P. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. *Toxicon*. 1990; 28: 215-224.
63. Zapellini A. Estudos bioquímico e farmacológico da peçonha de *Bothrops erythromelas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 1991; Campinas. 57p.
64. Alzahaby M, Rowam EG, Young LC, al-Zahaby AS, Abu-Sinna G, Harvey AL. Some pharmacological studies on the effects of *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) snake venom. *Toxicon*. 1995; 33: 1299-1311.
65. Hattori Y, Gando S, Nagashima M, Kanno M. Histamine receptors mediating a positive inotropic effect in guinea pig and rabbit ventricular myocardium: distribution of the receptors and their possible intracellular coupling processes. *Jpn J Pharmacol*. 1994; 65: 327-336.
66. Bonfin VL, Toyama MH, Novello JC, Hyslop S, Oliveira CRB, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J Protein Chem*. 2001; 20: 239-245.
67. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 2003; 42: 885-901.
68. Barbosa PSF, Martins AMC, Havt A, Toyama DO, Evangelista JSAM, Ferreira DPP, Joazeiro PP, Beriam LOS, Tayama MH, Fonteles MC, Monteiro HSA. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*. 2005; 46: 376-386.
69. Oshima-Franco Y, Hyslop S, Cintra ACO, Giglio JR, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. *Muscle Nerve*. 2000; 23: 1832-1839.
70. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65: 2897-2912.
71. Gomes A, De P, Dasgupta SC. Occurrence of a unique protein toxin from the Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon*. 2001; 39: 363-370.
72. Raina RK, Ng'ang'a JN, Telang BV. Neuromuscular, cardiac and smooth muscle effects of whole venom of *Naja mossambica pallida*. *Agressologie*. 1978; 19: 23-27.

73. Harvey AL. Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanisms of action. *J Toxicol - Toxin Rev.* 1985; 4: 41-69.
74. Sun JJ, Walker MJA. Actions of cardiotoxins from the southern Chinese cobra (*Naja naja atra*) on rat cardiac tissue. *Toxicon.* 1986; 24: 233-245.
75. Alloatti G, Gattullo G, Losano G, Marsh NA, Pagliaro P, Vono P. The mechanical effects of rhinoceros horned viper (*Bitis nasicornis*) venom on the isolated perfused guinea-pig heart. *Exp Physiol.* 1991; 76: 611-614.
76. Huang MZ, Wang QC, Liu GF. Effects of an acidic phospholipase A₂ purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. *Toxicon.* 1993; 31: 627-635.
77. Fletcher JE, Yang C-C, Rosenberg P. Basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* snake venom: phospholipid hydrolysis and effects on electrical and contractile activity of the rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982; 66: 39-54.
78. Petkovic D, Pavlovic M, Matejevic D, Unkovic-Cvetkovic N, Jovanovic T, Aleksic N, Cvetkovic M, Colovic J, Stamenovic B. Influence of calcium on the action of *Vipera ammodytes ammodytes* snake venom on the myocardium. *Toxicon.* 1983; 21: 887-892.
79. El-Saadani MAM, El-Sayed MF. A bradykinin potentiating peptide from Egyptian cobra venom strongly affects rat atrium contractile force and cellular calcium regulation. *Comp Biochem Physiol Part C.* 2003; 136: 387-395.
80. Guzy PM. Creatine Phosphokinase-MB (CPK-MB) and the diagnosis of myocardial infarction. *West J Med.* 1977; 127: 455-460.
81. Moura-da-Silva AM, desmond H, Laing G, Theakston DG. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon.* 1991; 29: 713-723.
82. Calil-Elias S, Thattasery E, Martinez AMB, Melo PA. Effect os perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. *Brazil. J Med Bio Research.* 2002; 35: 1233-1235.
83. Kashima, S, Roberto, PG, Soares, AM, Astolfi-Filho, S, Pereira, JO, Giuliati, S, Faria Jr, M, Xavier, MA, Fontes, MR, Giglio, JR, França, SC. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I – gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. *Biochimie.* 2004; 86: 211-219.

84. Rosenberg, P. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons, in: Harris, J.B. (Ed.), *Natural Toxins – Animal, Plant and Microbial*. Clarendon Press/Oxford University Press, Oxford. 1986. pp. 129-174.
85. Baumann G, Permanetter B, Wirzfelce A. Possible value of H₂-receptoragonist for treatment of catecholamine-insensitive congestive heart failure. *Clin Pharmacol Ther*. 1984; 24: 165-177.
86. Mantelli L, Amerini S, Picchi A, Mugelli A, Ledda F. Some characteristics on the inotropic effects of histamine H₁ and H₂ receptor agonists in comparison with those of alpha-and-beta-adrenoreceptor agonists. *Agents and Actions*. 1982; 12: 1-2.
87. Brazil, V., 1901. Do envenenamento ophidico e seu tratamento. *Coll. Trab. Inst. Butantan* 1901, 31-55.
88. Brazil, V., 1903. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras de cobras. *Rev. Med. São Paulo* 6, 265-278.
89. Brazil, V., 1911. *A Defesa contra o Ophidismo*. Pocaí & Weiss, São Paulo.

ANEXOS



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1433-1, sobre "Avaliação dos efeitos da peçonha de *Bothrops jararacussu* sobre o coração e átrio isolados de ratos" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Stephen Hyslop / Mariana Acedo Pitocco Rodrigues está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 19 de dezembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1433-1, entitled "Evaluation of the effect of *Bothrops jararacussu* venom in the hearth and isolated atria in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on december 19, 2007.

Campinas, 03 de março de 2010.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva