

Francine Gonzaga Serafim

**Efeitos do veneno de *Micrurus dumerilii*
carinicauda na junção neuromuscular e no
músculo esquelético de rato**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Dias Fontana
Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Alice da Cruz-Höfling

UNICAMP
-2000-

Francine Gonzaga Serafim

**Efeitos do veneno de *Micrurus dumerilii*
carinicauda na junção neuromuscular e no
músculo esquelético de rato**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Dias Fontana
Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Alice da Cruz-Höfling

UNICAMP
-2000-

ii



2015 15430

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	du 65e
V.	Ex.
TOMBO BC/	42640
PROC.	16/278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 41,00
DATA	11/10/00
N.º CPD	

CM-00145881-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Se65e

Serafim, Francine Gonzaga

Efeitos do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* na junção neuromuscular e no músculo esquelético de rato / Francine Gonzaga Serafim. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientadores : Marcos Dias Fontana, Maria Alice da Cruz-Höfling
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. *Junção - Neuromuscular. 2. Farmacologia. 3. Morfologia. 4. Venenos. I. Marcos Dias Fontana . II. Maria Alice da Cruz-Höfling. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Membros:

1. Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

2. Prof. Dr. José Carlos Cogo

3. Profa. Dra. Angélica de Fátima Assunção Braga

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

Data: 25/08/00

Dedico este trabalho a minha mãe Alice e ao meu pai João
(*in memoriam*) por toda dedicação, respeito e inesgotável amor.

Agradecimentos especiais:

A minha irmã Flávia, para quem não existem palavras que expressem toda a minha admiração, amor e amizade.

Ao meu avô José, às tias Vera e Ester, aos tios José Luiz e José Luis (Tico) e às primas Isadora e Ludimilla, por todo o amor e pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

À tia Odette e às primas Maria Lúcia e Carmen por terem me recebido em sua casa. Pela preciosa convivência que tanto contribuiu para o meu crescimento pessoal. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, por ter-me acolhido com carinho e segurança, pela orientação e inestimável dedicação que foram indispensáveis para a minha formação científica e pessoal.

À Prof^a. Dr^a. Maria Alice da Cruz-Höfling, pela valiosa amizade e pela orientação durante a etapa dos estudos morfológicos compreendidos neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela preciosa colaboração na tradução dos textos para o inglês.

Ao Prof. Dr. Paulo Joazeiro, pela concessão do uso do fotomicroscópio.

Aos amigos Antônio Vilson dos Santos, Gildo B. Leite e Gustavo Henrique da Silva, pelo suporte técnico, interesse sempre notável e atenção constante nas diferentes fases de desenvolvimento deste trabalho.

Aos secretários Gislaine, Rita, Wanderlei e Eduardo do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelos serviços prontamente prestados, sempre com eficiência e competência.

As grandes amigas Ana Maria T. Grégio, Marielga Reali e Érika M. S. Freitas, pela amizade incondicional, pelo imenso carinho, pelo essencial suporte emocional e constante presença em todos os momentos deste trabalho e da minha vida. De coração, muito obrigada.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia, Cháriston, Yoko, Carol e Sara que sempre compartilharam seus conhecimentos com muita alegria e entusiasmo, pelo companheirismo e pela grandiosa ajuda nos momentos difíceis.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, por ter possibilitado a execução deste trabalho.

Aos docentes do Curso de Farmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelo conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelos serviços prestados.

Ao Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Unicamp por possibilitar a execução de parte deste trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp pelo apoio técnico e pelo uso dos seus equipamentos.

Às técnicas Antônia M. Ferreira, Adriane C.S. Sprogis e Loló, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp, pela ajuda durante o desenvolvimento das técnicas ultra-estruturais.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Ministério da Educação (Brasília-DF) pelo suporte financeiro.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP) - Unicamp (Campinas-SP), pelo suporte financeiro concedido para o término deste trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a elaboração deste trabalho e para a minha formação que, não foram citados, mas nem porisso contribuíram de forma menos importante.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SUMÁRIO

RESUMO.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1-A FAMÍLIA <i>ELAPIDAE</i> : DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	2
1.2-CARACTERÍSTICAS DAS SERPENTES VENENOSAS DO GÊNERO <i>MICRURUS</i>	2
1.3-ACIDENTES POR <i>MICRURUS</i>	4
1.4-ASPECTOS CLÍNICOS DO ENVENENAMENTO E SOROTERAPIA.....	5
1.5-CARACTERÍSTICAS DOS VENENOS DAS SERPENTES DO GÊNERO <i>MICRURUS</i>	8
1.5.1- Ação neurotóxica.....	11
1.5.2- Ação miotóxica.....	13
1.6- A SERPENTE <i>ELAPIDAE</i> : <i>Micrurus dumerilii caninicauda</i>	19
2-OBJETIVOS.....	24
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1-ANIMAIS.....	27
3.2-VENENO UTILIZADO.....	27
3.3-ESTUDOS BIOLÓGICOS.....	27
3.3.1-Preparação nervo frênico-diafragma de rato.....	27
3.3.2-Preparação diafragma de rato cronicamente desnervado.....	29
3.3.3- Preparação músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	31
3.4-DOSE LETAL 50.....	32
3.5-ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS.....	32
3.5.1-Descrição do circuito.....	33
3.5.2-Medida da resistência do microeletrodo.....	36
3.5.3- Potencial de membrana.....	36

3.5.4-Potencial de placa terminal em miniatura.....	37
3.6- ESTUDOS MORFOLÓGICOS.....	38
3.6.1-Microscopia de Luz.....	38
3.6.2-Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	39
3.7-ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4-RESULTADOS.....	41
4.1-ESTUDOS MIOGRÁFICOS.....	42
4.1.1- Preparação nervo frênico-diafragma de rato.....	42
4.1.1.1-Estimulação elétrica indireta.....	42
4.1.1.2- Estimulação elétrica direta.....	48
4.2- PREPARAÇÃO DIAFRAGMA DE RATO CRONICAMENTE DESNERVADO.....	51
4.3- PREPARAÇÃO MÚSCULO <i>BIVENTER CERVICIS</i> DE PINTAINHO.....	53
4.3.1-Estimulação elétrica indireta.....	53
4.3.2-Estimulação elétrica direta.....	55
4.4- DOSE LETAL 50.....	58
4.5-ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS.....	58
4.5.1- Potencial de membrana.....	58
4.5.2-Potencial de placa terminal em miniatura.....	60
4.6- ESTUDOS MORFOLÓGICOS.....	62
4.6.1-Microscopia de Luz.....	62
4.6.2-Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	63
5-DISCUSSÃO.....	93
6-CONCLUSÃO.....	108
7- SUMMARY	110
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

LISTA DE ABREVIÇÕES

M. d. carinicauda - *Micrurus dumerilii carinicauda*

Neo - neostigmina

3,4-DAP - 3,4-diaminopiridina

α -BTx - α -bungarotoxina

d-Tc - *d*-tubocurarina

NTXs - neurotoxinas

ACh - acetilcolina

PLA₂ - fosfolipase A₂

KCl - cloreto de potássio

Hz - Hertz

ms - milisegundo

V - volt

pptm - potencial de placa terminal em miniatura

PM - potencial de membrana

M Ω - mega ohm

Fig. - figura

DL₅₀ - dose letal mediana

JNM - junção neuromuscular

MET - microscopia eletrônica de transmissão

ML - microscopia de luz

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Distribuição geográfica da serpente <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i>	19
FIGURA 2 - Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de membrana e potenciais de placa terminal em miniatura.....	35
FIGURA 3 - Efeito da Neo (5,8 μ M) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 μ g/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.....	44
FIGURA 4 - Efeito da Neo (5,8 μ M) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (20 μ g/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.....	45
FIGURA 5 - Efeito da 3,4-DAP (230 μ M) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 μ g/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.....	46
FIGURA 6 - Efeito das lavagens sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 μ g/ml), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.....	47

FIGURA 7 - Efeito do veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 µg/ml) sobre a preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizada (<i>d</i> -Tc; 15 µM).....	49
FIGURA 8 - Efeito do veneno de <i>M. d. carinicauda</i> (5 µg/ml) sobre a preparação nervo frênico-diafragma de rato, previamente bloqueada com α -bungarotoxina (α -BTx; 13 µM).....	50
FIGURA 9 - Efeito do veneno de <i>M. d. carinicauda</i> sobre a preparação diafragma cronicamente desnervado de rato.....	52
FIGURA 10 - Efeito da ACh (37 µM) e KCl (134 µM) na preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, antes e após a adição do veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 µg/ml).....	54
FIGURA 11 - Efeito do veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 µg/ml) sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho curarizada (<i>d</i> -Tc; 15 µM).....	56
FIGURA 12 - Efeito do veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 µg/ml) sobre a preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho previamente bloqueada com α -bungarotoxina (α -BTx; 13 µM).....	57
FIGURA 13 - Efeitos do veneno de <i>M.d.carinicauda</i> sobre o potencial de membrana, nas fibras musculares do diafragma de rato.....	59

FIGURA 14 - Efeitos do veneno de <i>M.d.carinicauda</i> sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (pptom), no diafragma de rato.....	61
FIGURA 15 - Hemidiafragma de rato controle. A e B - Secções longitudinal e transversal, respectivamente.....	67
FIGURA 16 - Alterações morfológicas causadas na preparação diafragma de rato incubada com o veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> - 5, 10 e 20 µg/ml por 90 min.....	68
FIGURA 17 - Preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho incubada com veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 µg/ml) – 90 min.....	69
FIGURA 18 - Eletromicrografias de hemidiafragma de rato controle 0h (A) e incubados em solução de Tyrode, estimuladas indiretamente por 90 min (B,C e D).....	70
FIGURA 19 - Eletromicrografias das preparações diafragma de rato incubadas com veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> - 5 µg/ml por 90 min.....	71
FIGURA 20 - Detalhes das alterações musculares provocadas pelo veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 µg/ml) – 90 min.....	72

FIGURA 21 - Aspectos da degeneração necrótica das fibras musculares de hemidiafragma incubado com 10µg/ml do veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> - 90 min.....	73
FIGURA 22 -Eletromicrografias dos feixes nervosos presentes em preparações diafragma de rato, submetidas a diferentes tratamentos.....	74
FIGURA 23 - Junções neuromusculares (JNM) controles incubadas com solução de Tyrode, com estimulação elétrica indireta (90 min).....	75
FIGURA 24 - Eletromicrografia de JNM: veneno de <i>M. d. carinicauda</i> (5 µg/ml) - 90 min.....	76
FIGURA 25 - Eletromicrografia de JNM do diafragma de rato: veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (5 µg/ml) - 90 min.....	77
FIGURA 26 - Eletromicrografia de JNM do diafragma de rato incubado com o veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (10 µg/ml) - 90 min.....	78
FIGURA 27 - Eletromicrografia de JNM do diafragma de rato incubado com o veneno de <i>Micrurus dumerilii carinicauda</i> (10 µg/ml) -90 min.....	79

LISTA DE DROGAS

Acetato de uranila	Polysciences Inc. (Warrington, Ohio, USA)
Acetilcolina	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
Acetona	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
Ácido acético	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
Ácido pícrico	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
Álcool etílico	LabSynth- Prod. Para Laboratório Ltda, Brasil
Amônia	Carlo Erba – Itália
Azul de metileno	Carlo Erba – Itália
Azul de toluidina	Carlo Erba – Itália
Bicarbonato de cálcio	Carlo Erba – Itália
α -Bungarotoxina	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
Citrato de chumbo	Ladd-Reseach Industries, Inc., Burlington, USA
Cloreto de cálcio	Merck do Brasil
Cloreto de magnésio	Merck do Brasil
Cloreto de potássio	Merck do Brasil
Cloreto de sódio	Merck do Brasil
3,4-Diaminopiridina	Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA)
d-Tubocurarina	ABBOTT- Laboratórios do Brasil, Ltda.
Éter etílico	Chemco Ind. Com. Ltda, Brasil
Fosfato de potássio	Merck do Brasil
Fosfato de sódio	Merck do Brasil
Formaldeído	Ecibra – Cetus Ind. Com. Prod. Quím. Ltda, S.P.
Glicose	Merck do Brasil

Glutaraldeído	Polysciences Inc. (Warrington, Ohio, USA)
Hidrato de Cloral	Pentofarma Ltda, Brasil
Historesin – Embedding Kit	Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Germany
Neostigmina: “Prostigmine”	Laboratório Roche-Quím. Farmac. S.A-Brasil
Paraformaldeído	Polysciences Inc. (Warrington, Ohio, USA)
Resina Epon	Pelco/ Spi-Chem.
Sulfato de magnésio	Merck do Brasil
Tetróxido de Ósmio	Polysciences Inc. (Warrington, Ohio, USA)

UNICAMP
 BIBLIOTECA CENTRAL
 SEÇÃO CIRCULANTE

RESUMO

A serpente *Micrurus dumerilii carinicauda* (*M.d.carinicauda*) é uma espécie de coral, encontrada do Norte de Santander, região nordeste da Colômbia, atravessa a Bacia do Maracaibo e estende-se até Caracas no Estado de Miranda, na Venezuela. Pouco se conhece sobre o modo de ação do veneno desta espécie de *Micrurus*, que contém uma variedade de neurotoxinas e miotoxinas.

Neste trabalho, o veneno de *M. d. carinicauda* induziu bloqueio neuromuscular nas preparações nervo frênico-diafragma de rato e *biventer cervicis* de pintainho. Em ambas as preparações, o veneno (5 µg/ml) não deprimiu a resposta contrátil evocada pela estimulação elétrica direta. A Neo (5,8 µM) e a 3,4-DAP (230 µM) antagonizaram, parcialmente, o efeito bloqueador neuromuscular produzido pelo veneno (5, 10 e 20 µg/ml) nas preparações nervo frênico-diafragma de rato, enquanto as sucessivas lavagens da preparação com Tyrode foram ineficazes na tentativa de reverter o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno. Tais resultados sugerem uma ação do veneno nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos.

As contraturas induzidas pela adição de acetilcolina (ACh; 15 µM) tanto no diafragma desnervado como no *biventer cervicis* de pintainho (ACh; 37 µM) foram inibidas pela ação do veneno (5 µg/ml), mas a contratura evocada pela adição do KCl (134 µM) não foi deprimida. Sugerindo mais uma vez, que a ação

do veneno ocorre nos receptores colinérgicos nicotínicos e que não possui ação sobre a fibra muscular, nesta dose estudada.

Esta hipótese foi confirmada com o estudo dos potenciais bioelétricos. O veneno, na dose de 5 $\mu\text{g/ml}$, produziu um progressivo decréscimo na amplitude e frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) até seu bloqueio completo. A Neo e a 3,4-DAP foram capazes de reverter totalmente o bloqueio dos pptm, sugerindo assim que a ação do veneno (5 $\mu\text{g/ml}$) ocorra pós-sinapticamente. O estudo do potencial de membrana mostrou que o veneno (5 $\mu\text{g/ml}$) não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular do diafragma de rato, embora os estudos morfológicos tenham demonstrado que este possui ação miotóxica já com esta dose. A dissociação dos efeitos miotóxicos dos efeitos farmacológicos está relacionado com o número de fibras musculares que permaneceram íntegras.

O efeito miotóxico do veneno, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, mostrou ser dose-dependente. Estudos histológicos e ultra-estruturais mostraram que nas doses de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ o veneno induziu miotoxicidade e, esta foi mais evidente com a dose de 10 $\mu\text{g/ml}$, afetando a integridade do sarcolema de numerosas fibras musculares e produziu desorganização dos sarcômeros e ainda condensação dos miofilamentos. Nestas mesmas doses, o veneno também causou alterações ultra-estruturais sobre a junção neuromuscular, dentre as quais a bipartição do terminal nervoso e invaginação dos processos da célula de Schwann,

alterações topológicas na distribuição das vesículas sinápticas, bem como a presença de mitocôndrias degeneradas e indentações ômega, formando pequenas invaginações no axolema. Em conclusão, os resultados sugerem que o veneno induz miotoxicidade nas preparações estudadas, mas o efeito predominante do ocorre nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A Família *Elapidae*: distribuição geográfica

As serpentes venenosas pertencem a três famílias dentro da subordem das *Serpentes*: as *Viperidae* (serpentes do Velho Mundo e as víboras), as *Elapidae* (cobras, mambas, kraits, serpentes corais) e as *Colubridae* (aproximadamente 80 gêneros venenosos). Uma classificação alternativa é colocar as *Hydrophidae* (cobras do mar) dentro da família das serpentes venenosas (BERGER & BHATTI, 1989).

Dentre essas, a família *Elapidae* interessa epidemiologicamente, porque a picada destas serpentes constitui um importante problema de saúde pública em áreas rurais, nos países em desenvolvimento. Muitas destas espécies são responsáveis por acidentes em humanos (AMUY *et al.*, 1997).

A família *Elapidae* possui representantes na América, África, Ásia, Austrália e Nova Guiné, perfazendo um total de 43 gêneros (VITAL BRAZIL, 1980). Das 2300 espécies de serpentes existentes no mundo, 240 estão incluídas nestes 43 gêneros (KOCHVA, 1987).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1.2 - Características das serpentes do gênero *Micrurus*

As serpentes do gênero *Micrurus* (popularmente conhecidas por serpentes corais) são as representantes da família *Elapidae* nas Américas. Esses representantes são particularmente importantes do ponto de vista médico, científico e social pelo fato de causarem acidentes gravíssimos, apesar da baixa

incidência. Essas serpentes, abundantes nas Américas Central e do Sul e menos abundantes na América do Norte, possuem os dentes inoculadores conectados às glândulas de veneno e providos de sulcos por onde ele escoar, isto é, são Proteróglifas. Os dentes estão localizados na região anterior da boca (maxilar superior), e, no ato da picada, músculos são acionados e respondem pela eliminação instantânea do veneno (VITAL BRAZIL, 1982). Todas as Proteróglifas são venenosas (KOCHVA, 1987).

As serpentes corais (corales, coralillos, coralillas), são as *Elapidae* do Novo Mundo, atualmente, incluídas em 2 gêneros: *Micruroides* e *Micrurus*. As *Micruroides* são conhecidas no sudeste dos Estados Unidos e no oeste do México. Há somente uma espécie de *Micruroides*, *Micruroides euryxantus*, na qual 3 subespécies são reconhecidas. O gênero *Micrurus* é distribuído ao longo das áreas tropicais e temperadas quentes da América do Norte, Central e do Sul e provisoriamente, engloba o gênero *Leptomicrurus*, e em conjunto incluem 53 espécies e mais de 120 subespécies, distribuídas do sudeste dos Estados Unidos à região central da Argentina, ocupando uma variedade de habitats, desde regiões desérticas até florestas úmidas (ROZE, 1982, 1989; ROZE & BERNAL-CARLO, 1987; CAMPBELL & LAMAR, 1989).

Apesar do grande número de representantes do gênero *Micrurus*, a literatura existente é muito escassa (BOLAÑOS & CERDAS, 1980) e poucas espécies têm

sido investigadas quanto ao modo de ação dos seus venenos (BARROS *et al.*, 1994).

Do ponto de vista médico-epidemiológico, as mais importantes espécies de *Micrurus* são: *M. fulvius* nos Estados Unidos, *M. diastema*, *M. distans* e *M. laticolares* no México e Guatemala, *M. nigrocinctus* e *M. alleni* no resto da América Central e *M. mipartitus*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii*, *M. surinamensis*, *M. isozonus* e *M. dumerilii carinicauda* na América do Sul (ALAPE-GIRÓN *et al.*, 1994).

1.3 - Acidentes por *Micrurus*

A quase totalidade dos acidentes é provocada pela manipulação das serpentes sem as devidas precauções e técnica, por indivíduos que as tomam pelas falsas corais (serpentes não-peçonhentas) cuja natureza inofensiva, juntamente com sua coloração atrativa (anéis alternados em vermelho, amarelo ou branco e preto), tem, em muitas ocasiões, induzido ao seu manuseio inadequado (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

Apesar do grande número de espécies de corais, de sua ampla distribuição geográfica no continente americano e da gravidade do acidente provocado pelas *Micrurus*, o estudo dos venenos de tais serpentes tem recebido pequena atenção (BOLAÑOS & CERDAS, 1980). Em parte, isto ocorre pela dificuldade que seus hábitos subterrâneos e esquivos oferecem para sua captura, e da necessidade de

condições adequadas para mantê-la em cativeiro (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

A incidência dos envenenamentos pela picada das serpentes *Micrurus*, na América, não possui a alta frequência observada nos envenenamentos causados pelas serpentes viperídeas e crotalídeas, porém alguns relatos de acidentes têm ocorrido recentemente (PETTIGREW & GLASS, 1985; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 1998; COELHO *et al.*, 1993). Os acidentes provocados pelas serpentes corais são freqüentemente gravíssimos, podendo sobrevir a morte em poucas horas, se as vítimas não forem tratadas convenientemente (ver aspectos clínicos do envenenamento) (VITAL BRAZIL, 1980).

A austeridade dos sintomas de envenenamento por picada de *Micrurus* pode variar de trivial a extremamente grave. Os estudos das peçonhas das serpentes do gênero *Micrurus* têm sido direcionados para a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos nos efeitos que as mesmas causam, que inclui um progressivo bloqueio da transmissão neuromuscular, podendo levar à parada respiratória e por conseguinte à morte ocorre em razão da (ALAPE-GIRÓN *et al.*, 1994).

1.4 - Aspectos clínicos do envenenamento e soroterapia

Os sinais e sintomas do envenenamento por *Micrurus* são resultantes de uma paralisia progressiva da musculatura esquelética, isto é, bloqueio da

neurotransmissão o qual pode evoluir até a falência respiratória e morte, a menos que a vítima receba ventilação artificial. Os efeitos resultantes da paralisia ocorrem nas primeiras 2 a 6 horas do envenenamento, e podem levar até 48 horas para atingir intensidade máxima. Estes consistem em sintomas sistêmicos como euforia, náusea, vômito, salivação excessiva, parestesia na extremidade picada, ptose, fraqueza, reflexos anormais, paralisia motora, depressão, dispnéia e paralisia respiratória (VITAL BRAZIL, 1980; CAMPBELL & LAMAR, 1989).

A partir destas observações clínicas em humanos e animais de laboratório, foi sugerido que os sinais e sintomas decorrentes da picada destas serpentes eram devidos aos efeitos neurotóxicos (BRAZIL, 1914; RAMSEY & KLICKSTEIN, 1962; McCOLLOUGH & GENNARO, 1963; VITAL BRAZIL, 1965; PARRISH & KHAN, 1967; RUSSEL, 1967; ROSENFELD, 1971; SHAW, 1971; JIMÉNEZ-PORRAS, 1973; SNYDER *et al.*, 1973; VITAL BRAZIL, FONTANA, PELLEGRINI FILHO, 1976/77; VITAL BRAZIL, 1980, 1987; MOUSSATCHÉ & MELENDEZ, 1979; VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84; DALÓ *et al.*, 1989), geralmente fatais para o homem (COHEN, DAWSON, SELIGMAN, 1968; ALAPE-GIRÓN *et al.*, 1994).

Clinicamente, são idênticos os sinais e sintomas neurotóxicos gerais, observados nos acidentes causados pela mordedura das várias espécies de serpentes elapídicas, quer da África, Ásia, Oceania ou Américas, e são causadas pela ação das neurotoxinas presentes nos venenos (VITAL BRAZIL, 1980).

Entretanto, apesar de possuírem sinais e sintomas neurotóxicos similares, a importância médica dos diferentes gêneros difere, enormemente, nos diferentes países (VITAL BRAZIL, 1980).

Os estudos empreendidos em modelos de envenenamento experimental por *Micrurus* mostra que os venenos apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas, reproduzindo os sinais e sintomas assinalados clinicamente nos pacientes acidentados. Além dos cuidados sintomáticos (ventilação artificial e neostigmina precedida de atropina, na vigência de parada respiratória), a soroterapia, com antivenenos heterólogos de animais hiperimunizados com venenos brutos, é o principal tratamento para o envenenamento por picada de serpentes corais (RUSSELL, 1983; BOLANÕS, 1984; ALAPE-GIRÓN *et al.*, 1994).

Muitos laboratórios, em diferentes países, produzem o soro contra o veneno de *Micrurus* (THEAKSTON & WARREL, 1991). Se o antiveneno é administrado poucas horas após à picada, a parada respiratória pode ser evitada, mas se há demora no início do tratamento, os sinais e sintomas neurológicos aparecem, e nem sempre é possível prevenir as ações adicionais do veneno, ou reverter rapidamente as alterações que já ocorreram. O soro antielapídico, para uso na América Central, é preparado mediante a mescla dos venenos das duas subespécies mais comuns de *M. nigrocinctus* (a principal serpente da América Central): *M. nigrocinctus nigrocinctus* e *M. nigrocinctus musquitensis*, em partes

iguais. Este soro antielapídico é polivalente, sendo utilizado para neutralização de venenos de outras espécies de *Micrurus*, e é produzido mediante a imunização de cavalos, que são exsanguinados 4 vezes ao ano (BOLAÑOS & CERDAS, 1980).

1.5 - Características dos venenos das serpentes do gênero *Micrurus*

Os estudos farmacológico e bioquímico dos venenos de animais e de suas toxinas são de extrema importância, pois somente através deles é possível a aquisição de conhecimento adequado sobre a fisiopatologia dos envenenamentos e a instituição de medidas racionais e eficientes em seu tratamento. Além disso, auxiliam no esclarecimento de vários fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos do organismo e o estudo das toxinas, presentes nesses venenos, tem mostrado que estas atuam como valiosos instrumentos de pesquisa, além de se prestarem à elucidação das relações taxonômicas entre animais peçonhentos (MACDONNEL *et al.*, 1976; MYERS & DALY, 1976).

Venenos de *Micrurus* analisados, exibiram modelo eletroforético similar, com uma banda muito intensa de proteínas de baixa massa molecular relativa, muito semelhantes às do veneno de *Naja*, também Elapidae. Assim, venenos de *Micrurus*, únicos elapídios na América, exibem propriedades biológicas semelhantes a de outros gêneros da família que são encontrados na Ásia e África (TAN & PONNUDURAI, 1992).

Os venenos de *Micrurus* são complexas misturas de proteínas (ALAPE-GIRÓN *et al.*, 1996; ROSSO *et al.*, 1996) e mais de 49 proteínas de baixa massa molecular têm sido identificadas em alguns venenos de *Micrurus* (PERKINS & TOMER, 1995).

Os venenos de serpentes corais não causam alterações no sítio da mordedura, tais como edema, hemorragia e necrose. Efeitos nefrotóxicos também não são evocados por estes venenos em animais ou humanos (VITAL BRAZIL, 1980). A atividade proteolítica é pequena ou nula, quando testada em substratos sintéticos ou naturais (MEBS, 1970; AIRD & SILVA, 1991; TAN & PONNUDURAI, 1992; BARROS *et al.*, 1994). Os venenos de *Micrurus* apresentam atividade fosfolipásica A₂, produzindo hemólise *in vitro*, porém *in vivo* não causam hemólise intravascular ou hemoglobinúria (VITAL BRAZIL, 1980).

Embora tenham sido feitas generalizações a respeito das propriedades farmacológicas dos venenos de *Micrurus*, no que se refere à neurotoxicidade e à ausência de efeitos locais, tais como necrose e hemorragia, alguns estudos têm mostrado a ocorrência de mionecrose, após o envenenamento por algumas espécies de *Micrurus* (WEIS & McISAAC, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1982, 1983; MEBS & OWNBY, 1990).

Os venenos das serpentes elapídicas apresentam neurotoxinas (NTXs) pós-sinápticas e podem encerrar NTXs pré-sinápticas (KELLAWAY, CHERRY, WILLIAMS, 1932; LEE, CHANG, CHEN, 1972), além de muitos outros

constituintes tóxicos, dentre os quais podemos salientar as cardiotoxinas e fosfolipases A₂ (CHANG, 1979; HARVEY, 1990; LAI, WEN, LEE, 1972; VITAL BRAZIL, 1980; VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84). Embora a atividade hemorrágica tenha sido observada como uma característica dos venenos das serpentes da família Viperidae, recentemente foi isolada e caracterizada uma hemorragina do veneno de *Ophiophagus hannah* (king cobra) (TAN & SAIFUDDIN, 1989; TAN & PONNUDURAI, 1992). O veneno desta espécie da família Elapidae já havia sido relatado, por exibir um efeito hemorrágico relativamente alto, OHSAKA, 1979. Estudos recentes também demonstraram que o veneno de *Micrurus averyi* produz discreto efeito hemorrágico, confirmado através da análise histológica (BARROS *et al.*, 1994).

O veneno é constituído por uma complexa mistura de moléculas de natureza química diversa e de diferentes ações (JIMÉNEZ-PORRAS, 1970; TU, 1977). Dentre os componentes, aproximadamente 90% são proteínas, dotadas de atividades enzimáticas e/ou tóxicas, tais como, fosfolipases, fosfodiesterases, fosfatases, acetilcolinesterases e enzimas proteolíticas. Os 10% restantes são compostos não protéicos como carboidratos, fosfolipídeos, amins biogênicas, peptídeos, nucleotídeos, ions e água (BIEBER, 1979; BERGER & BHATTI, 1989; BJARNASON & FOX, 1994). Estes componentes têm a função primária de imobilizar ou de matar a presa e, em seguida, digeri-la. O sucesso da captura e digestão da presa devem-se às atividades neurotóxicas (pré/pós-sinápticas),

cardiotóxicas, miotóxicas, coagulantes, anticoagulantes, hemorrágicas e, direta ou indiretamente, nefrotóxicas ou hepatotóxicas do veneno. Estas atividades, tanto em acidentes humanos como nos causados experimentalmente, são devidas a efeitos aditivos ou sinérgicos e também a antagonísticos, produzidos pelas diferentes toxinas e enzimas presentes nos venenos, que atuam quer, indiretamente, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, quer, diretamente, através de ações nas membranas celulares (LEE & CHANG, 1966; IWANAGA & SUSUKI, 1979; BERGER & BHATTI, 1989; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; HARRIS & CULLEN, 1990).

1.5.1 - Ação neurotóxica

As serpentes pertencentes às famílias *Elapidae* (cobras, kraits, mambas, serpentes tigre e serpentes corais) e *Hydrophidae* (serpentes do mar) têm venenos neurotóxicos típicos, com alto conteúdo de neurotoxinas (VITAL BRAZIL, 1982).

As neurotoxinas são os constituintes mais tóxicos do veneno e são divididas em duas classes farmacológicas, com base nos seus sítios de ação, as pré-sinápticas e pós-sinápticas (IWANAGA & SUSUKI, 1979).

As NTXs elapídicas pós-sinápticas são proteínas básicas de baixa massa molecular relativa (entre 7.000 a 8.000 dáltons). Em virtude da sua baixa massa molecular, podem ser rapidamente absorvidas pela circulação sistêmica, difundidas para todos os tecidos, explicando a precocidade dos sintomas do

envenenamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). São constituídas de cadeia polipeptídica única, interligada por pontes de dissulfeto, sendo que, em um grupo são formadas por 61-62 resíduos de 15-16 aminoácidos e 4 pontes dissulfídicas (cobratoxina do veneno de *Naja naja atra*, toxina do veneno de *Naja nigricolis*, etc.) e em outro, de 71-74 resíduos de 17-18 aminoácidos e 5 pontes dissulfídicas (α -bungarotoxina do veneno de *Bungarus mutlicictus*, toxinas T₃ e T₄ do veneno de *Naja naja naja*, etc.). A cobratoxina, do primeiro grupo, causa bloqueio reversível, enquanto a α -bungarotoxina, do segundo grupo, causa bloqueio irreversível nas preparações neuromusculares isoladas. Estudos mostram que a irreversibilidade estaria ligada ao maior número de aminoácidos hidrofóbicos, presentes nas moléculas das neurotoxinas pós-sinápticas do segundo grupo (VITAL BRAZIL, 1980). As NTXs pós-sinápticas combinam-se com os receptores colinérgicos da placa, sem promover despolarização da membrana dessa região da fibra muscular. As NTXs elapídicas pós-sinápticas ocorrem nos venenos de todas as serpentes elapídicas (e nas *Hydrophidae*) até o presente momento estudados. As drogas anticolinesterásicas (neostigmina e edrofônio) podem antagonizar o bloqueio neuromuscular causado pelas NTXs pós-sinápticas (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77; VITAL BRAZIL, 1980).

As NTXs elapídicas pré-sinápticas são proteínas de massa molecular variada (entre 12.000 a 56.000 dáltons), básicas ou moderadamente ácidas. As NTXs pré-sinápticas são os constituintes mais tóxicos encontrados no veneno ofídico e sua

ação é irreversível. As drogas anticolinesterásicas não antagonizam o bloqueio produzido pelas NTXs pré-sinápticas, ocorrendo apenas em alguns venenos. Elas atuam nas terminações nervosas da placa terminal, inibindo a liberação do mediador (ACh) pelos impulsos nervosos, interrompendo a transmissão neuromuscular (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77; VITAL BRAZIL, 1980). A letalidade das NTXs pré-sinápticas é muito maior que a das toxinas pós-sinápticas, pois elas são extremamente letais e estruturalmente relacionadas com as fosfolipases (PLAs). Algumas delas também atuam como toxinas mionecróticas, produzindo necrose da fibra muscular (IWANAGA & SUSUKI, 1979). As NTXs com atividade fosfolipásica como a β -bungarotoxina, crottoxina e notexina inibem a transmissão neuromuscular, por agirem seletivamente em nível pré-sináptico e são altamente tóxicas. Elas produzem uma alteração trifásica na liberação evocada do transmissor, que compreende uma inibição inicial (atribuída à ligação da toxina ao sítio pré-sináptico específico), seguida por uma facilitação da liberação de ACh e uma progressiva depressão até bloqueio irreversível da transmissão. A atividade fosfolipásica parece ser essencial para a neurotoxicidade dessas toxinas pré-sinápticas, uma vez que a sua inibição resulta na diminuição ou abolição da neurotoxicidade (HAWGOOD & SMITH, 1989; MEBS & OWNBY, 1990).

O veneno de *Micrurus corallinus* foi descrito por conter ações tanto pré- como pós-sinápticas. Este veneno produz um bloqueio neuromuscular irreversível, reduzindo a liberação evocada de ACh e aumentando a liberação espontânea de

ACh (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84). O veneno de *M. lemniscatus* e *M. frontalis* possuem apenas ação pós-sináptica (VITAL BRAZIL, 1987).

1.5.2 - Ação miotóxica

Diz-se que uma substância é miotóxica, quando ela é capaz de induzir alterações mionecróticas nas fibras musculares, particularmente as esqueléticas.

MEBS & OWNBY (1990) definem miotoxicidade causada por componentes do venenos de serpentes (ou outros animais peçonhentos) como a ação tóxica direta e específica sobre o músculo esquelético, denominados miotoxinas, que levam à degeneração e morte celular ou mionecrose.

As miotoxinas dos venenos das serpentes constituem um grupo heterogêneo, do ponto de vista bioquímico estrutural, de toxinas. As miotoxinas podem ser componentes extremamente tóxicos, ativos mesmo em doses muito menores que 1µg. Em animais experimentais resultam quase sempre em maciço dano da fibra muscular (MEBS & OWNBY, 1990; MELO & OWNBY, 1996).

As miotoxinas estão presentes em uma grande variedade de venenos elapídicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1983; MEBS, EHRENFELD, SAMEJIMA, 1983).

Com relação aos venenos de *Micrurus*, muitos têm sido caracterizados por sua ação miotóxica em camundongos. Após a injeção intramuscular, evidências histológicas de dano muscular local e significativo aumento nos níveis plasmáticos de creatinoquinase (CK) têm sido mostradas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1983). A

fosfolipase A₂, isolada do veneno de *M. nigrocinctus* (ARROYO *et al.*, 1987), é a toxina, muito provavelmente, responsável pela miotoxicidade observada após envenenamento, à maneira do que ocorre com outros venenos da família *Elapidae* (HARRIS, JOHNSON, MACDONELL, 1980; MEBS, 1986).

A ação deletéria direta das miotoxinas as diferenciam de outros componentes tóxicos, como as hemorraginas constituintes de alguns venenos ofídicos, que podem, indiretamente, também afetar as fibras musculares esqueléticas e outros tecidos. Neste caso, as lesões musculares dão-se por falência da microcirculação, por conta dos fatores hemorrágicos contidos no veneno, levando à anóxia, falta de perfusão e degeneração muscular. As miotoxinas não destroem terminais nervosos, células satélites, vasos sanguíneos ou tecidos conjuntivos, a não ser aquelas que desempenham atividade neurotóxica.

A mionecrose, embora possa ocorrer em muitos casos de envenenamento por serpentes, é mais proeminente com venenos de *Crotalidae* e *Viperidae* mas também pode ser observada em envenenamentos por *Hydrophidae* e *Elapidae* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1983, 1986; TU, 1991).

Como exemplo de miotoxinas, presentes em venenos elapídicos, temos as cardiotoxinas e as fosfolipases A₂ (VITAL BRAZIL, 1980; HARRIS & CULLEN, 1990; MEBS & OWNBY, 1990).

As cardiotoxinas, conhecidas como citotoxinas, 'fatores líticos diretos' e 'toxinas de membrana', assim denominadas por causarem *in vitro* e *in vivo*,

parada cardíaca durante a sístole (CONDREA, 1974; HARRIS & CULLEN, 1990). As cardiotoxinas são proteínas de caráter básico e baixa massa molecular relativa (6.000-7.000 dáltons), desprovidas de atividade enzimática e possuem de 60 a 62 resíduos de aminoácidos interligados por 4 pontes de dissulfeto. São polipeptídeos pequenos e homólogos na estrutura com as neurotoxinas pós-sinápticas (VITAL BRAZIL, 1980; HARRIS & CULLEN, 1990; MEBS & OWNBY, 1990; HARRIS, 1990). As cardiotoxinas são encontradas nos venenos das *Elapidae*, como por exemplo nos gêneros *Naja*, *Ophiophagus* e *Hemachatus*, em concentrações de 50% ou mais (LEE, HO, EAKER, 1977) e possivelmente, na *Micrurus fulvius* do hemisfério norte (WEIS & McISAAC, 1971) e *Bungarus fasciatus* da Ásia (SHIAU LIN, HUANG, LEE, 1972; SHIAU LIN *et al.*, 1975). Foi demonstrado *in vivo*, que a cardiotoxina I, presente nos venenos das cobras *Naja mossambica mossambica* e *Naja naja atra*, possui habilidade para causar necrose da musculatura esquelética (DUCHEN *et al.*, 1974; COUTEAUX, MIRA, D'ALBIS, 1988; OWNBY, FLETCHER, COLBERG, 1993).

Os possíveis mecanismos de ação para as cardiotoxinas incluem: (1) ação direta sobre a membrana plasmática, provocando ruptura da mesma, acompanhada por despolarização, (2) ação indireta através da ativação da fosfolipase C endógena do tecido, ou (3) uma combinação dos dois mecanismos; (4) uma outra possibilidade seria através da inibição da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase, seguida por aumento da

concentração osmótica de Na^+ e edema celular por influxo passivo de água para a célula (OWNBY *et al.*, 1993).

As fosfolipases A_2 (PLA_2) têm sido isoladas dos venenos de serpentes das famílias *Crotalidae* e *Elapidae* e têm estrutura muito semelhante às PLA_2 pancreáticas.

Podem ser divididas em 2 grupos: o grupo I é constituído pelas enzimas pancreáticas e elapídicas, enquanto o grupo II pode ser dividido em dois subgrupos, o 2A com sete pontes dissulfídicas e o 2B com seis pontes dissulfídicas (ROSENBERG, 1990). Posteriormente, ficou estabelecido que, um dos subgrupos compreendia as PLA_2 Asp 49 e o segundo subgrupo as PLA_2 Lys 49.

As PLA_2 têm estrutura variável com cadeia única, como a notexina, da serpente *Notechis scutatus scutatus* (HARRIS, JOHNSON, KARLSSON, 1975), ou consistem de 2 e 4 subunidades como a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* (GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984) e a taipoxina da *Oxyuranus scutellatus* (HARRIS & MALTIN, 1982), respectivamente.

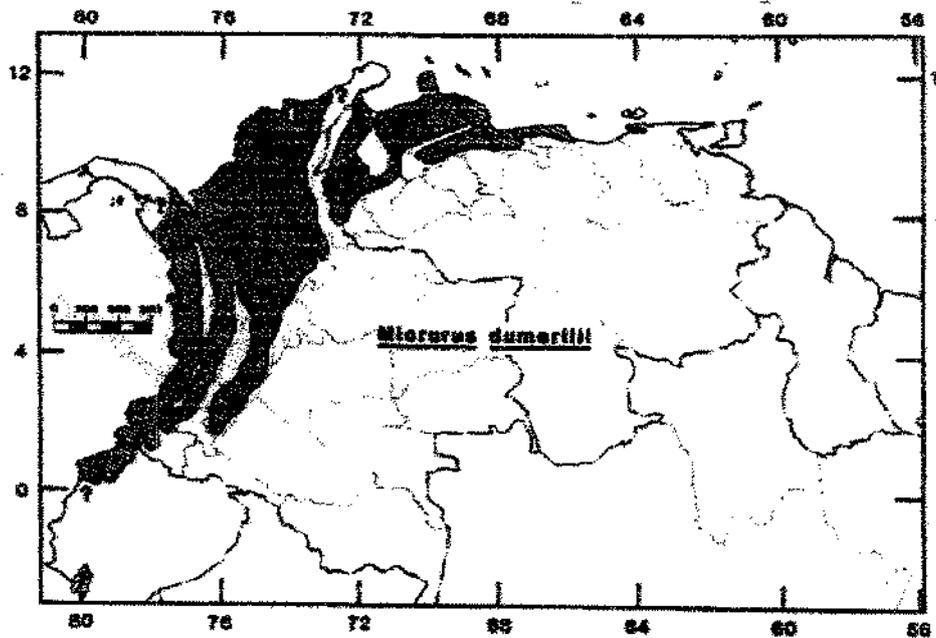
As PLA_2 atuam, hidrolisando a ligação éster dos fosfatídios, formando lisofosfatídeos (VITAL BRAZIL, 1982), que atuam como detergente na membrana das células e são responsáveis pela atividade hemolítica indireta dos venenos ofídicos. Nos músculos esqueléticos de vertebrados, as PLA_2 podem inibir a transmissão neuromuscular por diferentes mecanismos.

O segundo grupo de PLA₂ (PLA básica de *Naja nigricolis*), produz um efeito miotóxico acentuado e também deprime a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos à ACh. Os efeitos miotóxicos, geralmente, mascaram os efeitos pré-sinápticos das PLA₂.

O terceiro grupo, que inclui as PLA₂s ácidas e neutras de vários venenos de serpentes, tem pequeno efeito sobre as fibras nervosas e musculares em baixas concentrações, e são consideradas não tóxicas. A seletividade da ação das PLA₂s sobre as fibras nervosas e os musculares é dependente da dose. Portanto, além dos efeitos pré-sinápticos, essas neurotoxinas podem apresentar efeitos pós-sinápticos e musculares. Apenas a minoria das fosfolipases podem ser consideradas verdadeiramente miotóxicas (VITAL BRAZIL, 1980; HARRIS & CULLEN, 1990; MEBS & OWNBY, 1990; FLETCHER *et al.*, 1996). As PLA₂ foram previamente relatadas em venenos de *Micrurus* (POSSANI *et al.*, 1979; ARROYO *et al.*, 1987; MOCHCA-MORALES *et al.*, 1990) que possui neurotoxinas pós-sinápticas e PLA₂ pré-sinápticas (CRUZ-HÖFLING, RODRIGUES-SIMIONI, VITAL BRAZIL, 1983/84; VITAL BRAZIL, 1987; GOULARTE, CRUZ-HÖFLING, RODRIGUES-SIMIONI, 1996).

1.6 - A serpente *Elapidae: Micrurus dumerilii carinicauda*

A espécie *Micrurus dumerilii carinicauda* (*M. d. carinicauda*), objeto deste estudo, está distribuída do Norte de Santander, região nordeste da Colômbia, atravessa a Bacia de Maracaibo e estende-se até Caracas no Estado de Miranda na Venezuela (Fig. 1).



CAMPBELL & LAMAR, 1989.

FIGURA 1 - A área grifada corresponde a distribuição geográfica da serpente *M. d. carinicauda*, do Norte de Santander, região nordeste da Colômbia, atravessando a Bacia de Maracaibo e estendendo-se até Caracas no Estado de Miranda na Venezuela.

As serpentes *M.d. carinicauda* têm como hábitat as florestas tropicais úmidas. Estas serpentes medem aproximadamente 50-70 cm de comprimento, chegando a atingir, no máximo, 77,5 cm. As serpentes da espécie *M. d. carinicauda* não são espécies tricoloridas como as *M. corallinus*, *M. lemniscatus* e a *M. surinamensis*, sua cabeça tem coloração preta e possuem de 14-27 anéis corporais pretos, não dispostos em tríades (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

São escassos os estudos sobre o veneno de *M. d. carinicauda*, visando compreender suas propriedades e composição.

Em 1968, COHEN *et al.* relataram que esta espécie era coletada em número suficiente, e era utilizada para a produção de antivenenos em larga escala. Testes sorológicos mostram que o anti-soro preparado contra o veneno de *M. d. carinicauda* produz um grau satisfatório de proteção para camundongos contra os efeitos letais do veneno de *M. fulvius fulvius* (Linnaeus) e, portanto, um antígeno potencial na preparação do antiveneno para tratar a picada de *Micrurus fulvius fulvius*.

Características comuns, bem como a variabilidade em algumas propriedades biológicas entre venenos de diferentes gêneros de *Micrurus*, têm sido demonstradas em estudos comparativos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1983; VITAL BRAZIL, 1987; AIRD & SILVA, 1991; TAN & PONNUDURAI, 1992).

Estudos histológicos realizados por GUTIÉRREZ *et al.* (1983), para detectar os efeitos locais (mionecrose, edema e hemorragia), induzidos pela

inoculação intramuscular de venenos de seis espécies de serpentes corais, dentre eles o veneno de *M. d. carinicauda*, mostraram que, nas doses de 15 e 30 µg/ml, este induz mionecrose em camundongos e confirmou a miotoxicidade deste veneno. Nenhum dos venenos das corais, induziu edema ou hemorragia no sítio de injeção.

TAN & PONNUDURAI (1992) estudaram as propriedades biológicas como as atividades proteásica, fosfodiesterásica, 5'-nucleotidase, fosfolipásica A₂, hialuronidásica, L-aminoácido oxidase e trombolítica de nove amostras de venenos de seis espécies de *Micrurus* (dentre eles o veneno de *M.d. carinicauda*) e compararam com venenos elapídicos da Ásia e África.

ALAPE-GIRÓN *et al.* (1994) estudaram a mobilidade eletroforética de componentes do veneno de 15 espécies de *Micrurus*, por eletroforese, em gel de poliacrilamida. Os venenos mostraram-se espécie-específicos em relação a modelos protéicos sob condições naturais (PAGE) ou desnaturação (urea-PAGE). As propostas deste estudo foram: comparar modelos eletroforéticos de venenos de diferentes espécies de *Micrurus*; avaliar a variabilidade intra-específica em venenos de *M. nigrocinctus nigrocinctus* por métodos eletroforéticos e, estudar a afinidade imunológica entre venenos de diferentes espécies de *Micrurus*, usando anticorpos monoclonais e policlonais produzidos contra o veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus*. Os resultados mostraram que os venenos de *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. fulvius fulvius*, *M. dumerilii carinicauda* e *M.*

albicinctus foram reconhecidos por ambos os tipos anticorpos, sugerindo que os mesmos possuem um alto grau de antigenicidade, similar ao apresentado pelo veneno de *M. n. nigrocinctus*.

Através de estudos de aglutinação reversa e ELISA, foram realizadas análises com o intuito de determinar a cinética dos antígenos dos venenos de *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. fulvius*, *M. spixii*, *M. dumerilii carinicauda*, *M. alleni*, *M. mipartitus*, *M. frontalis* e *M. corallinus* que aparecem no soro de animais envenenados experimentalmente. Nos testes de aglutinação reversa, o menor limite de detecção foi de 0,3 para *M.n. nigrocinctus* e 3,0 para *M. d.carinicauda*. Nenhum dos testes foi apropriado para a curva dose-resposta, na detecção dos venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. mipartitus*, em concentrações em ng/ml, indicando que a especificidade destas análises é restrita para venenos de espécies mais antigenicamente relacionadas. Este teste é importante para diferenciar as serpentes corais verdadeiras das falsas; permite um rápido diagnóstico do envenenamento antes do aparecimento dos sintomas e facilita o desenvolvimento de protocolos de soroterapia adequados, em que o paciente envenenado recebe apenas a quantidade de anti-soro adequada para neutralizar o veneno inoculado, uma vez que este é o grande problema da soroterapia (AMUY *et al.*, 1997).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Na literatura, são escassas as informações sobre os efeitos bioquímicos, farmacológicos e morfológicos (com a dose utilizada neste estudo) do veneno de *M.d.carinicauda*.

Embora alguns estudos acêrca dos efeitos morfológicos do veneno de *M. d. carinicauda* em camundongos (*in vivo*) encontrem-se na literatura (GUTIÉRREZ *et al.*, 1982, 1983), os autores utilizaram doses elevadas (15 e 30 µg/ml) que não permitiram a visualização do efeito neurotóxico de forma objetiva.

Até o momento, nada foi demonstrado, sobre as alterações ultra-estruturais que atingem os componentes do músculo e dos terminais nervosos, sob efeito do veneno de *M. d. carinicauda*.

As informações obtidas sobre este veneno poderão auxiliar na compreensão dos complexos fenômenos fisiopatológicos que ocorrem nos envenenamentos ofídicos, contribuindo para a elucidação das relações entre a estrutura dos componentes e a função que exercem.

2 - OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do veneno da serpente elapídica *Micrurus dumerilii carinicauda* sobre a junção neuromuscular e o músculo esquelético.

Objetivos específicos:

- Estudos miográficos: avaliar as características do veneno quanto à sua capacidade de causar bloqueio neuromuscular, e se este bloqueio, foi decorrente de uma ação predominante nos receptores colinérgicos nicotínicos ou se deveu também à uma atuação na fibra muscular.

- Estudos eletrofisiológicos: determinar se a gênese do efeito do veneno em estudo ocorre pré- e/ou pós-sinápticamente e ainda avaliar a atividade do veneno na fibra muscular, confirmando os resultados tanto miográficos como morfológicos.

- Estudos morfológicos: fornecer informações sobre a atividade miotóxica do veneno, o ultra-estrutural permitiu determinar alterações submicroscópicas nas fibras musculares resultantes do efeito miotóxico, bem como correlacionar os efeitos sobre a neurotransmissão com aqueles produzidos nos componentes pré- e pós-sinápticos da junção neuromuscular.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 250-300 g; camundongos da linhagem Swiss, com peso entre 18-30 g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas (SP) e pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40-50 g (4 a 8 dias de idade) fornecidos pela Granja ITO S/A, Sumaré (SP). Os animais foram mantidos em gaiolas e tratados com água e ração *ad libitum*.

3.2 - Veneno

O veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

3.3 - Estudos biológicos

3.3.1 - Preparação nervo frênico-diafragma de rato

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946) para ratos. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (250 mg/Kg, via intraperitoneal) e, após sangria por secção dos vasos do pescoço, procedeu-se à retirada e montagem do hemidiafragma esquerdo com porção do nervo frênico correspondente (nas preparações destinadas à estimulação indireta). A preparação foi fixada em cuba contendo 40 ml de solução nutritiva de Tyrode, com a seguinte composição mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 11,9;

MgCl₂ 0,25; NaH₂PO₄ 0,3 e glicose 11. A solução foi aerada constantemente com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e mantida a 37°C. Um eletrodo bipolar era colocado em torno do nervo frênico para a estimulação indireta com um estimulador Grass S48 (0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração e 3 V). Nos experimentos em que se procedeu à estimulação direta foram utilizados pulsos supramaximais (0,1 Hz, 2 ms e 80 V). As contrações musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de um transdutor isométrico Load Cell BG 50 GMS. A preparação foi mantida sob tensão de 2,5 g.

Experimentos destinados a escolher a dose ideal foram realizados, incubando-se a preparação (para experimentos com estimulação elétrica direta ou indireta) com o veneno de *M. d. carinicauda* nas doses de 2, 5, 10 e 20 µg/ml para a determinação do tempo para a instalação do bloqueio da transmissão neuromuscular. A dose de 5, 10 e 20 µg/ml foram a seguir escolhida para estudos posteriores.

Com o fim de se investigarem os mecanismos envolvendo os efeitos na neurotransmissão realizaram-se estudos com drogas como a neostigmina (Neo; 5,8 µM), 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP; 230 µM) e ainda, lavagens da preparação com solução nutritiva de Tyrode, na vigência do bloqueio neuromuscular, na tentativa de reverter o bloqueio produzido pelo veneno, nas doses de 5, 10 e 20 µg/ml.

Estudos foram realizados para avaliar se o veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml) estaria causando bloqueio das respostas contráteis evocadas pela ACh, em razão do bloqueio da transmissão neuromuscular ou pelo dano muscular. Para este estudo, a preparação era previamente incubada com α -bungarotoxina (α -BTx; 13 µM) ou curarizada (*d*-Tc; 15 µM) antes da adição do veneno.

Em todos os experimentos sob estimulação elétrica indireta, antes da adição do veneno ou das outras drogas utilizadas, procedeu-se à estabilização da preparação por 10 minutos.

3.3.2 - Preparação diafragma de rato cronicamente desnervado

A desnervação foi realizada segundo a técnica de VITAL BRAZIL (1965). Os animais, após anestesia com éter etílico, eram colocados em decúbito lateral direito, e era feita uma incisão de aproximadamente 0,5 cm, perpendicular à linha mediana, no terço inferior da região lateral do tórax esquerdo, previamente depilada. A incisão compreendia a pele e a camada muscular delgada que recobria esta região. Ao longo do espaço intercostal cortou-se então, com tesoura, os músculos intercostais. Com um bastão de vidro de extremidade recurvada, prendia-se o nervo que, tracionado para as bordas da incisão, era seccionado com tesoura. Em seguida, suturava-se apenas a pele por meio de um ou dois pontos, conforme a extensão da incisão. Decorridos 15 dias, montava-se a preparação com o hemidiafragma, segundo a técnica adotada para nervo frênico-diafragma de rato.

O diafragma cronicamente desnervado, era submetido a uma tensão constante de 2,5 g, através de um fio preso à sua porção tendinosa e ao transdutor isométrico Myograph F-60 (Narco Bio-Systems, Inc.), que era acoplado a um fisiógrafo Narcotrace 40 (Narco Bio-Systems, Inc.).

A resposta a contratura à ACh (15 μ M) era realizada antes da adição do veneno (condições controle) e após 90 minutos de incubação. Após cada adição de ACh (15 μ M), e observação da resposta contraturante do diafragma, procedeu-se à lavagem da preparação com solução de Tyrode (5 lavagens).

Em alguns experimentos, as preparações foram pré- tratadas com *d*-tubocurarina (*d*-Tc, 15 μ M). A preparação era incubada com *d*-Tc durante 30 minutos e, em seguida, fazia-se a adição de ACh (15 μ M). Por meio de sucessivas lavagens com solução de Tyrode (5 lavagens no período de 15 minutos), obtinha-se total reversão do bloqueio da resposta contraturante à ACh (15 μ M). Após proceder a este controle, a *d*-Tc (15 μ M) era novamente adicionada ao banho por 30 minutos e, em seguida, adicionava-se o veneno (5 μ g/ml), o qual era mantido em contato com a preparação por 90 minutos. Posteriormente, a mesma dose de ACh (15 μ M) era adicionada. A estimulação direta do músculo (estimulador Grass S 88; pulsos supramaximais de 2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência) era simultaneamente registrada em alguns experimentos.

Os resultados foram lançados em gráfico, onde cada ponto correspondia à porcentagem de resposta muscular evocada pela ACh, após a incubação com o

veneno, em relação à resposta evocada pela mesma dose de ACh, durante a condição controle (Tyrode) ou à pré-curarização.

3.3.3 - Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

A preparação foi montada de acordo com o método descrito por GINSBORG & WARRINER (1960). Os pintainhos foram anestesiados com éter etílico e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição mM: NaCl 136; KCl 5; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 11,9; glicose 11,2. A solução foi aerada com borbulhamento de carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida sob tensão de 0,5 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados pulsos supramaximais (estimulador Grass S88) com 7 V, 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração para a estimulação indireta, e 20V, 2 ms de duração para a estimulação direta.

As contrações musculares, resultantes de estímulos elétricos e as contraturas em resposta à adição de ACh (37 µM) ou KCl (134 µM), foram registradas em fisiógrafo Narcotrace 40 (Narco Bio-Systems, Inc.), por meio de um transdutor isométrico (Myograph F-60 - Narco Bio-Bystems, Inc.). O registro das contraturas evocadas pela adição de KCl (134 µM) e ACh (37 µM) foram realizados na ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição do veneno) e no final do experimento (após 90 min de incubação com o veneno).

A fim de investigar se o veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml) possuía atividade muscular, em preparação de ave, algumas preparações *biventer cervicis* foram pré-tratadas com a *d*-Tc (concentração de 30 µM) ou com α -bungarotoxina (concentração de 13 µM).

3.4 - Dose letal 50 (DL₅₀)

A dose letal mediana (DL₅₀) e os intervalos fiduciais de 95% do veneno de *M. d. carinicauda* foram determinados pelo método de WEIL (1952). Foram utilizadas quatro doses de veneno, em progressão geométrica, na razão de 1,25. Grupos de seis camundongos foram utilizados para cada dose. Administrou-se o veneno por via venosa (veia caudal), num volume de 0,5 ml. Os animais foram observados durante 24 horas.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

3.5 - Estudos eletrofisiológicos

Para o estudo do potencial de placa terminal em miniatura (pptom) e potencial de membrana, foram realizados experimentos utilizando a preparação nervo frênico-diafragma de rato. A preparação foi montada horizontalmente com a superfície torácica voltada para cima e fixada com alfinetes em cuba perspex "Dow Corning-Sylgard" (10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de altura) contendo 10 ml de solução de Tyrode (composição já descrita anteriormente) e borbulhada com carbogênio. Para a realização das observações

eletrofisiológicas, a cuba foi colocada na platina do microscópio, usando-se a técnica convencional de registros com microeletrodos de vidro (FATT & KATZ, 1951). Os microeletrodos (Me), após serem preparados no próprio laboratório, com o auxílio do “Microelectrode Puller”(modelo 8104, Palmer), e preenchidos com KCl 3M, tendo uma resistência entre 5-20 M Ω eram conservados em geladeira. Para sua confecção, utilizaram-se tubos de vidro apropriados (capilares de vidro Clark com microcapilar interno, para facilitar o preenchimento com KCl).

3.5.1 - Descrição do circuito

O Me era fixado, em sua extremidade posterior, a um suporte apropriado de acrílico. A fixação do Me, na parte ântero-inferior do suporte, era feita através de um tubo de aço inox com rosca externa e porca cônica de metal com orifício central suficiente para a introdução do Me, junto com um anel de vedação de polietileno. Na parte pósterio-inferior do suporte, sai um fio de platina que é unido a um seguidor catódico através de um fio condutor. A conexão entre o Me e o fio de platina era feita através de um vaso comunicante, preenchido com KCl (3 M). Na extremidade superior do suporte, os orifícios do vaso comunicante eram vedados por uma lamínula, mediante uma delgada camada de vaselina sólida. O suporte era fixado ao braço de um micromanipulador Jena (Alemanha) acoplado a um microscópio estereoscópico Zeiss para aumento de até 40 vezes. Este equipamento permitia realizar pequenos deslocamentos horizontais e verticais,

controlando a introdução do Me nas fibras musculares, para as medidas do potencial de repouso e captação dos pptm. O seguidor catódico estava posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectava-se ao canal do osciloscópio (Tektronix 5103N com módulo 5A 22N "Diferential Ampl" e 5B 12N "Dual Time Base"). O eletrodo indiferente constituiu-se de um fio de platina, incluído em tubo de vidro submerso em mercúrio vivo, onde colocou-se um tubo curvo (para adaptação à cuba) preenchido com ágar-salina. A preparação e toda a aparelhagem empregada permanecia no interior de uma gaiola de Faraday, montada sobre uma mesa rígida, fixada no solo a fim de evitar vibrações. O circuito descrito, apresenta-se no esquema a seguir.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



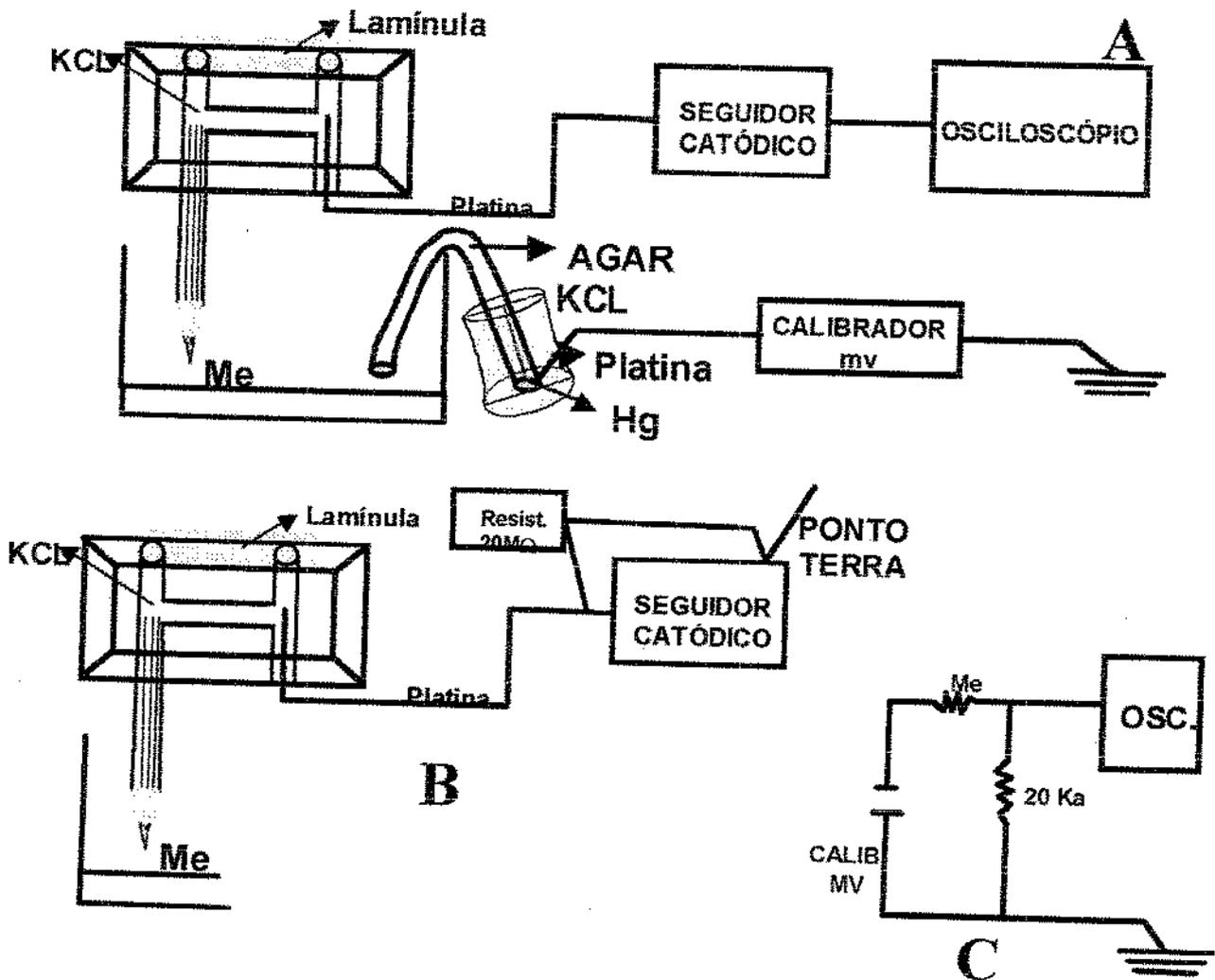


FIGURA 2 - Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de repouso e de placa terminal em miniatura

A - Circuito simplificado

B - Circuito simplificado para obtenção de resistência do Me

C - Circuito para medida da resistência do Me

3.5.2 - Medida da resistência do microeletrodo

Após a retirada do seu suporte de estocagem, o Me era encaixado no suporte. Fixava-se o conjunto no braço do micromanipulador, ligando-se o fio condutor ao seguidor catódico.

Procedia-se à medida da resistência do Me, mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo, em paralelo, no circuito, uma resistência de valor conhecido (20 M Ω). Eram desprezados aqueles Me cuja resistência não estava compreendida entre 5 e 20 M Ω .

3.5.3 - Potencial de membrana (PM)

Para a determinação do potencial de membrana das fibras musculares, os Me eram inseridos intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais, com o auxílio do microscópio e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. Repetia-se o mesmo procedimento em cinco fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média aritmética e o erro-padrão das leituras realizadas. Determinava-se o potencial de membrana, multiplicando-se o valor da média por um fator de correção (fc). Este era estabelecido, aplicando-se ao circuito um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio (fc=100/deflexão correspondente).

Nas experiências realizadas para avaliar o efeito do veneno de *M. d. carinicauda* sobre o potencial de membrana, utilizou-se a dose de 5 μ g/ml.

Os estudos dos efeitos do veneno de *M. d. carinicauda* sobre o potencial de repouso foram realizados antes (controle), 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após a adição do veneno, e os valores obtidos foram comparados com aqueles obtidos do controle. A medida do potencial de repouso foi feita em 5 regiões distintas das fibras musculares, nos diferentes momentos da leitura do experimento.

3.5.4 - Potencial de placa terminal em miniatura (pptm)

Para captação dos pptm, o Me era implantado junto ou o mais próximo possível, da região da placa terminal motora. Os pptm foram captados e registrados em osciloscópio (sensibilidade 1mV/cm).

Os pptm foram registrados antes (controle), 30, 60 e 90 minutos após a adição do veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml). Na tentativa de reversão do bloqueio produzido pelo veneno, o registros dos pptm foram realizados incubando-se a preparação com Neo (5,8 µM) ou 3,4-DAP (230 µM) após o bloqueio dos mesmos. Os pptm foram fotografados em filme "Polaroid" por meio de uma 'câmara osciloscope' modelo C-5A.

3.6 - Estudos morfológicos

3.6.1 - Microscopia de luz

Para este estudos utilizaram-se as preparações nervo frênico-diafragma de rato (montada segundo a técnica de BÜLBRING (1946), e músculo *biventer cervicis* de pintainho (segundo a técnica de GINSBORG & WARRINER, 1960).

Na preparação nervo frênico-diafragma de rato utilizaram-se as doses de 5, 10 e 20 µg/ml e para a preparação *biventer cervicis* de pintainho utilizou-se a dose de 5 µg/ml. Para cada uma das preparações acima citadas foram realizados 3 protocolos distintos: 1) incubação da preparação com as diferentes doses do veneno de *M.d. carinicauda* sob estimulação indireta, por 90 minutos; 2) incubação da preparação com Tyrode, sob estimulação indireta por 90 minutos e 3) a preparação não foi nem estimulada indiretamente e nem incubada com o veneno de *M. d. carinicauda*.

Logo após os períodos de incubação, as preparações foram presas com alfinetes, em placa de Petri, preenchida com cera utilidade (uso odontológico) e, rapidamente, submetidas à fixação com solução Bouin e cortadas em pequenos fragmentos (1mm por 2 mm). As amostras de músculo foram seccionadas na proximidade do curso do nervo frênico a fim de se obterem locais com junções neuromusculares. Os fragmentos permaneciam na solução fixadora Bouin, por 24 horas.

Após a fixação, os fragmentos foram lavados 3 vezes com uma solução de água e amônia e então, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e três vezes em etanol 100%) por 30 minutos cada série. Após a desidratação, os fragmentos eram embebidos em historesina (Embedding Kit-Leica Instruments).

Cortes de 2 μm foram obtidos em micrótomo Leica RM 2035 (Leica, Vienna, Austria) e corados com Azul de metileno em bórax 0,5% para análise em microscópio de luz (Carl Zeiss). As fotomicrografias foram obtidas, usando-se um microscópio de luz Nikon Optiphot (Nippon Kogaku K K, Tokio, Japão).

3.6.2 - Microscopia eletrônica de transmissão

Terminados os experimentos com a preparação nervo frênico-diafragma de rato (item 3.6.1), o músculo foi dividido em fragmentos de aproximadamente 1mm de lado (face), que foram imersos rapidamente em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) por aproximadamente 24 horas. Após este período, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, pós-fixados com solução de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas em temperatura ambiente e novamente lavados 3 vezes com tampão fosfato 0,1 M. Após, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, uma vez de 15 minutos cada e 3 vezes de 10 minutos em acetona 100%), embebidas em uma mistura de acetona-resina Epon na proporção

1:1, durante 24 horas (em rotor) e, finalmente, em resina pura, por 48 horas. A inclusão foi em resina Epon e a polimerização conduzida à 60°C, por 48 horas.

Cortes semi-finos (1µm de espessura) foram obtidos em ultramicrotomo Leica UCT, em navalhas de vidro e corados em solução bórica de Azul de metileno 0,5% para definição da área de interesse.

Os cortes ultrafinos (60 - 70 nm de espessura) foram obtidos com navalha de diamante, coletados em telas de cobre (200 “mesh”) e contrastados com acetato de uranila a 2%, durante 20 minutos, e citrato de chumbo a 0,5%, durante 8 minutos.

As observações e os registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de transmissão Leo 906 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.7 - Análise Estatística

A significância para as diferenças observadas foi determinada pelo teste "t" de Student, com o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressados como a média±erro-padrão ($\Sigma \pm e.p.$).

4 - RESULTADOS

4.1 - Estudos miográficos

4.1.1 - Preparação nervo frênico-diafragma de rato

4.1.1.1 - Estimulação elétrica indireta

Nos experimentos controles, com a preparação imersa em solução de Tyrode, não houve alteração significativa nas respostas contráteis, no período de 90 min. Entretanto, o veneno (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) levou à inibição da resposta contrátil evocada pela estimulação elétrica do nervo, após estimulação elétrica indireta. Em todos os experimentos, após um período de latência de duração variável, em função da concentração do veneno no meio, a resposta contrátil declinava gradualmente, sem que houvesse aumento da amplitude das contrações, contraturas, fasciculações ou outros fenômenos intercorrentes. Observou-se que o tempo de bloqueio da resposta contrátil do músculo foi dose-dependente. Os tempos para levar ao bloqueio foram: $291,75 \pm 7,32$ min; $108,25 \pm 13,82$ min e $57,50 \pm 3,0$ min, respectivamente para 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ de veneno.

A dose de 2 $\mu\text{g/ml}$ não causou alterações na resposta contrátil ($4,0 \pm 1,44\%$ de bloqueio neuromuscular) ao final de $240 \pm 6,52$ min.

Vários tratamentos foram efetuados na tentativa de reverter o bloqueio da resposta contrátil, induzido pelo veneno de *M. d. carinicauda*.

A Neo (5,8 μM) foi adicionada em 3 experimentos, quando a resposta contrátil encontrava-se reduzida em torno de 85% em relação ao controle ($84,55 \pm 1,44\%$ para 5 $\mu\text{g/ml}$; $85,66 \pm 4,35\%$ para 10 $\mu\text{g/ml}$ e $89,44 \pm 1,81\%$ para

20 µg/ml). Observou-se que a Neo é capaz de reverter, parcialmente, o bloqueio produzido pelo veneno, tanto na dose de 5 µg/ml ($83,33 \pm 5,41\%$) (n=3; Fig. 3), 10 µg/ml (dado não ilustrado) quanto na dose de 20 µg/ml ($71,56 \pm 2,29\%$) (n=3; Fig. 4).

A adição de 3,4-DAP (230 µM) em 3 experimentos, nas condições citadas anteriormente, foi capaz de reverter parcialmente o bloqueio produzido pelo veneno de *M. d. carinicauda* na dose de 5 µg/ml ($77,78 \pm 7,64\%$) (Fig. 5), 10 µg/ml ($66,67 \pm 3,22\%$) e 20 µg/ml ($68,89 \pm 10,57\%$) (dados não ilustrados). Resultado semelhante foi observado com a adição de Neo.

As preparações (n=3), após a instalação do bloqueio de 85%, com as doses de 5 µg/ml (Fig. 6) e 20 µg/ml (não ilustrado), sofreram repetidas lavagens (n=5) a cada 15 min com Tyrode (n=10), e estas foram ineficazes na tentativa de reversão do bloqueio.

Mesmo após o bloqueio produzido pelo veneno de *M. d. carinicauda*, nas doses de 5 µg/ml, 10 µg/ml (não ilustrado) e 20 µg/ml, as respostas das contrações musculares à estimulação elétrica direta não sofreram alterações.

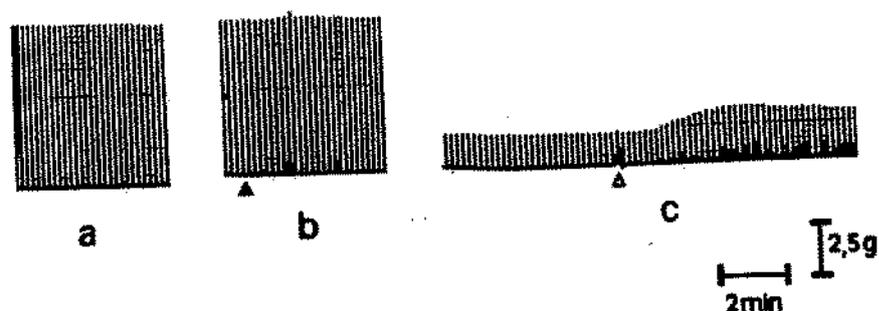


FIGURA 3 - Efeito do veneno de *M. d. carinicauda* sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta (n=3). O bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno, nesta preparação, é parcialmente revertido pela Neo.

a - Controle (10 min).

b - (▲) Adição do veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml).

c - (▲) Adição de Neo (5,8 µM), após bloqueio neuromuscular de 85% (291,75±7,32 min da adição do veneno).

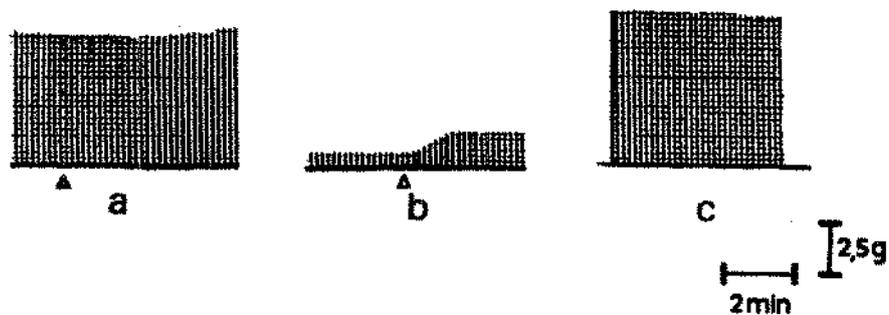


FIGURA 4 - Efeito da Neo sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de *M. d. carinicauda* (20 $\mu\text{g/ml}$), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta (n=3).

a - Controle (10 min) e (\blacktriangle) adição do veneno de *M. d. carinicauda* (20 $\mu\text{g/ml}$).

b- (\triangle) Adição de Neo (5,8 μM), após bloqueio neuromuscular (57,50 \pm 3,0 min da adição do veneno).

c- Estimulação elétrica direta, após 10 min de b.

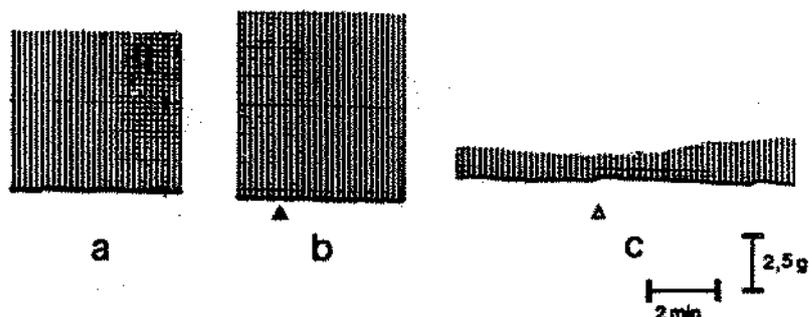


FIGURA 5 - Efeito do veneno de *M. d. carinicauda* sobre a amplitude das respostas musculares, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta. O bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno, nesta preparação, é parcialmente revertido pela 3,4-DAP.

a - Controle (10 min)

b - (▲) Adição do veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml)

c - (Δ) Adição de 3,4-DAP (230 µM), após bloqueio neuromuscular (291,75±7,32 min da adição do veneno).

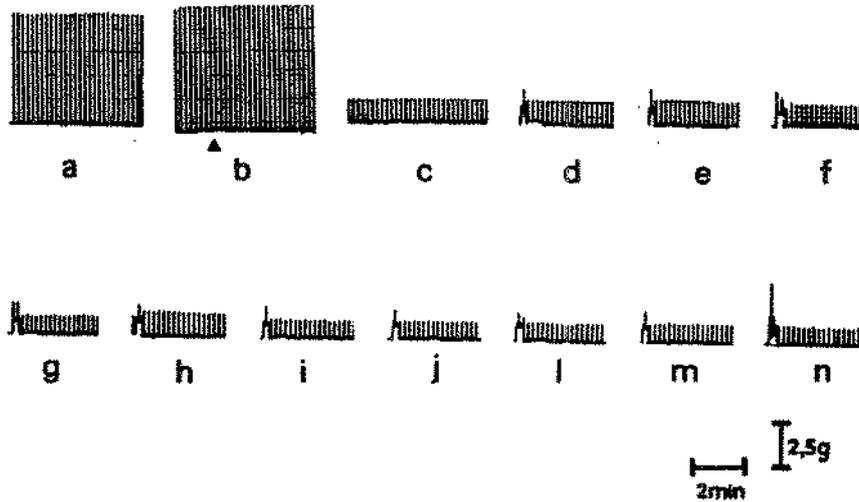


FIGURA 6 - Efeito das lavagens sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de *M. d. carinicauda*, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

a - Controle (10 min)

b - (▲) Adição do veneno de *M. d. carinicauda* (5 $\mu\text{g/ml}$)

c - Bloqueio neuromuscular após (291,75 \pm 7,32 min da adição do veneno).

d, e, f, g, h, i, j, l, m, n - Lavagens da preparação com Tyrode, a cada 15 min (cada letra corresponde a 5 lavagens da preparação).

4.1.1.2 - Estimulação elétrica direta

Foram também realizados experimentos, utilizando-se o pré-tratamento com *d*-Tc (15 μ M; n=3; Fig.7), e com α -bungarotoxina (13 μ M; n=3; Fig.8). Para ambos os tratamentos, as doses das drogas, acima citadas, foram suficientes para bloquear as respostas à estimulação elétrica indireta. Após este bloqueio, as preparações eram estimuladas diretamente (por 10 min) e, a estas preparações, adicionava-se o veneno de *M. d. carinicauda* (5 μ g/ml) que permanecia incubado por 90 minutos. O veneno não causou alteração na amplitude da resposta contrátil evocada pela estimulação elétrica direta. Com ambas as drogas utilizadas no pré-tratamento, obtivemos resultados similares, em que as respostas contráteis à estimulação elétrica direta não sofreram alterações.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

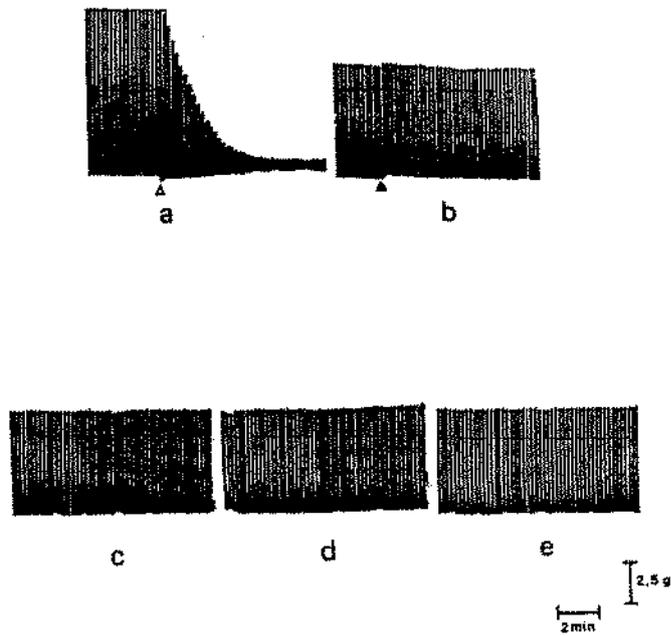


FIGURA 7 - Efeito do veneno de *M. d. carinicauda* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizada (*d*-Tc; 15 μ M).

a - Estimulação elétrica indireta (10 min) e (Δ) adição de *d*-Tc.

b - Estimulação elétrica direta (10 min) e (\blacktriangle) adição do veneno (5 μ g/ml).

c, d, e - 30, 60 e 90 min da adição do veneno, respectivamente.

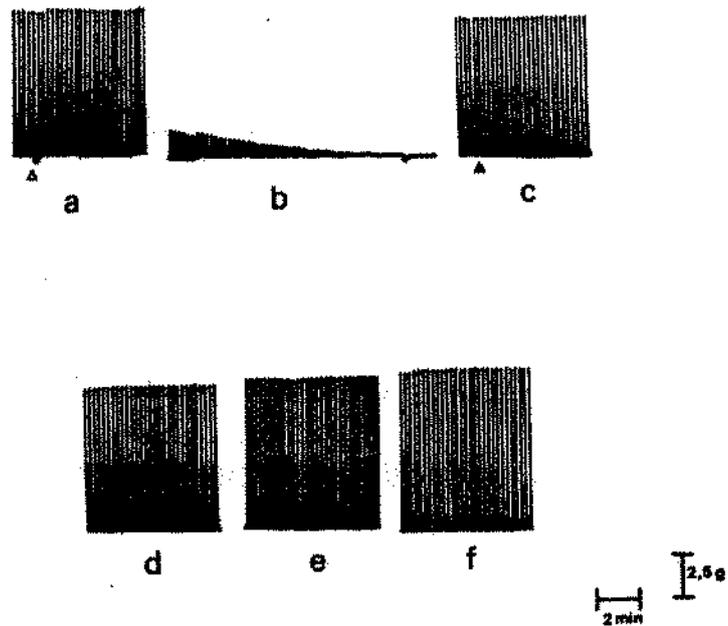


FIGURA 8 - Efeito do veneno de *M. d. carinicauda* sobre a preparação nervo frênico-diafragma de rato, previamente bloqueada com α -bungarotoxina (α -BTx; 13 μ M).

a - Estimulação elétrica indireta (10 min) e (Δ) adição de α -BTx.

b - Bloqueio neuromuscular.

c - Estimulação elétrica direta (10 min) e (\blacktriangle) adição do veneno (5 μ g/ml).

d, e, f - 30, 60 e 90 min da adição do veneno, respectivamente.

4.2 - Preparação diafragma de rato cronicamente desnervado

Nos diafragmas cronicamente desnervados observou-se que, em condições controle, a resposta muscular máxima foi obtida com a concentração de 15 μ M de ACh. Houve, no entanto, bloqueio total da resposta contraturante induzida pela ACh, após incubação por 90 min com o veneno *M. d. carinicauda* (5 μ g/ml; n=5). O bloqueio foi parcialmente revertido ($34,67 \pm 7,86\%$), após sucessivas lavagens com Tyrode, sugerindo que o veneno atua nos receptores colinérgicos pós-sinápticos de maneira competitiva e parcialmente reversível (Fig. 9).

Nos experimentos em que foram realizados o pré-tratamento com a *d*-Tc (15 μ M; n=5), observou-se que, após 90 minutos de incubação com o veneno *M. d. carinicauda* (5 μ g/ml), as respostas contraturais à ACh foram parcialmente revertidas ($56,34 \pm 7,69\%$). Resultados estes, que demonstram que a *d*-Tc é capaz de promover proteção parcial dos receptores colinérgicos pós-sinápticos à contratura evocada pela ACh (15 μ M), após 90 minutos de incubação com o veneno de *M. d. carinicauda* (5 μ g/ml) (Fig. 9).

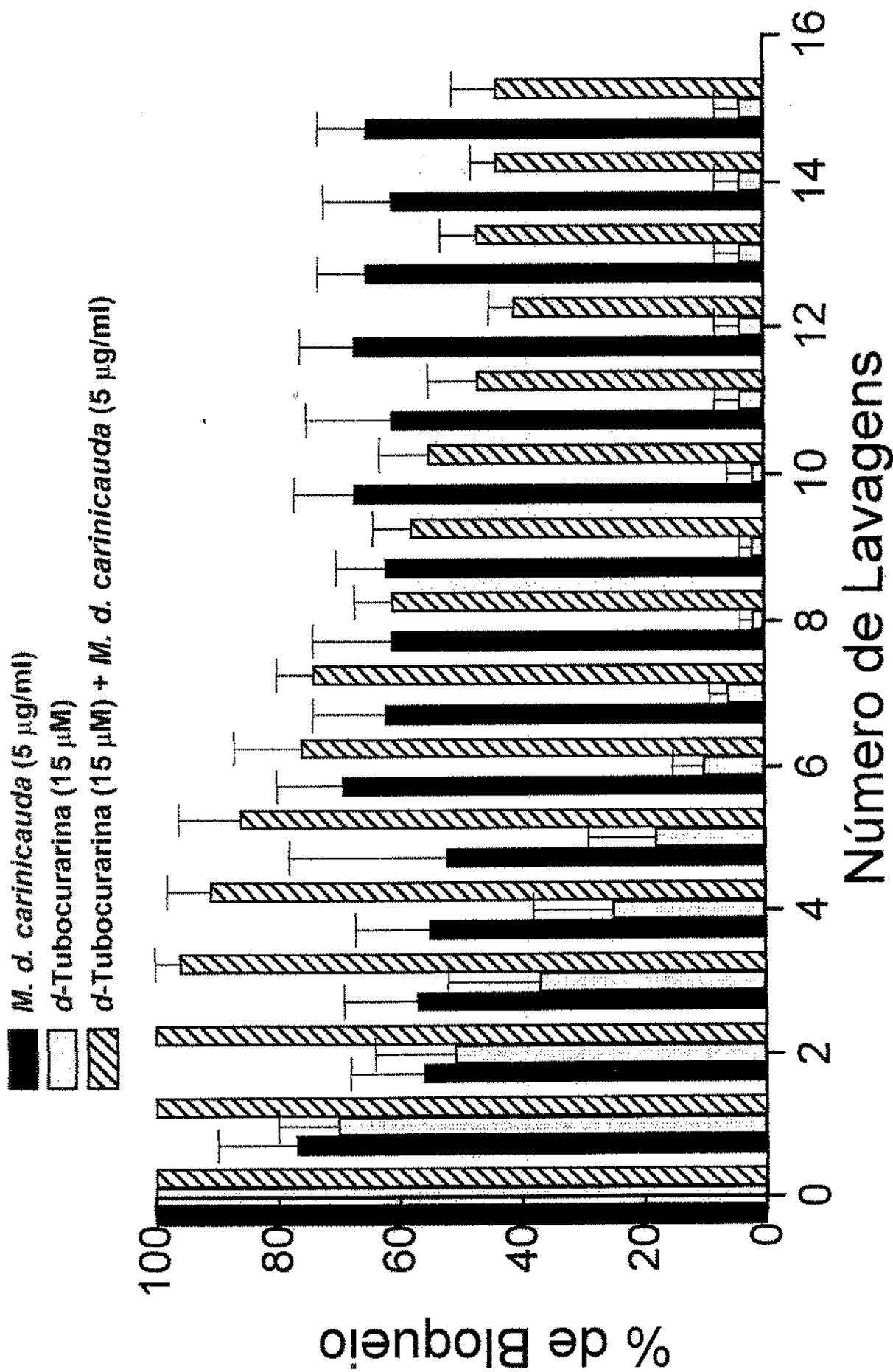


FIGURA 9 - Efeito do veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml) sobre a preparação diafragma cronicamente desnervado de rato. Este gráfico demonstra que a *d-Tc* (15 µM) promove proteção parcial à contaminação crônica pela *ACh* (15 µM) após a incubação do veneno

4.3 - Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

4.3.1 - Estimulação elétrica indireta

O veneno *M. d. carinicauda*, na dose de 5 µg/ml, causou bloqueio da transmissão neuromuscular na preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho. Após o bloqueio da resposta contrátil ($95,0 \pm 2,0$ min), evocada pela estimulação indireta, o veneno induziu bloqueio total da contração à ACh (37 µM). Porém o mesmo não ocorreu com a resposta contraturante evocada pelo KCl (134 µM), em que não houve alteração da resposta muscular (Fig. 10), sugerindo que o veneno pode estar atuando nos receptores colinérgicos nicotínicos e que não atua sobre a fibra muscular.

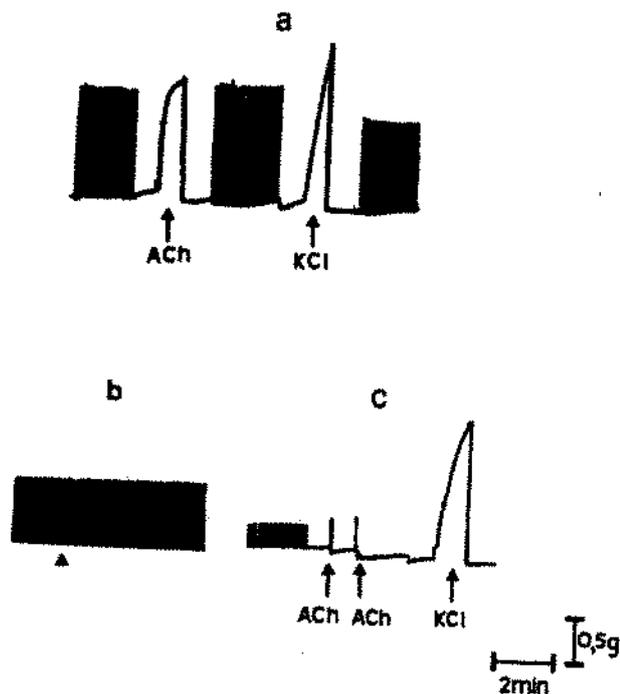


FIGURA 10 - Efeito da ACh ($37 \mu\text{M}$) e KCl ($134 \mu\text{M}$) na preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição do veneno de *M. d. carinicauda* ($5 \mu\text{g/ml}$).

a - Controle - Estimulação elétrica indireta e adição de ACh e KCl.

b - (▲) Adição do veneno.

c - Adição da ACh e KCl, após o bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno.

4.3.2 - Estimulação elétrica direta

Experimentos foram realizados, utilizando-se o pré-tratamento das preparações com *d*-Tc (30 μ M; n=5; Fig.11), ou com α -BTx (13 μ M; n=4; Fig. 12).

Para ambos os procedimentos, as doses, das drogas acima citadas, foram suficientes para bloquear as respostas contráteis à estimulação elétrica indireta. Após este bloqueio, produzido tanto pela *d*-Tc como pela α -BTx, as preparações foram estimuladas diretamente e, a estas preparações, adicionava-se o veneno de *M. d. carinicauda* (5 μ g/ml) que permanecia incubado por 90 minutos. O veneno não causou alterações nas respostas contráteis evocadas pela estimulação elétrica direta. Este resultado sugere que o veneno não possui ação direta sobre a fibra muscular.

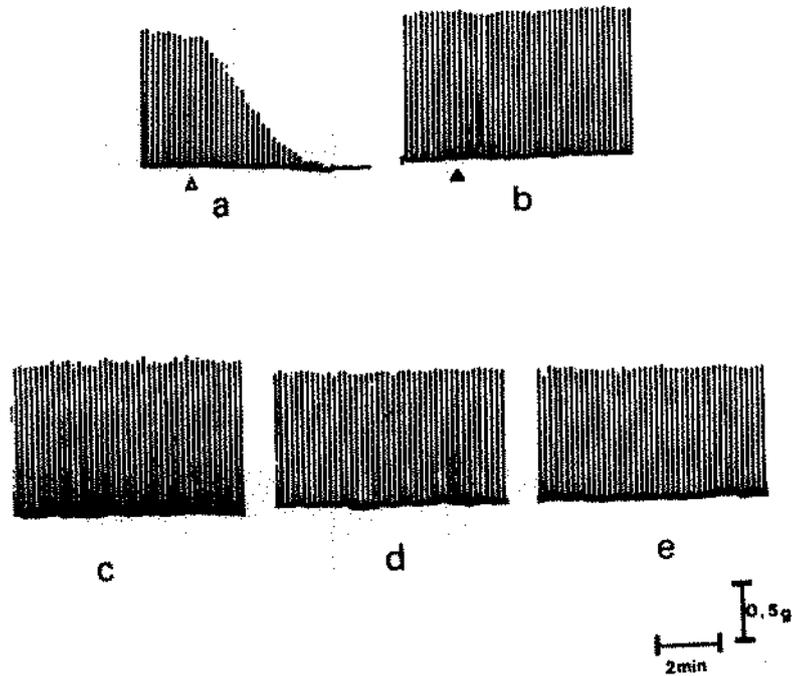


FIGURA 11 - Efeito do veneno de *M. d. carinicauda* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho curarizada (*d*-Tc; 30 μ M).

a - Estimulação elétrica indireta (10 min) e (Δ) adição de *d*-Tc.

b - Estimulação elétrica direta (10 min) e (\blacktriangle) adição do veneno (5 μ g/ml).

c, d, e - 30, 60 e 90 min da adição do veneno, respectivamente.

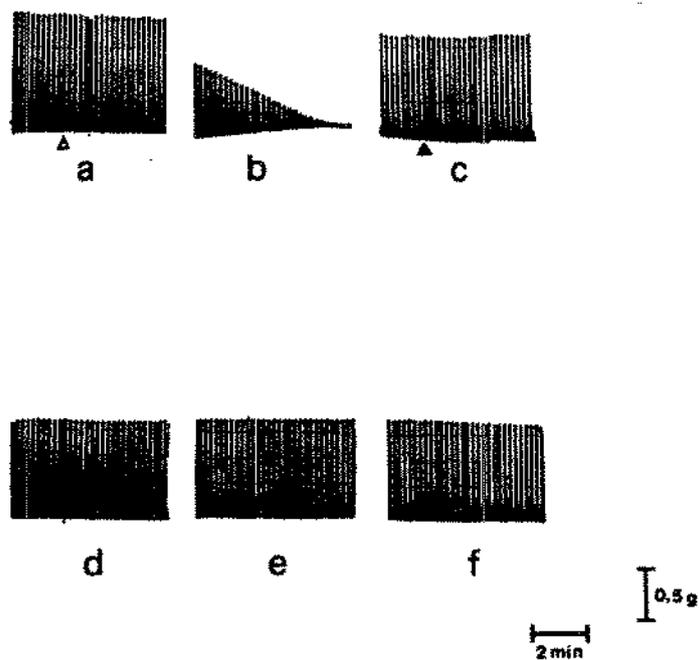


FIGURA 12 - Efeito do veneno de *M. d. carinicauda* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho, previamente bloqueada com α -bungarotoxina (α -BTx; 13 μ M).

a - Estimulação elétrica indireta (10 min) e (Δ) adição de α -BTx.

b - Bloqueio neuromuscular.

c - Estimulação elétrica direta (10 min) e (\blacktriangle) adição do veneno (5 μ g/ml).

d, e, f - 30, 60 e 90 min da adição do veneno, respectivamente.

4.4 - Dose letal 50 (DL₅₀)

Na avaliação da dose mediana letal (DL₅₀) em camundongos, o veneno de *M. d. carinicauda* produziu o seguinte resultado: 0,764 mg/Kg (0,511 mg/Kg a 1,141 mg/Kg). Os cálculos foram realizados através do método de WEIL (1952).

4.5 - Estudos eletrofisiológicos

4.5.1 - Potencial de membrana

O veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml) não causou alterações significativas ($p < 0,05$ – teste *t-Student*) nas medidas do potencial de membrana ($n=3$), demonstrando que este veneno não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular (Fig.13).

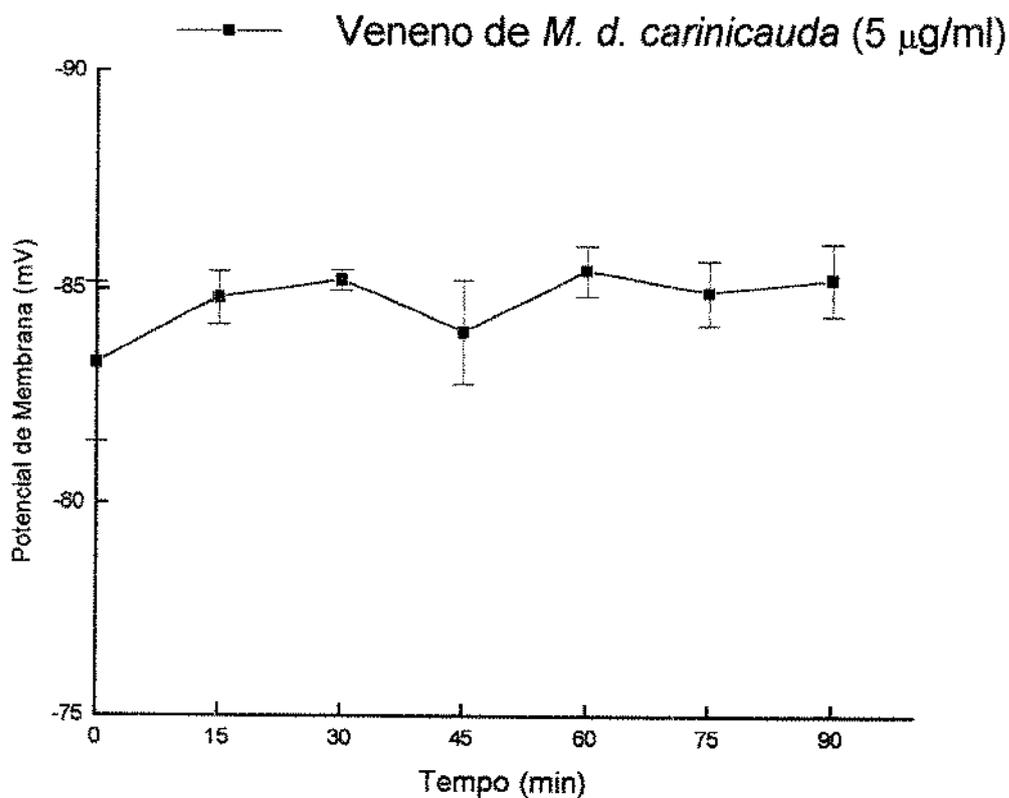


FIGURA 13 - Efeitos do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* (5 µg/ml) sobre o potencial de membrana, nas fibras musculares do diafragma de rato. O potencial de membrana foi determinado como foi descrito no texto. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão de três experimentos.

4.5.2 - Potencial da placa terminal em miniatura

A ação do veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml; n=6) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (pptm), caracterizou-se, em geral, por diminuição progressiva das amplitudes e freqüência destes potenciais, até o bloqueio total. Em 3 experimentos, antes da adição do veneno, determinou-se o valor-controle da freqüência dos pptm (69,33±5,04). Após o bloqueio dos pptm pela adição do veneno, as preparações foram tratadas com a Neo (5,8 µM). Esta droga foi capaz de reverter totalmente o bloqueio neuromuscular que levou à diminuição da freqüência e amplitude dos pptm (92,33±10,35). O mesmo também foi observado quando se usou a 3,4-DAP. Em outros 3 experimentos (freqüência-controle 77,66±5,36), a 3,4-DAP (230 µM), adicionada após o bloqueio dos pptm também reverteu o bloqueio da freqüência desses micropotenciais (76,33±9,46) (Fig.14). Após 5 minutos da adição das drogas acima citadas, já foi possível observar esta reversão. Este resultado demonstra que a ação preponderante do veneno dá-se em razão da atuação sobre os receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos.

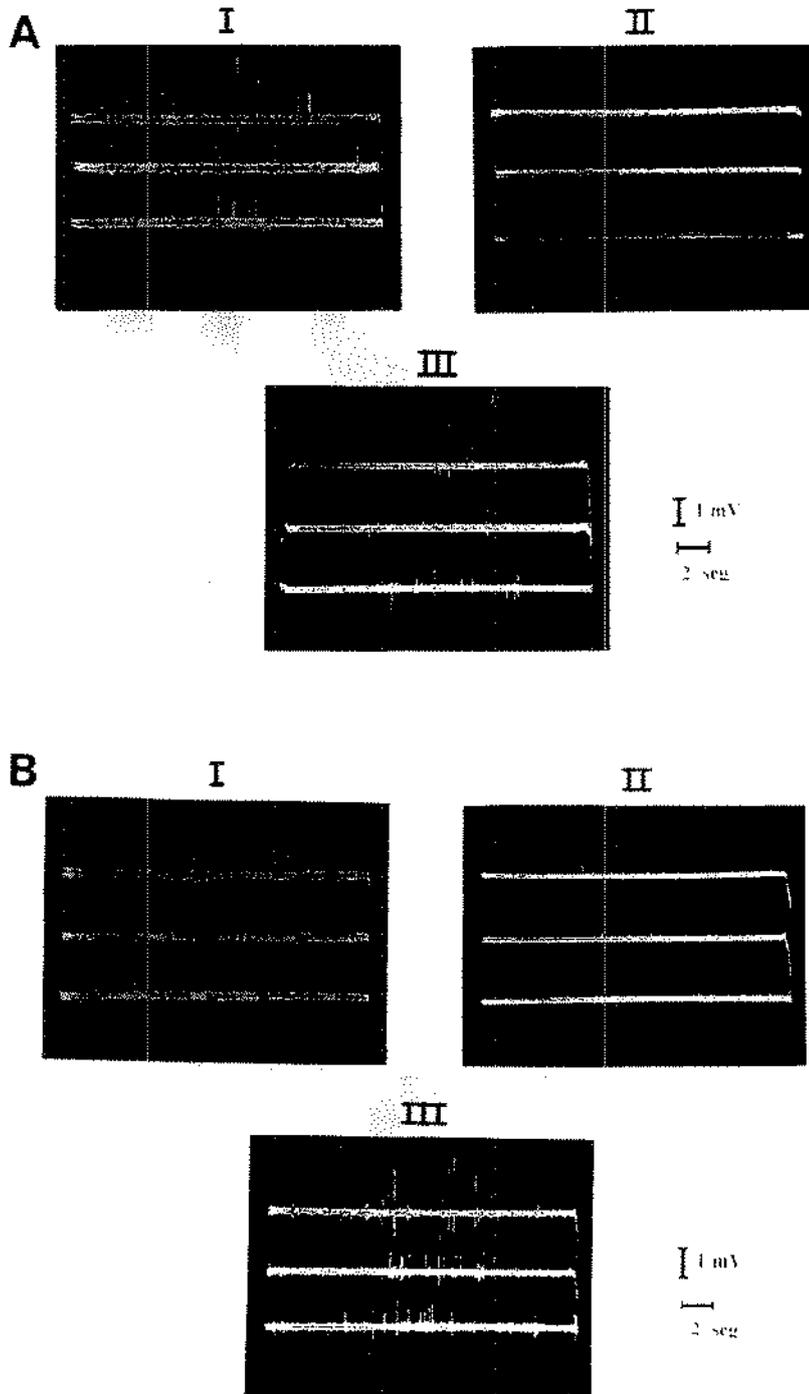


FIGURA 14 - Efeitos do veneno de *M. d. carinicauda* (5 $\mu\text{g/ml}$) sobre os ptpm, no diafragma de rato. Efeito antagônico da Neo e 3,4-DAP.

A. I. Controle; II. Bloqueio após 90 min da adição do veneno; III. 5 min após a adição de Neo (5,8 μM). B. I. Controle; II. Bloqueio após 90 min da adição do veneno; III. 5 min após a adição de 3,4-DAP (230 μM).

4.6 - Estudos morfológicos

4.6.1 - Microscopia de luz

O músculo diafragma de rato no controle (Fig. 15A e B) e após 90 min de incubação com solução de Tyrode, sob estimulação elétrica indireta (sem fotodocumentação), apresentava-se normal.

Em secções longitudinais de hemidiafragma, incubado com solução de Tyrode, as estriações das fibras estavam bem definidas (Fig. 15 A) e nas secções transversais os fascículos organizados por fibras musculares com perfil poligonal (Fig. 15 B) estavam normais. Ao contrário, os músculos diafragmas de rato, incubados com o veneno de *M. d. carinicauda* mostraram alterações estruturais nas fibras, cuja relação entre intensidade e concentração de veneno, pareceu ser dose-dependente. O veneno, na dose de 5 µg/ml, produziu microvacúolos nas fibras musculares (Fig. 16 A, B); nas secções longitudinais podia haver contração (ondulação) e, com 10 µg/ml, zonas localizadas de hipercontração, com aumento local do diâmetro da fibra (Fig. 16 C). Em secções longitudinais, a dose de 10µg/ml de veneno produziu fibras musculares com áreas hipercontraídas alternadas com áreas vazias do citoplasma (Fig. 16 D), na mesma fibra muscular. Estas alterações foram mais severas com a dose de 20 µg/ml do veneno, mostrando que tanto a aglutinação como a desintegração das fibras musculares, produziam uma aparência 'rendada' na fibra (Fig. 16 E). Muitas das células

permaneciam, entretanto, normais, sendo mais frequente essa condição nas concentrações mais baixas de veneno.

Os músculos controles do *biventer cervicis* de pintainho mostravam a organização estrutural dos fascículos musculares, mostrando tanto em secções transversal (Fig. 17 A) e longitudinal (Fig. 17 B) aspecto normal, com núcleos bem distribuídos e estriações transversais visíveis.

Entretanto, os músculos *biventer cervicis* incubados com 5 µg/ml do veneno de *M. d. carinicauda* e estimulados indiretamente, por 90 min, ou incubados sem estimulação, apresentaram grupos de fibras musculares com hipercontração e desorganização linear na disposição dos fascículos musculares (Fig. 17 C e 17 D). Muitas fibras, entretanto, tinham aparência íntegra.

4.6.2 - Microscopia eletrônica de transmissão

A organização estrutural das fibras musculares dos hemidiafragmas controles 0 h (n=5) e incubados com solução de Tyrode, por 90 min, sob estimulação elétrica indireta (n=5) quer em secções longitudinal, como em transversal mostraram-se normais. As miofibrilas apresentavam sarcômeros alinhados, cada qual limitada por retículo sarcoplasmático e mitocôndrias intactas (Figs. 18A - D).

A incubação do hemidiafragma com o veneno de *M. d. carinicauda* induziu mudanças morfológicas com padrões de alteração mionecrótica, em muitas células, compatível com a dose utilizada no processo necrótico (Figs. 19, 20 e 21).

Nos músculos incubados com 5 µg/ml do veneno algumas fibras mostraram miofibrilas espaçadas e aumento do da banda I e desaparecimento da banda H (Fig. 19 A), outras apresentavam difícil demarcação dos sarcômeros (Fig. 19 B), e outras apresentavam o retículo sarcoplasmático desorganizado e mitocôndrias eletrodensas ou estouradas (Figs. 19 B, C, D). Além disso, massas amorfas condensadas, onde os miofilamentos ficavam indistinguíveis, intercalavam-se com restos de organelas (Figs. 19 C, D). Ocasionalmente, com esta dose foi observada a ruptura do sarcolema e nessa situação as alterações eram mais marcantes ocasionadas por desintegração das organelas e miofilamentos (Figs. 20 A, B, C). Entretanto, um contingente apreciável de fibras musculares não apresentavam alterações.

Nos músculos incubados com 10 µg/ml do veneno de *M. d. carinicauda* as alterações foram muitas por conta da perda da integridade do sarcolema (Fig. 21). Áreas de hipercontração foram observadas, além de dispersão das miofibrilas e distorção dos sarcômeros, e áreas hipercontraídas alternadas com áreas vazias (Figs. 21 C, D), bem como a ruptura do sarcolema (Fig. 21 B). De novo, embora em número menor do que com a dose de 5 µg/ml, muitas células tinham aparência normal.

Com relação às fibras nervosas pertencentes aos ramos do nervo frênico, nas preparações-controle apresentavam-se sem anormalidades tanto no axônio como na bainha de mielina. Estes apresentavam os neurofilamentos e as mitocôndrias bem distribuídas no axoplasma, com a bainha de mielina compacta (Figs. 22 A, B).

Nas preparações incubadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ do veneno alguns axônios, apresentavam entre o axolema e a bainha de mielina, ou entre a bainha e a célula de Schwann, muitas vesículas resultantes do enrolamento de fragmentos de membranas desses componentes (Fig. 22 C).

Nas preparações incubadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ ou 10 $\mu\text{g/ml}$, os axônios afetados apresentaram retração do axoplasma associado, em alguns casos, com alterações mitocondriais (Figs.22 C, D).

A célula de Schwann mostrou-se normal no controle (Fig.23), mas, em preparações incubadas com 10 $\mu\text{g/ml}$, mostrou sinais de degeneração, incluindo dilatação do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 27 A).

Nas preparações-controle, a ultra-estrutura da junção neuromuscular era semelhante às observadas em camundongos e outros mamíferos, mostrando-se normal (Fig. 23). A região pós-sináptica mostrou dobras sinápticas com aparência normal e contendo muitas mitocôndrias e núcleos da placa (Fig. 23).

Entretanto, com as doses de 5 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ do veneno, as junções neuromusculares apresentaram alterações morfológicas relacionadas com

alterações na distribuição das vesículas sinápticas dentro do terminal (Fig. 24 a 26), bem como a presença de mitocôndrias degeneradas, rompidas e/ou eletro-lucentes (Fig. 24 a 27) e indentações no axolema (Fig. 24 B e 26 C). Uns poucos vacúolos eletro-lucentes e grandes vesículas maiores que as vesículas sinápticas puderam ser encontradas no axoplasma (Fig. 25 A).

Em algumas junções neuromusculares, o terminal axônico mostrou-se bipartido e, nesses casos, havia invaginação da célula de Schwann (Fig. 25 B e 26 B) entre as duas partes.

Na dose de 10 µg/ml do veneno, alguns terminais nervosos apresentaram-se necróticos, sendo apenas reconhecidos pela localização dos elementos pós-sinápticos (Fig. 27 B).

Com 10 µg/ml do veneno, alguns terminais aparecem diminuídos no tamanho, algumas vezes contendo células de Schwann interpostas com o terminal. Algumas junções apresentam o terminal diminuído ou degenerado (Fig. 27 A, B). A região das dobras pós-sinápticas ora podiam estar alargadas ora pobremente desenvolvidas (Fig. 25 A). A lâmina basal apresentou-se bipartida (Fig. 26 A).

As alterações exibidas pelas junções neuromusculares não eram uniformes, podendo umas estarem mais afetadas que outras.

FIGURA 15 – Hemidiafragma

de rato controle

A e B - Secções longitudinal e transversal, respectivamente. Observe que as fibras musculares longitudinais apresentam estriações transversais e núcleos periféricos e, em secção transversal apresentam forma poligonal, como é usual. **A** =275×; **B**=300×.

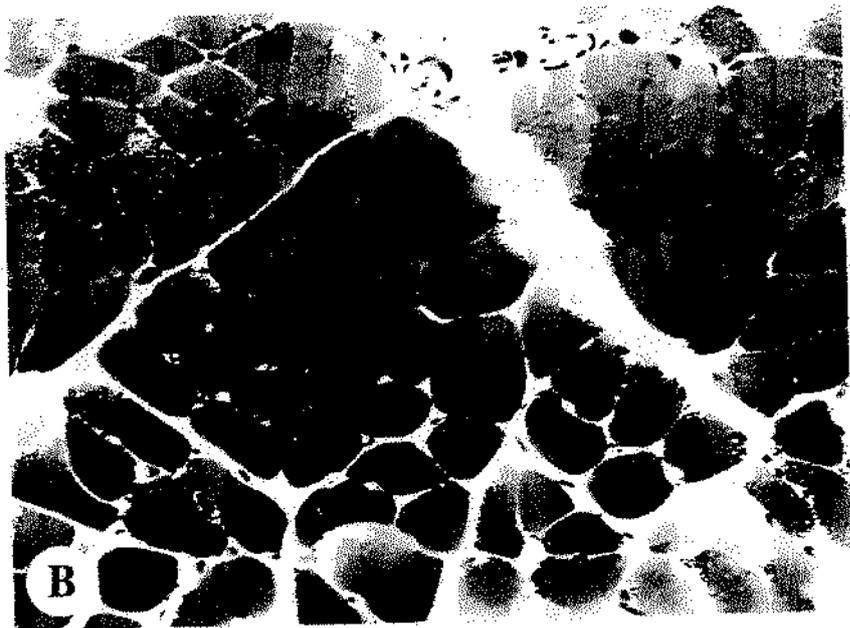
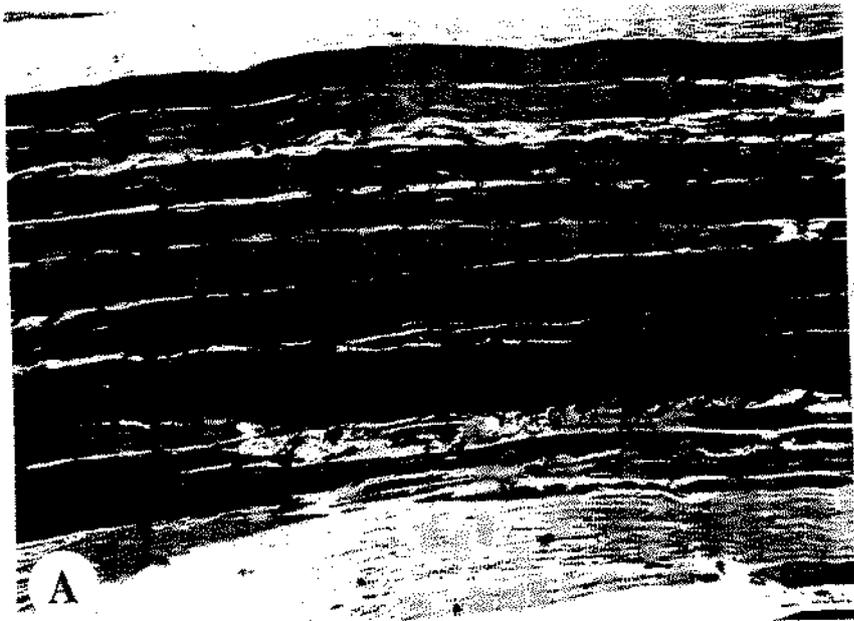
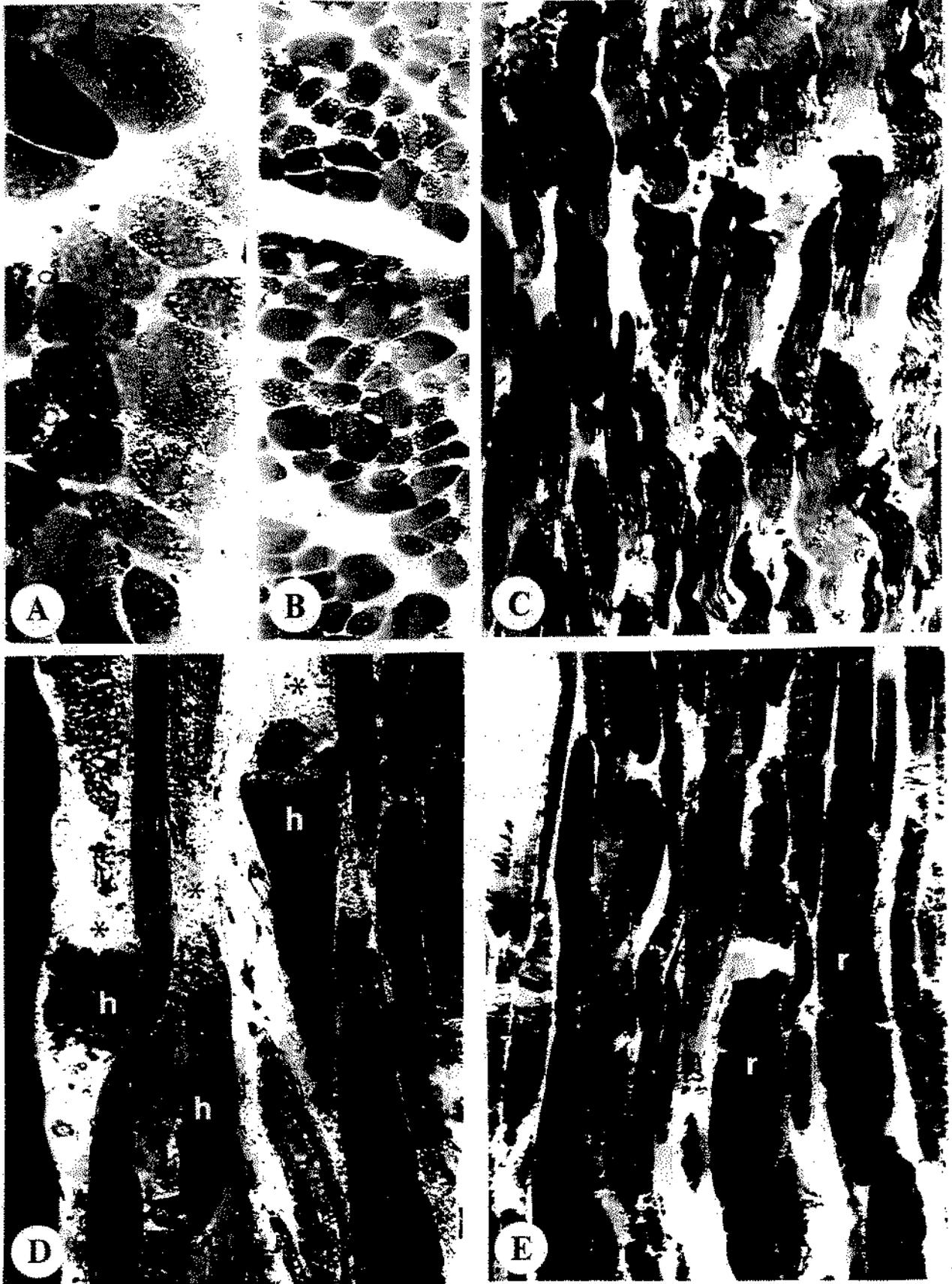


FIGURA 16 – Alterações morfológicas causadas na preparação diafragma de rato, incubada com o veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* (M.d.c.) – 5, 10 e 20µg/ml por 90 min.

A, B e C - 5 µg/ml; D - 10 µg/ml e E - 20 µg/ml.

Em **A e B**, secções transversais, mostrando células musculares com forma normal (poligonal), mas apresentando microvacúolos (setas pequenas). **A = 550 ×; B = 275 ×.**

Em **C, D e E**, cortes longitudinais, mostrando fibras musculares escurecidas em estágios necróticos, incluindo dispersão (d) das miofibrilas, zonas hipercontraídas (h) intercaladas com áreas vazias (*) do citoplasma e algumas fibras com aspecto 'rendado' (r), decorrente de faixas irregulares de sarcômeros hipercontraídos. **C, D e E = 275 ×.**



**FIGURA 17- Preparação *biventer cervicis* de pintainho, incubada com veneno de
M.d.c. (5 µg/ml) – 90 min.**

Controle. Em **A** e **B**, secções transversal e longitudinal, mostrando os fascículos de fibras musculares com aspecto normal, com núcleos periféricos e estriações transversais visíveis: **A** e **B** =275×.

C e **D**, secções longitudinais das fibras musculares incubadas com o veneno, respectivamente, sem e com estimulação elétrica indireta. Note que a estimulação elétrica não aumenta o grau de hipercontração das fibras musculares, provocado pelo veneno. Observe ainda as zonas constrictadas (seta) ao longo da fibra hipercontraída (h). **C** e **D** =275×.

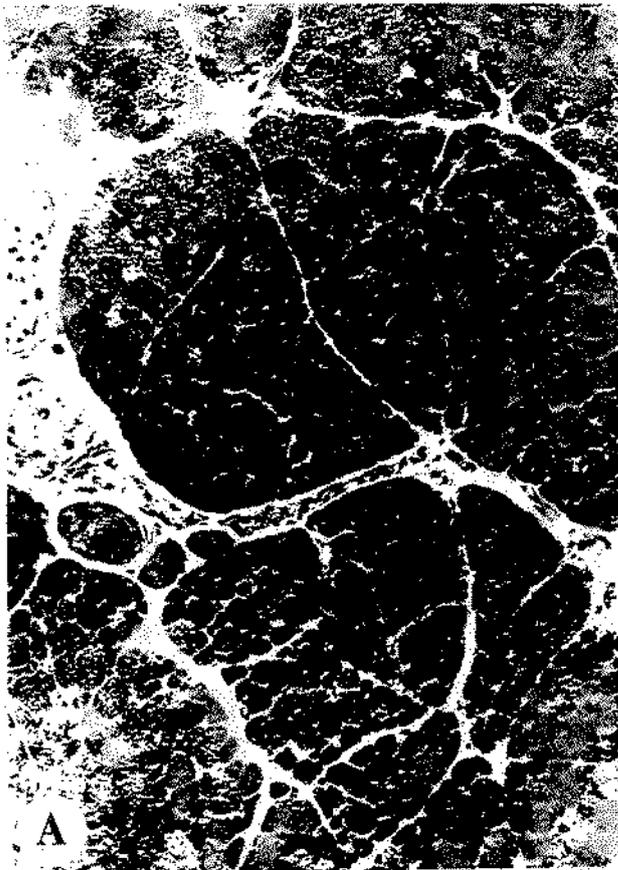


FIGURA 18 - Eletromicrografias de hemidiafragma de rato
controle 0h (A) e incubados em solução de Tyrode, estimuladas indiretamente por
90 min (B,C e D).

A e C: secção longitudinal, mostrando que as miofibrilas das fibras musculares estão bem preservadas, cada qual limitada por retículo sarcoplasmático e mitocôndrias intactas e com sarcômeros alinhados regularmente: 4.176 \times , 11.625 \times , respectivamente. **B e D,** secção transversal das miofibrilas, circundadas por mitocôndrias (m) e retículo sarcoplasmático (seta) com perfil regular: 9.000 \times , 11.625 \times , respectivamente.

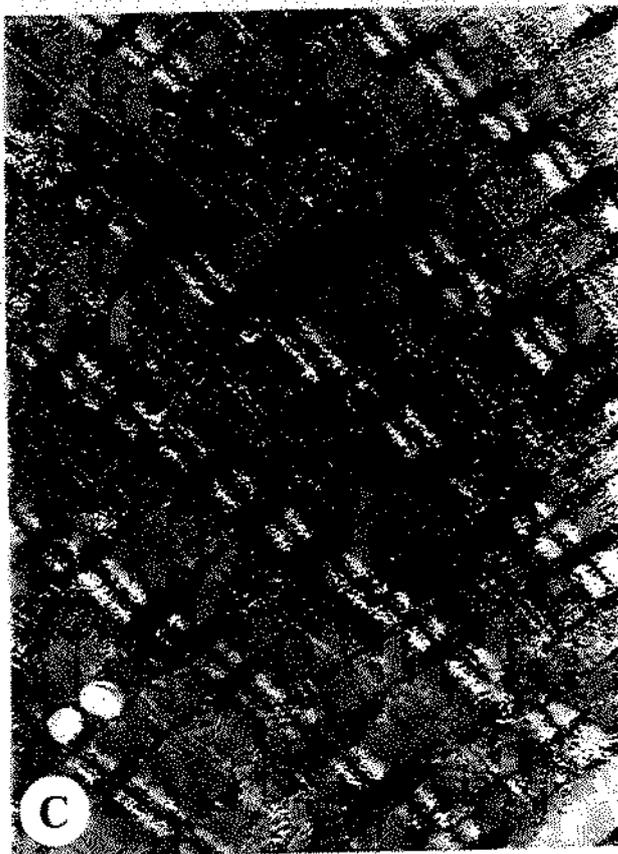
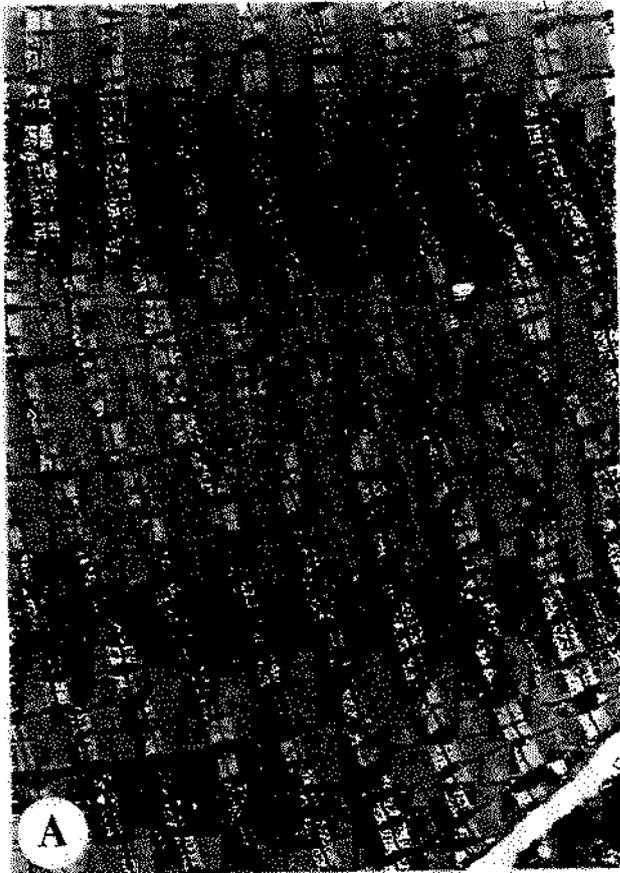
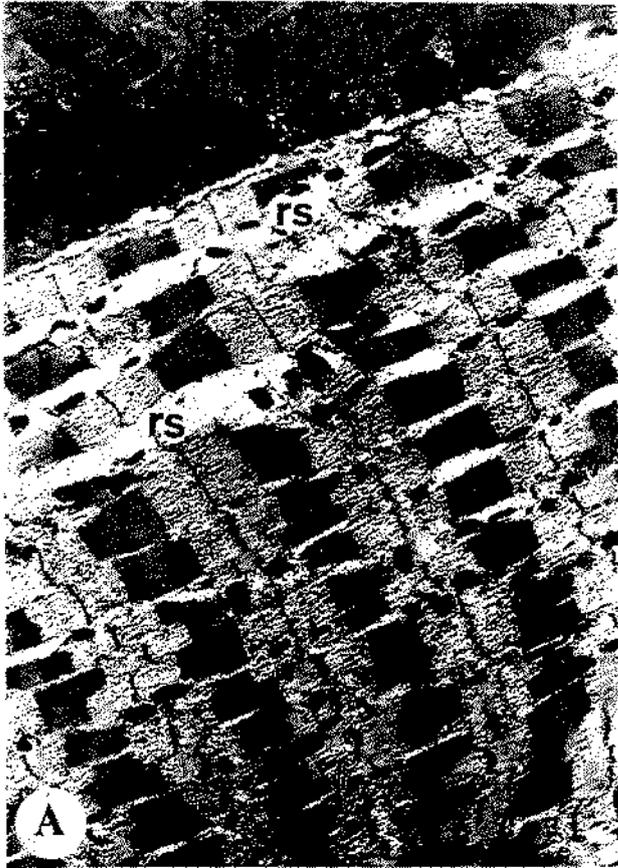


FIGURA 19 - Eletromicrografias das preparações diafragma de rato, incubadas com veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* (M. d. c.) - 5 µg/ml por 90 min.

A, B, C e D – Diferentes aspectos das alterações das miofibrilas e da disposição dos miofilamentos em células musculares esqueléticas em estágios de necrose, mais e menos avançados. Em **A**, miofibrilas espaçadas, com desorganização do retículo sarcoplasmático (rs) e sarcômeros anormais: contração da banda A e expansão da banda I. Em **B**, as miofibrilas estão distorcidas, com difícil demarcação dos sarcômeros e mitocôndrias (m) intactas ou estouradas. Em **C**, áreas de dissolução dos miofilamentos com restos de organelas. Em **D**, condensação (c) dos miofilamentos em massas amorfas e alterações marcantes das mitocôndrias (m). C = capilar; l = gotas de lípidos. **A e D**: 6.969 ×, **B**: 15.000 ×, **C**: 11.625 ×.



**FIGURA 20 - Detalhes das alterações musculares provocadas pelo veneno de *M.d.c.*
(5 µg/ml) – 90 min.**

Em **A**, fibras musculares totalmente alteradas, destituídas dos miofilamentos e, no seu lugar, material floculento e mitocôndrias eletrodensas degeneradas. Observe a alteração do núcleo (N) (11.615 ×). Em **B**, as fibras musculares 1 e 2 mostram estrutura mais preservada e a 3 mostra ruptura do sarcolema (seta) e dispersão das organelas (9.000 ×). Em **C**, fibras musculares apresentando áreas amorfas e vazias, extensa área com os restos dos miofilamentos, mitocôndrias e retículo sarcoplasmático (4.176 ×).

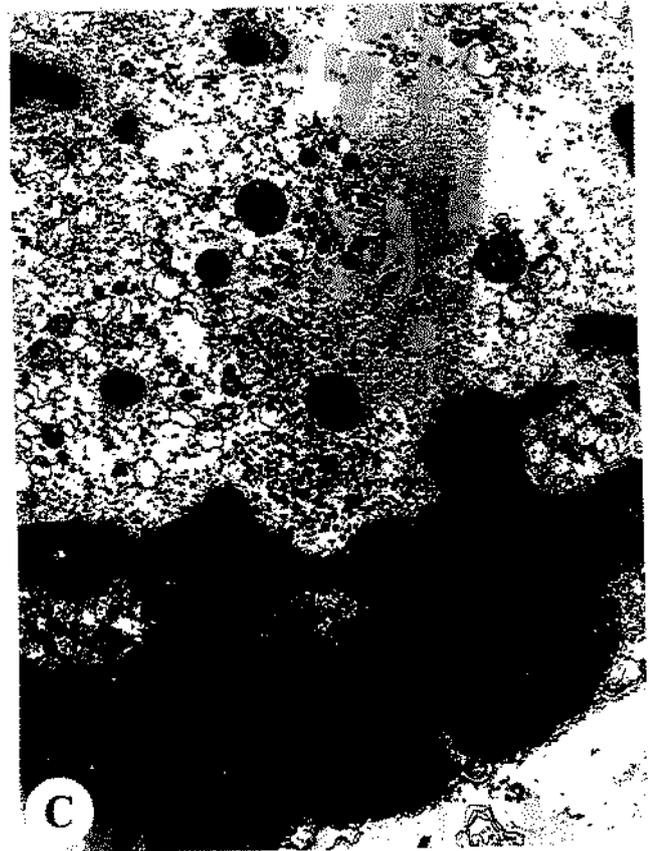
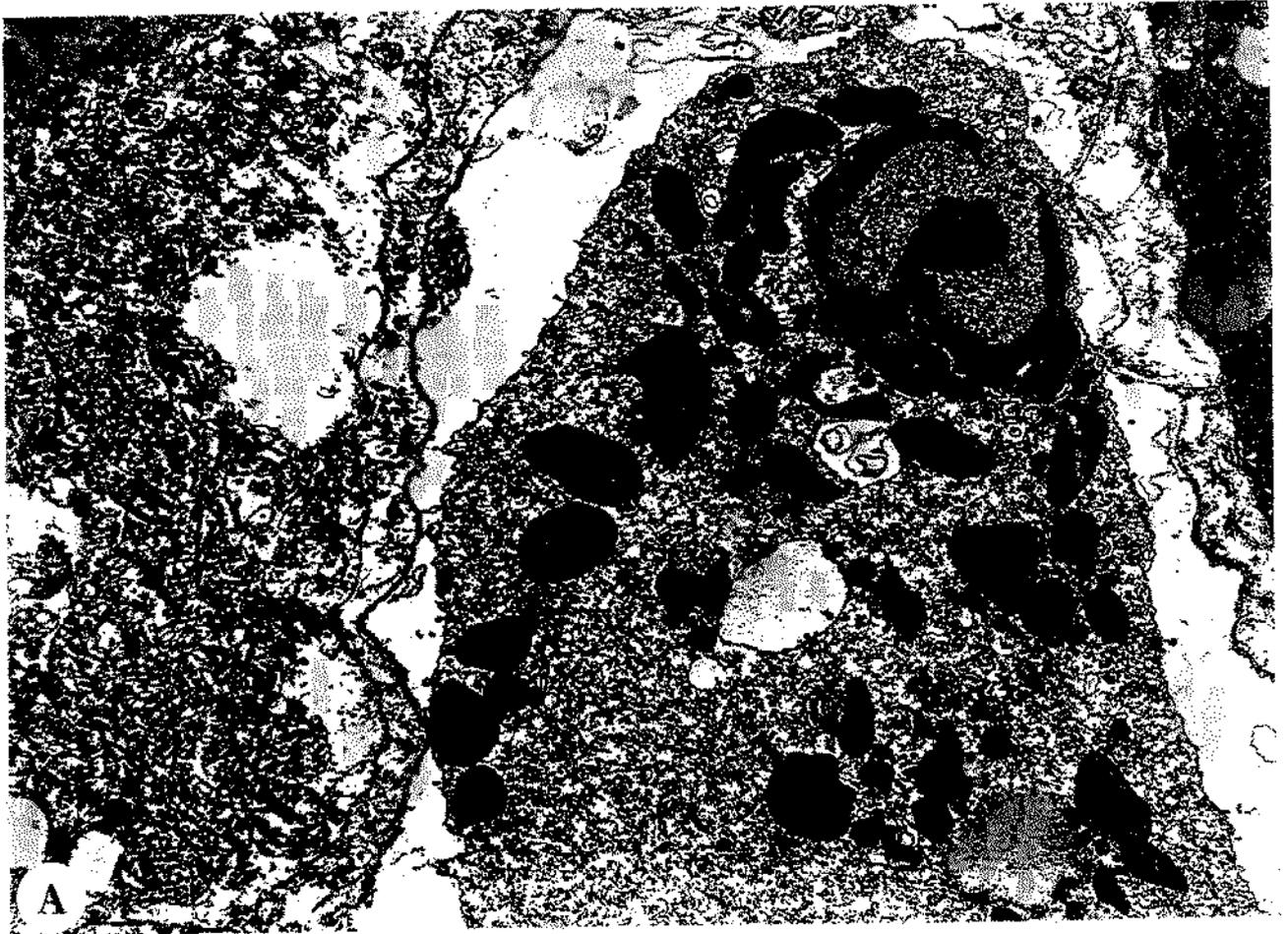


FIGURA 21 – Aspectos da degeneração necrótica das fibras musculares de hemidiafragma incubado com 10µg/ml do veneno de *M.d.c.* – 90 min.

A- Note a distorção tanto das miofibrilas, como dos sarcômeros, refletindo a hipercontração dos miofilamentos (4.176 ×). **B-** A distorção dos sarcômeros (S) é constatada pela irregularidade das linhas Z, observe as ondas de hipercontração (h), bem como a ruptura do sarcolema (seta) (5.395,5 ×). **C e D-** Alterações mais avançadas do estágio necrótico (6.969 ×, respectivamente).

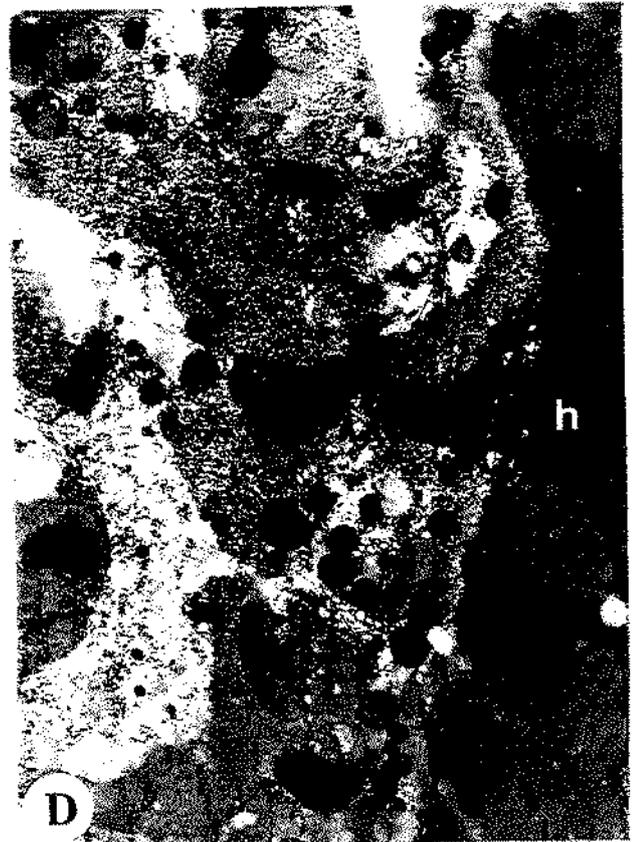


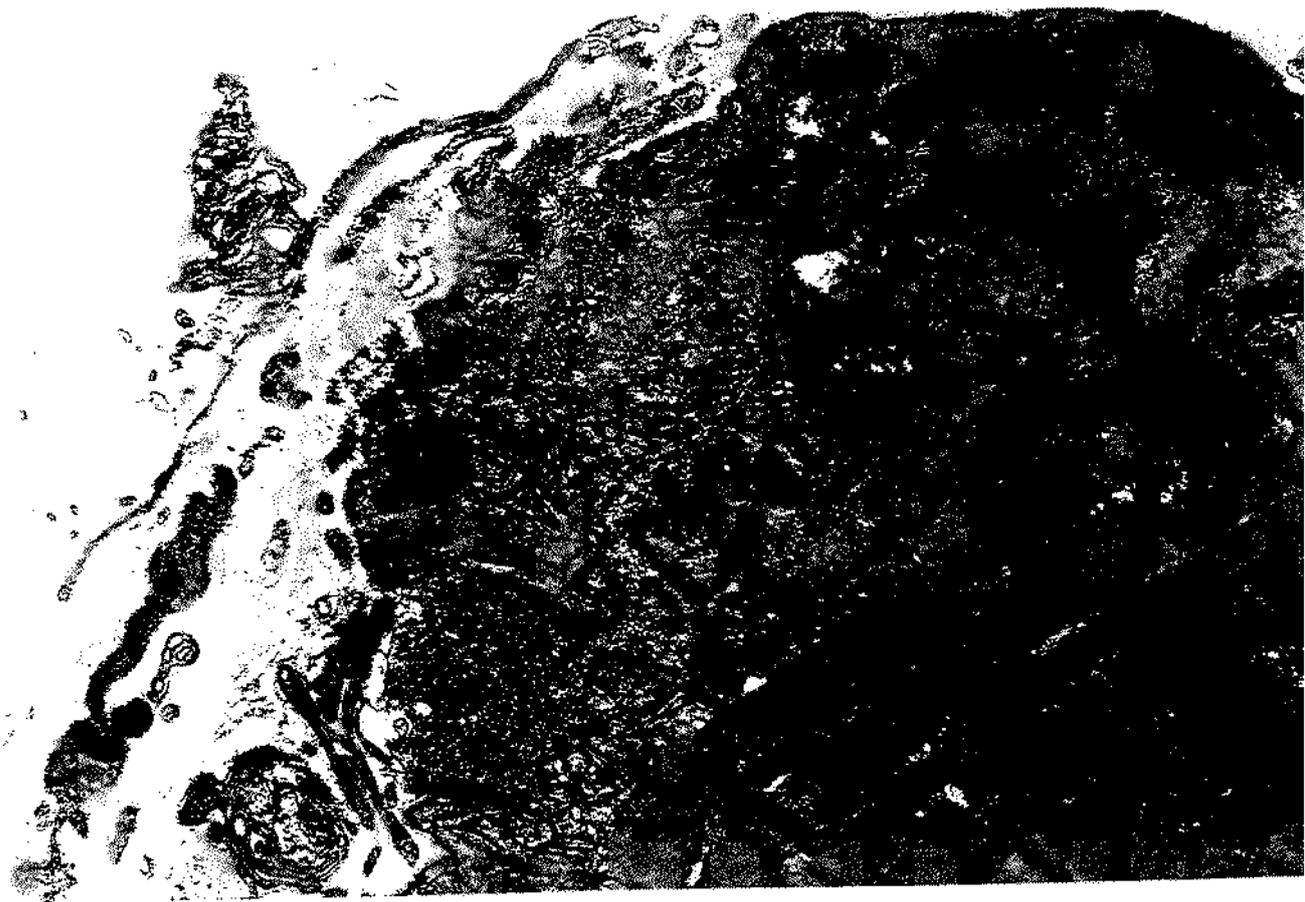
FIGURA 22-Eletromicrografias dos feixes nervosos presentes em preparações diafragma de rato submetidas à diferentes tratamentos.

Em **A**, feixe nervoso intramuscular na situação controle apresentando aspecto normal com mielina compacta, neurofilamentos e mitocôndrias bem distribuídos no axoplasma; S = célula de Schwann normal (15.000 ×). Em **B**, 90 min de estimulação (controle), feixe de axônios apresentando aspecto normal, com neurofilamentos bem distribuídos. As células de Schwann (S) também estão normais (6.969 ×). Em **C**, a preparação foi incubada com veneno (5 µg/ml)-90 min, mostrando um axônio pré-terminal envolvido pelo perineuro (p). A célula de Schwann (S) mostra membranas enroladas (★). Note a diminuição da espessura da bainha de mielina no pólo inferior devido à fragmentação e enrolamento das lamelas mielínicas (*) (15.000 ×); A = axônio retraído, mitocôndrias escuras no axoplasma. Em **D**, veneno de *M.d.c.* (10 µg/ml)-90 min, feixe intramuscular de axônios envolvidos pelo perineuro (p). Note o aspecto eletrodense do axoplasma e compactação dos neurofilamentos (11.625 ×).



FIGURA 23 - Junções neuromusculares (JNM) controle, incubadas com solução de Tyrode, com estimulação elétrica indireta (90 min).

Observe dois terminais nervosos (T), encaixados na goteira sináptica e recobertos por prolongamentos das células de Schwann (S), com a população de vesículas sinápticas . As dobras juncionais (d) apresentam-se normais; N = núcleos da placa (15.000 ×).



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FIGURA 24 - Eletromicrografia de JNM: veneno de *M.d.c.*

(5 µg/ml) -90 min.

Micrografias mostrando terminais nervosos alterados. Em **A**, terminal nervoso apresentando microvacúolos (v), mitocôndrias com pouca definição das cristas e população de vesículas sinápticas. Note a desorganização das dobras juncionais (d); S = célula de Schwann com mitocôndrias (m) degeneradas (15.000×). Em **B**, terminais nervosos com inúmeras indentações em forma de ômega ao longo do axolema (setas), mitocôndrias (m) inchadas e tumefeitas. Terminal nervoso indicando exocitose do conteúdo das vesículas sinápticas. Note a fragmentação do terminal. As dobras juncionais (d) apresentam aumento do espaço interno e baixa eletrodensidade (19.375 ×).

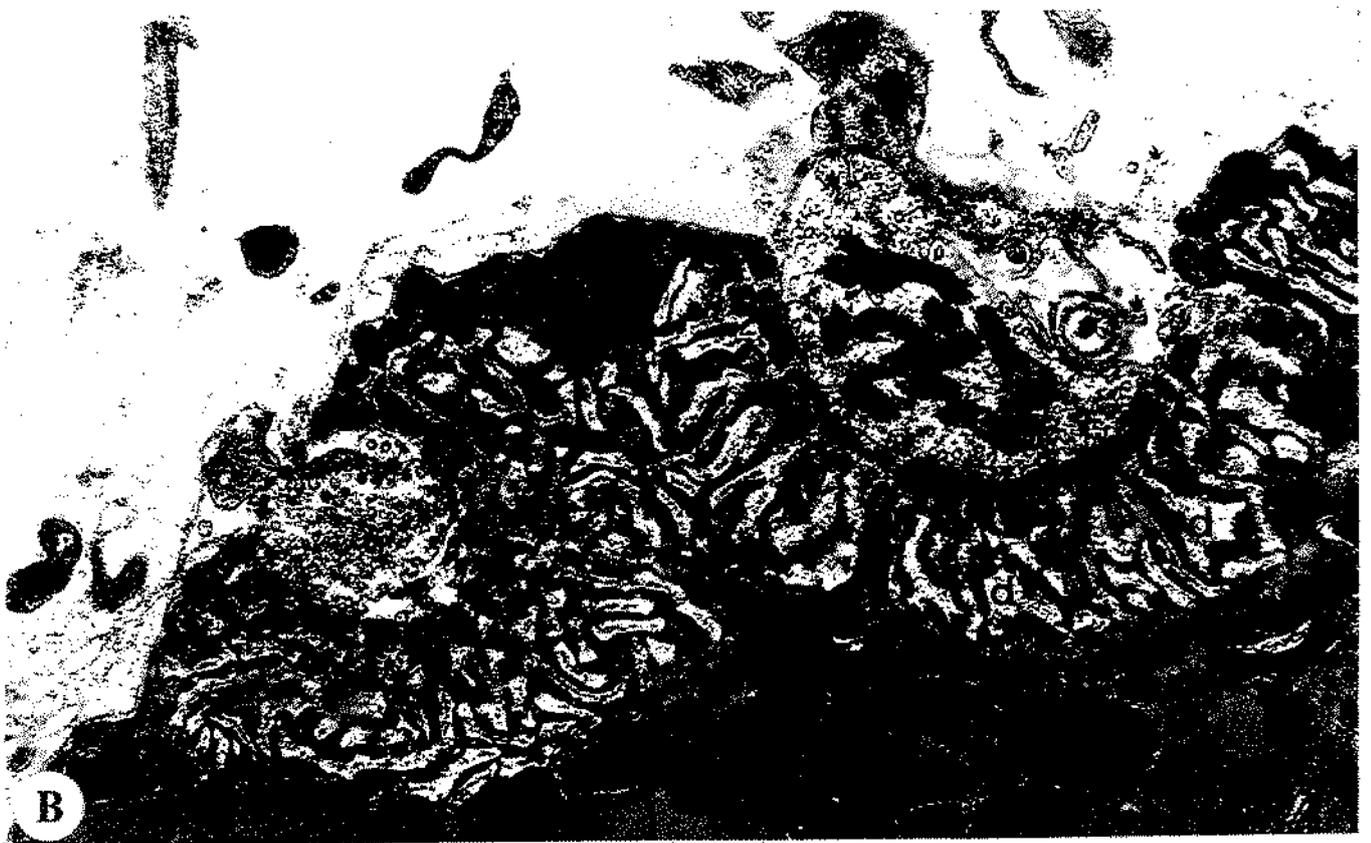
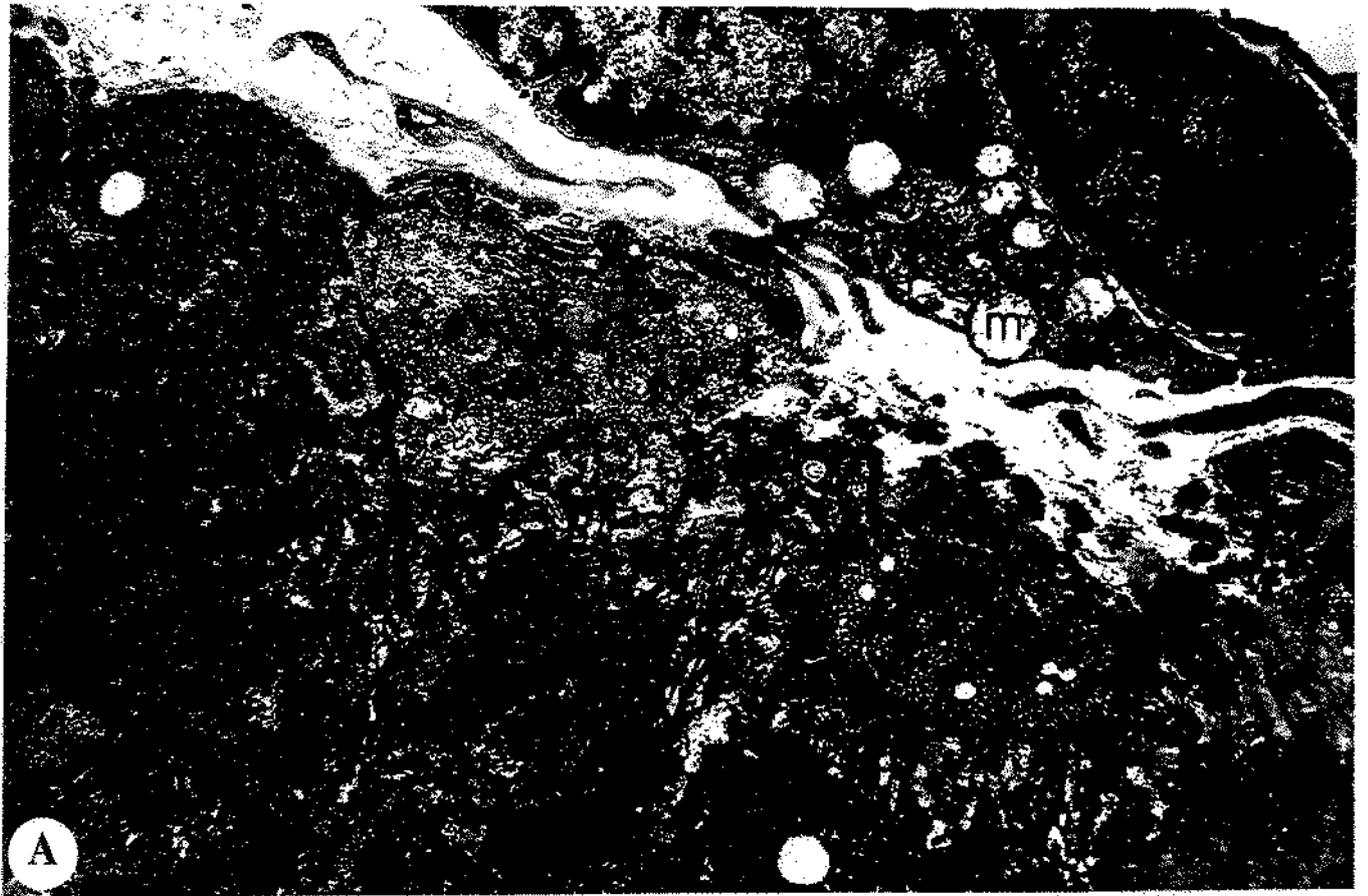


FIGURA 25 - Eletromicrografia de JNM do diafragma de rato: veneno de

M. d. c. (5 µg/ml) -90 min.

Em **A**, terminal nervoso com acúmulo de mitocôndrias e poucas vesículas sinápticas. Elementos subsinápticos mal definidos e pouco desenvolvidos (25.000×). Em **B**, bipartição do terminal nervoso (T1 e T2) e entre eles prolongamentos das células de Schwann (S) (15.000 ×).

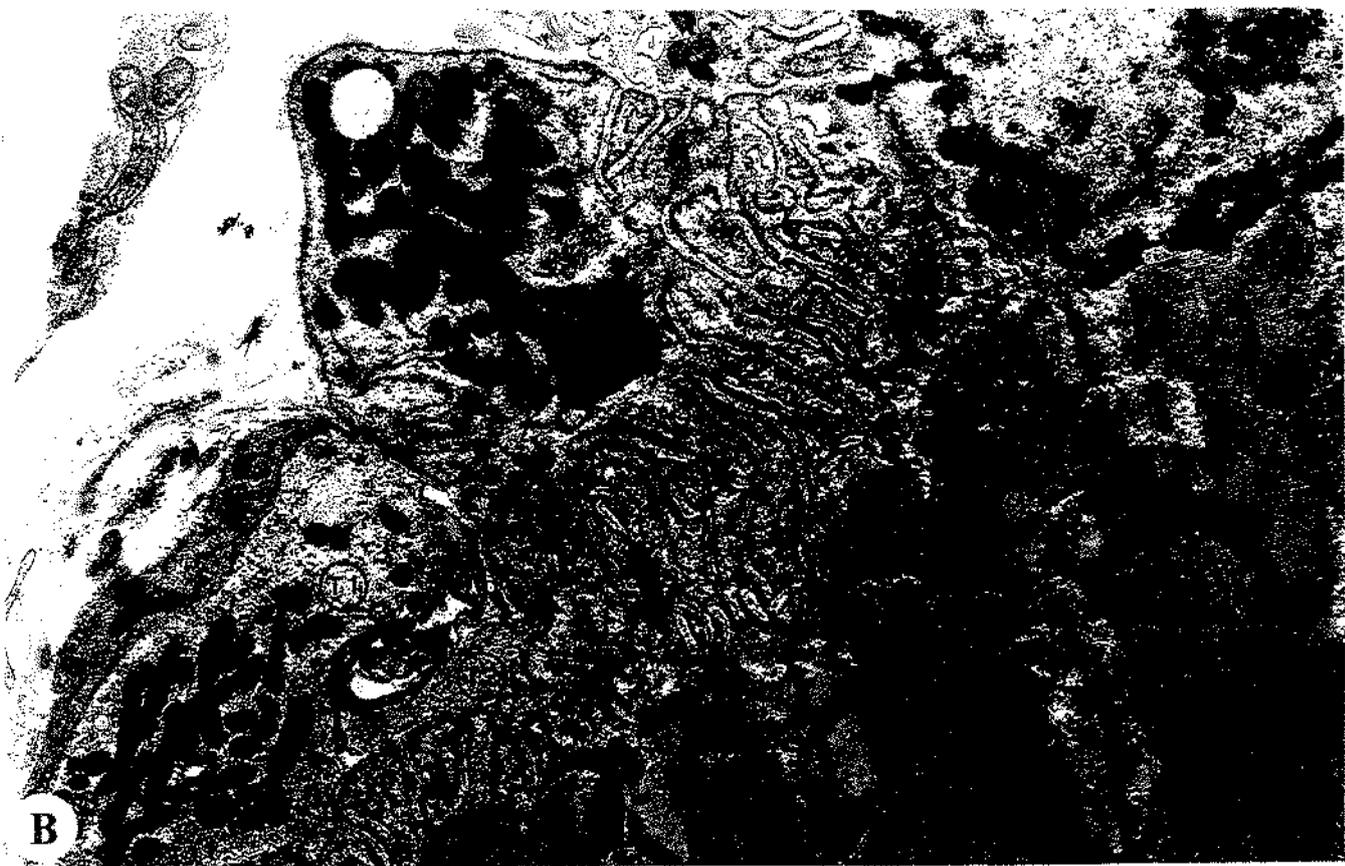
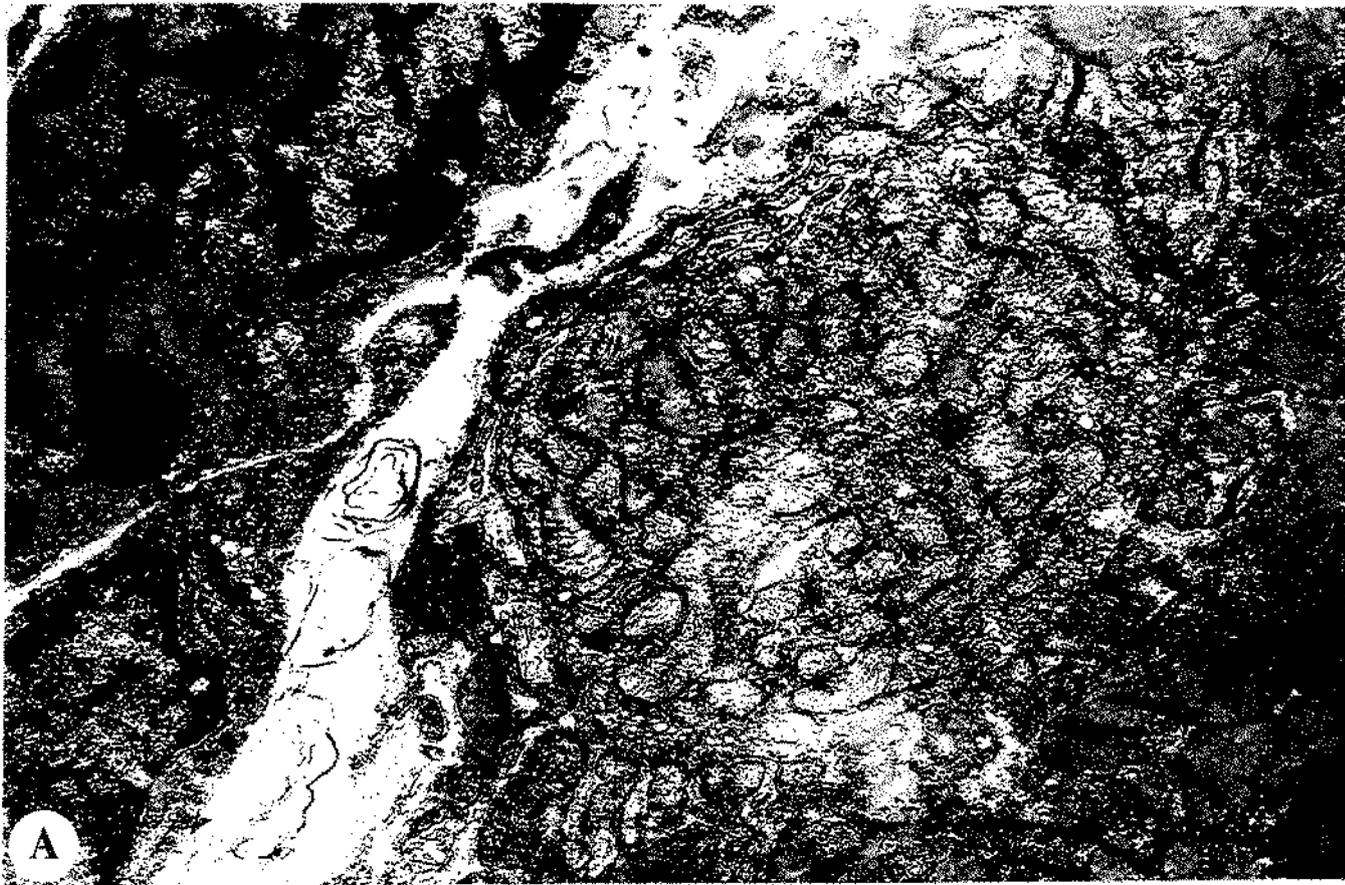


FIGURA 26 - Eletromicrografia de JNM do diafragma de rato, incubado com o veneno de *M. d. c.* (10 µg/ml) -90 min.

Em **A** e **B**, micrografias de terminais nervosos com axolema descontínuo, mitocôndrias estouradas, vesículas sinápticas altamente compactadas e de tamanho anormal. As dobras juncionais alargadas mostram bipartição da lâmina basal (*). Em **B**, nota-se fragmentação do terminal e, no local, infiltração dos prolongamentos da célula de Schwann (S). Em **C**, terminal nervoso com mitocôndrias degeneradas e axolema com indentações ômega. (**A**= 19.395×; **B**=15.000 ×; **C**= 38.808 ×).

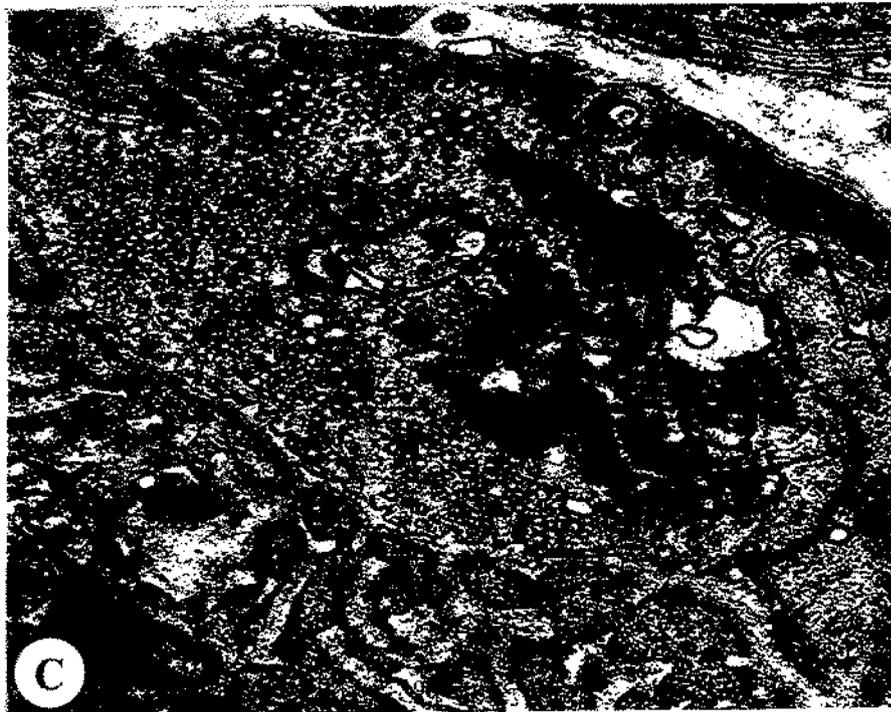
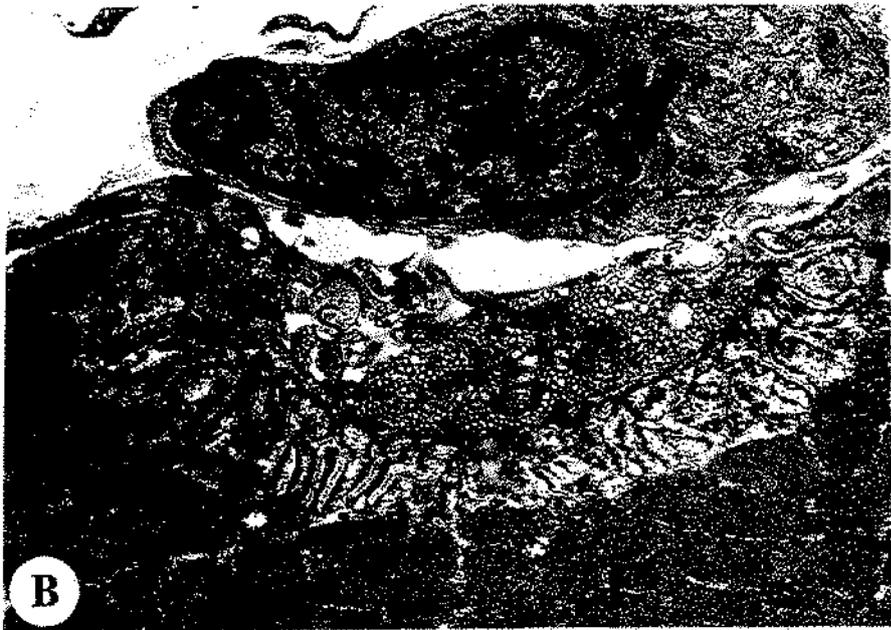
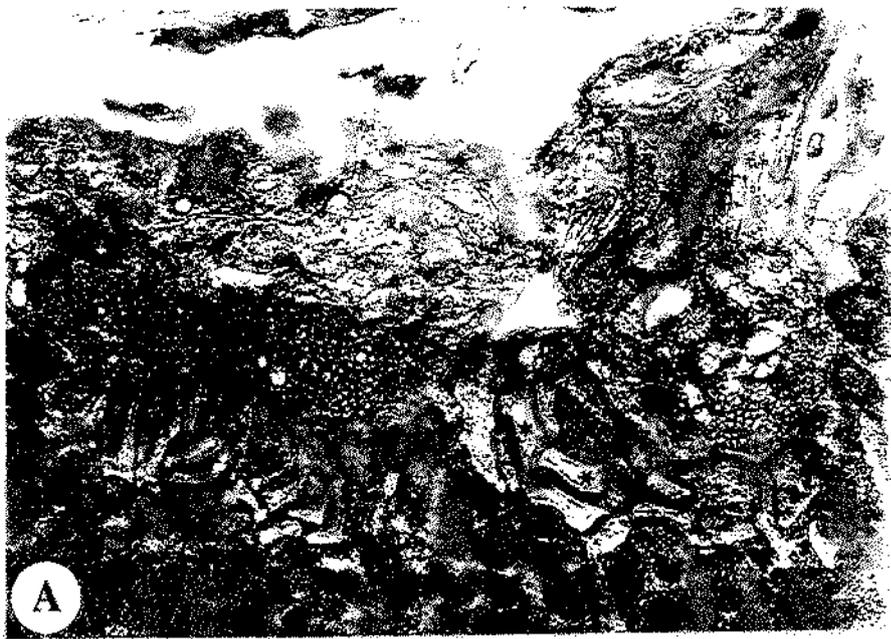
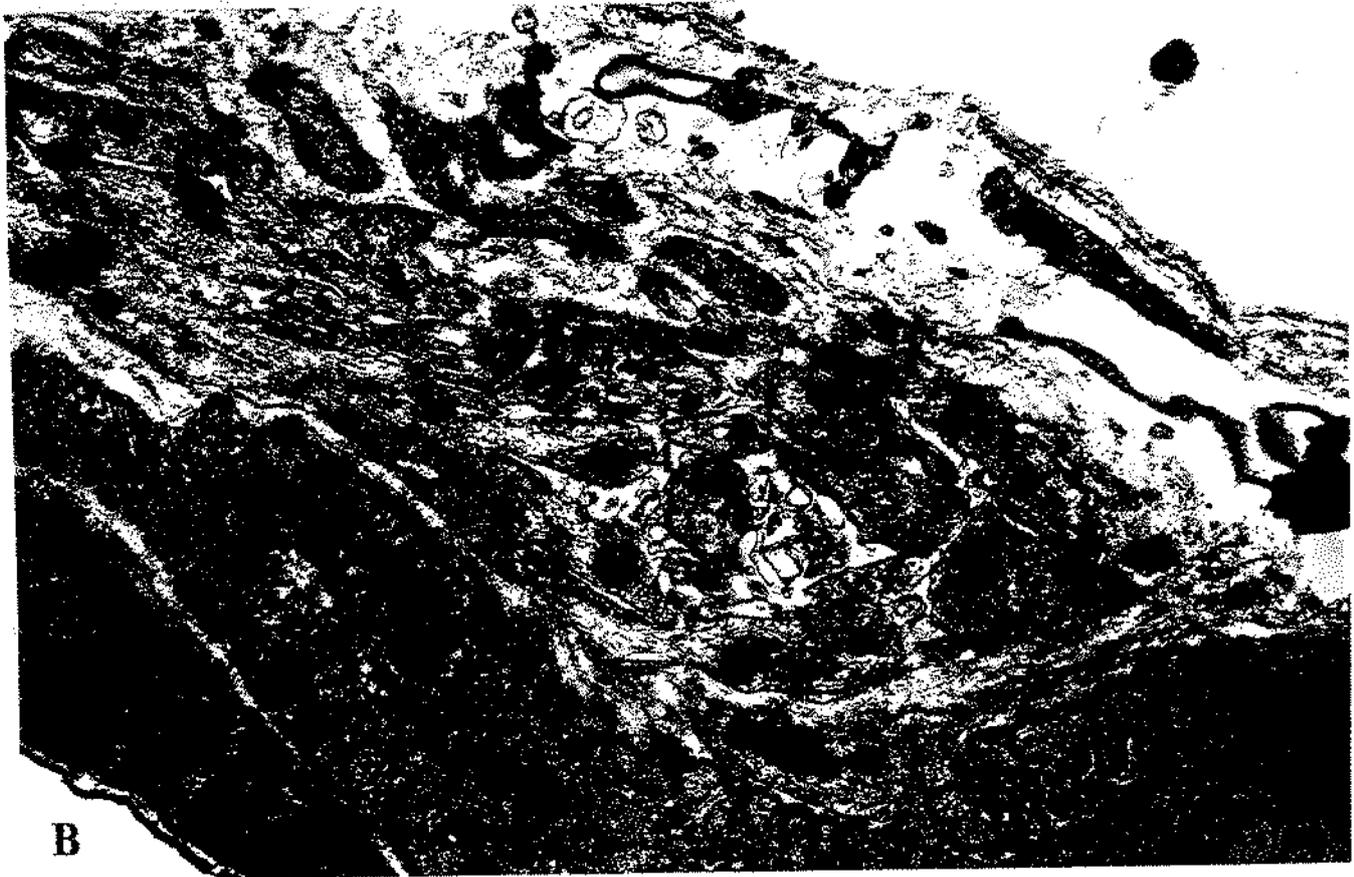
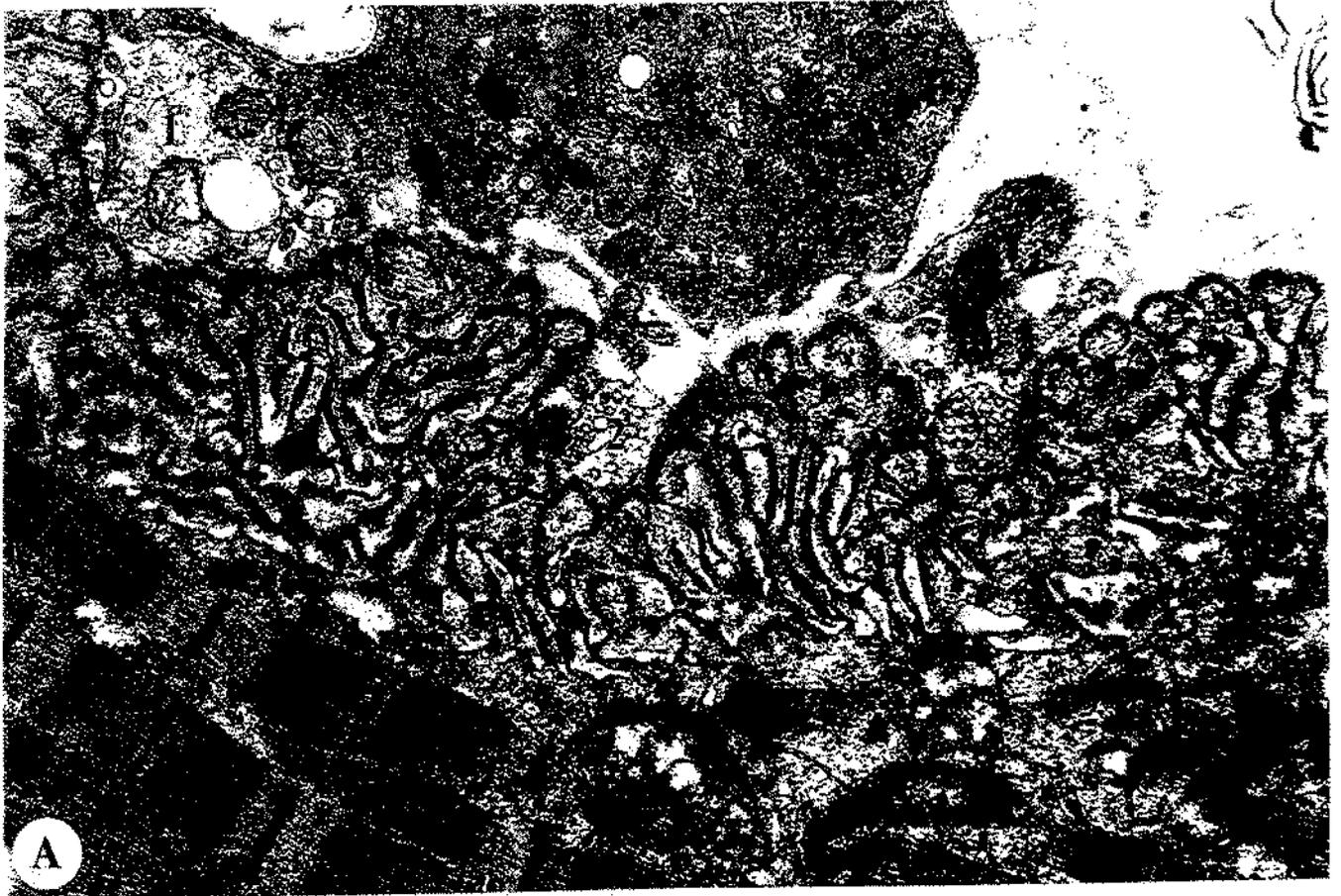


FIGURA 27 - Eletromicrografia de JNM do diafragma de rato, incubado com o veneno de *M. d. c.* (10 µg/ml) -90 min.

A e **B**, detalhes de quatro terminais nervosos (1, 2, 3 e 4), mostrando alterações importantes da região pré-sináptica: atrofia dos terminais (em **A**) e grande fragmentação e/ou invasão de prolongamentos das células de Schwann na goteria sináptica (em **B**). Note em **A**, as cisternas engurgitadas do retículo endoplasmático rugoso (*) da célula de Schwann. (**A**=25.000 ×; **B**=19.375 ×).



5 - DISCUSSÃO

A serpente *M. d. carinicauda* está distribuída na América do Sul, principalmente na Venezuela e Colômbia (ROZE, 1982; CAMPBELL & LAMAR, 1989). Seu veneno foi ainda alvo de pouca investigação, quanto à sua atividade sobre a junção neuromuscular e a fibra muscular esquelética.

No presente estudo, as preparações nervo frênico-diafragma de rato, diafragma de rato cronicamente desnervado e *biventer cervicis* de pintainho foram utilizadas para estimar o potencial neurotóxico e miotóxico do veneno de *M. d. carinicauda*, e determinar as características dessa ação tóxica.

Este trabalho demonstrou que o veneno de *M. d. carinicauda* causa alterações miográficas, eletrofisiológicas e morfológicas sobre a fibra muscular esquelética, e em fibras nervosas e terminal nervoso.

Verificou-se que, na preparação nervo frênico-diafragma de rato, o bloqueio das respostas contráteis à estimulação elétrica indireta, induzido pelo veneno total de *M. d. carinicauda* é dose-dependente. Após este bloqueio, as respostas contráteis à estimulação elétrica direta mantiveram-se inalteradas. Tais resultados demonstram um efeito sobre a junção neuromuscular.

Os venenos de *Micrurus frontalis* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77), *Micrurus corallinus* (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84) e *Micrurus spixii* (VITAL BRAZIL, FONTANA, HELUANY, 1995) também produzem bloqueio neuromuscular, na preparação nervo frênico-diafragma de rato. A adição de neo e de 3,4-DAP na preparação nervo frênico-diafragma de rato, produziu um

de 3,4-DAP na preparação nervo frênico-diafragma de rato, produziu um antagonismo parcial no bloqueio da estimulação elétrica indireta, causado pelo veneno de *M.d. carinicauda*.

O fato de ambas as drogas serem capazes de reverterem parcialmente a resposta contrátil, após o bloqueio de 85%, induzido pela exposição do músculo ao veneno de *M. d. carinicauda*, pode indicar como causa, um bloqueio dos receptores nicotínicos colinérgicos da placa terminal. Este resultado é similar à ação do veneno de *Micrurus frontalis*, que apresenta neurotoxinas pós-sinápticas e cujo bloqueio é efetivamente antagonizado pela adição de drogas anticolonesterásicas (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77).

Este resultado difere daqueles obtidos com o veneno de *M. n. nigrocinctus*, que produz bloqueio não antagonizado por drogas como a Neo e a 3,4-DAP (GOULARTE *et al.*, 1995).

VITAL BRAZIL & FONTANA (1983/84) observaram que o veneno de *M.corallinus* produz bloqueio neuromuscular irreversível na preparação nervo frênico-diafragma de rato. Os autores não observaram o antagonismo com a Neo, e não usaram a 3,4-DAP nos seus experimentos. Estes autores concluíram que a ação pré-sináptica do veneno é preponderante em relação à pós-sináptica. A ação neurotóxica pré-sináptica foi confirmada por CRUZ-HÖFLING *et al.* (1983/84) em estudos de ultra-estrutura.

Com o estudo do veneno de *M. spixii*, VITAL BRAZIL *et al.* (1995) também observaram bloqueio neuromuscular irreversível nas preparações nervo frênico-diafragma de rato e *biventer cervicis* de pintainho.

O veneno de *M. d. carinicauda* causou bloqueio da resposta contraturante induzida pela ACh – mas não pela do KCl, nas preparações de diafragma cronicamente desnervado de rato e *biventer cervicis* de pintainho. Estes resultados sugerem uma ação pós-sináptica do veneno sobre os receptores nicotínicos, portanto, uma ação curaremimética, e não efeito sobre as fibras musculares, que é também demonstrado quando se faz estímulos elétricos diretos na vigência do bloqueio neuromuscular a estímulos elétricos indiretos.

Este resultado é confirmado, quando as preparações diafragma de rato cronicamente desnervado são protegidas com a *d*-Tc previamente, concordando com os resultados obtidos por VITAL BRAZIL *et al.* (1976/77), sem a *d*-Tc, o veneno de *M.d. carinicauda* causou uma inibição bem mais acentuada da contratura à ACh do que a produzida com a adição prévia de *d*-Tc, o que, de certa forma, sugere-nos a ocorrência da proteção dos receptores colinérgicos nicotínicos.

Com a utilização do veneno de *M. frontalis* (VITAL BRAZIL, *et al.*, 1976/77), na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado, a *d*-Tc foi capaz de proteger os receptores contra o efeito bloqueador deste veneno e sem a *d*-Tc, o veneno de *M. d. carinicauda* causou uma inibição bem mais acentuada à

contratura induzida pela ACh do que a produzida com a adição prévia de *d*-Tc, o que, sugere a ocorrência da proteção pela *d*-Tc dos receptores nicotínicos recém-formados, e indica uma possível interação entre este veneno e os receptores colinérgicos nicotínicos.

Quando VITAL BRAZIL *et al.* (1995) empregaram o veneno de *M. spixii*, também observaram que este veneno produzia inibição irreversível das contraturas induzidas pela ACh, nas preparações diafragma de rato cronicamente desnervado.

Tais resultados, obtidos nas preparações diafragma de rato cronicamente desnervado, sugerem que a provável atuação deste veneno seja nos receptores nicotínicos pós-sinápticos.

Os diferentes mecanismos de ação de um veneno podem ser observados em preparações *biventer cervicis*. Uma neurotoxina exclusivamente pré-sináptica pode abolir a contração muscular, sem afetar a resposta nos receptores nicotínicos ou resposta muscular direta, pela despolarização induzida pelo potássio. Neurotoxinas que atuam pós-sinápticamente podem bloquear as respostas nos receptores, bem como à estimulação indireta, mas não afetam a resposta a altas doses de KCl ou à estimulação direta do músculo.

O veneno de *M. d. carinicauda*, após bloquear as respostas evocadas pela estimulação elétrica indireta nas preparações *biventer cervicis* de pintainho, causou bloqueio das respostas contraturais, causadas pela adição de ACh, o que

novamente sugere a ação pós-sináptica do veneno de *M. d. carinicauda* nos receptores nicotínicos.

O veneno de *M. d. carinicauda* não bloqueia a resposta evocada pelo K^+ , na preparação *biventer cervicis* de pintainho, sugerindo que este veneno, provavelmente, não tenha atuação nas fibras musculares.

VITAL BRAZIL *et al.* (1995), estudando o veneno de *M. spixii* na preparação *biventer cervicis* de pintainho, observaram que a resposta a altas doses de ACh (370 μ M) era inibida, quando a transmissão neuromuscular estava bloqueada. Este é um dos motivos pelos quais os autores sugerem que o veneno de *M. spixii* atue pós-sinápticamente.

Os estudos eletrofisiológicos permitiram confirmar a neurotoxicidade do veneno de *M. d. carinicauda*, ajudando a esclarecer suas ações pré- e/ou pós-sinápticas.

Nos estudos eletrofisiológicos realizados com o veneno de *M. d. carinicauda*, observou-se que este veneno não altera o potencial de membrana das fibras musculares. De forma idêntica, os venenos de *M. frontalis* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77), *M. corallinus* (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84) e *M. spixii* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1995) também não alteram o potencial de membrana das fibras musculares. Mas estes resultados são opostos àqueles com o veneno de *M. n. nigrocinctus* que causa alterações nas regiões das placas motoras e fibra muscular (GOULARTE *et al.*, 1995).

Estes resultados corroboram no aspecto de que estes venenos não devem conter componentes que atuem no músculo, despolarizando as fibras musculares, porém tem componentes miotóxicos como se verá adiante.

Quando foram estudados os potenciais de placa terminal em miniatura (pptm), observou-se que o veneno de *M. d. carinicauda* causa bloqueio progressivo destes (principalmente a sua amplitude) até o seu desaparecimento. O veneno de *M. frontalis* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77) reduz igualmente, a amplitude dos pptm tal como o curare.

Nos estudos realizados por VITAL BRAZIL & FONTANA (1983/84) com o veneno de *M. corallinus*, demonstrou-se que este aumenta a frequência dos pptm (possível ação pré-sináptica) e reduz a amplitude dos pptm (ação pós-sináptica).

O bloqueio dos pptm pelo veneno de *M. d. carinicauda* foi antagonizado tanto pela Neo como pela 3,4-DAP. O efeito antagônico, produzido tanto pela Neo como pela 3,4-DAP sobre os pptm, confirma que a atuação do veneno de *M. d. carinicauda* deve-se principalmente a uma ação pós-sináptica. Em estudos com o veneno de *M. spixii*, em preparações nervo frênico diafragma de rato, por VITAL BRAZIL *et al.* (1995), a Neo foi capaz de induzir o reaparecimento dos pptm bloqueados pelo veneno.

A *d*-Tc e a α -BTx são conhecidas por agir sobre os receptores nicotínicos pós-sinápticos, impedindo a ação despolarizante das drogas. A *d*-Tc atua por mecanismo competitivo (JENKINSON, 1960), enquanto a α -BTx produz bloqueio

específico e irreversível do receptor colinérgico (CHANG & LEE, 1963; LEE & CHANG, 1966), o que permite sua utilização no estudo e caracterização do envolvimento do receptor colinérgico pós-sináptico (CHANGEAUX, KASAI, LEE, 1970), na gênese dos efeitos de algumas substâncias ou toxinas.

Quer em preparações curarizadas (*d*-Tc, 15 μ M) quer em preparações bloqueadas com α -BTx (13 μ M) ou usando preparações desnervadas, com os venenos de: *M. d. carinicauda*, *M. frontalis* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77), *M. corallinus* (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84) e *M. spixii* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1995), não alteram as respostas à estimulação elétrica direta. Isto sugere que a possível atuação do veneno de *M. d. carinicauda* seja principalmente na junção neuromuscular, o que corrobora os estudos realizados sobre o potencial de membrana, resposta contraturante do potássio e sobre os pptm.

A presença de componentes miotóxicos no veneno de serpente pode causar redução da resposta do músculo esquelético à estimulação elétrica direta ou da contratura evocada por doses elevadas de potássio e/ou iniciar contraturas no músculo (HARVEY *et al.*, 1994).

Se venenos afetam a integridade das fibras musculares ou bloqueiam a contratilidade muscular, pode-se esperar que reduzam a capacidade das fibras musculares em se contraírem, quando despolarizadas pelo potássio.

As mudanças morfológicas musculares induzidas por este veneno (*M. d. carinicauda*) não corroboram os resultados acima citados.

Os venenos de serpentes corais são classicamente descritos como neurotóxicos. No entanto, estudos prévios descreveram um efeito miotóxico acentuado, induzido pelo veneno de *M. d. carinicauda* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1983, 1992).

Estudos realizados por GUTIÉRREZ *et al.* (1983) mostraram que o veneno de *M. d. carinicauda* e de outras cinco espécies de serpentes corais eram capazes de induzir mionecrose em camundongos, demonstrando então, a presença de miotoxinas na composição destes venenos.

A necrose que se segue à incubação da preparação com venenos é um fenômeno altamente complexo, resultante de fatores de ação específica e/ou da combinação de fatores secundários, e de reações inespecíficas sobre o músculo afetado (OWNBY *et al.*, 1982; OWNBY, 1990). Por esta razão, a combinação de diferentes métodos como miografia, eletrofisiologia e morfologia são recomendados para a detecção e avaliação da miotoxicidade (MEBS & OWNBY, 1990).

O veneno de *M. d. carinicauda* causou mionecrose difusa no músculo diafragma de rato, efeito atribuído aos componentes miotóxicos do veneno que pode ou não estar associados com a atividade fosfolipásica A_2 (PLA₂), o que também explica as alterações morfológicas causadas pré- sinápticamente. A maioria das miotoxinas isoladas dos venenos de serpentes são PLA₂ (HARRIS *et al.*, 1980).

Neste trabalho, demonstrou-se que o veneno de *M. d. carinicauda* (10 µg/ml) apresenta um potente efeito sobre a fibra muscular e a junção neuromuscular. Os resultados mostraram um bloqueio dose-dependente das respostas das contrações musculares sob estimulação elétrica indireta, o que se julga ter origem principalmente no efeito neurotóxico. Apesar de se encontrarem fortes indícios de mionecrose, supõe-se que ela não seja o fator mais importante na gênese do bloqueio neuromuscular o que vem corroborar os resultados obtidos com a miografia e a eletrofisiologia.

Os dados ultra-estruturais mostram que a ruptura do sarcolema das fibras musculares e do axolema dos terminais nervosos ocorre apenas em alguns casos. As mudanças morfológicas causadas por miotoxinas PLA₂ (Asp 49 e PLA₂-“like” Lys-49) são características da rápida lise do sarcolema, hipercontração e necrose (FLETCHER *et al.*, 1996).

Neste presente trabalho, o veneno de *M.d.carinicauda* (5 e 10 µg/ml) produziu dano nas células musculares de forma dose-dependente. O bloqueio da resposta contrátil também foi dose-dependente. Entretanto, independente da dose, um estágio comum de mionecrose foi exibido, apresentando hipercontração das miofibrilas. Em secção transversal, as células mostraram vacuolização, o que na secção longitudinal era representada pela dispersão das miofibrilas. Os achados morfológicos (microscopia de luz e eletrônica) do músculo exibiram características clássicas de mionecrose inespecífica e independente do agente, com

hipercontração e condensação das miofibrilas alternadas com áreas vazias do citoplasma e desorganização do material intracelular. Este tipo de mionecrose é classificado como tipo miolítico (HOMMA & TU, 1971).

Os achados ultra-estruturais sugerem que o veneno de *M.d.carinicauda* tem efeito tanto pré-sináptica como pós-sinapticamente, assim como também ocasionou alterações na fibra muscular. No entanto, com a dose de 5µg/ml, os estudos eletrofisiológicos (potencial de membrana) não foram capazes de detectar qualquer alteração muscular.

As alterações ultra-estruturais induzidas pelo veneno de *M. d. carinicauda* são caracterizadas pela dispersão das miofibrilas, intumescimento e/ou ruptura das mitocôndrias, desorganização do retículo sarcoplasmático, hipercontração dos miofilamentos e lesões nos terminais nervosos.

Ambas as doses utilizadas nos estudos ultra-estruturais foram capazes de causar alterações extensas, levando a alterações na forma das mitocôndrias. Além disso, houve desorganização do retículo sarcoplasmático. As fibras nervosas mielínicas mostraram alterações no axônio e na mielina, que se tornava mais estreita e apresentava a formação de vesículas tanto dentro como fora do axônio. Resultados similares foram obtidos com o veneno de *M. corallinus* em estudos realizados por CRUZ-HÖFLING *et al.* (1983/84). Estes autores sugerem que a formação destes corpos possam estar relacionadas com uma fragmentação das

membranas dos terminais nervosos degenerados, devido à uma ação direta do veneno ou a uma tentativa de fagocitose dos restos celulares.

Os terminais nervosos foram parcialmente destruídos e houve alteração na população de vesículas sinápticas, com aparecimento de vacúolos e com mitocôndrias profundamente alteradas. Houve, ainda, alterações nas células de Schwann, que, ao invés de permanecerem como cobertura do terminal pré-sináptico, emitiam prolongamentos que invadiam o terminal nervoso semi-destruído. Esses resultados mostraram que o veneno tem efeito miotóxico e também atua no terminal nervoso da junção neuromuscular.

Os estudos eletrofisiológicos do veneno de *M. d. carinicauda* (5 µg/ml), confirmaram que a neurotoxicidade deste veneno é decorrente principalmente da sua ação pós-sináptica.

Os achados morfológicos são compatíveis com aqueles apresentados por GUTIÉRREZ *et al.*, 1983), que descreveram um efeito miotóxico acentuado induzido pelo veneno de *M. d. carinicauda* (15 e 30 µg/ml). Uma vez que a dose do veneno de *M. d. carinicauda* usada neste presente estudo foi de 5 µg/ml, pode ser sugerido que altas doses resultem em maior miotoxicidade. Esta possibilidade foi testada com este veneno, na dose de 10 µg/ml, incubado *in vitro*. Os resultados de GOULARTE *et al.* (1995), mostram que os efeitos miotóxicos, induzidos pelo veneno de *M. nigrocinctus*, são importantes para o desenvolvimento do bloqueio irreversível das respostas contráteis. O veneno de *M. nigrocinctus* possui

neurotoxinas pós- e pré-sinápticas, mas o seu efeito predominante parece ser pós-sináptico, em que as neurotoxinas ligam-se, irreversivelmente, aos receptores da placa terminal. O fato do veneno diminuir as contraturas induzidas pela ACh, na curva dose-resposta clássica, corrobora a sua atuação nos receptores colinérgicos nicotínicos

Apesar de não haver relatos clínicos do efeito miotóxico causado pela picada de serpentes corais, é possível que este seja omitido em razão da falta de efeitos locais, macroscopicamente proeminentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 1983).

Segundo HARVEY *et al.* (1994), pode-se prever que, em baixas concentrações do veneno, não é revelada qualquer neurotoxina, enquanto altas concentrações são necessárias para indicar a possível presença de componentes miotóxicos.

Este fato foi observado com o veneno de *M. surinamensis*, em que a miotoxicidade só era vista em altas doses. Observa-se neste estudo, variações quantitativas, visíveis não só na extensão da miotoxicidade induzida por diferentes doses, como também entre diversas populações ou subespécies de uma serpente coral. A mionecrose também foi descrita em camundongos injetados com o veneno de *M. nigrocinctus*, *M. alleni* e *M. carinicauda*. Apesar das diferenças quantitativas, visíveis na miotoxicidade induzida por venenos de serpentes corais, análises histológicas revelaram uma morfologia similar à das células musculares

necróticas, com hipercontração e agrupamentos dos miofilamentos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1992).

Os achados miográficos, eletrofisiológicos e morfológicos, portanto, mostraram direta correlação entre si.

A DL₅₀ para o veneno de *M. d. carinicauda*, neste trabalho, foi de 0,764 mg/Kg de peso de camundongo, em injeção i.v.; resultados encontrados na literatura que são similares aos nossos, em que COHEN *et al.* (1968) usando este veneno em injeção i.p., obtiveram, como resultado para a DL₅₀, 0,7 mg/Kg de peso de camundongo.

A toxicidade do veneno de *M. d. carinicauda* em camundongos mostrou-se inferior à dos venenos de *M. corallinus* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1983/84) e *M. spixii* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1995). Por outro lado, não difere significativamente da toxicidade dos venenos de *M. frontalis* (VITAL BRAZIL *et al.*, 1976/77) e *M. surinamensis* (HELUANY, 2000).

Em conclusão, os dados com o veneno de *M. d. carinicauda* sugerem que o modo de ação do veneno envolve um efeito pós-sináptico que abrange a ligação de toxinas nos receptores nicotínicos da placa motora. O veneno de *M. d. carinicauda*, mesmo possuindo um pronunciado efeito miotóxico, não contribui para a hipótese de que o bloqueio das contrações musculares, observadas após a exposição ao veneno, seja exclusivo de uma ação na junção neuromuscular.

Finalmente, usando-se o veneno total, foi possível evidenciar correlações entre as alterações miográficas, eletrofisiológicas e morfológicas, as quais poderão ser melhor esclarecidas com o fracionamento do veneno total e o estudo individual das frações.

A caracterização parcial do veneno da serpente *M. d. carinicauda* trouxe relevantes informações quanto ao seu efeito na junção neuromuscular e no músculo esquelético. Trabalhos futuros com as frações deste veneno são necessários, na tentativa de se investigar mais detalhadamente os efeitos miotóxicos e neurotóxicos observados no presente estudo.

6 - CONCLUSÃO

Conclusão

1- O veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* causa bloqueio da transmissão neuromuscular. A Neo bem como a 3,4-DAP produziram um antagonismo parcial nas preparações nervo frênico-diafragma de rato.

2- O veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* atua, provavelmente, nos receptores nicotínicos pós-sinápticos.

3- As alterações morfológicas produzidas pelo veneno foram insuficientes para assumirem a responsabilidade das alterações farmacológicas observadas neste trabalho.

7 - SUMMARY

Summary

The effects of the venom of *Micrurus dumerilii carinicauda* (*M. d. carinicauda*), a coral snake restricted to north of South America (Venezuela and Colombia), was studied in mammal (rat hemidiaphragm) and avian (chick *biventer cervicis*) muscle preparations by pharmacological and morphological approaches. The venom induced neuromuscular blockade in the rat phrenic nerve-diaphragm preparation and on the chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation. Neostigmine (Neo) and 3,4-Diaminopyridine (3,4-DAP), antagonize partially the effect of the venom on the neuromuscular transmission in the rat nerve-diaphragm. Either in rat phrenic nerve-diaphragm preparation as well as on the chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation, the venom does not depress the twitch response elicited by direct muscle stimulation. The contractures induced by acetylcholine (ACh) in the denervated rat hemidiaphragm and in the chick *biventer cervicis* are inhibited by the venom. This findings suggests that the main cause of the neuromuscular blockade is due to a post synaptic action on the nicotinic receptors. It is corroborated by our findings on the bioelectrical potentials where *M. d. carinicauda* venom (5 µg/ml) produced a progressive decrease in the amplitude of the miniature end-plate potentials until these were abolished. Neo (5.8 µM) and 3,4-DAP (230 µM) antagonized this blocked effect on neuromuscular transmission and fully prevented the venom-induced blockade of m.e.p.s. These results indicates that *M. d. carinicauda* venom produces neuromuscular blockade mainly by apost synaptic action. *M. d. carinicauda* venom (5 µg/ml) had no effect on the

resting membrane potential and had no effects on the muscle contractile response under direct stimulation. Our findings also shown that this venom (5 or 10 μ g/ml) induces pronounced myotoxicity (10 μ g/ml), affecting in a number of fibers the sarcolemma integrity and producing sarcomere disorganization and clumping of myofilaments. This effect though seems to have little influence on the neuromuscular-inducing effect, since even with 20 μ g/ml of the venom there is no change in the muscle contractile response under direct stimulation.

In parallel, *M.d.carinicauda* venom produced a dose-dependent morphological change on the mammal preparation. In addition the higher the dose the more frequent the presence of multiple zones of closely-massed myofibrils in diaphragm preparation. In *biventer cervicis*, changes have a slow onset and were greatly characterized by undulation of fibers and rarely by collapsing zones of myofibrils by the end of the incubation period. In this work, also was observed, that the most markedy morphological changes related was related to bipartition of the presynaptic elements with invagination of the Schwann cell processes. Furthermore, was observed topological alterations in the synaptic vesicle distribution as well as the presence of the degenerated electron-lucent mitochondrias and axolemma indentations forming omega shaped small invaginations. Our results suggest that *M.d.carinicauda* venom has myotoxic and neurotoxic effects.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, S. D. & SILVA, N. J. - Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp Biochem Physiol**, **99B** (2): 287-294, 1991.
- ALAPE-GIRÓN, A.; LOMONTE, B.; GUSTAFSSON, B.; DA SILVA, N. J.; THELESTAM, M. - Electrophoretic immunochemical studies of *Micrurus* snakes venoms. **Toxicon**, **32**: 713-723, 1994.
- ALAPE-GIRÓN, A.; STILES, B.; SCHMIDT, J.; GIRÓN-CORTES, M.; THELESTAM, M.; JÖRNVALL, H.; BERGMAN, T. - Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A₂ from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. **FEBS Letters**, **380**: 29-32, 1996.
- AMUY, E.; ALAPE-GIRÓN, A.; LOMONTE, B.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J.M.- Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomation by coral snakes (*Micrurus* species). **Toxicon**, **35** (11): 1605-1616, 1997.
- ARROYO, O., ROSSO, J.P., VARGAS, O., GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. - Skeletal muscle necrosis induced by a phospholipase A₂ isolated from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. **Comp Biochem Physiol**, **87B** (4): 949-952, 1987.

- BARROS, A.C.S.; FERNANDES, D.P.; FERREIRA, L.C.L.; SANTOS, M.C. - Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes). **Toxicon**, 32 (4): 445-452, 1994.
- BERGER, B. J. & BHATTI, A. R. - Snake venom and their cross-reactivity: a review. **Biochem Cell Biol**, 67 (9): 597-601, 1989.
- BIEBER, A.L. - Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: LEE, C.Y. ed. - **Snake venoms: Handbook of experimental pharmacology**. New York, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 1979. v. 52.
- BJARNASON, J. & FOX, J. W. - Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, 2: 325-372, 1994.
- BOLAÑOS, R. - Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centroamerica. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 1984.
- BOLAÑOS, R. & CERDAS, L. - Produccion y control de sueros antiofidicos em Costa Rica. **Bol Of Sanit Panam**, 88 (33): 189-196, 1980.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1998. p. 33-36.

- BRAZIL, V. La défense contre l'ophidisme. 2 ed. São Paulo, Pocaí Weiss, 1914.
- BÜLBRING, E. - Observations on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. **Brit J Pharmacol**, 1: 38-61, 1946.
- CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**, New York Custom Publishing Associates, 1989, p. 90-153.
- CHANG, C. C. - The action of snake venoms on the nerve and muscle. In: **Snake Venoms**. LEE, C. Y. ed. Berlin: Springer, pp. 309-376, 1979.
- CHANG, C. C. & LEE, C. Y. - Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 144: 241-257, 1963.
- CHANGEAUX, J. P.; KASAI, M.; LEE, C. Y. - Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. **Proc Nat Acad Sci USA**, 67: 1241-1247, 1970.
- COELHO, L. K.; SILVA, E.; ESPOSITO, C.; ZANIN, M. - Clinical features and treatment of elapidae bites: report of three cases. **Human Exp. Toxicol**, 11: 135-138, 1993.

- COHEN, P.; DAWSON, J. H.; SELIGMAN JR., E. B. - Cross-neutralization of *Micrurus fulvius fulvius* (coral snake) venom by anti-*Micrurus carinicauda dumerilii* serum. **Am J Trop Med Hyg**, 13 (2): 308-310, 1968.
- CONDREA, E. - Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytoxins. **Experientia**, 30: 121-129, 1974.
- COUTEAUX, R.; MIRA, J.C.; D'ÁLBIS, A. - Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. **Biol Cell**, 62: 171-182, 1988.
- CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; VITAL BRAZIL, O. - Ultrastructural changes in the neuromuscular junction of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. **Mem Inst Butantan**, 47/48: 95-105, 1983/84.
- DALÓ, N.; PERALES, J.; MUNÕS, R.; MARTINEZ, B.; MOUSSATCHÉ, H. - Neuromuscular blocking activity of a fraction isolated from the venom of coral snake, *Micrurus nigrocinctus*. **Toxicon**, 27 (1): 40, 1989.
- DUCHEN, L.W.; EXCELL, B.J.; PATEL, R.; SMITH, B. - Changes in motor endplates resulting from muscle fibre and regeneration. A light and electron microscopic study of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. **J Neurol Sci**, 21: 391-417, 1974.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FATT, P. & KATZ, B. - An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. **J Physiol**, **115**: 320-370, 1951.

FLETCHER, J. E.; HUBERT, M.; WIELAND, S. J.; GONG, Q. H.; JIANG, M. S. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. **Toxicon**, **34**: 1301-1311, 1996.

GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. N. - The isolated chick *biventer cervicis* nerve muscle preparation. **Brit J Pharmacol**, **15**: 410-415, 1960.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D. M.; HAWGOOD, B. J.; EKDER, H. Y. - Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, **22**: 85-98, 1984.

GOULARTE, F. C.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; COGO, J. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. **Toxicon**, **33**: 679-689, 1995.

GOULARTE, F. C.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - Electrophysiological and ultrastructural effects of *Micrurus nigrocinctus* venom on the neuromuscular junction. **Toxicon**, **34**: 315, 1996.

- GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L.; ARROYO, O.; ROJAS, E.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A. - Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente "terciopelo" (*Bothrops asper*). **Acta Méd Costarric**, **25**: 255-262, 1982.
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Y. - Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem Inst Butantan**, **51**: 211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Y. - Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, **33**: 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; PORTILLA, E.; CERDAS, L.; ROJAS, E. - Local effects induced by coral snakes venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. **Toxicon**, **21**: 777-783, 1983.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, E.; SILVA, N. J.; NUNES, J. - Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). **Toxicon**, **30**: 1299-1302, 1986.
- HARRIS, J. B. & CULLEN, M. J. - Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc Rev**, **3**: 153-211, 1990.

HARRIS, J. B.; JOHNSON, M.A.; KARLSSON, E. - Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, **2**: 383-404, 1975.

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

HARRIS, J.B. & MALTIN, C.A. - Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin, of the Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*. **Br J Pharmac**, **76**: 61-75, 1982.

HARVEY, A. L. - Cytolytic toxins. In: SHIER, W. R. & MEBS, D., eds. **Handbook of Toxinology**. New York, Marcel Dekker, 1990. p. 48-53.

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

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

HELUANY, N.F. - Ação da peçonha de *Micrurus surinamensis* na junção neuromuscular e no músculo esquelético. Piracicaba, 2000. Faculdade de Odontologia, tese de Doutorado, Unicamp.

HOMMA, M. & TU, A.T. - Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br J Exp Path**, **52**: 538-542, 1971.

IWANAGA, S. & SUSUKI, T. - Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. ed. - **Snake venoms: Handbook of Experimental Pharmacology**. New York, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, , 1979. p. 41-55. v.52.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

JENKINSON, D. - The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate. **J Physiol**, **152**: 309-324, 1960.

JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. - Biochemistry of snake venoms. **Clin Sci**, **65**: 389-431, 1970.

JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. - Reptile Toxins. In: **Biology Data Book. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), U.S.A.**, p. 697, 1973. v. 2.

KELLAWAY, S. H.; CHERRY, R. O.; WILLIAMS, F. E. - The peripheral action the Australian snake venoms. II. The curare-like action in mammals. **Australian J Exper Biol Med Sci**, **10**: 181-194, 1932.

- KOCHVA, E. - The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, 25:65-106, 1987.
- LAI, M.K.; WEN, C.Y.; LEE, C.Y. - Local lesion caused by cardiotoxin isolated from Formosan cobra venom. **J Formosan Med Assoc**, 71: 328, 1972.
- LEE, C. Y. & CHANG, C. C. - Modes of action of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. **Mem Inst Butantan**, 33: 555-572, 1966.
- LEE, C. Y., CHANG, C. C.; CHEN, Y. M. - Reversibility of neuromuscular blockade by neurotoxins from Elapid and Sea snake venoms. **J Formosan Med Assoc**, 71: 344-350, 1972.
- LEE, C. Y.; HO., C. L.; EAKER, D. - Cardiotoxin-like action of a basic phospholipase A isolated from *Naja nigricolis* venom. **Toxicon**, 15: 355-356, 1977.
- MACDONELL, J. G.; BLUM, M. S.; BUREN, W. F.; WILLIAMS, R. N.; FALES, H. M. - Fire ants venoms: Chemataxonomic correlations with alkaloidal compositions. **Toxicon**, 14: 69, 1976.
- MCCOLLOUGH, N. C. & GENNARO, J. F. - Coral snake bites in the United States. **J Florida Med Assoc**, 49: 968-972, 1963.

- MEBS, D. - Myotoxic activity of phospholipase A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon**, **24**: 1001-1008, 1986.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. - Local necrositing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, **21**: 393-404, 1983.
- MEBS, D. & OWNBY, C. L. - Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther**, **48**: 223-236, 1990.
- MELO, P.A. & OWNBY, C.L. - Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. **Toxicon**, **34**: 653-669, 1996.
- MOCHCA-MORALES, J.; MARTIN, B. M.; ZAMUDIO, F. Z.; POSSANI, L. D. - Isolation and characterization of three toxic phospholipases from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. **Abstracts, Third Symp. On Animal, Plant and Microbial Toxins**, Int. Soc. On Toxinology, Pan Amer. Sect., 1990, p. 95.
- MOUSSATCHÉ, H. & MELENDEZ, T. - Some pharmacological observations with Elapidae and Crotalidae snake venom in the guinea-pig denervated diaphragm on the specificity of the cholinergic blockade by their venoms. **Rev Bras Biol**, **39**: 605-610, 1979.

- MYERS, C. W. & DALY, J. W. - Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolution by studies of poison-dart frogs (*Dendrobatidae*). **Bull Amer Museum Nat Hist**, 153: 175, 1976.
- OHSAKA, A. - Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: LEE, C. Y. ed. - **Snake venoms: Handbook of Experimental Pharmacology**. New York, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, , 1979. p. 480-546. v.52.
- OWNBY, C. L. - Locally-acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: SHIER, T. W. & MEBS, D. eds - **Handbook of Toxinology**, New York, Marcel Dekker, 1990. pp. 602-654.
- OWNBY, C. L.; FLETCHER, E.; COLBERG, T.R. - Cardiotoxin I from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle *in vivo*. **Toxicon**, 31: 697-709, 1993.
- OWNBY, C. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; COLBERG, T. R.; ODELL, G. V. - Quantification of myonecrosis induced by myotoxin *a* from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon**, 20: 877-885, 1982.
- PARRISH, H.M. & KHAN, M. S. - Bites by coral snakes: report of 11 representative cases. **Am J Med Sci**, 253: 561, 1967.

- PERKINS, J.R. & TOMER, K.B. - Characterization of the lower-molecular-mass fraction of venoms from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* and *Micrurus fulvius* using capillary-electrophoresis electrospray mass spectrometry. **Eur J Biochem**, **233**: 815-827, 1995.
- PETTIGREW, L.C. & GLASS, M. - Neurologic and complications of a coral snake bite. **Neurology**, **35**: 589-592, 1985.
- POSSANI, L. D.; ALAGÓN, A. C.; FLETCHER, P. L Jr.; VARELA, M. J.; JULIÁ, J. Z. - Purification and characterization of a phospholipase A₂ from the venom of the coral snake, *Micrurus fulvius microgalbineus*. **Biochem J**, **179**: 603-606, 1979.
- RAMSEY, C. F. & KLICKSTEIN, G. D. - Coral snake bite: report of a case and suggested therapy. **J Am Med Ass**, **182**: 949-951, 1962.
- ROSENBERG, P. Phospholipases. In: (SHIER, T. W. & MEBS, D. eds) **Handbook of Toxinology**, New York, Marcel Dekker, 1990. pp. 68-223.
- ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BÜCHERL, E. E. & DEULOFEU, V., eds. **Venomous Animals and Their Venoms**. New York, Acad. Press, 1971. pp. 345-384. v. 2.

- ROSSO, J.P.; VARGAS-ROSSO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P.E. – Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. **Eur J Biochem**, **238**: 231-239, 1996.
- ROZE, J.A. - New species and subspecies of coral snakes, genus *Micrurus* (Elapidae), with notes on type specimens of several species. **Am Mus Novitates**, **2932**: 1-15, 1989.
- ROZE, J. A. - New world coral snake (ELAPIDAE): a taxonomic and biological summary. **Mem Inst Butantan**, **46**: 305-338, 1982.
- ROZE, J. A. & BERNAL-CARLO, A. - Las serpientes corales venenosas del genero *Leptomicrurus* (serpentes Elapidae) de Suramérica com descripción de una nueva subspécie. **Boll Mus Reg Sci Nat**, **5**: 573-608, 1987.
- RUSSEL, F. E. - Bites by the Sonoran coral snake, *Micruroides euryxanthus*. **Toxicon**, **5**: 39, 1967.
- SHAW, C. E.-The coral snakes, genera *Micrurus* and *Micruroides*, of the United States and Northern Mexico. In: BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E. E. eds. **Venomous animals and their venoms**. New York, Academic Press, 1971, pp. 157-172. v. 2.

- SHIAU LIN, S.Y.; HUANG, M.C.; TSENG, W.C.; LEE, C.Y. - Comparative studies on the biological activities of cardiotoxin, melitin and prymnesin. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **287**: 349-358, 1975.
- SHIAU LIN, S.Y.; HUANG, M.C.; LEE, C.Y. - Isolation of cardiotoxic and neurotoxic principles from the venom of *Bungarus fasciatus*. **J Formosan Med Assoc**, **71**: 350, 1972.
- SNYDER, G. K.; RAMSEY, H. W.; TAYLOR, W. J.; CHIOU, C.Y. - Neuromuscular blockade of chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparations by a fraction from coral snake venom. **Toxicon**, **11**: 505-508, 1973.
- TAN, N. H. & PONNUDURAI, G. - The biological properties of venoms of some american coral snakes (genus *Micrurus*). **Comp Biochem Physiol**, **101B** (3): 471-474, 1992.
- TAN, N. H. & SAIFUDDIN, M. N. - Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. **Toxicon**, **27**: 689-695, 1989.
- THEAKSTON, R.D.G. & WARRELL, D.A. - Antivenoms: a list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. **Toxicon**, **29**: 1419-1470, 1991.
- TU, A.T. - **Venoms: chemistry and molecular biology**. New York, (WILEY & SONS eds.), 1977. p. 560.

Referências Bibliográficas

- TU, A.T. - Tissue damaging effects by snake venoms: hemorrhage and myonecrosis. In:
TU, A.T. ed - **Handbook of Natural Toxins: Reptile Venoms and Toxins**. New
York, Marcel Dekker, 1991. pp. 297-338. v. 5.
- VITAL BRAZIL, O. - Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. **O Hospital**, **68**
(4):183-224, 1965.
- VITAL BRAZIL, O. - Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev Ass Med Brasil**, **26** (6): 212-
218, 1980.
- VITAL BRAZIL, O.-Peçonhas. In: CORBETT, C.E., ed. - **Farmacodinâmica**. Guanabara
Koogan, Rio de Janeiro, 1982. pp. 1044-1074.
- VITAL BRAZIL, O. - Coral snakes venoms: mode of action and pathophysiology of
experimental envenomation. **Rev Inst Med Trop**, **29**: 119-126, 1987.
- VITAL BRAZIL, O. & FONTANA, M. D. - Ações pré-juncionais e pós-juncionais
da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular.
Mem Inst Butantan, **47 / 48**: 13-26, 1983/84.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D.; HELUANY, N. F. - Mode of action of the
coral snake *Micrurus spixii* venom at the neuromuscular junction. **J Natural
Toxins**, **4** (1): 19-33, 1995.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; PELLEGRINI FILHO, A. - Physiologie et thérapeutique de l'énvenomation causée par le venin de *Micrurus frontalis*. **Mem Inst Butantan**, 40/41: 221-240, 1976/77.

WEIL, C.S. - Tables for the convenient calculation of median-effective dose (LD₅₀ and ED₅₀) and instruction in their use. **Biometrics**, 8: 249-263, 1952.

WEIS, R. & McIsaac, R. J. - Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. **Toxicon**, 9: 219-228, 1971.

De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas

Referências Bibliográficas: NB 66/78 (BIREME)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE