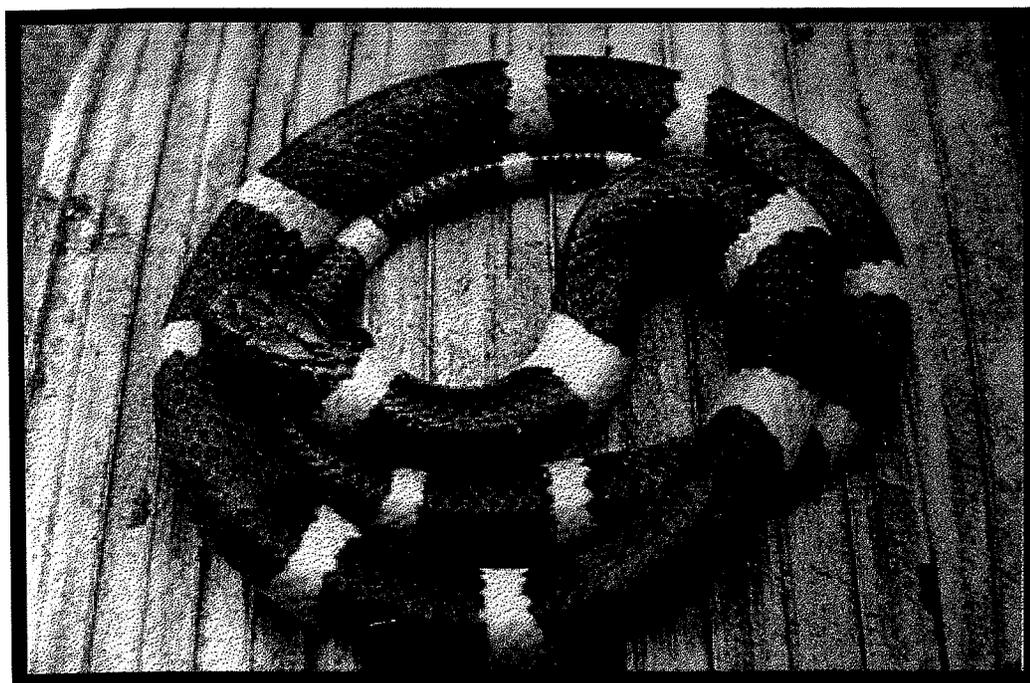

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Nadim Farah Heluany Sobrinho

**AÇÃO DA PEÇONHA DE *Micrurus surinamensis*
NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO**



Piracicaba
UNICAMP
2000

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

NADIM FARAH HELUANY SOBRINHO

**AÇÃO DA PEÇONHA DE *Micrurus surinamensis*
NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO**

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em
Odontologia, na área de
Farmacologia, Anestesiologia e
Terapêutica.**

Orientador: Prof. Emérito Dr. Oswaldo Vital Brazil

**Banca Examinadora: Prof. Dra. Júlia Prado Franceschi
Prof. Dr. Marcos Dias Fontana
Prof. Dr. José Ranali
Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CGPC-036/83
CPC, 15/05/2000

Oswaldo Vital Brazil
Assinatura do Orientador

**Piracicaba
UNICAMP
2000**

2008403

UNIDADE ISC
L.º CHAMADA: T/UNICAMP
H369a
EX. 41457
PREÇO 278/00
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 11-07-00
N.º CPD _____

CM-00143168-2

Ficha Catalográfica

H369a Heluany Sobrinho, Nadim Farah.
Ação da peçonha de *Micrurus surinamensis* na junção neuromuscular e no músculo esquelético. / Nadim Farah Heluany Sobrinho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
74p. : il.

Orientador : Prof. Emérito Dr. Oswaldo Vital Brazil.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Venenos de cobra. 2. Hemorragia. 3. Bloqueio nervoso. 4. Bloqueadores neuromusculares. 5. Fosfolipase A. I. Brazil, Oswaldo Vital. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2000, considerou o candidato NADIM FARAH HELUANY SOBRINHO aprovado.

1. Prof. Dr. OSWALDO VITAL BRAZIL

2. Profa. Dra. JULIA PRADO FRANCESCHI

3. Prof. Dr. MARCOS DIAS FONTANA

4. Prof. Dr. JOSE RANALI

5. Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPA

Dedicatória

A Deus pelo dom da vida.

A Maria Stela, minha esposa e amiga querida cuja fibra, empenho, dedicação e principalmente sua espiritualidade foram imprescindíveis em todos os momentos, para que esse empreendimento se tornasse realidade. Te amo.

Aos meus filhos André Luís e Daniel Luís que juntos incentivaram a realização deste trabalho. Deus os abençoe.

Aos meus pais Waldomiro e Vitória, minhas irmãs Rosa Vera, Salua Léia e Regina Célia, por um ideal.

Agradecimento Especial

*Ao Professor Emérito e cientista **Dr. Oswaldo Vital Brazil**, a quem devo meu início nos caminhos da pesquisa, pela dedicação constante, pela paciência, pelo incentivo, pelos conselhos e pela orientação na execução desta Tese.*

Pelo privilégio do seu convívio nessas quase quatro décadas e pela grande amizade, obrigado.

Professor Vital:

Que o seu exemplo de tenacidade e determinação e perseverança em prol da ciência seja estímulo permanente para os jovens que ora trilham esta caminhada.

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi** pelo incentivo e amizade de longa data, que continue sempre inovando os caminhos da educação e da ciência. Não pare.

À **Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni**, não há como expressar o tamanho de minha gratidão e de meu respeito.

Ao **Prof. Dr. Marcos Dias Fontana**, pela orientação e sugestões oportunas oferecidas durante a execução deste trabalho, e pela sua amizade.

Ao **Prof. Dr. José Ranali**, sempre presente na evolução da minha vida científica.

Ao **Prof. Thales Rocha de Mattos Filho**, que no decorrer do tempo me orientou nas diversas etapas do curso. Uma espiritualidade. Considero um presente autêntico.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade**, por suas valiosas sugestões. Obrigado.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luís Rosalen**, coordenador do curso de pós-graduação, pelo seu desempenho em favor dos interesses do curso e conduta imparcial na coordenação do mesmo. Continue.

Ao **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo** que com toda sua juventude, humildade e aguçada inteligência tenha um futuro promissor. Persista sempre.

Ao biólogo e amigo **Gildo Bernardo Leite**, que tornou possível a existência deste trabalho, o meu agradecimento sincero.

À sempre simpática **Gislaine Elias Alípio**, secretária do Depto. de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, por sua dedicação e desempenho, e aos seus axiliares **Rita, Eliseu**, bem como **Adilson, Toninho e Miguel** que, dentro de suas possibilidades, sempre colaboraram.

À **Regina Célia Longo**, pelo apoio. Um carinho.

À **Srta. Maria Elisa dos Santos**, secretária do Depto. de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por sua solicitude.

Ao amigo **Prof. Dr. Paulo Friedrich Bühlrheim**, do Centro de Ofidismo do Instituto de Medicina Tropical da Amazônia que, não medindo esforços, enviou-me parte de veneno para o término deste trabalho.

Ao amigos especiais **Prof. Dr. José Fernando G. Faigle**, **Dr. João Rui O. Muniz** e **Profa. Maria Eugênia G. Porto**, do compromisso assumido em tempos passados, consolidando-o neste presente e à finalizar num breve futuro, mediante nossos esforços alicerçados na amizade, rompa todas as barreiras para que possamos iniciar o terceiro milênio com um novo conceito dentro da ciência, em prol do Homem e sob o manto de Deus.

*Aos professores do Depto. de Ciências Fisiológicas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, **Prof. Dr. Ernesto José D'Ottaviano, Prof. Dr. Pedro Paulo Barros, Profa. Dra. Maria José Costa S. Moura, Prof. Wilson Roberto Paschoini, Profa. Olga Narcisa P. Paschoini**, pela oportunidade, amizade e incentivo demonstrados durante a elaboração deste trabalho.*

Aos amigos docentes e demais funcionários do Depto. de Farmacologia da UNICAMP, do Depto. de Farmacologia da F.O.P. e do Depto. de Fisiologia e Biofísica da PUC-Campinas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta tese.

*“Agarramo-nos às coisas terrenas,
enquanto o portão do Coração de
Deus permanece escancarado.
Pisamos o pão da vida, enquanto a
fome corrói nossos corações. Como
a Vida é boa para o Homem, mas
quão longe está o Homem da Vida.”*

*Kahlil Gibran
“A Voz do Mestre”*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	3
RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO DIAFRAGMA DE RATO.....	17
3.2. HEMIDIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO DE RATO	19
3.3. PREPARAÇÃO NERVO-MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTOS	20
3.4. ELETROFISIOLOGIA - ESTUDO DO EFEITO DO VENENO NO POTENCIAL DE REPOUSO E NO DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (P.P.T.M.) EM DIAFRAGMAS DE RATO.....	21
3.4.1. <i>Descrição sumária do circuito</i>	22
3.4.2. <i>Medida da resistência do microeletrodo</i>	26
3.4.3. <i>Potencial de repouso</i>	26
3.4.4. <i>Potencial de placa terminal em miniatura (p.p.t.m.)</i>	27
3.5. <i>Drogas e sais usados</i>	28
3.5.1. VENENO DE MICRURUS SURINAMENSIS	29
3.6. ESTATÍSTICA.....	29
4. RESULTADOS	31
4.1. DOSE MEDIANA LETAL EM CAMUNDONGOS; SINTOMAS.....	31

4.2. EFEITOS SOBRE A TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR E SOBRE O MÚSCULO NA PREPARAÇÃO NERVO-FRÊNICO DIAFRAGMA DE RATO; AÇÃO ANTAGÔNICA DA NEOSTIGMINA E DA 3,4-DIAMINOPIRIDINA.	32
4.3. EFEITOS SOBRE AS RESPOSTAS À ACETILCOLINA (ACH) E, À EXCITAÇÃO ELÉTRICA NO HEMIDIAFRAGMA DESNERVADO DE RATO.	41
4.4. EFEITOS SOBRE O POTENCIAL DE REPOUSO DA MEMBRANA DAS FIBRAS MUSCULARES DO DIAFRAGMA DE RATO.	43
4.5. EFEITOS SOBRE OS POTENCIAIS DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA (PS.P.T.M.); AÇÃO ANTAGÔNICA DA NEOSTIGMINA E DA 4-AMINOPIRIDINA (4-AP).....	45
4.6. EFEITOS SOBRE A TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR, SOBRE AS CONTRATURAS PROVOCADAS PELA ACETILCOLINA (ACH), CARBACOL E K^+ E SOBRE À EXCITAÇÃO ELÉTRICA DIRETA NA PREPARAÇÃO NERVO-MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTOS; INFLUÊNCIA DO Ca^{2+} SOBRE A CONTRATURA DO BIVENTER CERVICIS INDUZIDA PELO VENENO.	49
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	63
7. SUMMARY.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

Lista de Abreviaturas

μg	Micrograma
3,4-DAP	3,4-Diaminopiridina
4-AP	4-Aminopiridina
Ach	Acetilcolina
CALIB.	Calibrador
cm	Centímetros
DL ₅₀	Dose mediana letal
DLF	Fator lítico direto
dTc	d-Tubocurarina
E.P.M.	Erro padrão da média
g	Gramma
Hg	Mercúrio

Hz	Hertz
kg	Kilograma
M	Mol
MΩ	Megaohm
Me	Microeletrodo
Mês	Microeletrodos
mg	Miligrama
min	Minuto(s)
ml	Mililitro
mod.	Modelo
ms	Milisegundos
mV	Milivolt
NCBs	Bloqueadores não competitivos
Neo	Neostigmina
OSC	Osciloscópio
p.p.t.m.	Potencial de placa terminal em miniatura
PR	Potencial de Repouso
ps.p.t.m.	Potenciais de placa terminal em miniatura
Resist.	Resistência
TTX	Tetrodotoxina
V	Volts

Lista de Ilustrações

Tabela 1	Efeito do veneno sobre o Potencial de Repouso no diafragma de rato.	44
Figura 1	Distribuição geográfica da <i>Micrurus surinamensis</i> .	12
Figura 2	Cobra coral <i>Micrurus surinamensis</i> .	13
Figura 3	Eletrofisiologia – Esquema do Circuito.	25
Figura 4	Preparação nervo frênico-diafragma de rato – bloqueio direto e indireto.	34
Figura 5	Gráfico – bloqueio 80% do diafragma de rato com estímulo elétrico em preparações curarizadas e não-curarizadas.	35
Figura 6	Efeito da neo no bloqueio produzido pela peçonha de <i>M. surinamensis</i> no diafragma de rato.	38

Figura 7	Efeito da 3,4-DAP no bloqueio produzido pela peçonha no diafragma de rato.	39
Figura 8	Gráfico do bloqueio dos “twitches” pelo veneno e o efeito do antagonismo da 3,4-DAP.	40
Figura 9	Preparação hemidiafragma desnervado de rato – reversão do bloqueio da resposta à Ach.	42
Figura 10	Ação do veneno sobre os ps.p.t.m. e o efeito do antagonismo da Neostigmina.	47
Figura 11	Ação do veneno sobre os ps.p.t.m. e o efeito do antagonismo da 4-DAP.	48
Figura 12	Ação do veneno no músculo biventer cervicis. 1. Resposta à contratura produzida pelo K ⁺ e Ach; 2. Em preparações pré-tratadas com dTc; 2. Em preparações sem estímulos.	51
Figura 13	Gráfico da ação contraturante do veneno sobre o músculo biventer cervicis de pintos. Efeito antagônico do MgSO ₄ em preparações pré-tratadas com dTc e normal.	52
Figura 14	Ação do veneno sobre a preparação nervo-músculo biventer cervicis sem estímulos. Antagonismo pelo MgSO ₄ .	53
Figura 15	Ação do veneno sobre a preparação nervo-músculo biventer cervicis com estímulos indiretos na presença de alto teor de Ca ²⁺ .	54

Resumo

O veneno da *Micrurus surinamensis*, uma cobra coral da região amazônica, induz bloqueio neuromuscular nas preparações nervo frênico-diafragma de rato e nervo-músculo biventer cervicis de pintos. O veneno deprime a tensão das respostas do diafragma à estimulação direta, não deprimindo, entretanto, a do biventer cervicis. Deve conter uma ou mais toxinas pós-sinápticas curaremiméticas, uma vez que os potenciais de placa terminal em miniatura (ps.p.t.m.) bloqueados pelo veneno reapareceram após a adição da neostigmina ao banho. Deve haver também no veneno toxina ou toxinas que induzem a dessensibilização do receptor da placa terminal, fato demonstrado

pelo efeito antagônico da 4-aminopiridina (4-AP) sobre o bloqueio dos ps.p.t.m. induzido pelo veneno. A reversibilidade e o efeito antagônico da neostigmina e da 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) apenas parciais nas preparações nervo frênico-diafragma de rato e biventer-cervicis de pintos sugere a presença de neurotoxina pós-sináptica irreversível ou de neurotoxinas pré-sinápticas no veneno. A ação contraturante do veneno, mais evidente no músculo biventer-cervicis de pintos, não abolida pela curarização da preparação mas suprimida pela elevação da concentração de cálcio na solução nutritiva ou adição de sulfato de magnésio ($MgSO_4$), e a ação despolarizante das membranas das fibras do diafragma mostram que o veneno contém constituintes de ação semelhante à das cardiotoxinas. Portanto, os efeitos neuromusculares e miotóxico do veneno de *M. surinamensis* resultam de ações de um conjunto de toxinas, que ocorrem em outros venenos de cobras corais. É a primeira vez que ações semelhantes à das cardiotoxinas é identificada em espécies de *Micrurus* sul-americana.

1. INTRODUÇÃO

As cobras corais são os representantes da família *Elapidae* no Novo Mundo. Encerram os gêneros *Micruroides* e *Micrurus*. O gênero *Micrurus* compreende cerca de 120 espécies e subespécies, segundo [ROZE (1982); CAMPBELL & LAMAR (1989)]. Estão distribuídas desde o Sul dos Estados Unidos até a América do Sul, onde apenas no Chile não são encontradas. São as serpentes do gênero *Micrurus* as cobras corais responsáveis por acidentes de envenenamento no homem. Os acidentes entretanto, são pouco freqüentes, em razão de estas serpentes apresentarem hábitos subterrâneos, sendo além disso esquivas e pouco agressivas.

Segundo o Programa Nacional de Ofidismo do Ministério da Saúde do Brasil, dos 70.600 acidentes ofídicos, no período de junho de 1986 à dezembro de 1989, apenas 0,43%, (333) são atribuídos às corais (RESENDE et al., 1989; Ministério da Saúde, 1990). Em São Paulo dentre as 4.685 notificações recebidas de acidentes, onde consta o gênero a que pertencia a serpente, apenas 1,1% foram causados por *Micrurus* (RIBEIRO et al., 1993). Embora pouco freqüentes, os acidentes, regra geral, são severos, dada a grande toxicidade da peçonha .

Segundo VITAL BRAZIL (1982), as características das peçonhas elapídicas são as seguintes:

- apresentam elevada toxicidade, muito superior, regra geral, à das serpentes solenóglifas;
- causam paralisia flácida e, em geral, morte por insuficiência respiratória aguda;
- exercem pequena ou nenhuma atividade proteolítica;
- não provocam hemorragias ou exercem ação coagulante, com exceção de elapídios australianos;
- não liberam bradicinina.

Nos acidentes causados por cobras corais, além da paralisia motora e dos músculos da respiração, já citados, ocorrem sialorréia e, na região da mordedura, perturbações da sensibilidade (dor, parestesia, anestesia). Mionecrose é induzida por várias espécies de *Micrurus* na região de inoculação da peçonha, com aumento dos níveis plasmáticos de creatina quinase (GUTIERREZ et al., 1983/1992). A peçonha de *Micrurus* comumente apresenta, atividade fosfolipásica A₂ (AIRD & DA SILVA, 1991).

Nos acidentes, não são observadas mioglobínúria, oligúria ou anúria. Facies semelhante ao que apresentam os pacientes de miastenia grave e nos intoxicados pelo curare e denominado por ROSENFELD (1971) “fácies neurotóxico”, é sintoma precoce que foi registrado, pela primeira vez, por BRAZIL & BRAZIL FILHO (1933). Consiste em ptose palpebral, perturbações da visão (diplopia, turvação da visão, oftalmoplegia), ptose mandibular e paralisia de outros músculos faciais. Em casos graves, há paralisia da laringe e da faringe, impossibilitando o paciente de falar e de deglutir.

Em razão de induzir paralisia, a peçonha das corais é considerada neurotóxica (BRAZIL, 1914; ROSENFELD, 1971) como a da cascavel sul-americana.

A causa da paralisia motora e respiratória induzida pela peçonha das *Micruri*, é a sua ação bloqueadora da transmissão neuromuscular (VITAL BRAZIL & BARRIO, 1950a, 1950b; VITAL BRAZIL, 1963; PELLEGRINI FILHO & VITAL BRAZIL, 1976; VITAL BRAZIL, 1976/1977). Este bloqueio se deve:

1) a uma ação pós-juncional exclusiva, através da interação de sua ou suas neurotoxinas, com o receptor nicotínico da placa terminal como a peçonha de *M. frontalis* (VITAL BRAZIL et al., 1976/1977) e, provavelmente, como a de *M. lemniscatus* (VITAL BRAZIL, 1963);

2) a ações pós e pré-juncionais, através da interação com os receptores nicotínicos da placa terminal e inibição da liberação evocada do neurotransmissor como a peçonha de *M. corallinus* (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/1984);

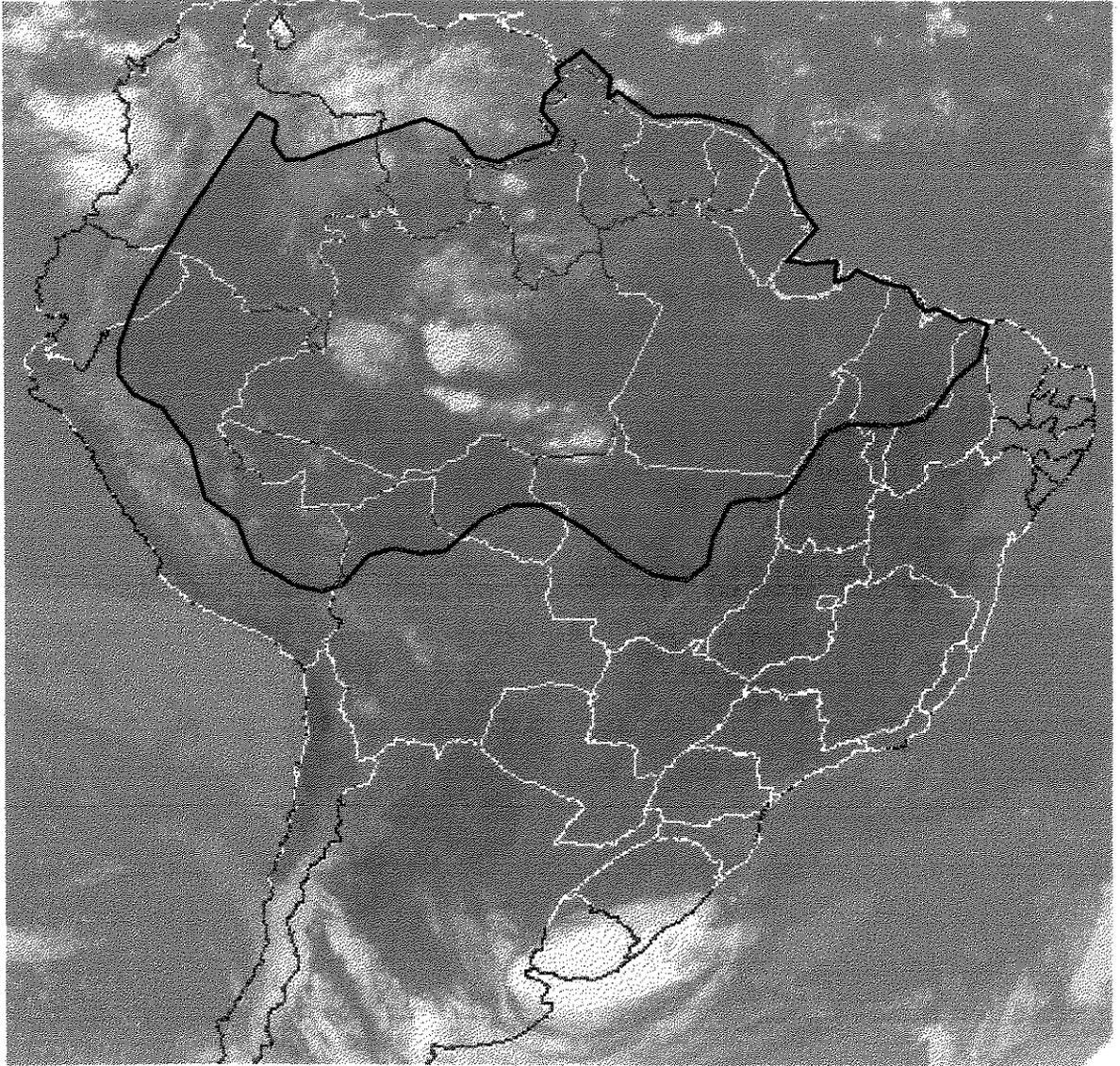
3) a ações pós-juncional e despolarizante da membrana da fibra muscular como a peçonha de *M. fulvius* (WEISS & MCISAAC, 1971; SNYDER et al., 1973) e *M. nigrocinctus*, (DOLÔ et al., 1986; GOULARTE & RODRIGUES-SIMIONI, 1994);

4) a uma ação pós-juncional devida à dessensibilização do receptor da placa terminal e, possivelmente, a ações pré-juncional e

pós-juncional no sítio receptivo para a acetilcolina do receptor da placa terminal como a peçonha de *M. spixii* (VITAL BRAZIL et al., 1995).

A cobra coral *Micrurus surinamensis* distribui-se através do vale do Amazonas e alto dos rios Orinoco e Negro, abrangendo os países Colômbia, Equador, Peru, Brasil, Guianas e Venezuela (Figura 1). Seu nome vulgar em tupi é “boichumbeguaçu” e significa “cobra grande de focinho chato” (AMARAL, 1977). Tem tamanho médio de 740 mm podendo atingir até 1.125 mm. A cabeça é vermelha, larga, com suturas negras e tríades negras distintas, sendo o anel mediano largo. Dois anéis amarelos mais estreitos separa os anéis laterais estreitos. Uma faixa larga vermelha separa as tríades que variam em número de 5 a 8 (Figura 2).

Difere das outras corais por ter hábitos aquáticos, vivendo em lugares alagados (igapós), igarapés e em área da mata primitiva (HOGE & ROMANO, 1972; CUNHA & NASCIMENTO, 1978). Alimenta-se de peixes (CAMPBELL & LAMAR, 1989).



CAMPBELL & LAMAR, 1989

Figura 1: Distribuição da *M. surinamensis* - Vale do Amazonas e alto dos rios Orinoco e Negro, abrangendo os países da Colômbia, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Guianas e Venezuela.



CAMPBELL & LAMAR, 1989

Figura 2: Cobra coral *Micrurus surinamensis*, tamanho médio 740 mm, podendo atingir até 1.125mm. A cabeça é vermelha, larga, com suturas negras e tríades negras distintas, sendo o anel mediano largo. Dois anéis amarelos mais estreitos separa os anéis laterais estreitos. Uma faixa larga vermelha separa as tríades que variam em número de 5 a 8.

2. OBJETIVO

Estudo do modo de ação do veneno de *Micrurus surinamensis* na junção neuromuscular e no músculo esquelético.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação nervo frênico diafragma de rato

Ratos Wistar macho ou fêmea com peso entre 200 à 250 g, foram usados para a retirada do hemidiafragma esquerdo, após serem anestesiados pelo cloral hidratado (0,3 mg/g) e sacrificados por secção dos vasos cervicais.

Uma vez retirado o hemidiafragma com seu nervo frênico, foi fixado à um eletrodo-suporte e suspenso em uma cuba de 20 ml com solução de Tyrode (composição em mM: NaCl 136,8, KCl 2,7, CaCl₂

1,8, NaHCO₃ 11,9, MgCl₂ 0,25, NaH₂PO₄ 0,3, glicose 11,0). A preparação foi mantida à 37 °C e borbulhada com carbogênio à 5% (95% de O₂ e 5% de CO₂). As experiências foram sempre iniciadas após sua estabilização por um período de 30 min. Em todas as preparações isoladas do nervo frênico-diafragma de rato a técnica empregada foi a de BÜLBRING (1946).

Estimulou-se o nervo frênico com pulsos retangulares supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,05 Hz de frequência. A estimulação direta foi feita com pulsos de 80 V, 2 ms, 0,05 Hz, em preparações bloqueadas pela peçonha de *M. surinamensis* ou pela d-tubocurarina (dTc). Os pulsos foram gerados por estimulador Grass mod. S88 e as contrações registradas em fisiógrafo NARCO BIO-SYSTEMS mod. Narcotrace-40 através do transdutor F 60 isométrico, em acoplador universal mod.7189. Em algumas experiências foram registradas por transdutor isométrico LOAD CELL BG-10 Gm, em pré-amplificador universal acoplado ao fisiógrafo GOLD mod. RS 3400

3.2. Hemidiafragma cronicamente desnervado de rato

Hemidiafragmas esquerdos de ratos foram desnervados segundo técnica descrita por VITAL BRAZIL (1963). Quinze a trinta dias após a desnervação, os hemidiafragmas esquerdos foram retirados, montados em eletrodo especial e suspensos em cuba de vidro, com 20 ml de solução de Tyrode mantida à 37°C e borbulhada com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (técnica descrita em 3.1).

As contraturas do hemidiafragma foram produzidas pela adição de 1 a 4 µg/ml de acetilcolina (Ach) e registradas em fisiógrafo com transdutor isométrico. Excitava-se o diafragma com estímulos elétricos por períodos de 5 minutos, juntando-se a Ach ao banho 30 a 40 segundos após a cessação da estimulação elétrica.

Entre os períodos de estimulação, procedia-se à lavagem do diafragma desnervado. Com esse objetivo, substituía-se a solução de Tyrode de 5 em 5 minutos durante períodos de 30 min. A lavagem da preparação tinha início 30 a 60 segundos após a junção da Ach ao banho. A solução contendo a peçonha permanecia 30 minutos em

contato com o diafragma antes da estimulação elétrica e da junção da Ach ao banho.

3.3. Preparação nervo-músculo biventer cervicis de pintos

Músculos biventer cervicis de pintos (linhagem HY-Line W 36; 4 - 12 dias) foram preparados de acordo com o método de GINSBORG & WARRINER (1960). Suspenderam-se as preparações em cuba de 5 ml com solução de Krebs (composição em mM: NaCl 136,0, KCl 5,0, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 23,8 e glicose 11,0), à temperatura de 37 °C e borbulhamento com carbogênio à 5%.

A preparação foi estimulada indiretamente com pulsos retangulares supramaximais de 0,2 ms de duração e 0,05 Hz de frequência. Interrompia-se a estimulação durante a adição da Ach, carbacol e/ou do KCl ao banho. Em outras preparações, adicionou-se neostigmine, 3,4- diaminopiridina (3,4-DAP) ou 4-aminopiridina (4-AP) quando a preparação se encontrava em torno de 90% de bloqueio, após a adição do veneno.

A influência do Ca²⁺ foi investigada, mantendo a preparação banhada em solução de Krebs com alto Ca²⁺ (10 µg/ml), antes e após

a adição do veneno. A estimulação direta do músculo foi realizada com pulsos retangulares entre 60 a 80 V, 0,2 ms e 0,05 Hz, quando a preparação se achava bloqueada pelo veneno ou previamente curarizada, (dTc 10 µg/ml).

A peçonha foi também adicionada a preparações não estimuladas eletricamente, com ou sem TTX ou dTc e na vigência de seu efeito máximo contraturante, adicionava-se sulfato de magnésio (MgSO₄) - isento da água de hidratação ao banho. O tempo de equilíbrio em todas as preparações foi de 20 minutos.

3.4. Eletrofisiologia - Estudo do efeito do veneno no potencial de repouso e no de placa terminal em miniatura (p.p.t.m.) em diafragmas de rato

Utilizou-se a mesma técnica usada em (3.1) para a retirada do hemidiafragma esquerdo com um segmento do nervo frênico correspondente. A preparação, com sua face torácica voltada para cima, foi estendida e fixada horizontalmente por meio de alfinetes apropriados, em cuba acrílica revestida de resina e silicone ("Sylgard"), com 8 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de profundidade. A

cuba foi preenchida com 10 ml de solução de TYRODE, sendo borbulhada com carbogênio. Manteve-se o banho à temperatura ambiente (20 - 27° C).

Os potenciais foram captados através de microeletrodos (Mes) de vidro preenchidos com solução de KCl 3 M. Os Mes apresentaram resistência compreendida entre 5 - 25 MΩ (FATT & KATZ, 1951/1952). Foram preparados no próprio laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção utilizaram-se tubos de vidro apropriado e um "Microelectrode Puller" CPF, modelo 8104, Palmer.

3.4.1. Descrição sumária do circuito

O Me fixado em sua parte posterior a um suporte apropriado de acrílico. A fixação do Me na parte ântero-inferior do suporte é feita através de um tubo de aço inoxidável 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 pósteroinferior do suporte, um fio de platina é conectado à um seguidor catódico através de um fio condutor blindado (Figura 3). A conexão entre o Me e o fio de platina é feita através de um vaso comunicante,

preenchido com solução KCl a 3 M. Na parte superior do suporte, os orifícios do vaso comunicante são vedados por uma lamínula aderida através de uma delgada camada de vaselina sólida.

O suporte é fixo ao braço de um micromanipulador JENA acoplado a um microscópio estereoscópio ZEISS para aumento de até 40 vezes. Este equipamento permite realizar micro deslocamentos verticais e horizontais, controlando a introdução do Me nas fibras musculares para as medidas do potencial de repouso (PR) e captação dos potenciais de placa terminal em miniatura (NASTUK & HODGKIN, 1951; FATT & KATZ, 1951). O seguidor catódico é posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conecta-se ao canal do osciloscópio TEKTRONIX 5103 N com módulos 5A 22N "differential Ampl" e 5812 N "dual time base".

O eletrodo indiferente constituiu-se de um fio de platina incluído em tubo de vidro submerso em mercúrio (Hg), e preenchido com KCl 3 M onde colocou-se um tubo curvo (para adaptação à altura da cuba com solução nutritiva) preenchido com ágar-salina e ligado por meio de um fio condutor a um gerador de impulsos capaz de fornecer sinais de 100 ou 50 mV. A preparação e toda a aparelhagem empregada permaneciam no interior de uma gaiola de FARADAY montada sobre

uma mesa rígida, fixada no solo a fim de evitar vibrações. O circuito descrito está esquematizado de forma simplificada na Figura 3.

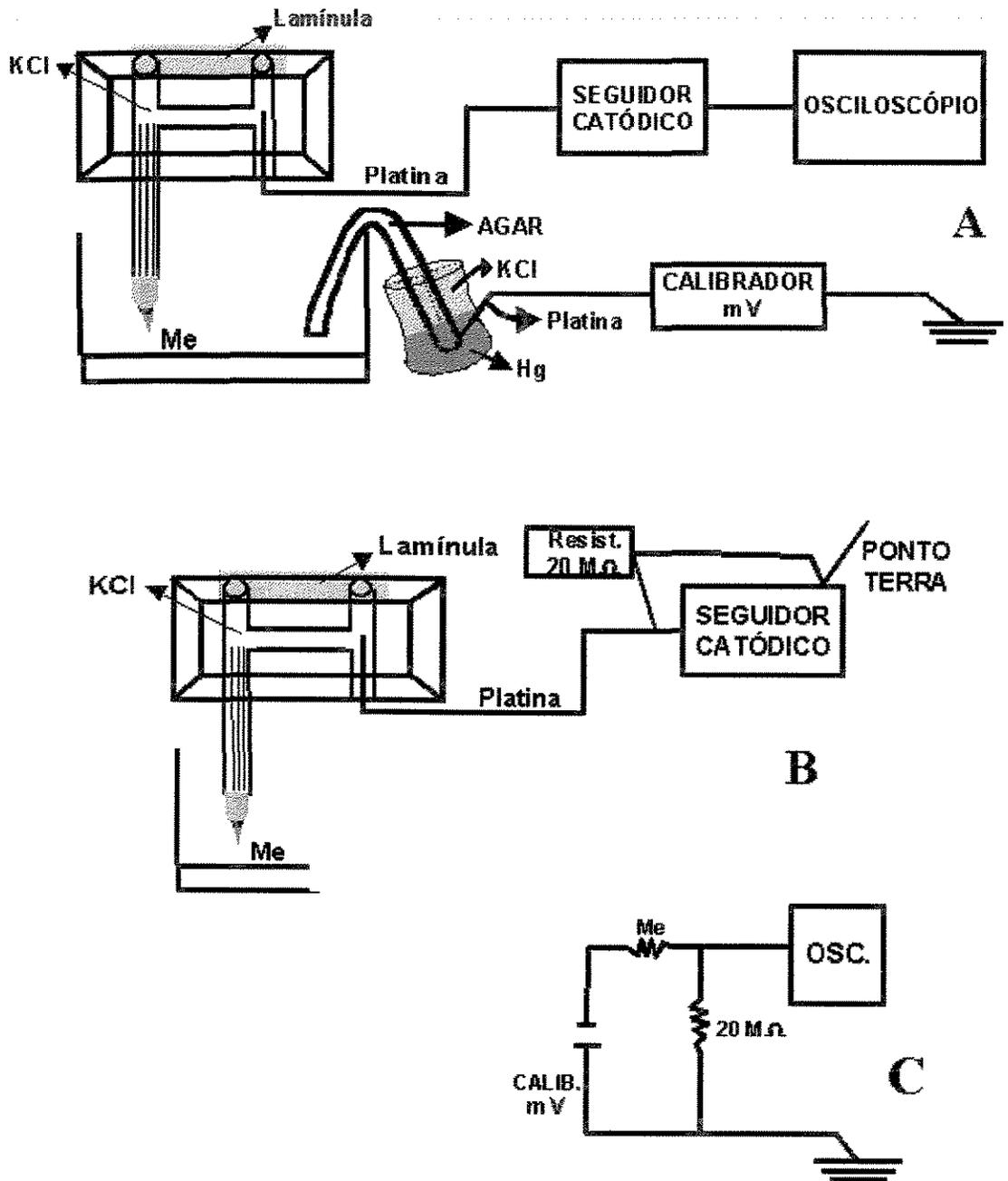


Figura 3 – Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais de repouso, de placa terminal em miniatura, de placa terminal e do potencial de ação.

A – circuito simplificado

B – circuito simplificado para a obtenção da resistência do Me

C – circuito para medida da resistência do Me

3.4.2. Medida da resistência do microeletrodo

Após ser retirado de seu suporte de estocagem, o Me era encaixado e preso em seu suporte. Fixava-se o conjunto no braço do micromanipulador, ligando-se o seguidor catódico ao suporte do Me, através de seu fio condutor.

Procedia-se a 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 cujas resistências não estavam compreendidas entre 5 – 25 M Ω .

3.4.3. Potencial de repouso

A determinação do potencial de repouso (PR) das fibras musculares fez-se da seguinte maneira: sob controle microscópico inseria-se o microeletrodo no interior de uma fibra muscular e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em 5 fibras distintas da região em períodos não superiores a 1 minuto, calculando-se a média aritmética das

leituras realizadas e o erro padrão. Antes da adição do veneno de *M. sunnamensis*, fizeram-se medidas do PR (tempo zero controle), repetidas em 5, 15, 30, 60 e 90 min após a adição da peçonha nas concentrações de 10 e 20 µg/ml.

3.4.4. Potencial de placa terminal em miniatura (p.p.t.m.)

Nas experiências em que se estudou o efeito da peçonha sobre a amplitude e frequência dos ps.p.t.m., o processo usado para a sua obtenção foi semelhante àquele usado para a obtenção dos PR. A diferença consistiu em implantar o Me junto à placa terminal motora ou o mais próximo da sua região e monitorar no visor do osciloscópio a frequência ou forma dos ps.p.t.m.. A forma era observada através do aumento da velocidade de varredura do sinal, de 2 ms para 10 ms . Quanto mais vertical a fase ascendente do p.p.t.m., mais próximo da placa se encontrava o Me (FATT & KATZ, 1951,1952).

Os ps.p.t.m. foram registrados através do osciloscópio (sensibilidade 1,0 mV/cm) e fotografados com filme "polaroid" por meio de "camera osciloscope" modelo C - 5A. A peçonha foi adicionada nas

doses de 5, 10 e 15 µg/ml, em doses únicas ou cumulativas, a 4-AP e a neostigmine foram adicionadas após o bloqueio total (desaparecimento dos ps.p.t.m.) doses de 20 µg/ml e 2 µg/ml respectivamente.

3.5. Drogas e sais usados

Metilsulfato de neostigmine (NEO) - ("Prostigmine[®]" Roche); cloreto de d-tubocurarina (dTc) (Abott), cloreto de carbamilcolina (carbacol), iodeto de acetilcolina (ACh), 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), 4-aminopiridina (4-AP) e tetrodotoxina (TTX) (Sigma), cloral hidratado (Reagen), bicarbonato de sódio (Na₂CO₃) (Carlo Erba), cloreto de cálcio (CaCl₂H₂O) (Merck), cloreto de magnésio (MgCl₂6H₂O) (Reagen), cloreto de sódio (NaCl) (Ecibra), cloreto de potássio (KCl) (Merck), fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄H₂O) (Merck), glicose (Merck), sulfato de magnésio (MgSO₄7H₂O) (Merck) e resina/silicone - Sylgard (Dow Corning CO.).

3.5.1. Veneno de *Micrurus surinamensis*

Parte do veneno de *M. surinamensis* foi adquirida da Sigma Company St. Louis, MO, USA, e parte foi gentilmente cedida por Paulo Friedrich Bülhrneim, do Centro de Ofidismo do Instituto de Medicina Tropical da Amazônia.

Na determinação de sua dose mediana letal usaram-se seis camundongos machos de 18 a 22 g por dose e quatro níveis de doses em progressão geométrica de razão 1,25.

Administram-se as soluções da peçonha por via venosa caudal, no volume de 0,5 ml. Fizeram-se cálculos para a determinação da DL₅₀ pelo procedimento de WEIL (1952).

Os sinais e sintomas do envenenamento dos animais foram observados durante quarenta e oito horas. Realizaram-se necropsias logo após a morte dos animais.

3.6. Estatística

Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão das médias (E.P.M.). Avaliou-se a significância da diferença entre duas

médias pelo test- t de Student, sendo considerada significativa quando igual ou maior de 95% ($p < 0,05$). Os resultados do PR foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Dose mediana letal em camundongos; sintomas

A dose mediana letal (DL₅₀) do veneno de *M. surinamensis* e seus intervalos a nível fiduciais de 95%, em camundongos, calculados pelo processo de WEIL (1952), foram os seguintes: 739 (558 a 982) µg/Kg.

Decorridos 40 a 60 minutos da injeção do veneno de *M. surinamensis*, produziu-se cianose da cauda, do focinho e das patas, além do aumento acentuado da hipotonia muscular. Observou-se também hemorragia nas narinas e genitália, e em alguns a exoftalmia

se fez presente. Sob a autópsia, os intestinos apresentaram-se cianóticos e observou-se hemorragia torácica e pulmonar. O sangue apresentou-se incoagulável.

Nos primeiros 5 a 30 minutos, observaram-se também hemorragia no local da injeção, hipotonia muscular e piloereção que perdurou em alguns camundongos por mais de 48 horas.

As mortes durante os primeiros 40 a 60 minutos foram devidas, provavelmente, às hemorragias. Nos animais que sobreviveram após esse tempo, observaram-se paralisia flácida, vasodilatação periférica, respiração diafragmática, e as mortes desses animais ocorreram, possivelmente, por parada respiratória.

4.2. Efeitos sobre a transmissão neuromuscular e sobre o músculo na preparação nervo-frênico diafragma de rato; ação antagônica da neostigmina e da 3,4-diaminopiridina.

A peçonha de *M. surinamensis* nas concentrações de 2,0, 10,0 e 20,0 µg/ml induziu 80% de bloqueio neuromuscular no diafragma estimulado indiretamente (pulsos de 0,05 Hz) em $198 \pm 17,7$ min

(n=3), $172,0 \pm 16,0$ min (n=6) e $78,0 \pm 15,0$ min (n=6) respectivamente (Figuras 4 e 5). Após bloqueio completo das respostas, a estimulação direta do diafragma (pulsos de 80 V, 2,0ms e 0,05 Hz) provocou contrações de tensões $69,8 \pm 21,8\%$, $44 \pm 5,9\%$ e $52 \pm 9,4\%$ inferiores às dos "twitches" obtidos antes da adição do veneno ao banho.

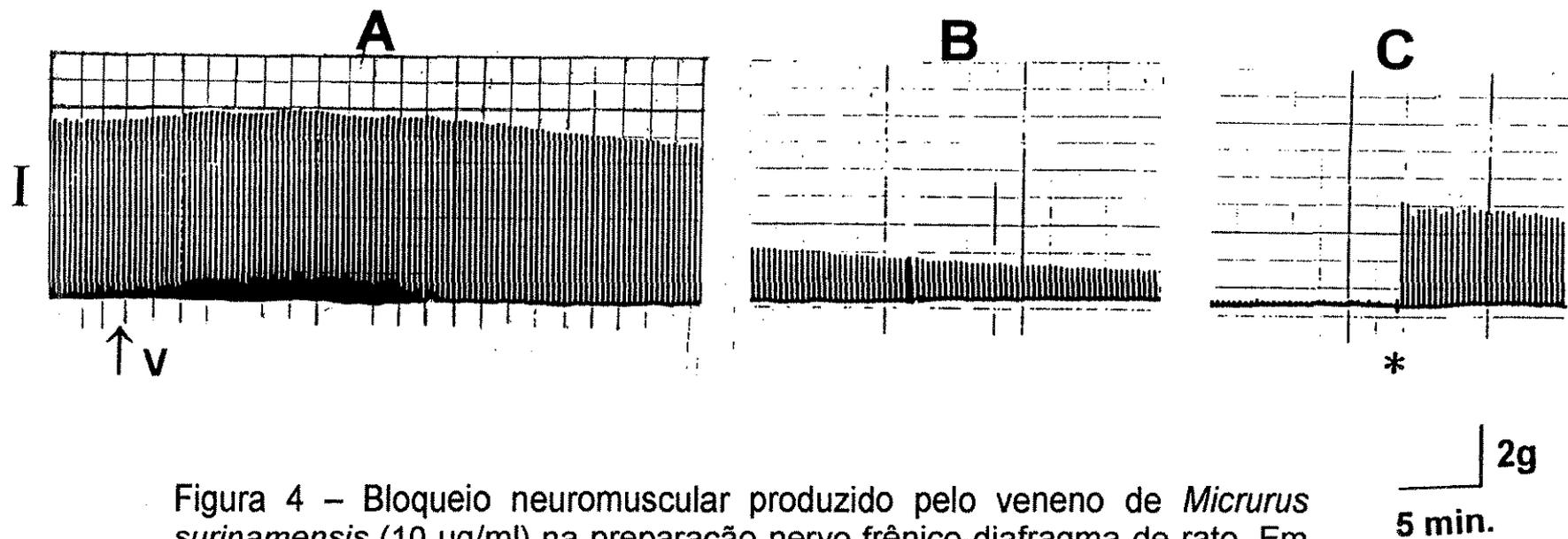


Figura 4 – Bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de *Micrurus surinamensis* (10 $\mu\text{g/ml}$) na preparação nervo frênico-diafragma de rato. Em (A) adição do veneno (V) seguido de discreto aumento da tensão dos “twitches”. Em (B) bloqueio de 85% após 180 min da adição do veneno ao banho. Estimulação indireta com pulsos supramaximais de 0,05 Hz e 0,2 ms. Em (C) estimulação direta (*) com pulsos de 0,05 Hz, 2 ms e 80 V, após bloqueio total.

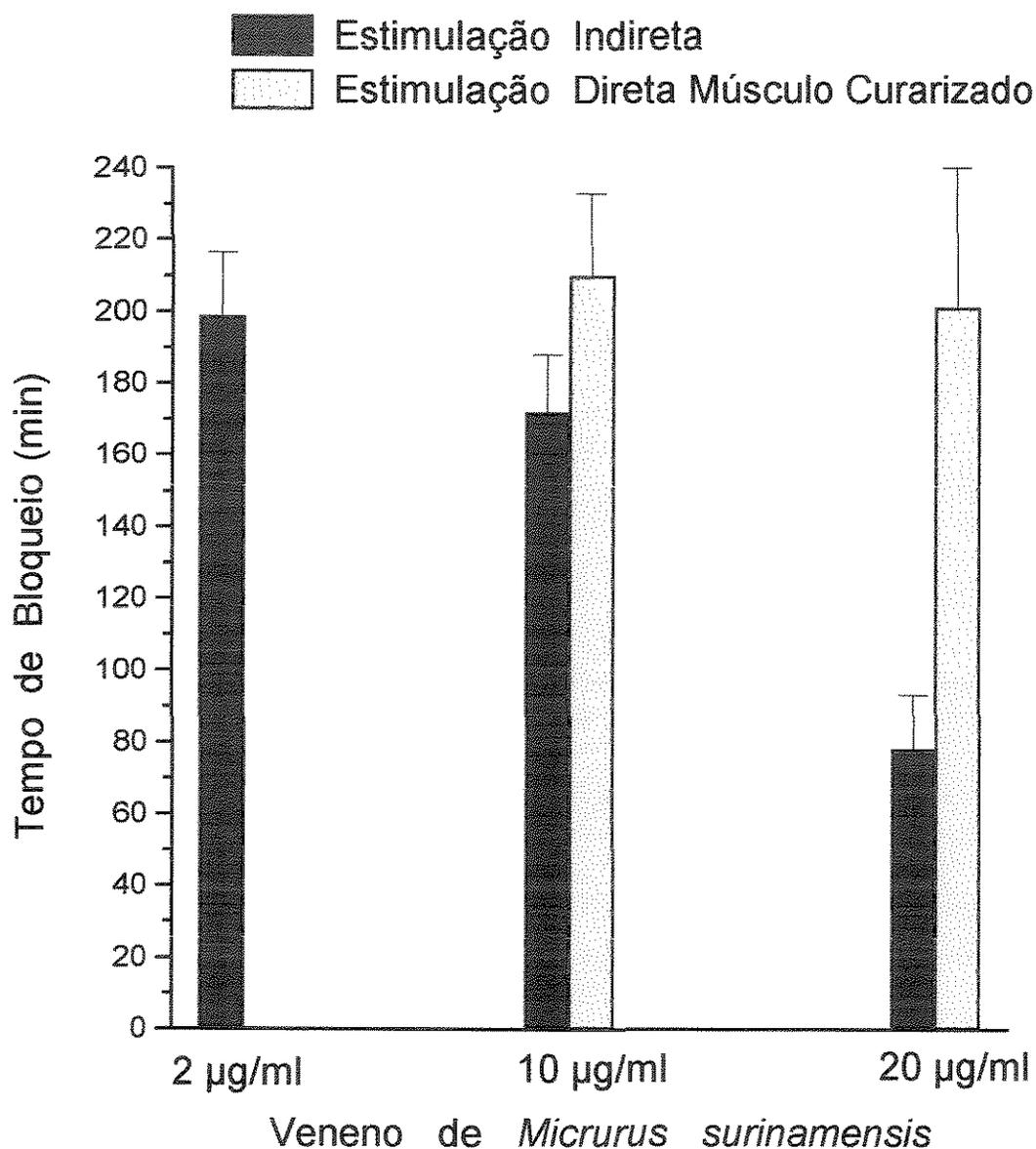


Figura 5 – Bloqueio de 80% das respostas do diafragma de rato não curarizado e curarizado, produzido pela peçonha de *Micrurus surinamensis* nas concentrações de 2 µg/ml (n=3), 10 µg/ml (n=6) e 20 µg/ml (n=6) à estimulação indireta e nas concentrações de 10 µg/ml (n=3) e 20 µg/ml (n=5) à estimulação direta em diafragmas curarizados. Cada ponto indica a média ± erro padrão.

Em preparações curarizadas (dTc, 10,0 µg/ml) estimuladas com pulsos de 80 V, 2,0 ms e 0,05 Hz, o veneno produziu 80% de bloqueio das respostas do diafragma aos 210 ± 23 min (n=3) e aos 201 ± 39 min (n=5) nas concentrações de 10,0 e de 20,0 µg/ml, respectivamente (Figura 5). Aos 150 min a depressão na tensão dos “twitches” foi de $39 \pm 14,0\%$ (n=5) com emprego de 10,0 µg/ml de veneno e de $50 \pm 13,0$ (n=6)^{*} com o de 20,0 µg/ml.

O efeito depressor do veneno na tensão das contrações provocadas pela estimulação direta do diafragma não foi, pois, dose dependente.

Em três experiências, adicionou-se a neostigmina (2,0 µg/ml) ao banho na vigência de 90% aproximadamente ($91,0 \pm 2,3\%$) de bloqueio das respostas do diafragma à excitação indireta produzido por 10,0 µg/ml da peçonha de *M. surinamensis*. O anticolinesterásico induziu apenas pequeno ($22,0 \pm 10,0\%$) e transitório aumento na tensão dos “twitches” (Figura 6). Adicionada ao banho após bloqueio superior a 95%, a neostigmina não alterou ou reverteu as contrações.

* A diferença entre os valores $39 \pm 14,0\%$ (n=5) e $50 \pm 13,0$ (n=6) não é estatisticamente significante

A 3,4-diaminopiridina (20,0 µg/ml), adicionada ao banho em quatro experiências, quando o bloqueio produzido pelo veneno era de $83,0 \pm 0,93\%$, causou $72,0 \pm 20,8\%$ de aumento na tensão das respostas do diafragma à excitação do nervo frênico (Figuras 7 e 8) aos 20 minutos em média de sua adição. Contudo, o efeito não persistiu, reinstalando-se lentamente o bloqueio. Em duas experiências em que se adicionou a 4-AP na vigência de bloqueio superior a 95% não houve efeito antagônico.

A peçonha de *M. surinamensis* produziu ligeira contratura do diafragma em todas as experiências (Figuras 6, 7 e 8). Observou-se também aumento na tensão dos "twitches" previamente ao bloqueio (Figuras 6, 7 e 8).

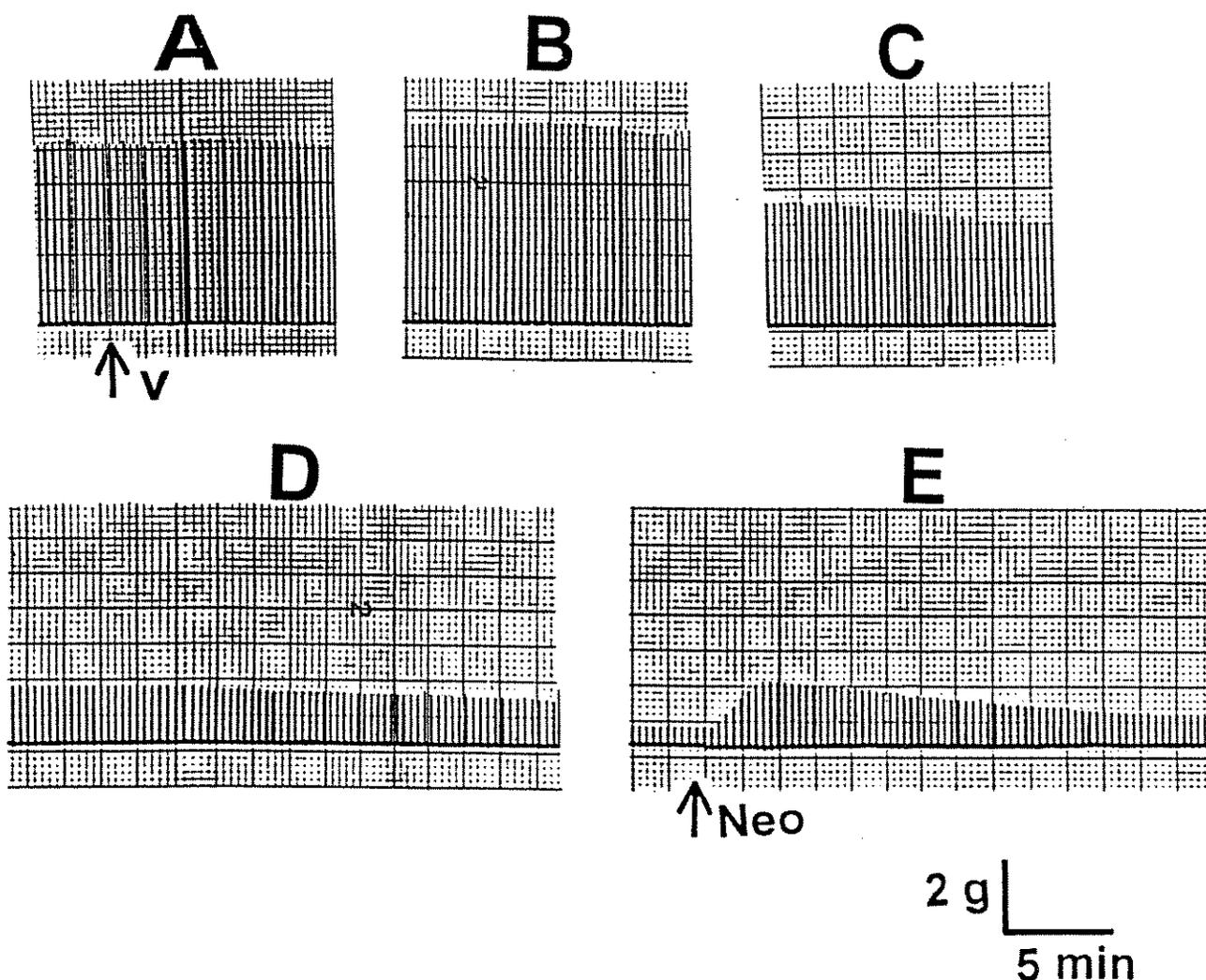


Figura 6 – Efeito da neostigmina (Neo) no bloqueio produzido pela peçonha de *M. surinamensis* (V) na preparação nervo frênico-diafragma. Em (A), adição do veneno (10 $\mu\text{g/ml}$) ao banho. Em (B), (C) e (D) bloqueios produzidos em 40, 170 e 240 min, respectivamente. Em (E), efeito antagônico parcial da Neo, após 90% de bloqueio. Em (B), discreto aumento da tensão dos “twitches”, logo após a adição do veneno.

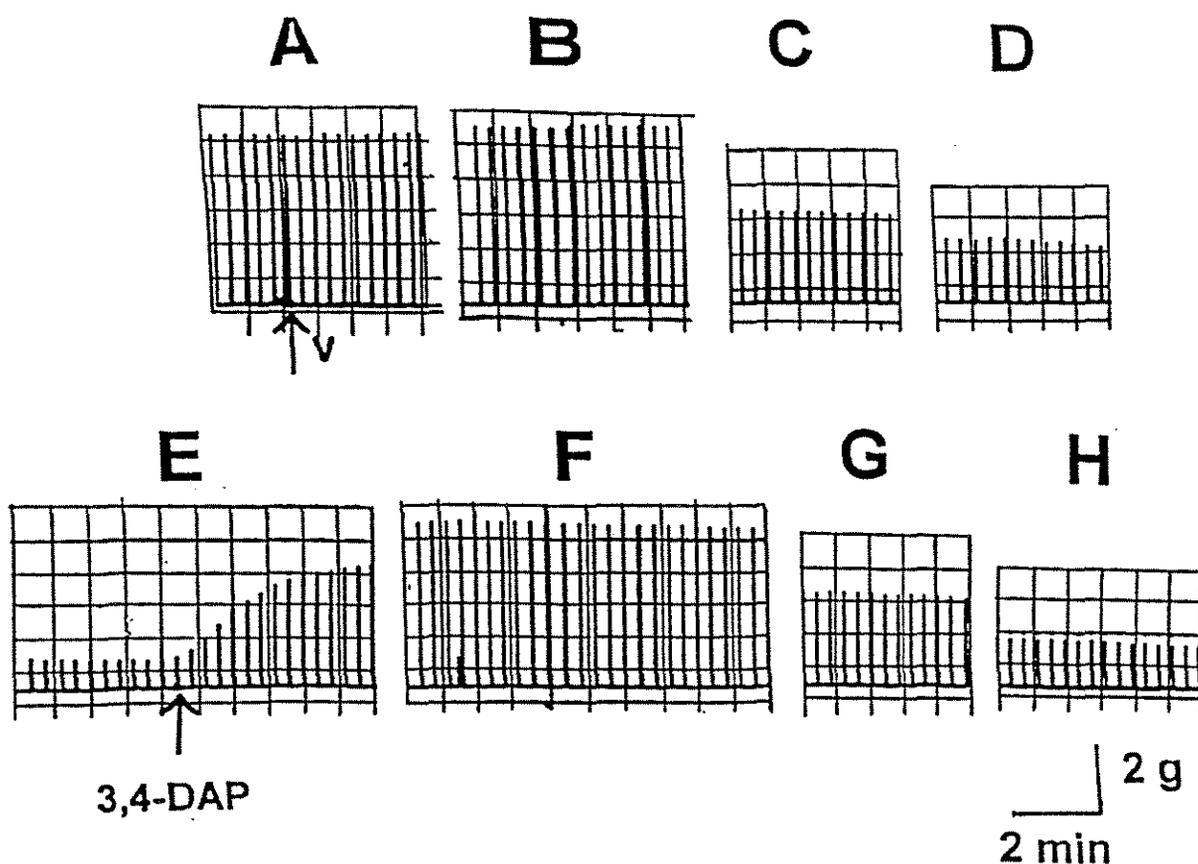


Figura 7 – Efeito da 3,4 diaminopiridina (3,4-DAP) no bloqueio produzido pela peçonha de *M. surinamensis* (V), na preparação nervo frênico-diafragma de rato. Em (A), adição da peçonha. ao banho. Em (B), (C) e (D), respostas à estimulação indireta aos 25, 180 e 210 min, respectivamente. Em (E), após 233 min, bloqueio de 84% e adição da 3,4-DAP ao banho. Em (F), antagonismo total após 22 min da adição da diaminopiridina. Observa-se em (G) e (H) o período em que o bloqueio volta a instalar-se. Doses – veneno: 10 $\mu\text{g/ml}$; 3,4-DAP: 20 $\mu\text{g/ml}$.

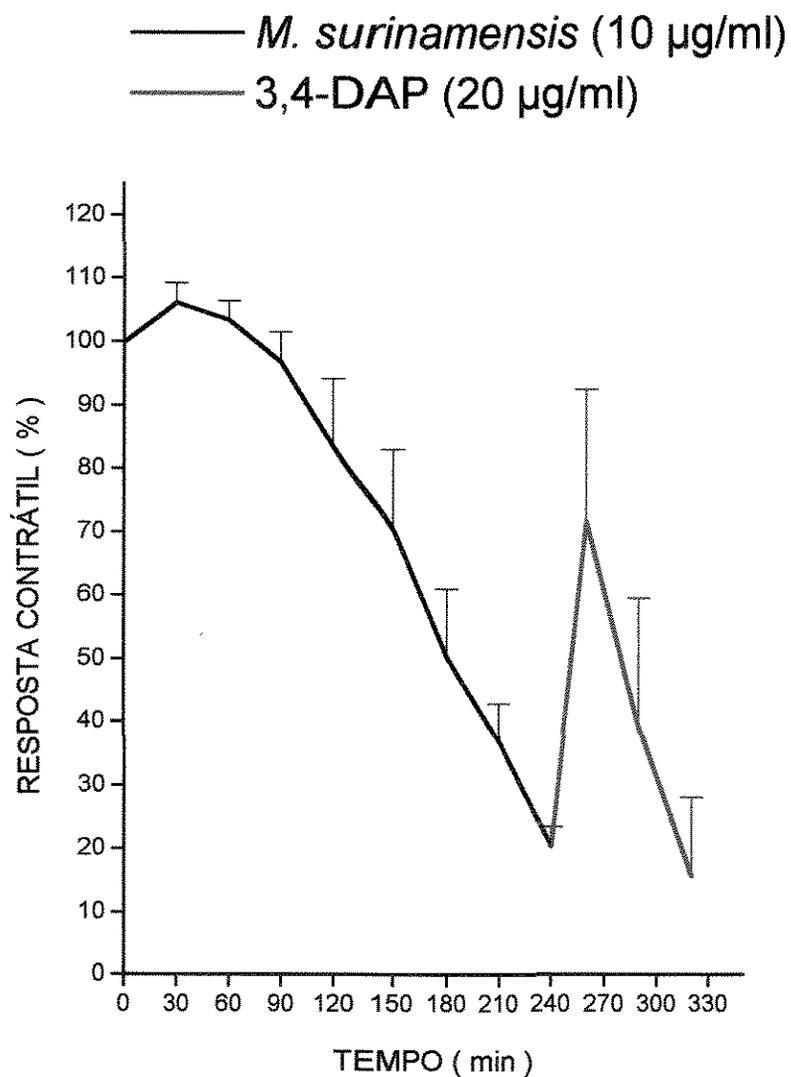


Figura 8 - O gráfico representa o bloqueio dos "twitches" pela adição do veneno de *M. surinamensis* (10 µg/ml), à preparação nervo frênico-diafragma de rato. Cada ponto na curva corresponde à média \pm erro padrão de 4 experimentos. Em vermelho o antagonismo induzido pela adição da 3,4-DAP (20 µg/ml) e o retorno para o bloqueio total (não mostrado). Observa-se discreta facilitação, após adição do veneno.

4.3. Efeitos sobre as respostas à acetilcolina (ACh) e, à excitação elétrica no hemidiafragma desnervado de rato.

A peçonha de *M. surinamensis* na dose de 5 µg/ml (n=3), 5 min após incubação durante 30 min com o hemidiafragma desnervado inibiu a contratatura produzida pela ACh (1 a 4 µg/ml) (Figura 9). A intensidade da inibição da contratatura decresceu progressivamente durante as sucessivas lavagens da preparação. Em uma experiência no final de 180 min, a resposta do hemidiafragma desnervado à ACh era 44% da obtida antes da incubação com o veneno (Figura 9). Nas outras duas experiências as respostas atingiram 78 e 60% aos 210 e 240 min, respectivamente.

A excitação elétrica do hemidiafragma desnervado (pulsos de 80 V, 2 ms e 0,05 Hz) após a incubação com o veneno, provocou respostas que diminuíram de maneira progressiva durante as sucessivas lavagens (Figura 9). Em uma experiência verificaram-se aos 180 min respostas com tensão de 43% da dos "twitches" obtidos antes da incubação da peçonha. Nas outras duas, a tensão foi de 33,0 e 40,0% aos 210 e 240 minutos.

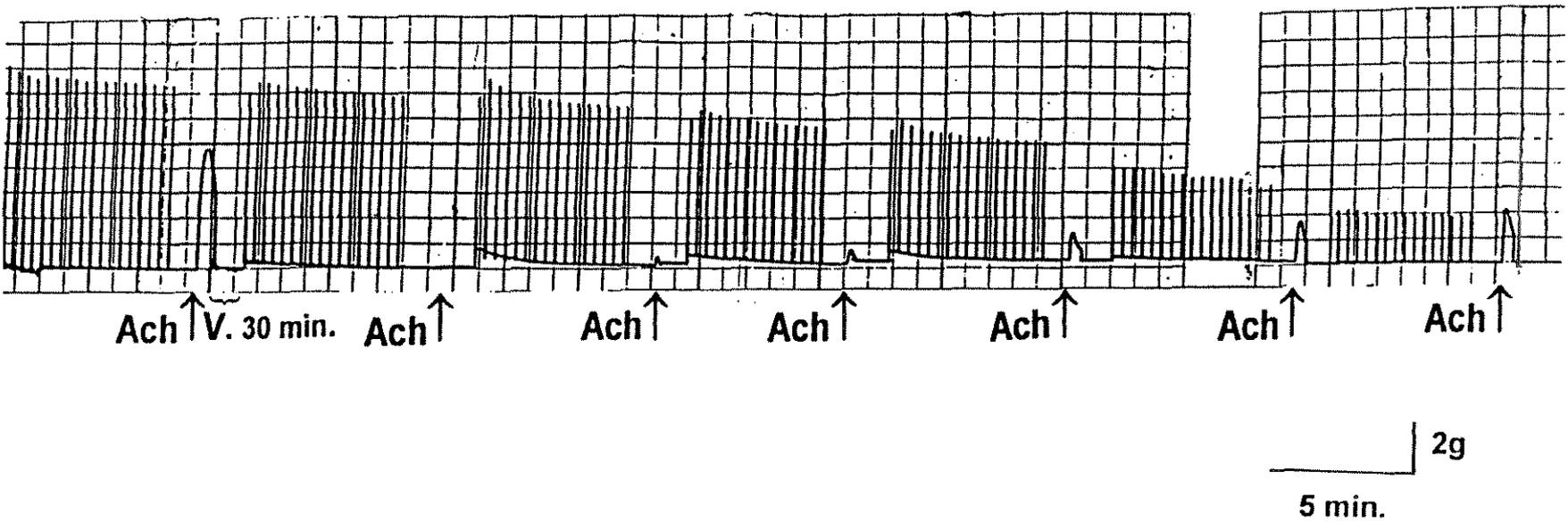


Figura 9 - Preparação hemidiafragma desnervado de rato. Respostas à estimulação elétrica (pulsos de 80 V, 2 ms e 0,05 Hz) durante 5 min e à Ach ($2 \mu\text{g/ml}$). O veneno de *M. surinamensis* ($5 \mu\text{g/ml}$) permaneceu 30 min em contato com a preparação antes da adição de Ach. Interrompeu-se a estimulação elétrica 30 à 40 segundos antes de cada adição de Ach ao banho e lavou-se a preparação 30 à 60 segundos após a resposta de 5 em 5 min por períodos de 30 min. Aos 180 min após a adição do veneno ao banho observou-se reversão parcial do bloqueio à Ach (44 %).

4.4. Efeitos sobre o potencial de repouso da membrana das fibras musculares do diafragma de rato.

Determinou-se o potencial de membrana antes e 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a adição de 10,0 µg/ml de veneno ao banho e 5, 10, 20, 40 e 80 minutos após a administração da dose de 20 µg/ml. Os valores na Tabela 1 representam a média da determinação do potencial em 5 fibras e seu erro padrão. Realizaram-se três experiências com o emprego de 10,0 µg/ml do veneno e cinco com a de 20,0 µg/ml. As reduções do potencial de membrana foram estatisticamente significantes a partir dos 10 ou 15 min da adição do veneno ao banho (Tabela I).

Tabela 1 - Efeito do veneno de *Micrurus surinamensis* sobre o potencial de repouso (PR) no diafragma de rato.

Tempo (min)	Doses do veneno	
	10 µg/ml (n=3)	20 µg/ml (n=5)
	PR (mV)	PR (mV)
0	81,60 ± 0,83	84,5 ± 0,69
5	78,53 ± 1,87	82,24 ± 0,93
10	-----	79,2 ± 1,03**
15	77,2 ± 1,68*	-----
20	-----	78,08 ± 0,735 **
30	75,73 ± 1,42*	-----
40	-----	76,72 ± 0,68 **
60	73,60 ± 1,6**	76,16 ± 0,848 **
80	-----	78,8 ± 0,57 **
90	74,3 ± 2,24*	-----

* e ** diferenças com o potencial de membrana (PR) antes da adição do veneno ao banho significantes, a nível de 95% (p<0,05) e 99% (p < 0,01), respectivamente.

4.5. Efeitos sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (ps.p.t.m.); ação antagônica da neostigmina e da 4-aminopiridina (4-AP).

Realizaram-se seis experiências no diafragma isolado de rato para esclarecer os efeitos do veneno de *M. surinamensis* sobre os ps.p.t.m. e os da neostigmina e da 4-AP sobre o seu bloqueio. Em três experiências, empregou-se a dose única de 5,0 µg/ml de veneno e em três, adicionaram-se ao banho, cumulativamente, duas ou três de 5,0 µg/ml. O tempo de abolição dos ps.p.t.m. variou em limites de 47 (14-80) min e 85 (67-107) min com o uso da dose única e das cumulativas, respectivamente. Em todas as experiências, a amplitude dos ps.p.t.m. decresceu progressivamente após a adição de veneno ao banho até o seu desaparecimento (Figura 11-II). O bloqueio foi antagonizado pela neostigmina (Figura 10) e pela 4-AP (Figura 11).

Após a administração de neostigmina, os ps.p.t.m. retornaram com amplitude muito reduzida em uma (Figura 10-II) das três experiências realizadas. A média de redução da frequência dos ps.p.t.m. em relação à sua frequência anterior à adição do veneno ao banho foi de 42%, com parciais de 76% e 70% de reduções e de 21%

de aumento. Após a adição da 4-AP, os ps.p.t.m. reapareceram com amplitudes pouco diferentes das anteriores à adição do veneno ao banho (Figura 11). A frequência dos ps.p.t.m., por outro lado, foi em média apenas 30% inferior à anterior ao emprego do veneno (Figura 11), com parciais de 72% e 27% de redução e 9% de aumento.

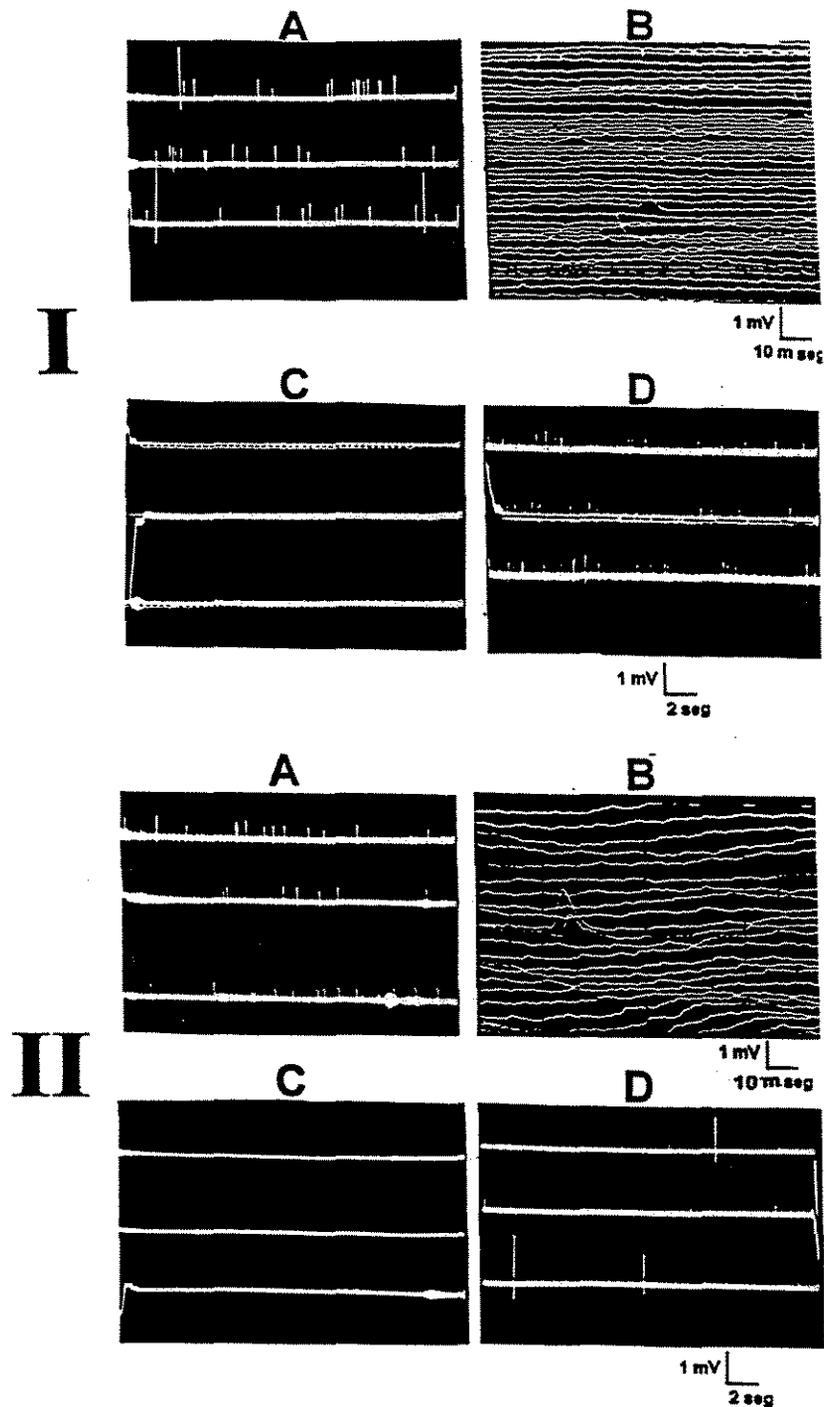


Figura 10 – Ação do veneno de *M. surinamensis* sobre os potenciais de placa terminal em miniatura no diafragma de rato. Efeito antagônico do metilsulfato de neostigmina (2 $\mu\text{g/ml}$). I.A e B e II.A e B. Controle; I.C e II.C. 47 e 40 min, respectivamente, após a adição do veneno ao banho; I.D e II.D. 15 min após a adição da neostigmina.

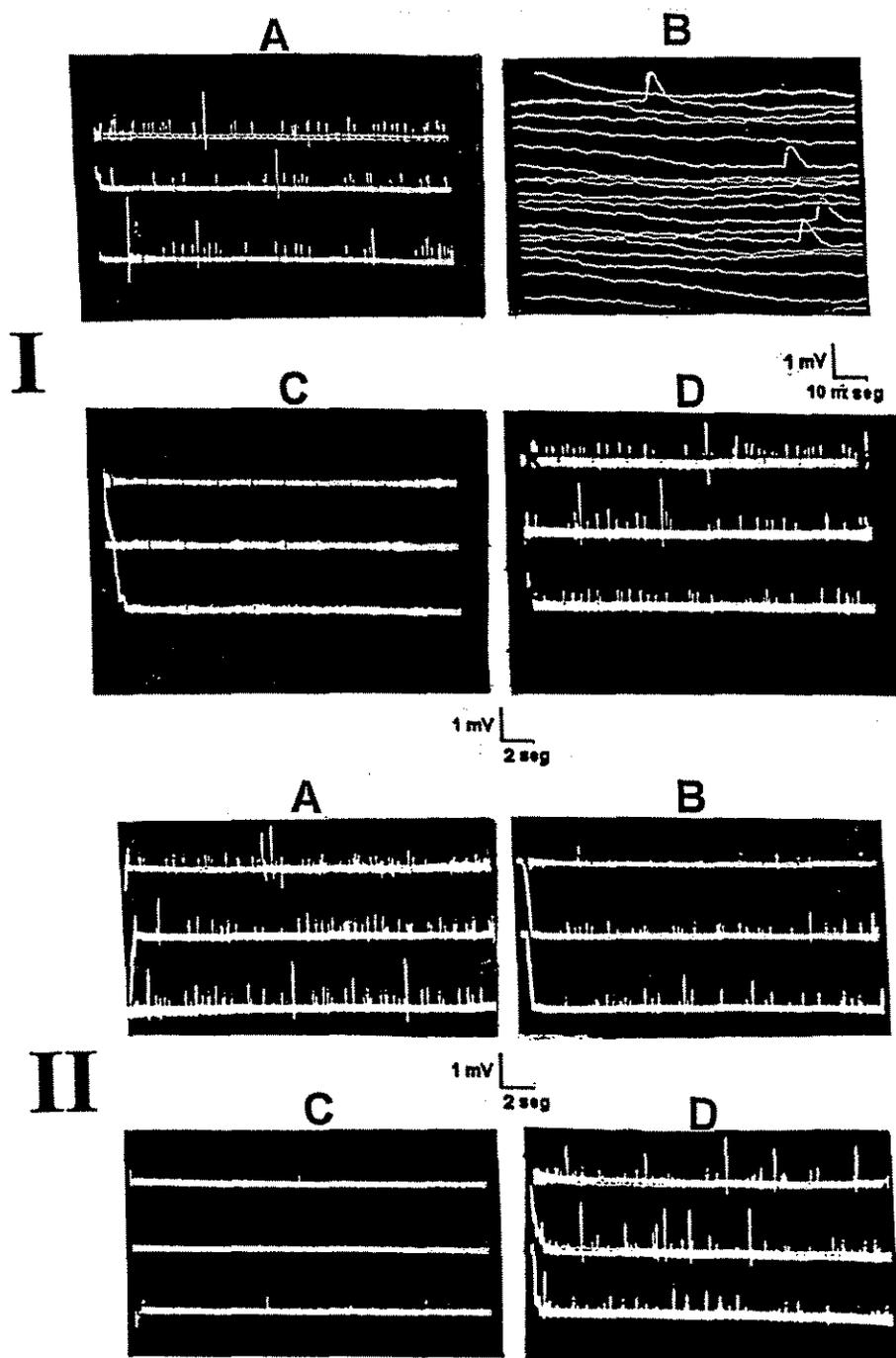


Figura 11 – Ação do veneno de *M. surinamensis* sobre os potenciais de placa terminal em miniatura. Efeito antagônico da 4-aminopiridina (4-AP). I.A e B. Controle; I.C. 60 min após a adição do veneno (5 $\mu\text{g/ml}$) ao banho; I.D. 10 min após a adição da 4-AP (20 $\mu\text{g/ml}$); II.A. Controle; II.B. 30 minutos após a adição do veneno (5 $\mu\text{g/ml}$) ao banho e imediatamente após à de uma segunda dose (5 $\mu\text{g/ml}$); II.C. 85 min após a primeira dose do veneno; II.D. 10 min após a 4-AP (20 $\mu\text{g/ml}$).

4.6. Efeitos sobre a transmissão neuromuscular, sobre as contraturas provocadas pela acetilcolina (Ach), carbacol e K^+ e sobre à excitação elétrica direta na preparação nervo-músculo biventer cervicis de pintos; influência do Ca^{2+} sobre a contratura do biventer cervicis induzida pelo veneno.

A peçonha de *M. surinamensis* na concentração de 10,0 µg/ml produziu bloqueio de 80% aos 18 ± 1 min (n=6) na preparação nervo-músculo biventer cervicis, estimulada indiretamente com pulsos maximais de 0,2 ms e 0,05 Hz (Figura 12 - I). Após a ocorrência do bloqueio completo não houve depressão das respostas do músculo à estimulação direta (pulsos de 70 V, 2,0 ms e 0,05 Hz).

As respostas à Ach (2,0 µg/ml) e ao carbacol (20,0 µg/ml) - respostas ao carbacol não mostradas na figura - foram bloqueadas enquanto a contratura provocada pelo K^+ foi potencializada (Figura 12 - I).

Em preparações curarizadas (dTc 5,0 µg/ml) estimuladas diretamente (pulsos de 70 V, 2,0 ms, 0,05 Hz) o veneno (10,0 µg/ml)

não induziu depressão dos "twitches" (Figura 12-II). A neostigmina produziu efeito antagônico sobre o bloqueio neuromuscular provocado pelo veneno na preparação nervo-músculo biventer cervicis semelhante ao induzido na preparação nervo frênico-diafragma. A 4-AP foi menos eficiente do que a neostigmina.

A adição do veneno em doses de 10,0 e 20,0 µg/ml ao banho foi sempre seguida de contratura do biventer cervicis, quer em músculos não estimulados (Figuras 12 - III, 13 e 14), quer em preparações estimuladas com pulsos elétricos (Figuras 12-I, II e 15-II).

A curarização da preparação não preveniu a ocorrência da contratura (Figura 12-II e 13-II), assim como a adição da tetrodotoxina (TTX 1,0 µg/ml) (Figura 14) ao banho. A adição de MgSO₄ (0,4886 mg/ml)* desfez a contratura relaxando o músculo (Figuras 13 e 14). O aumento na concentração de Ca²⁺ na solução nutritiva (Krebs com CaCl₂ 10 mM) inibiu a contratura (Figura 15-I).

* Dose usada sem água de hidratação.

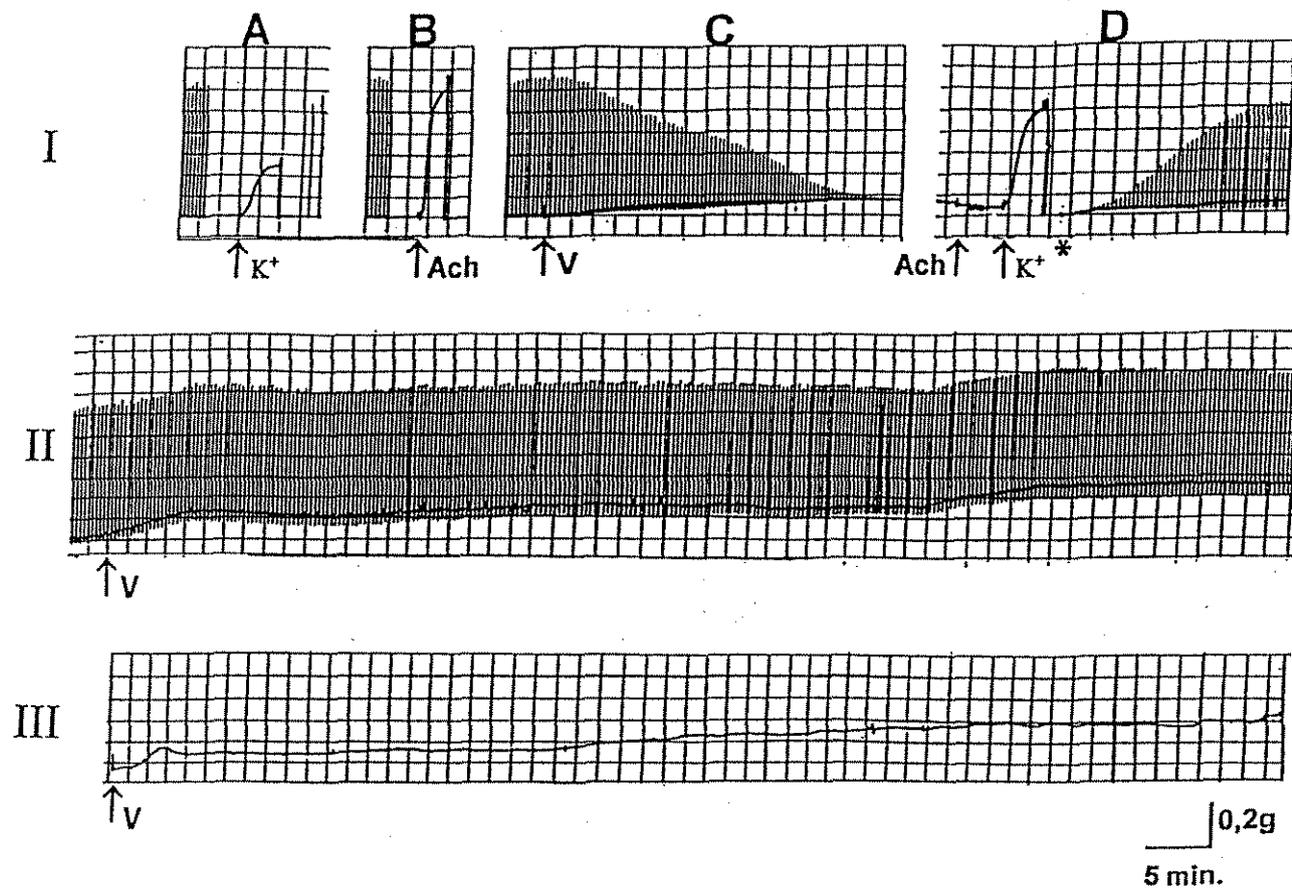


Figura 12 - Ação do veneno de *M. surinamensis* na preparação nervo-músculo biverter cervicis de pintos. I.A e B. Contratura produzida pela adição ao banho de K^+ e Ach antes do veneno. I.C. - Adição de $10 \mu\text{g/ml}$ de *M. surinamensis* ao banho. I.D. - Abolição da resposta à Ach e potencialização da contratura produzida pelo K^+ . Após (*), estimulação direta do músculo biverter cervicis. Após a adição do K^+ e Ach a preparação foi lavada 3x, durante 5 min. II- Preparação curarizada e estimulada diretamente (60 V, 0,2 ms e 0,05 Hz); em (V) adição de *M. surinamensis* ($10 \mu\text{g/ml}$) ao banho. III- Ação de $10 \mu\text{g/ml}$ *M. surinamensis* em preparação não estimulada.

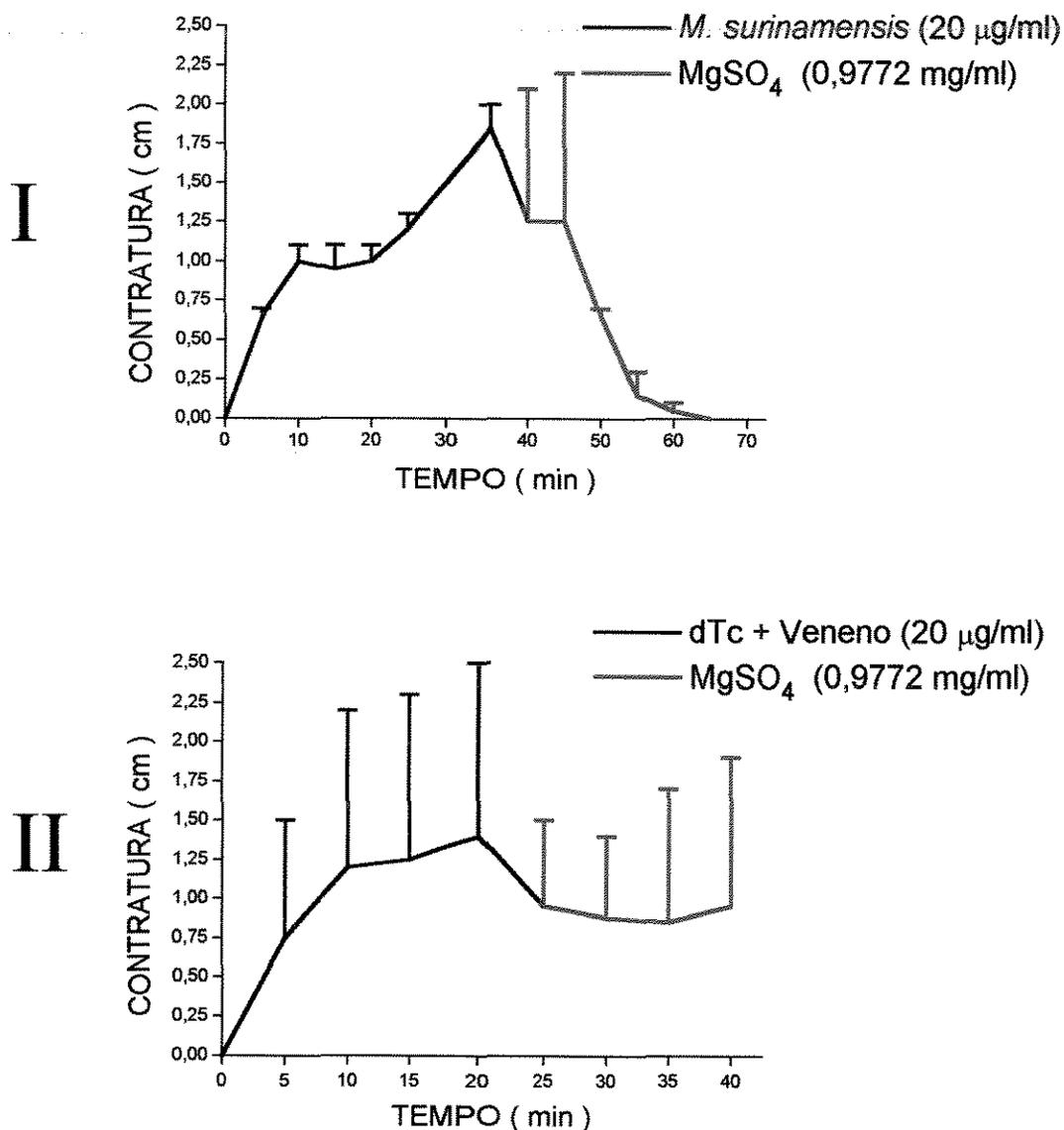


Figura 13 – Representação gráfica da ação contraturante do veneno de *Micrurus surinamensis* sobre o músculo biventer cervicis de pintos e do efeito antagônico do sulfato de magnésio (MgSO₄). I. Adição de MgSO₄ (2 doses de 0,4886 mg/ml) ao banho aos 40 e 50 min após à do veneno (vermelho). II. Preparação pré-tratada com dTc (10 µg/ml) e adição de 0,4886 mg de MgSO₄ após 15 min. As preparações foram estimuladas indiretamente (I) ou diretamente (II) com pulsos elétricos.

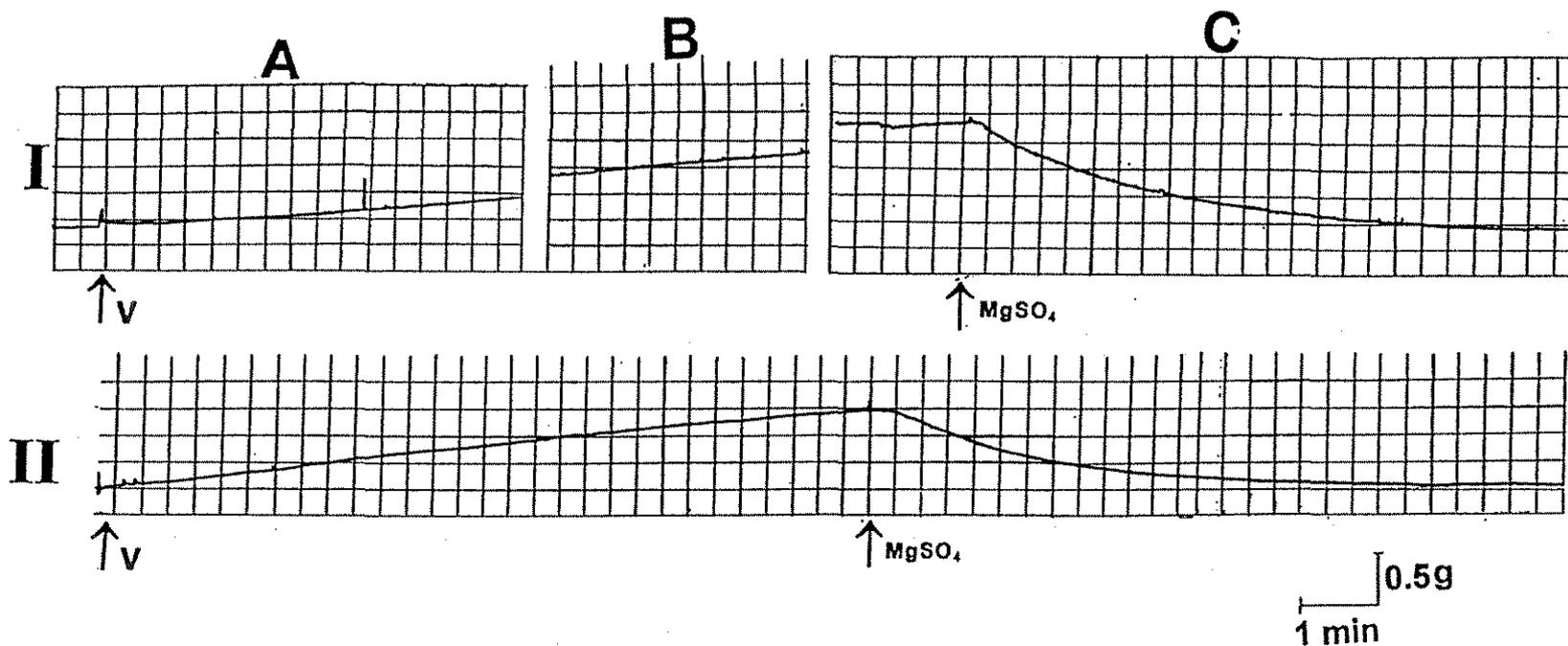


Figura 14 - Ação do veneno de *M. surinamensis* sobre a preparação nervo-músculo biverter cervicis de pintos, não estimulada. I.A. - Adição do veneno; I.B. - Contratura após 10 min da adição; I.C. - Adição de MgSO₄ (0,4886 mg/ml) quando do efeito máximo da contratura (22 min); II - Adição do veneno e no máximo da contratura, adição de MgSO₄. Dose do veneno: 20 µg/ml. As preparações foram pré-tratadas com TTX (1 µg/ml - 40 min de incubação).

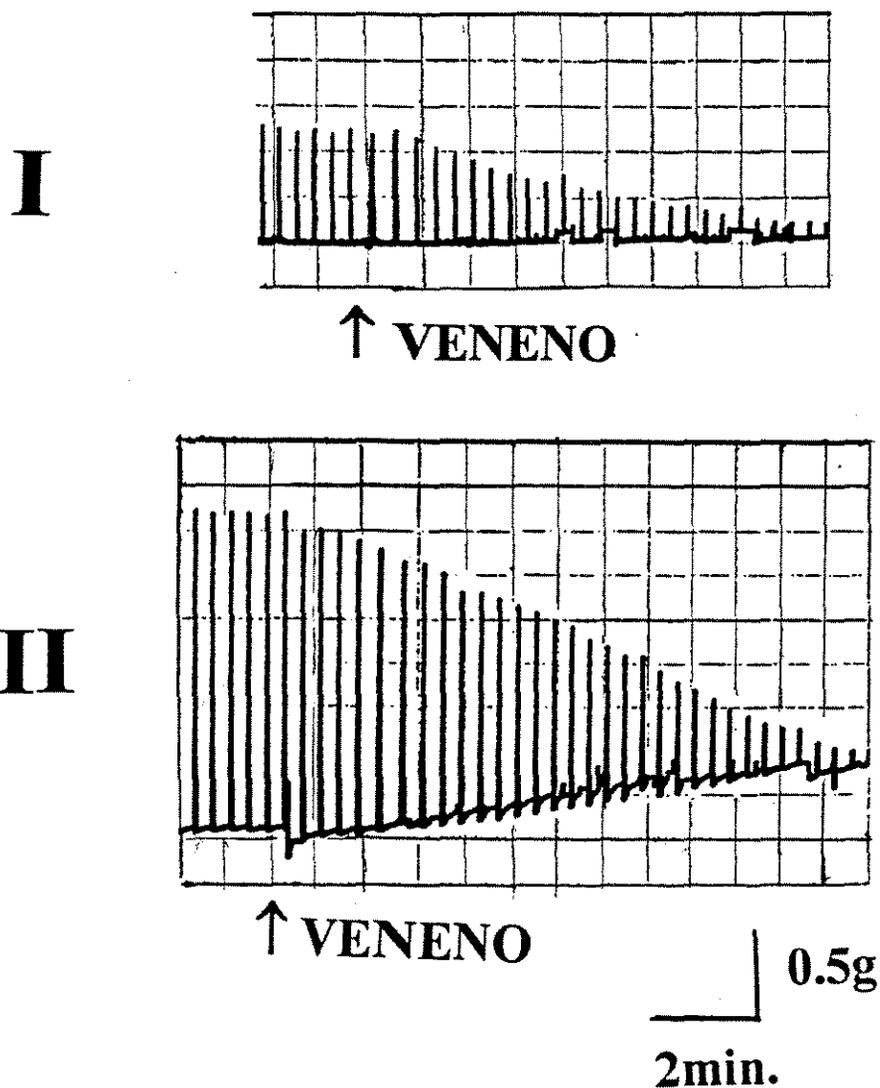


Figura 15 – Ação do veneno de *M. surinamensis* sobre a preparação nervo-músculo biventer cervicis de pintos, estimulada indiretamente (pulsos maximais de 0,2 ms e 0,05 Hz). I. Efeito da adição do veneno ao banho em solução de Krebs com alto teor em Ca^{2+} ; II. Efeito da adição do veneno em Krebs normal. Dose do veneno 10 $\mu\text{g/ml}$. Nota-se a inibição da contratatura na presença de alto teor em Ca^{2+} .

5. DISCUSSÃO

A toxicidade avaliada pela DL_{50} da peçonha de *M. surinamensis* em camundongos mostrou-se inferior às da peçonha de *M. spixii* (VITAL BRAZIL et al., 1995), cobra coral também da região amazônica e da peçonha de *M. corallinus* (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/1984). A dose letal mediana da *M. surinamensis* situou-se em torno de 1,8 vez inferior à das peçonhas daqueles tanatofídios. Por outro lado, não diferiu significativamente da toxicidade da peçonha de *M. frontalis* obtida de serpentes de Mato Grosso (VITAL BRAZIL et al., 1976/1977).

A peçonha de *M. surinamensis* produziu paralisia flácida nos camundongos, efeito causado pelo veneno de todas as *Micruri* estudadas e pela maioria senão a totalidade, das peçonhas elapídicas (VITAL BRAZIL, 1982). Contudo, observaram-se também hemorragias nas narinas e genitálias assim como no tórax e pulmões dos camundongos mortos nos primeiros 40 a 60 minutos subseqüentes à injeção da peçonha.

RAMSEY e colaboradores (1962) verificaram que a peçonha de *M. fulvius fulvius* dos EE.UU. e cinco das sete frações isoladas desse veneno por cromatografia de troca iônica em carboximetil celulose causam hemorragia pulmonar em camundongos. Entretanto a fração que encerra a ou as neurotoxinas da peçonha não produziu esse efeito. A peçonha, essa fração, e mais duas outras exibiram forte ação anticoagulante sobre o plasma humano. Estes efeitos aproximam pois, do ponto de vista de suas ações, as peçonhas de *M. surinamensis* e *M. fulvius*. Deve-se referir, entretanto, que nos acidentes causados no homem por *M. fulvius* não são registradas hemorragias e alterações da coagulação sangüínea (ver SHAW, 1971; RAMSEY & KLICKSTEIN, 1962; KITCHENS & VAN MIEROP, 1987).

WAJCHENBERG e colaboradores (1954), por outro lado, relataram acidente causado por *M. frontalis* em que, além dos sintomas neurotóxicos, foi observado aumento do tempo de coagulação. A incoagulabilidade sangüínea pode ser causada pela peçonha de muitas elapídiás dentre as quais as de *Naja naja* e *Bungarus* (BOQUET, 1948).

A atividade bloqueadora neuromuscular do veneno das *Elapidae* depende da ação de suas principais toxinas: neurotoxinas pós-sinápticas e neurotoxinas pré-sinápticas (LEE, 1972). As primeiras atuam em sua grande maioria, combinando-se com o receptor nicotínico da placa terminal nos sítios para acetilcolina (Ach). Atuam, portanto, como o curare, sendo denominadas toxinas curaremiméticas (KARLSSON, 1979).

Outro mecanismo de ação pós-sináptica, descrito mais recentemente (VITAL BRAZIL et al., 1983) consiste na dessensibilização do receptor nicotínico [bloqueadores não competitivos (NCBs)] (CHANGEUX, 1981; HEIDMANN et al., 1983). Nele, a afinidade do receptor para as neurotoxinas acha-se muito aumentada, mas da interação neurotoxina-receptor não resulta na abertura do canal iônico a ele associado e, portanto, em influxo de

íons sódio e a geração do potencial de placa terminal (p.p.t.). Não há pois formação do p.p.t..

As neurotoxinas pré-sinápticas atuam inibindo a liberação evocada de Ach pelas terminações nervosas motoras. Aumentam, regra geral, a frequência das ps.p.t.m. e a tensão das respostas musculares à estimulação indireta antes do seu bloqueio. São dotadas de atividade fosfolipásica A_2 a qual é essencial para a ação inibitória sobre a liberação de Ach.

Além dessas neurotoxinas, certos venenos elapídicos encerram toxinas que atuam na membrana das fibras musculares. As principais são as cardiotoxinas ou membranotoxinas (KARLSSON, 1979), também denominadas de fator lítico direto (DLF), cobraminas, citotoxinas e toxina γ (LEE, 1972).

As cardiotoxinas são constituintes dos venenos das *Najas* e gêneros afins, nos quais ocorrem em concentrações elevadas. Como as neurotoxinas curaremiméticas, as cardiotoxinas são proteínas fortemente básicas de pequeno peso molecular (7.000 - 8.000 daltons). Induzem contraturas de músculos esqueléticos cuja membrana despolarizam e deprimem as contrações musculares à estimulação direta. A ausência de cálcio na solução nutritiva inibe a

contratura mas não impede seu efeito despolarizante da membrana das fibras musculares. Por outro lado, um excesso de íons cálcio na solução nutritiva abole o efeito contraturante. As cardiotoxinas lisam hemácias, mesmo na ausência de soro ou de lecitina, razão pela qual foram denominadas também fator lítico direto. Certas fosfolipases A_2 básicas atuam como as cardiotoxinas, delas sendo farmacologicamente indistinguíveis (LEE et al., 1977).

A verificação, no presente estudo, de que o veneno de *M. surinamensis* inibe a contratura provocada pela Ach e pelo carbacol no diafragma desnervado de rato (Figuras 9 e 12 I) revela que encerra toxinas pós-sinápticas, curaremiméticas ou dessensibilizantes do receptor nicotínico da placa terminal (NCBs) ou ambas. A constatação de que a neostigmina antagoniza o bloqueio dos ps.p.t.m. produzido pelo veneno (Figura 10) demonstra, por outro lado, que pelo menos parte das toxinas pós-sinápticas é constituída de toxinas curaremiméticas de ação reversível. Da mesma forma, o antagonismo exercido pela 4-AP sobre o bloqueio dos ps.p.t.m. (Figura 11) prova a existência no veneno de toxinas dessensibilizantes do receptor (NCB).

As aminopiridinas são bloqueadoras do canal do potássio voltagem dependente (YEH et al., 1976; ULBRICHT & WAGNER,

1976; SCHAUF et al., 1976) e inibidoras da dessensibilização do receptor nicotínico da placa terminal (VITAL BRAZIL et al., 1983). Na ausência de potenciais de ação, as aminopiridinas não alteram a liberação de Ach. O efeito antagônico da 4-AP sobre o bloqueio dos ps.p.t.m. é, pois, inteiramente devido à sua ação inibitória da dessensibilização do receptor. Nas preparações nervo frênico-diafragma de rato e nervo biventer cervicis de pintos estimulados indiretamente, a neostigmina e a 3,4-DAP foram, entretanto, pouco eficientes como antagonistas do bloqueio produzido pelo veneno (Figuras 6, 7 e 8). Isto mostra que outras toxinas contribuíram de modo relevante em sua produção. A presença no veneno de neurotoxinas pré-sinápticas é sugerida pelo aumento da tensão dos "twitches" previamente a seu bloqueio (Figuras 6, 7 e 8). Outra possibilidade que explicaria a pequena eficiência antagônica da neostigmina e da 3,4-AP e a irreversibilidade do bloqueio seria a existência no veneno de toxina curaremimética de ação irreversível como a α -bungarotoxina (LEE & CHANG, 1966), não antagonizável portanto, por drogas anticolinesterásicas.

O veneno contém indubitavelmente cardiotoxinas ou fosfolipase de ação semelhante. Provam-no a sua ação contraturante (Figuras 4,

6, 7, 12, 13, 14, e 15) inibida pelo bloqueio do canal do cálcio (ação do magnésio - Figura 14) e por excesso de cálcio na solução nutritiva (Figura 15), além da sua ação despolarizante da membrana das fibras musculares (Tabela 1). Confirmam a presença da cardiotoxina (s) no veneno a ação depressora das respostas à estimulação direta do músculo curarizado (Figura 5) ou do músculo após o bloqueio à estimulação indireta. A ação desta toxina participa inquestionavelmente no bloqueio.

É interessante registrar que toxinas semelhantes às cardiotoxinas são também participantes dos venenos de *M. fulvius* e de *M. nigrocinctus* (WEISS & MCISAAC, 1971; SNYDER et al., 1973 e DOLÔ et al., 1986; GOULARTE & RODRIGUES-SIMIONI, 1994), a eles conferindo grande semelhança como o de *M. surinamensis* no modo de ação na transmissão neuromuscular e no músculo esquelético.

6. CONCLUSÕES

Os resultados da pesquisa permitem-nos tirar as seguintes conclusões:

- 1) o veneno deve conter uma ou mais toxinas pós-sinápticas curaremiméticas, uma vez que os ps.p.t.m. bloqueados pelo veneno reapareceram após a adição da neostigmina ao banho;
- 2) deve haver também no veneno toxina ou toxinas que induzem a dessensibilização do receptor da placa terminal (NCBs – Bloqueadores não competitivos), fato demonstrado pelo efeito antagônico da 4-AP sobre o bloqueio dos ps.p.t.m. induzido pelo veneno;

- 3) o aumento da tensão dos twitches previamente ao bloqueio na preparação nervo frênico-diafragma de rato estimulada indiretamente e a reversibilidade e o efeito antagônico da neostigmina e da 3,4-AP apenas parciais nas preparações nervo frênico-diafragma de rato e biventer-cervicis de pintos sugerem a presença de neurotoxina pré-sináptica no veneno;

- 4) a ação contraturante do veneno, mais evidente no músculo biventer-cervicis de pintos, não abolida pela curarização da preparação mas suprimida pela elevação da concentração de cálcio na solução nutritiva, e a despolarizante da membrana das fibras do diafragma mostram que o veneno contém constituintes de ação semelhante à das cardiotoxinas, podendo ser uma cardiotoxina ou mais provavelmente, fosfolipase A₂ básica, dotada de ação cardiotoxínica como a do veneno de *Naja mussambica mussambica*.

Em resumo, os efeitos neuromusculares e miotóxico do veneno de *M. surinamensis* resultam de ações de um conjunto de toxinas, as quais ocorrem em outros venenos de *Micrurus*. É a primeira vez que ações semelhantes à das cardiotoxinas é identificada em espécies de *Micrurus* sul-americana.

7. SUMMARY

Micrurus surinamensis occurs in the Amazon valley and upper Negro and Orinoco rivers. The distribution includes the countries Ecuador, Peru, Colombia, Brazil, Venezuela and the Guianas.

M. surinamensis venom produces neuromuscular blockade in the rat phrenic nerve-diaphragm and in the chick biventer-cervicis nerve-muscle preparations. It induces depression of the twitches elicited by direct muscle stimulation in the curarized rat diaphragm. In denervated hemidiaphragm of the rat, the contracture produced by acetylcholine (Ach) is blocked by the venom. Ach and carbachol-induced responses are also inhibited in chick biventer-cervicis muscle while the contracture produced by K^+ is increased. The blockade of the miniature

end-plate potentials (m.e.p.ps.) induced by *M. surinamensis* venom in the rat diaphragm is antagonized by neostigmine and by 4-aminopyridine. *M. surinamensis* venom causes depolarization of the rat diaphragm muscle fibers. It induces contracture of the rat diaphragm and biventer cervicis, the contracture being more intense in the last muscle. It is also produced in curarized muscles and in muscles treated with tetrodotoxin. On the other hand, calcium excess (Krebs solution with 10 mM CaCl₂) blocks the venom-induced contracture.

These results show that *M. surinamensis* venom contains reversible curaremimetic toxin(s) and toxin(s) that induces desensitization of the end-plate nicotinic receptor. They also show that it contains cardiotoxin-like toxin(s). Some results (increase of twitch tension before blockade, irreversibility of the neuromuscular blockade) suggest that presynaptic receptor toxins and irreversible curaremimetic toxins are contained in the *M. surinamenis* venom.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S.D. & JORGE DA SILVA, N. - Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp Biochem Physiol**, 99B, p. 287, 1991.

AMARAL, A. - Serpentes do Brasil. Iconografia Colorida. **Edição Melhoramentos**, São Paulo, 1977.

BOQUET, P. - Venins de serpents et antivenins. **Éditions Médicales Flammarion**, França, 1948.

BRAZIL, V. - La Défence Contre l'Ophidisme. 3 eme ed., **Pocai Weiss**, São Paulo, 1914.

BRAZIL, V. & BRAZIL FILHO, V. - Do envenenamento elapídico em confronto com o choque anaphylactico. **Bol. Inst. VITAL BRAZIL**, Nº **15**, 3, 1933.

BÜLBRING, E. - Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmac.** **1**: 38, 1946.

CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. - **The Venomous Reptiles of Latin America**. Comstock, London, 1989.

CHANGEUX, J.P. - Acetylcholine receptor; An "allosteric" membrane protein. **Harvey Lectures, Series 75**, 85-254, 1981.

CUNHA, O.R., & NASCIMENTO, F.P. de - **Ofídios da Amazônia. X - As cobras da região leste do Pará**. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, (Publ. Avulsas, 31), p. 168, 1978.

DOLÓ, N.; PELARLES, J.; MUÑNOS, R. & MOUSSATCHÉ, H. - Neuromuscular blocking activity of a fraction isolated from the venom of coral snake, *Micrurus nigrocinctus*. In: **Second Panamerican Symposiom on Animal, Plant and Microbial Toxins**. Arizona. Abstrat of Papers, 1986, p. 51.

FATT, P. & KATZ, B. – An analysis of the endplate potencial recorded with an intracellular electrode. *J. Physiology*. London, 115:320 - 370, 1951.

FATT, P. & KATZ, B. – Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiology*. London, 117:109, 1951,1952.

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

GOULARTE, F.C. & RODRIGUES-SIMIONI. - The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon*, **33**, 679, 1994.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; PORTILLA, E.; CERDAS, L.; ROJAS, E. - Local effects induced by coral snake venoms: evidence of mionecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon*, **21**, 777, 1983.

GUTIÉRREZ, J.M., ROJAS, G., JORGE DA SILVA JR, N. & NÚÑEZ, J. - Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon*, **30**, 1299; 1992

HEIDMANN, T., OSWALD, R.E. & CHANGEUX, J.P. – Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor-rich membrane fragments from *Torpedo marmorata*. **Biochemistry** **22**, 3112-3127, 1983.

NASTUK, W.L. & HODGKIN, A.L. - The electrical activity of single muscle fibers. **J. Cell Comp.Physiol.**, **35**: 39-73, 1951.

PELLEGRINI FILHO, A. & VITAL BRAZIL, O. – Origem da paralisia respiratória determinada pela peçonha de *Micrurus frontalis*. **Ciência e Cultura** **28**: p.199-202, 1976.

RAMSEY, G.F. & KLINKSTEIN, G.D. - Coral snake bite: Report of a case and suggested therapy. **JAMA.**, **182**, p.949-951, 1962.

RESENDE, C.C.; ARAUJO, P.A. & SALBENAVE, R.N.V.R. - Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos: Brasil - junho de 1986 - dezembro de 1989. **Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Ministério de Saúde**. Brasília, D.F., 1989.

RIBEIRO, L.A. et al. - Epidemiologia do acidente ofídico no Estado de São Paulo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, **39**: **4**, 1993.

ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bücherl, W. and Buckley, E., (Eds)

- Venomous Animals and their Venoms, vol 2***, Academic Press, New York, p.345, 1971.
- ROZE, J.A. - New world coral snakes (Elapidae): a taxonomic and biological summary. ***Mem. Inst. Butantan, 46***, 305, 1982.
- SCHAUF, C.L., COLTON, C.A., COLTON, J.S. & DAVIS, F.A. – Aminopyridine and sparteine as inhibitors of membrane potassium conductance. Effects on *Myxicola* giant axons and the lobster neuromuscular junction. ***J. Pharmacol. Exper. Ther. 194***: 414-425, 1976.
- SHAW, C.E. - The coral snakes, Genera *Micrurus* and *Micruroides*, of the limited United States and Northern Mexico. In: Bücherl, W. & Buckley, E. (Eds). ***Venomous Animals and their Venoms, vol. 2***, Academic Press, New York. p. 157, 1971.
- SNYDER, G.K.; RAMSEY, H.W.; TAYOR, W.J. & CHIOU, C.Y. - Neuromuscular blockade of chick biventer cervicis nerve-muscle preparations by a fraction from coral snake venom. ***Toxicon, 11***: 505, 1973.

ULBRICHT, W. & WAGNER, H.H. - Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. **Pflügers Arch.** **367**: 77-87, 1976.

VITAL BRAZIL, O. & BARRIO, A. - "Acción curarizante de las ponzoñas de Elapidae. I Fenómenos de inhibición y facilitación en la union neuromuscular". **Prensa Med. Arg.**, **37**: 1249, 1950a.

VITAL BRAZIL, O. & BARRIO, A. - "Acción curarizante de las ponzoñas de Elapidae. II. Efeictos de alguns antagonistas del curare". **Prensa Med. Arg.**, **37**: 1313, 1950b.

VITAL BRAZIL, O. (1963). Ação Neuromuscular da peçonha de *Micrurus leminiscatus*. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina, USP (publ. em **O Hospital** **68**, 909, 1965).

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D. & PELLEGRINI FILHO, A. - "Physiopathologie et thérapeutique de l' envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus Frontalis*". **Mem. Inst. Butantan**, **40/41**: 211, 1976/1977.

VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: CORBETT, C.E. - **Farmacodinâmica**, 6^ª ed., Guanabara Koogan, p. 1044-1074, 1982.

- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D. & PAVANI, N.J.P. – Effect of 4-aminopyridine on the post-synaptic action of polymyxin B. **Eur. J. Pharmacol.** **159**: 47-51, 1983.
- 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, 1983/1984.
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D.; HELUANY, N.F. & LAURE, C.J. - Mode of action of the coral snake *Micrurus spixii* venom at the neuromuscular junction. **J. Natural Toxins**, **4**, 19, 1995.
- WAJCHENBERG, L.; NETTO, S.F. & ULHOA CINTRA, A.B. - Elapidic poisoning (*Micrurus frontalis*), neurologic lesions. International Conference on Animals Venoms, Berkeley, California. Abstracts of papers, 43, 1954.
- WEIL, C.S. - Tables for the convenient calculation of median-effective doses (LD₅₀ and ED₅₀) and instruction in their use. **Biometrics**, **8**: 249, 1952.
- WEISS, R. & MCISAAC, R.J. - Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake *Micrurus fulvius*. **Toxicon** **9**: 219, 1971.

YEH, J.Z., OXFORD, G.S., WU, C.H. & NARAHASHI, T. – Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane, - **Gen. Physiol.** **68**: 519-535, 1976.