Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Roberta Silva Carreiro da Costa

AÇÃO NEUROMUSCULAR DA PEÇONHA DA COLUBRÍDEA OPISTÓGLIFA *Philodryas patagoniensis* EM PREPARAÇÕES DE AVES E MAMÍFEROS: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO(S) COMPONENTE(S) ATIVO(S)

São José dos Campos
2007

Roberta Silva Carreiro da Costa

AÇÃO NEUROMUSCULAR DA PEÇONHA DA COLUBRÍDEA OPISTÓGLIFA *Philodryas patagoniensis* EM PREPARAÇÕES DE AVES E MAMÍFEROS: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO(S) COMPONENTE(S) ATIVO(S)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cogo

São José dos Campos

2007

C875a

Costa, Roberta Silva Carreiro
Ação neuromuscular da peçonha da colubrídea opistóglifa *Philodryas patagoniensis* em preparações de aves e mamíferos: caracterização parcial do(s) componentes(s) ativo(s) / Roberta Silva Carreiro Costa. São José dos Campos: UniVap, 2007.
1 disco laser, color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1. Venenos de Crotalídeos 2. Serpentes 3. Junção Neuromuscular 4. Peçonhas I. Cogo, José Carlos, Orient. I.Título

CDU: 591.145

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial ou total desta Dissertação, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 10 de abril de 2007.

Roberta Silva Carreiro da Costa

"AÇÃO NEUROMUSCULAR DA PEÇONHA DA COLUBRÍDEA OPISTÓGLIFA *Philodryas patagoniensis* EM PREPARAÇÕES DE AVES E MAMÍFEROS: CARACTERIZAÇÃO DO(S) COMPONENTE(S) ATIVO(S)"

Roberta Silva Carreiro da Costa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **MARCOS JOSÉ SALVADOR** (UNIVAP)_____

Prof. Dr. **JOSÉ CARLOS COGO** (UNIVAP)_____

Profª. Dra. **CAROLINE R. DE BORJA OLIVEIRA** (UNICAMP)_____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedicatória

Ao meu querido marido Fábio, e à minha doce e tão amada filha Ana Cecília, por todo apoio, incentivo e compreensão.

Aos meus pais, Aldir e Neira, que sempre mostraram a relevância do estudo e nunca mediram esforços para permitirem meu crescimento profissional, pessoal e moral.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida; pela Tua luz, sempre guiando meus caminhos, por ter me "dado" uma família e amigos de valor humano inestimáveis, razões da minha força para continuar buscando a realização de meus ideais e prosperando sempre. Obrigada Senhor, pela saúde, serenidade e boas oportunidades.

Aos meus pais, Aldir e Neira, por sempre me incentivarem e darem todo apoio necessário para minha vitória profissional e pessoal.

Ao meu irmão Wagner e minha "irmã" Jacqueline, tão carinhosos, atenciosos e dedicados...Obrigada!!!

Ao meu marido Fábio e à minha linda filhinha Ana Cecília, pela enorme paciência, atenção, dedicação e incentivo. Amo Vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Cogo, que abriu as portas de seu laboratório, permitindo meu contato com a ciência e enriquecimento profissional e pessoal proporcionado durante esses dois anos de convivência. Agradeço do fundo do meu coração, a atenção, incentivo e confiança a mim dispensada. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, do Departamento de Farmacologia, UNICAMP, pelos ensinamentos e por ter colocado toda a infra-estrutura de seu laboratório necessária à realização dos ensaios bioquímicos à disposição. Obrigada por tudo!

A Prof. Dr. Léa Rodrigues Simioni, por ter disponibilizado seu laboratório para realização de testes eletrofisiológicos.

Ao Prof. Msc. Antônio Carlos Guimarães Prianti Jr., por todo incentivo e apoio desde a época de minha graduação, com seus ensinamentos tão valiosos, confiança e amizade. Obrigada por todos os momentos de descontração, imprescindíveis no meu dia a dia. Te adoro! Obrigada!

Ao Prof. Dr. Wellington Ribeiro, por toda atenção e disposição em ajudar SEMPRE!

A Prof. Dr. Stella Regina Zamuner, pela atenção dispensada, pelas dicas e correções tão importantes para a finalização deste trabalho.

A Profª. Drª. Cristina Pacheco Soares, por permitir, tão generosamente, a realização de experimentos bioquímicos em seu laboratório.

A Profª. Drª. Josane Mittimann, pela disposição e imensa ajuda prestada na realização de testes bioquímicos.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite, departamento de Farmacologia, UNICAMP, pela sua inestimável ajuda, apoio técnico, disposição em ajudar e pelos sábios conselhos proferidos durante esse tempo de convivência.

Ao técnico Zé Ilton por toda ajuda prestada nos ensaios bioquímicos.

Ao Msc. Gustavo H. M. F. de Souza, pela sua fantástica colaboração na parte bioquímica deste trabalho. Sua ajuda foi imprescindível para a concretização deste sonho. Muitíssimo obrigada!

Ao Msc. Thomaz, pela sua maravilhosa contribuição na extração do veneno das serpentes, mas, além disso, por todo apoio técnico prestado no laboratório de Bioquímica do Departamento de Farmacologia (UNICAMP). Obrigada por seus conselhos, dicas e vários dias de descontração e maravilhosas gargalhadas! Thank You!!

Ao amigo Alessandro Corrêa Mendes, pelas infinitas assessorias técnicas prestadas a mim e por sua grande bondade e presteza. Não tenho palavras para dizer o quanto sou grata por sua imensa ajuda. MUITO OBRIGADA!

À minha grande amiga Erika Fonseca Ferrari, por sua MARAVILHOSA amizade e extremo companheirismo. Obrigada amiga, por todos os momentos em que esteve ao meu lado, me apoiando e dando força em tudo o que eu necessitava. Obrigada por tamanha presteza, dedicação, interesse, incentivo, apoio, carinho e generosidade. Tenho muito orgulho de ser sua amiga! Obrigada por tudo!

A todas as pessoas que formam a "família" do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, que de uma forma ou de outra contribuíram de maneira relevante para a realização deste trabalho, em especial ás amigas Fabiana Vilela Requena e Kátia Cristiane Domingues de Brito, sempre dispostas a ajudar. Muito obrigada pela paciência, dedicação e carinho a mim dispensados! Adoro vocês.

A Msc. Ana Maria Barbosa, por seus preciosos conselhos, ajuda prestada e carinho dispensados na realização deste trabalho.

A todos os colegas que ingressaram junto comigo no Mestrado. Pessoas que vou levar para o resto da minha vida dentro do meu coração. Obrigada, queridos, por todo incentivo e apoio.

Ao apoio didático, pela atenção e ótimos serviços prestados.

À Fapesp e ao CNPq, pelo imprescindível suporte financeiro.

"Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

Fernando Pessoa

AÇÃO NEUROMUSCULAR DA PEÇONHA DA COLUBRÍDEA OPISTÓGLIFA *Philodryas patagoniensis* EM PREPARAÇÕES DE AVES E MAMÍFEROS: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO(S) COMPONENTE(S) ATIVO(S)

Resumo

As serpentes do gênero *Philodryas* são difundidas na América do Sul e causam a maioria de acidentes ofídicos por colubrídeos nesta região. Este estudo teve por objetivo avaliar as ações neurotóxicas e miotóxicas da peçonha da serpente opistóglifa *Philodryas patagoniensis* em preparações *biventer cervicis* de ave e caracterizar parcialmente as frações neurotóxicas desse veneno. A atividade neuromuscular da peçonha foi estudada *in vitro* em preparações de junção neuromuscular de pintainho nas concentrações de 5, 10 e 40 μg/mL sob estimulação elétrica indireta; 5 e 40 μg/mL sob estimulação direta. A peçonha de *P. patagoniensis* causou bloqueio neuromuscular dose-tempo dependente sob estímulo indireto, porém, não afetou as respostas contráteis das preparações sob estímulo direto. O bloqueio sob estimulação elétrica indireta se mostrou irreversível, mesmo após sucessivas lavagens. A concentração mais elevada testada (40 μg/mL) aboliu significativamente ($p<0.05$) as respostas à ACh (55 e 110 μM) e ao K^+ (13,4 mM) após 120 minutos de incubação; os efeitos nas concentrações menores (5 e 10 μg/mL) não se mostraram consistentes e significativos. A incubação de preparações *b. cervicis* com peçonha resultou na liberação de creatino quinase (CK) de forma dose-tempo dependente. O dano tecidual sugerido pela liberação de CK foi confirmado por análise histológica que mostrou lesões características da mionecrose, como perda da estrutura poligonal das células musculares, bem como, formação de vesículas em seu interior, células edemaciadas (5 μg/mL), ruptura de membrana, lesões do tipo delta (10 μg/mL) e processo mionecrótico altamente avançado na mais alta concentração testada (40 μg/mL). Ainda, o veneno não demonstrou ação despolarizante no terminal nervoso nem na fibra muscular (preparação nervo-frênico diafragma de camundongo) evidenciado pelo PM (150 μg/mL), embora tenha mostrado sutil e transitório aumento na freqüência dos pmpts. A cromatografia de Fase Reversa (RPC) e HPLC revelaram, respectivamente, a presença de quatro e três picos principais, dois quais as frações III (FIII) (5 μg/mL) e sub-fração III-II (FIII-II) se mostraram ativas na junção neuromuscular produzindo assim bloqueio das respostas contráteis evocadas por estimulação elétrica indireta. O estudo bioquímico com as frações revelou um aumento de CK para a FIII-II, embora com a FIII não se pôde verificar o mesmo. O dano histológico mostrou-se evidente para ambas as frações estudadas. Além disso, a FIII revelou alta atividade proteolítica (87,8 U/mg), fato esse que nos sugere uma grande contribuição tanto para o bloqueio neuromuscular como para a mionecrose observada. A eletroforese das frações por SDS-PAGE mostrou que a maioria das proteínas das frações se localizava na faixa de 20 a 66 KDa. Esses resultados sugerem a presença de componentes neurotóxicos e miotóxicos na peçonha da serpente *P. patagoniensis*, responsáveis pelos sinais de envenenamento ocasionados por esta serpente.

Palavras-chaves: *Philodryas patagoniensis*; veneno; junção neuromuscular, *biventer cervicis*; eletrofisiologia; HPLC.

"NEUROMUSCULAR ACTION OF THE OPISTHOGLYPHOUS COLUBRID *Philodryas patagoniensis* IN AVIAN AND MAMMALS PREPARATIONS: PARTIAL CHARACTERIZATION OF(S) ACTIVE(S) COMPONENT(S)"

Abstract

Snakes of the genus *Philodryas* are widespread in South American and cause most snakebite by colubrids in this region. The aim of this study was to evaluate the neurotoxic and myotoxic actions of the opisthoglyphous colubrid *Philodryas patagoniensis* venom in *biventer cervicis* preparations and to characterize partially neurotoxics fractions of this venom. The neuromuscular activity of the venom was studied *in vitro* in neuromuscular junction preparations in the concentrations of 5, 10 and 40 μg/mL at indirect; 5 e 40 μg/mL at direct electric stimulation. The venom of *P. patagoniensis* caused neuromuscular blockade that was concentration and time-dependent at indirect stimulation, however, it did not affect the twitch tension of preparations at direct stimulation. The blockade in indirect electric stimulation showed irreversible, after successive washing. In these preparations, the highest concentration of venom tested (40 μg/mL) significantly reduced ($p<0.05$) the contractures caused by acetylcholine and potassium after 120 minutes; lower concentrations tested (5 e 10 μg/mL) of venom had no consistent or significant effect on these responses. The incubation of *b. cervicis* preparations with venom resulted in the release of the creatine kinase (CK) that was dose and time-dependent. The tecidual damage suggested by the CK release was confirmed by histological analysis that showed characteristic injuries of myonecrosis, as loss of the polygon structure of the muscular cells, as well as formation of vesicles in its interior (5 μg/mL), rupture of membrane, injuries of type delta (10 μg/mL) and highly advanced myonecrotic process in highest concentration studied (40 μg/mL). The electrophysiological studies were realized in mice, the venom (150 μg/mL) did not demonstrate a depolarizing action in the nervous terminal or in the muscular fiber evidenced by the resting potential; even so it has been shown subtle and transitory increase in the frequency of mepps. The RPC and HPLC chromatography showed, respectively, the presence of four and three majority peaks, which the fractions III (FIII) (5 μg/mL) and sub-fraction III-II (FIII-II), both fractions had shown active in the neuromuscular junction producing blockade of the twitch tension evoked by indirect electric stimulation. The biochemistry study with the fractions showed an increase of CK for FIII-II, but not with FIII. The histological damage showed was evident for both fractions studied. Moreover, FIII showed high proteolytic activity (87,8 U/mg), this fact suggests a great contribution to them in the neuromuscular blockade as well as for histological damage observed. SDS-PAGE of the fractions showed that the majority proteins had a molecular mass of 20-66 KDa. These results suggest that the *P. patagoniensis* venom has neurotoxic and myotoxic components, probable responsible for signals of envenomation caused by this snake.

Keywords: *Philodryas patagoniensis*; venom; neuromuscular junction, *biventer cervicis*; electrophysiology; HPLC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da peçonha de *Philodryas patagoniensis* sobre as contraturas musculares produzidas em resposta a acetilcolina (ACh) e potássio (K^+) em preparações *biventer cervicis* de pintainho.....36

Tabela 2. Dosagem de proteínas e atividade proteolítica das quatro frações obtidas a partir do fracionamento da peçonha de *P. patagoniensis*.....54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Philodryas patagoniensis* Girard (1858).....15
Figura 2. Distribuição geográfica da serpente *Philodryas patagoniensis* no Brasil.....16
Figura 3. Efeito induzido pela peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC.....31
Figura 4. Efeito da peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC.....32
Figura 5. Efeito induzido pela peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica direta, a 37ºC.....33
Figura 6. Efeito da peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica direta, a 37ºC.....34
Figura 7. Curva de liberação de CK induzida pela ação da peçonha de *Philodryas patagoniensis* em preparação *biventer cervicis* de ave sob estimulação elétrica indireta.....37
Figura 8. Curva de liberação de CK induzida pela ação da peçonha de *Philodryas patagoniensis* em preparação *biventer cervicis* de ave sob estimulação direta.....38
Figura 9. Potenciais de membrana em repouso (diafragma de camundongo) frente à peçonha de *P. patagoniensis* (150 μg/mL).....40
Figura 10. Efeito da peçonha de *P. patagoniensis* (150 μg/mL) sobre a freqüência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura em preparação diafragma de camundongo em diferentes tempos.....42
Figura 11. Efeito do veneno de *Philodryas patagoniensis* sobre potenciais em miniatura de placa terminal (pmpt) em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.....43
Figura 12. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com solução de Krebs (controle) durante 120 minutos.....45

Figura 13. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de ave incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos.....46

Figura 14. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de ave incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos.....47

Figura 15. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de ave incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos.....48

Figura 16. Índice de mionecrose de músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com peçonha de *Philodryas patagoniensis*.....49

Figura 17. Perfil Cromatográfico obtido pelo fracionamento do veneno de *Philodryas patagoniensis* em RPC Source 15.....50

Figura 18. Perfil cromatográfico da Fração III (HPLC) obtida a partir da peçonha fracionada (RPC) da serpente *Philodryas patagoniensis*.....51

Figura 19. Perfis eletroforéticos das frações da peçonha de *P. patagoniensis*.....53

Figura 20. Efeito induzido pela Fração III (5 μg/mL) e Sub-fração III-II da peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC.....56

Figura 21. Efeito da Fração III (5 μg/mL) e da sub-fração III-II de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC.....57

Figura 22. Curva de liberação de CK induzida pela ação da Fração III e Sub-fração III-II obtida da peçonha de *Philodryas patagoniensis* em preparação *biventer cervicis* de ave sob estimulação indireta.....58

Figura 23. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com a fração III de *P. patagoniensis*.....59

Figura 24. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com a fração III e sub-fração III-II de *P. patagoniensis*.....60

Lista de Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

ACTH – Acetonitrila

ATF – Ácido Trifluoracético

BSA – Albumina de soro bovina

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CK – Creatino quinase

COBEA – Conselho Brasileiro de Experimental Animal

dTC – d-tubocurarina

EPM – Erro Padrão da Média

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

HVB-IB – Hospital Vital Brazil – Instituto Butantã

PLA_2 – Fosfolipase A_2

PM – Potencial de Membrana

PMPT – Potencial em miniatura de placa terminal

RPC – Cromatografia de Fase Reversa

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TCA – Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

1 Introdução **1**

2 Revisão Bibliográfica **4**

2.1 Epidemiologia dos acidentes por serpentes não-peçonhentas 5

2.2 A família Colubridae e a glândula de Duvernoy 7

2.3 Toxinologia de peçonhas da família Colubridae 9

2.4 Aspectos clínicos de envenenamento por serpentes não-peçonhentas 10

2.5 Ação neuromuscular da peçonha de Colubrídeas 11

2.6 *Philodryas patagoniensis* 13

3 Objetivos **17**

4 Material e Métodos **19**

4.1 Reagentes 20

4.2 Animais 20

4.3 Protocolo de Eutanásia 21

4.4 Comitê de Ética em Pesquisa 21

4.5 Peçonha 21

4.6 Fracionamento da peçonha 22

4.6.1 Cromatografia de Fase Reversa (RPC) 22

4.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) 22

4.7 Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 23

4.8 Atividade Proteolítica 23

4.9 Determinação de proteínas 24

4.10 Estudo miográfico 24

3.10.1 Preparação *biventer cervicis* de pintainho 24

4.11 Estudo eletrofisiológico 25

4.11.1 Registro do potencial de membrana 26

4.11.2 Registro do potencial em miniatura de placa terminal (pmpt) 27

4.12 Dosagem de creatino quinase (CK) 27

4.13 Análise morfológica 28

4.14 Análise estatística 28

5 Resultados **29**

5.1 Estudo miográfico 30

5.1.1 Preparação *biventer cervicis* de pintainho 30
5.1.2 Resposta contraturante a acetilcolina (ACh) e potássio (K^+) 35
5.1.3 Determinação de creatino quinase (CK) 37
5.2 Estudo Eletrofisiológico 39
5.2.1 Medida e Análise do potencial de membrana (P.M) 39
5.2.2 Medida e análise do potencial em miniatura de placa terminal (pmpt) 41
5.3 Análise histológica 44
5.4 Estudo Bioquímico 50
5.4.1 Ensaio Cromatográfico de fase reversa em RPC Source 15 50
5.4.2 Ensaio Cromatográfico em HPLC de coluna fase reversa C4 51
5.4.3 Eletroforese 52
5.4.4 Atividade Proteolítica e Dosagem de Proteínas 54
5.5 Estudo miográfico das frações obtidas a partir do veneno total de *P. patagoniensis* 55
5.5.1 Preparação *biventer cervicis* de pintainho 55
5.6 Dosagem de creatino quinase (CK) frente a incubação com a Fração III e Sub-fraçãoIII-II 58
5.7 Análise histológica 59
6 Discussão **61**
7 Conclusões **68**
Referências **70**
Anexo - Comitê de Ética em Pesquisa (UNIVAP) **80**

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais e em desenvolvimento devido à freqüência em que ocorrem, à alta morbidade que ocasionam, à gravidade e as seqüelas deixadas nos indivíduos acidentados (BARRAVIERA, 1999; PINHO; PEREIRA, 2001).

A maior parte dos acidentes ofídicos registrados no país é atribuída às serpentes peçonhentas, dentre as quais estão classificadas as serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* (Viperidae) e *Micrurus* (Elapidae). Entretanto uma pequena porcentagem desses acidentes está relacionada a serpentes consideradas não-peçonhentas, como a colubrídea *Philodryas patagoniensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

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

Devido à complexidade dos venenos animais, o conhecimento de suas propriedades ainda é bastante limitado. Entretanto, tem-se alcançado grande avanço, resultante de incessantes pesquisas que vêm sendo realizadas. De maneira geral, os agentes responsáveis pela toxicidade dos venenos são representados por componentes de natureza protéica, com ou sem atividade enzimática. Ainda, componentes de menor peso molecular e estrutura química variável, como histamina, serotonina, polipeptídeos, podem ser relacionados a outros efeitos

dos envenenamentos no homem e nos “animais de laboratório” (ALMEIDA, 1985 apud BORJA-OLIVEIRA, 1998).

Os venenos de serpentes são complexas misturas de toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos que variam, em sua composição, de acordo com a família, gênero e espécie a que pertence (LEITE *et al*., 1992).

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

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existem aproximadamente 3 mil espécies de serpentes no mundo, destas apenas 410 são consideradas peçonhentas e classificadas de acordo com suas características morfológicas, compreendendo 5 famílias: Crotalidae, Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae. No Brasil estão catalogadas até o momento 256 espécies, sendo 69 peçonhentas e 187 não-peçonhentas (BARRAVIERA, 1999).

A Família Colubridae é a que possui o maior número de gêneros (300) e espécies (1850), correspondendo, portanto, a 65% das aproximadamente 3000 espécies de serpentes conhecidas atualmente, enquanto as famílias Elapidae e Viperidae juntas contêm cerca de 93 gêneros e 510 espécies (SILVA JR., 1997; VIDAL, 2002).

A Família Colubridae inclui a maioria das serpentes ditas não-peçonhentas e sua distribuição abrange todo o território brasileiro. Essas serpentes produzem substâncias químicas que podem, em algumas vezes, ser tóxicas aos seres humanos e são comumente relacionadas a mordeduras com repercussões locais e, eventualmente, sistêmicas importantes (SILVA JR., 1997).

2.1 Epidemiologia dos Acidentes por Serpentes Não-Peçonhentas

No Brasil são relatados anualmente cerca de 20.000 casos de envenenamento causados por serpentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). Segundo Ministério da Saúde (1999), cerca de 90% dos acidentes é atribuído a serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops,* 6,2% ao

gênero *Crotalus,* 1,1% ao gênero *Lachesis* e 0,3% ao gênero *Micrurus.* Cerca de 3% dos casos estão relacionados a serpentes não-peçonhentas.

Em um estudo recente realizado na região Vale do Paraíba constatou-se que 8% dos acidentes eram causados por estas serpentes (PIRES, 2004). Com isso, supõem-se que a maioria dos colubrídeos oferece pouco risco aos seres humanos devido a um sistema relativamente ineficiente da secreção e inoculação do veneno se comparado com o aparato encontrado em serpentes da família Viperidae e Elapidae (KARDONG; LAVIN-MURCIO, 1993). Conseqüentemente a maioria dos venenos colubrídeos permaneceu descaracterizada, entretanto há um interesse crescente no estudo desses venenos, uma vez que a base evolucionária e extensiva da história sugere uma vasta fonte de toxinas com atividades biológicas (MACKESSY, 2002a).

Diferentemente de serpentes como a *Bothrops jararaca*, a *Crotalus durissus terrificus* e outras serpentes peçonhentas, a incidência de acidentes causados por serpentes do gênero *Philodryas* é baixa, talvez devido à anatomia de seu aparato inoculador, onde a injeção da peçonha fica dificultada por se tratarem de serpentes opistóglifas, ou ainda pelo fato de serem serpentes de hábitos não agressivos.

Embora a maioria dos estudos clínicos e toxinológicos terem sido relacionados à espécie *Philodryas olfersii (P. olfersii)* (ASSAKURA *et al*., 1994; PRADO-FRANCESCHI *et al*., 1996, 1998, RIBEIRO *et al*., 1999), *Philodryas patagoniensis (P. patagoniensis)* também é capaz de causar acidentes em humanos. A sintomatologia do envenenamento por esta espécie inclui edema progressivo com supuração em alguns casos, aparecimento de linfopatia nodular após 48 horas, perda de sensibilidade táctil e paresia, além de sensação de peso no

membro atingido (ARAÚJO E SANTOS, 1997). Martins (1917) aponta para a existência de grandes semelhanças entre os envenenamentos ocasionados por *P. patagoniensis* e *P. olfersii.*

Anualmente, segundo o Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan (HVB-IB), o percentual de acidentes causados pela *P. olfersii* é de 1% dos 500 casos atendidos (SILVA; BUONONATO, 1983/1984), com isso, essa espécie tem sido mais bem estudada. Contudo, acidentes com outras espécies desse gênero também são notificadas. Ribeiro *et al.* (1999), em seu estudo clínico e epidemiológico de 43 casos de picada produzidas em humanos pela serpente *P. olfersii*, concluíram que a maioria dos casos (58,1%) ocorreu durante a tarde (12-18h) e (27,9%) pela manhã (6-12h), enquanto os acidentados trabalhavam ou manipulavam a serpente. Assim, as épocas e horários das ocorrências foram coincidentes com as dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, sugerindo picos de incidência dependentes da variação sazonal da atividade humana. A região corporal mais afetada foi a mão ou dedos, com 72,1%, enquanto os pés foram afetados em 20,9% dos casos. A sintomatologia apresentada foi de dor local em 37,2% dos casos, edema em 34,9%, eritema em 18,6% e equimose em 9,3%.

2.2 A Família Colubridae e a Glândula de Duvernoy

Durante a segunda metade do século passado, numerosos trabalhos relataram que serpentes de várias espécies da família Colubridae (com ou sem dentes maxilares posteriores aumentados, isto é, áglifas ou opistóglifas), freqüentemente consideradas inócuas, eram capazes de causar envenenamento grave, e até fatal, em humanos (GANS, 1978; MCKINSTRY, 1978; DE LISLE, 1982; JAUME, 1983; HARDING, 1984; SLYPEN, 1984; MINTON, 1976, 1979, 1990, 1996; MACKESSY, 2002a; PRADO-FRANCESCHI; HYSLOP, 2002).

Cerca de 1560 espécies da família Colubridae possuem a glândula de Duvernoy que é histologicamente homóloga às verdadeiras glândulas de peçonha das famílias Elapidae, Hydrophidae e Viperidae, uma vez que se deriva do mesmo tecido embrionário que as glândulas de peçonha destas famílias (KOCHVA, 1978, 1987). Taub (1967) encontrou a glândula de Duvernoy em cerca de 250 de 300 espécies estudadas, e McKinstry (1983) listou 177 gêneros de colubrídeas com a glândula de Duvernoy e/ou dentes maxilares posteriores aumentados (sulcados ou não) e que poderiam representar algum risco para o envenenamento em humanos.

A glândula de Duvernoy é caracteristicamente uma glândula composta, tubular e ramificada, cujo parênquima é constituído exclusivamente ou predominantemente de células serosas. Não é observado nessas glândulas um grande reservatório extracelular de peçonha como ocorre com as verdadeiras glândulas de peçonha (TAUB, 1967; KOCHVA, 1987; WEINSTEIN; KARDONG, 1994).

A peçonha produzida por esta glândula chega à cavidade oral por um simples duto que se abre perto de uma ou mais presas posteriores do maxilar superior. Este duto abre-se em um espaço definido por um botão de epitélio oral ao redor da presa. Como não há um grande reservatório, há menos peçonha pronta para ser injetada na hora da picada, o que é refletido na necessidade da maioria das espécies colubrídeas segurarem a vítima enquanto a peçonha é lentamente injetada através de um processo que envolve a mastigação (WEINSTEIN; KARDONG, 1994). Este mecanismo de estocagem e injeção de peçonha também representa uma das principais dificuldades para a obtenção de peçonha de muitas espécies em quantidades suficientes para o estudo do seu modo de ação e sua caracterização bioquímica (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; MACKESSY, 2002b).

Há vários métodos descritos para a obtenção de peçonhas de colubrídeas (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; HILL; MACKESSY, 1997, 2000; MACKESSY, 2002b), um dos quais envolve a colocação de tubos capilares (~1mm de diâmetro) nas presas da serpente seguido de massagem das glândulas com suave compressão para estimular a liberação da peçonha (SOUZA-FILHO *et al*., 1999). Este processo pode ser facilitado com a administração de ketamina (sedativo) e pilocarpina (agonista muscarínico, para estimular a liberação da peçonha) (HILL; MACKESSY, 1997, 2000).

2.3 Toxinologia de Peçonhas da Família Colubridae

Em comum com peçonhas de serpentes das famílias Elapidae, Hydrophidae e Viperidae, as da família Colubridae possuem algumas enzimas (acetilcolinesterase, fosfatases, fosfodiesterase, proteases), porém em muitas destas peçonhas as atividades enzimáticas, comum em peçonhas de outras famílias de serpentes peçonhentas (p.ex. arginina esterases, fosfolipase A2 - PLA_2, hialuronidase, L-amino ácido oxidase e serinoproteases do tipo calicreína, fibrino (geno) lítica e trombina) são escassas ou presentes em níveis bastante reduzidos (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; MACKESSY 2002b).

Em termos de atividade biológica, as peçonhas de colubrídeas mostram uma variedade de atividades biológicas, incluindo edema, dor, hemorragia, necrose e neurotoxicidade (MACKESSY, 2002b; JANSEN, 1987). Como em outras serpentes peçonhentas, a toxicidade das peçonhas de colubrídeas varia dentre os gêneros e as espécies de colubrídeos e apresenta certa similaridade à variação observada em peçonhas de outras famílias de serpentes peçonhentas. É provável que, como em outras serpentes peçonhentas, existam variações inter e intraespecíficas, bem como ontogenéticas e geográficas, que podem influenciar as

propriedades e atividades das secreções destas glândulas (CHIPPAUX *et al*., 1991; WEINSTEIN; KARDONG, 1994).

2.4 Aspectos Clínicos de Envenenamento por Serpentes Não-Peçonhentas

Apesar de serem consideradas não-peçonhentas, serpentes com dentição opistóglifa têm capacidade de inocular peçonha podendo, eventualmente, provocar um quadro inflamatório local intenso. Algumas se destacam como as serpentes da família Colubridae, essencialmente os gêneros *Philodryas*, *Clélia* e *Boiruna* que podem causar acidentes que se assemelham bastante ao acidente botrópico (SOERENSEN, 1990; PUORTO; FRANÇA, 2003).

Na maioria dos casos, as picadas por serpentes não venenosas não provocam manifestações gerais, podendo causar alterações locais como dor moderada, discreto inchaço e eritema (GUIMARÃES, 1972). Entretanto, há estudos que demonstram que o veneno de *P. ofersii* possui atividade hemorrágica, edematogênica e fibrinogenolítica (ASSAKURA *et al*., 1994).

Araújo e Santos (1997), em estudo de envenenamento ocasionado por *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, apontam a progressividade do edema com possível supuração, linfopatia nodular, perda de sensibilidade táctil e de certos movimentos por algum tempo. De modo semelhante, Peichoto *et al.* (2003) comentam que o envenenamento por serpentes do gênero *Philodryas* tem a característica de, em acidentes com humanos, produzir edema, equimose e sangramento no local da picada, bastante similar àqueles causados por acidentes com

serpentes do gênero *Bothrops*. Também foi observado que a sintomatologia usual pode ser resumida em dor local, edema, eritema, equimose, linfoadenopatia regional e sangramento. Assakura *et al*. (1994) e Jorge e Ribeiro (1990) mostram que a equimose sugere um processo hemorrágico muito parecido com aquele observado em acidentes envolvendo espécies de *Bothrops*.

2.5 Ação Neuromuscular da Peçonha de Colubrídeas

Entre as atividades biológicas das peçonhas de colubrídeas, a capacidade de interferir com a neurotransmissão tem sido investigada para várias espécies. Assim, Levinson *et al*. (1976) observaram que, em preparação neuromuscular ciático-sartório de rã (*Rana temporaria*), a peçonha de *Boiga blandingi* (50-100 μg/mL) reduziu ou aboliu o potencial de placa terminal e aboliu as contrações musculares por estímulos indiretos em apenas 2 minutos. Este bloqueio foi irreversível uma vez que não foi revertido por diversas lavagens da preparação.

O fracionamento da peçonha através da gel-filtração resultou na purificação parcial de uma toxina de 7,1-8,5 KDa que correspondia a aproximadamente 5% do peso seco da peçonha. O mecanismo de ação desta(s) neurotoxina(s) consiste principalmente no bloqueio dos receptores colinérgicos nicotínicos da membrana pós-sináptica da junção neuromuscular, de maneira semelhante à α-bungarotoxina. Estudo posterior usando FPLC e colunas de Mono S identificou uma proteína básica tóxica de 13,5 KDa nesta mesma peçonha e que foi capaz de causar os sinais típicos de neurotoxicidade em animais de laboratório (WEINSTEIN; SMITH, 1993).

Investigações posteriores demonstraram que a peçonha desta espécie, bem como as de *Boiga dendrophila* e *Boiga irregularis* aparentemente contêm dois tipos de neurotoxinas pós-sinápticas diferentes (alta e baixa afinidades) cuja ligação aos receptores nicotínicos da acetilcolina é inibida por α-cobrotoxina e α-bungarotoxina de forma competitiva (WEINSTEIN *et al.,* 1993; BROADERS *et al*., 1999). No caso de *B. irregularis*, observou-se certa variação no conteúdo das neurotoxinas e na toxicidade da peçonha entre serpentes jovens e adultos (WEINSTEIN *et al*., 1993).

Em experimentos realizados com a peçonha de *Heterodon platirhinos* na concentração de 100 μg/mL na preparação neuromuscular ciático-gastrocnêmio de rã (*Rana pipiens*). Young (1992) relatou que ocorreu bloqueio total das contrações musculares em 120 minutos, e que este bloqueio era irreversível (por lavagem), podendo, entretanto, ser abolido pela presença da fisostigmina, inibidor da acetilcolinesterase. Ao contrário destas observações, a peçonha de *Dispholidus typus* é destituída de ação nesta preparação de anfíbio (em concentrações até 100 μg/mL), porém estimula a contração de músculo liso não-vascular por um mecanismo sensível à atropina (YOUNG, 1996).

Comparado aos trabalhos com outras colubrídeas, pouco se sabe da capacidade das peçonhas das colubrídeas sul-americanas e, especialmente as brasileiras, em produzir efeitos neuromusculares em animais experimentais ou em humanos envenenados acidentalmente. No início do século passado, Martins (1917) e Brazil e Vellard (1926) avaliaram a ação neurotóxica de algumas espécies brasileiras, observando que algumas delas possuíam ação potente sobre a neurotransmissão.

Mais recentemente, Fontana *et al*. (1996) relataram ação neurotóxica potente na peçonha de jararacussu do brejo (*Mastigodryas (= Dryadophis) bifossatus bifossatus*) quando testada em preparação *biventer cervicis* de pintainho. Esta atividade era termoestável, insensível a acetilcolina e carbacol, e não foi antagonizada pela neostigmina ou 4-aminopiridina, sugerindo assim um sítio de ação pós-sináptica. A toxina responsável por esta atividade possui uma massa molecular em torno de 12 KDa (HELENO *et al*., 1997).

Estudos com peçonha de *P. olfersii* demonstraram que tanto uma miotoxina isolada desta serpente (PRADO-FRANCESCHI *et al*., 1998), bem como uma fração semi-purificada (PRADO-FRANCESCHI *et al*., 1996) eram ativas na junção neuromuscular de *biventer cervicis* de pintainho, levando à inibição da neurotransmissão. A neurotoxina responsável pelo bloqueio observado neste último estudo ainda não foi caracterizada. Curiosamente, tanto a peçonha de *M. bifossatus* como a da *P. olfersii* são pouco ativas em preparações neuromusculares de mamíferos (nervo-frênico de camundongo), sugerindo uma seletividade para certo tipo de presa na dieta destas serpentes.

2.6 *Philodryas patagoniensis*

P. patagoniensis (Figura 1) pertence à família Colubridae e a subfamília Xenodontinae. Trata-se de serpentes opistóglifas, ou seja, com dentes localizados na parte posterior da boca. Os exemplares adultos chegam a medir mais de um metro de comprimento. É uma espécie semi-arborícola (ROCHA; MOLINA, 1987). Segundo Sazima e Haddad (1992), podem também ser terrestre, sendo bastante encontrada em lugares descampados.

São serpentes encontradas em diversos locais da América do Sul como Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (PETERS; OREJAS-MIRANDA, 1970; ROCHA; MOLINA, 1987). No Brasil sua predominância ocorre em todos Estados da região Sul e Sudeste, além dos Estados do Mato Grosso do Sul, parte de Goiás e quase totalidade da Bahia (MUSEU DO INSTITUTO BUTANTAN, 2006) (Figura 2).

A dieta dessas serpentes consiste de pequenos vertebrados como: anuros, pequenas aves, pequenos lagartos etc. (HARTMANN; MARQUES, 2005).

Em vista do exposto acima e considerando a ausência geral de informações sobre a ação neuromuscular das peçonhas de colubrídeas brasileiras, e que estudos anteriores demonstraram que a peçonha de *P. olfersii* contém pelo menos dois componentes (um deles uma miotoxina) capazes de prejudicar a neurotransmissão em preparações de aves (PRADO-FRANCESCHI *et al*., 1996, 1998), e ainda, que o estudo destas peçonhas pouco conhecidas poderá levar a descoberta de novas toxinas de possível utilidade experimental e terapêutica, demonstra-se necessário o estudo da peçonha de *P. patagoniensis* sobre a neurotransmissão em preparações de ave.

Figura 1. ***Philodryas patagoniensis*** **Girard (1858).**
Fonte: University of California (2006).

Figura 2. Distribuição geográfica da serpente *Philodryas patagoniensis* no Brasil.
Fonte: Museu do Instituto Butantan (2006).

3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os objetivos da presente pesquisa foram:

Objetivo Geral:

Avaliar as ações neurotóxicas e miotóxicas da peçonha de *P. patagoniensis*.

Objetivo específico:

Isolar e caracterizar (de forma preliminar) bioquímica e farmacologicamente o(s) componente(s) responsável(eis) pela ação neurotóxica da peçonha.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os solventes utilizados para cromatografia e dosagem de proteínas, acetilcolina, caseína bovina, albumina soro bovina, d-tubocurarina, hematoxilina e eosina foram provenientes da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os reagentes para eletroforese e ácido tricloroacético (TCA) foram provenientes da Amersham Biosciences (Piscatawy, NJ, USA). Os corantes utilizados para eletroforese foram obtidos da Pierce (Rockford, MD, USA) e o marcador de massa molecular da Bio Rad Labs. (Richimond, CA, USA). Os anestésicos (Cloridrato de Ketamina, Cloridrato de Xilazina) foram obtidos respectivamente da Agibrands do Brasil Ltda. (Paulínia, São Paulo, Brasil) e União Química Farmacêutica Nacional (Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e o reagente de Folin foi proveniente da Dinâmica (São Paulo, SP, Brasil). Os sais utilizados para soluções fisiológicas foram obtidos da Baker, Mallinckrodt ou Merck.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (18-24 g) fornecidos pela ANILAB (CAMPINAS) e pintainhos da linhagem HY-LINE W36 (4-8 dias) fornecidos pela Granja Ito S/A (Campinas). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*.

4.3 Protocolo de Eutanásia

Os animais foram anestesiados com 0,1 mL de cloridrato de xilazina e 0,1 mL de cloridrato de ketamina (pintainhos) e 0,6 mL/Kg de cloridrato de ketamina e 0,6 mL/Kg de cloridrato de xilazina (camundongos) e posteriormente a anestesia, os animais foram eutanasiados com halotano.

4.4 Comitê de Ética em Pesquisa

Os procedimentos utilizados neste projeto seguiram as normas e requisitos éticos da pesquisa envolvendo animais, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP sob protocolo nº L099/2005/CEP.

4.5 Peçonha

A peçonha foi obtida de espécimes de *P. patagoniensis* capturadas no Campus Urbanova da UNIVAP, na região do Vale do Paraíba e mantidas no Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN), UNIVAP. A extração da peçonha foi efetuada mensalmente conforme descrito por Souza-Filho *et al*. (1999), com intervalo de pelo menos 15 dias depois da última alimentação. Após a extração, a peçonha foi liofilizada e mantida a -20ºC.

4.6 Fracionamento da peçonha

4.6.1 Cromatografia Líquida de Baixa Pressão (LPLC) - Cromatografia de Fase Reversa (RPC)

Inicialmente, a peçonha foi dissolvida em solução aquosa de ácido trifluoracético (ATF:H_2O 1:99 - ATF 0,1%) e centrifugada a 4000x g à 10ºC durante 15 minutos (Beckman Coulter Avanti ^{TM} Centrifuge J-20XPI, Fullerton, CA, USA). O sobrenadante resultante foi submetido a uma Cromatografia de Fase Reversa em uma coluna Source 15 RPC (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) utilizando um gradiente linear contínuo de acetonitrila 66% (Solvente B - H_2O:ACTH:ATF 1:98:1) (0-60% em 30 minutos), com platô de 60% por 5 minutos e gradiente linear descontínuo de 60-100% com velocidade de fluxo constante de 1.0 ml/min. Em todos os ensaios, o perfil de eluição foi monitorado através de um detector UV a 214 e 280 nm. As frações resultantes foram liofilizadas para teste de sua(s) atividade(s) biológica(s).

4.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

A avaliação da pureza das frações foi realizada por HPLC de fase reversa (Acta Purifier System, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), usando-se colunas do tipo Symmetry 300 ^{TM} C4 (5 μm, St 4,6/250; Waters, Milford, USA). Para isso, a proteína foi aplicada à coluna pré-equilibrada com ATF 0,1%. O material foi eluído com um gradiente linear descontínuo (0-100%) de ACTH 66% em ATF 0,1% a um fluxo de 1.0 ml/min. Em todos os ensaios, o perfil de eluição foi monitorado através de um detector UV fixo a 214 e 280 nm. As frações resultantes foram liofilizadas para teste de sua(s) atividade(s) biológica(s).

4.7 Eletroforese em Géis de Poliacrilamida Contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

A eletroforese da(s) toxina(s) purificada(s) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em géis de 12% de poliacrilamida usando-se um sistema de eletroforese Eletrophoreses Power Suplly – EPS300 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 6,8, contendo EDTA 2 mM, SDS 5%, e azul de bromofenol 0,01% e fervidas durante 5 minutos. Alíquotas de 30 μl foram aplicadas aos poços do gel. A corrida foi feita em temperatura ambiente à 100 V (constante), 25 mA até o bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel. Em seguida, os géis foram fixados ("overnight"), corados com azul brilhante de Coomassie R250 e documentados. A massa molecular das toxinas purificadas foi determinada por comparação com proteínas de massa molecular conhecida utilizando-se marcador de massa molecular Bio-Rad/161-0317 (Bio Rad Labs., Richimond, CA, USA).

4.8 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi realizada segundo o método descrito por Kunitz (1947), usando-se a caseína como substrato. Para 1,9 ml de uma solução de substrato à 1% em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8, contendo $CaCl_2$ 5 mM, pré-incubada por 5 minutos a 37ºC, foi adicionado 0,1 ml de fração seguido por incubação durante 20 min a 37ºC. A reação foi interrompida pela adição de 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% e as amostras incubadas em gelo por 30 minutos prévios a centrifugação. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 280 nm. Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,001 na absorbância/min.

4.9 Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al*. (1951) utilizando BSA (albumina de soro bovina) como padrão.

As amostras (triplicatas) com solução de proteína (50 µl) foram diluídas em 950 µl de água e incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos com 2,5 mL de reagente C constituído de solução A ($CuSO_4.5H_2O$ 5%, citrato trissódico 1% em água) e solução B ($NACO_3$ 20%, NaOH 4% em água).

Em seguida foram adicionados 250 µl de reagente de Folin, deixando-se por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Posteriormente foi lida a absorbância a 750 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva padrão de soro albumina bovina, com concentrações de 0 a 400 µg/mL.

4.10 Estudo Miográfico

4.10.1 Preparação *biventer cervicis* de Pintainho

As preparações foram isoladas e montadas de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960) após sacrifício de pintainhos com halotano. Os músculos foram suspensos em 4 ml de solução de Krebs (composição, em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; $CaCl_2$ 1,88; KH_2PO_4 1,17; $NaHCO_3$ 14,99 e glicose 11,65; pH 7,4) arejados com carbogênio (mistura 95% O_2 e 5% CO_2) e mantidos a 37ºC. Os músculos foram submetidos a uma tensão constante de 0,5 g e estimulados através de eletrodos bipolares posicionados na região entre o tendão e o músculo de modo a produzir uma estimulação de campo. Foram aplicados estímulos de 4-8 V com pulsos supramaximais de 0,1 Hz de freqüência e 0,2 ms de duração para a estimulação indireta e 20-30 V (0,1 Hz; 2 ms), para a estimulação direta (estimulador

GRASS S88K, RI, USA). As preparações estimuladas diretamente foram previamente tratadas com d-tubocurarina (dTc) (5,86 μM) para bloquear as respostas à estimulação indireta. As contrações musculares resultantes dos estímulos elétricos maximais e as contraturas em resposta á adição de ACh (55 e 110 μM) e KCl (13,4 mM) foram registradas durante 120 minutos em fisiógrafo Gemini 7050 (Ugo Basile, VA, Italy) através de transdutores isométricos BG-25 GM (Kulite Semiconductor Products Inc., NJ, USA). O registro das contraturas para K^+ e ACh foram realizados com a ausência de estimulação elétrica, no início, (antes da adição da peçonha e frações ativas) e após o período de 120 minutos de incubação com a toxina. Os efeitos da peçonha nestas preparações foram avaliados testando-se concentrações de 5, 10 e 40 μg/ml da peçonha e 5 μg/ml da fração ativa. Nos experimentos controles, foram adicionados à preparação 0,2 ml de solução de Krebs.

4.11 Estudo Eletrofisiológico

O registro do potencial de membrana (PM) e do potencial em miniatura de placa terminal (pmpt) foi realizado em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. A preparação com sua face torácica voltada para cima (hemidiafragma esquerdo), foi fixada, horizontalmente, por meio de alfinetes entomológicos (BÜLBRING, 1946), em cuba revestida de resina e silicone ("Dow Corning-Sylgard"). A cuba foi preenchida com 2 ml de solução de Tyrode (de composição, em mM: NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $MgCl_2$ 0,49; Na_2PO_4 0,42; $NaHCO_3$ 11,9 e glicose 11,1; pH 7,4). A aeração foi feita com carbogênio (mistura de 95% O_2 e 5% CO_2). Para observação dos parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina de microscópio estereoscópico (Wild M7 S, Swizterland) com capacidade para aumento de até 40 vezes.

Foi usada a técnica convencional de registro com microeletrodo (FATT; KATZ, 1951). Os microeletrodos de vidro, preparados com o auxílio de um Vertical Pipete Puller modelo 720 (D-David Kopf Instruments; CA, USA), foram preenchidos com KCl 3 M, tendo uma resistência entre 15-25 MΩ. As micropipetas foram introduzidas intracelularmente (seis leituras em regiões distintas) nas fibras musculares superficiais, com o auxílio de micromanipulador M3301R (World Precision Instruments – USA), para a medida do potencial de membrana e captação dos potenciais em miniatura de placa terminal (pmpt). O eletrodo indiferente constituiu-se de um fio de prata cloretada. Os pmpts foram registrados em osciloscópio Digital TDS 1012 (Tektronix Inc. – USA) em um software para aquisição de dados AqDADOS (Lynx, São Paulo, Brasil). Todo o aparato para o registro eletrofisiológico esteve contido numa gaiola de Faraday apropriada e isolada de interferência elétrica externa.

4.11.1 Registro do Potencial de Membrana

Para a determinação do potencial de membrana das fibras musculares, os microeletrodos foram inseridos intracelularmente nas fibras musculares superficiais, com o auxílio de microscópio binocular, fazendo-se a medida do deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da inserção. O mesmo procedimento foi repetido em seis fibras distintas. A avaliação dos efeitos induzidos pela peçonha (150 μg/ml), sobre o potencial de repouso da fibra muscular foi realizado no tempo zero (controle), e aos 15, 30 e 60 min após a adição da mesma. Nos experimentos controles, foram adicionados 0,2 ml de solução de Tyrode (sem peçonha ou fração) e as medidas foram feitas nos mesmos tempos indicados acima.

4.11.2 Registro do Potencial em Miniatura de Placa Terminal (Pmpt)

Os pmpts foram medidos através da inserção do microeletrodo nas fibras musculares, na região da placa motora, e os sinais foram captados em osciloscópio Tektronix (sensibilidade 1 mV/cm) e registrados em um software para aquisição de dados AqDADOS (Lynx, São Paulo, Brasil). Os parâmetros controle foram definidos antes da adição da peçonha. Os pmpts foram registrados antes (controle) e após 15, 30 e 60 min de incubação com peçonha (150 μg/ml). Nos experimentos controles, foram adicionados 0,2 ml de solução de Tyrode e a leitura foi realizada nos mesmos tempos acima indicados sem a adição de peçonha.

4.12 Dosagem de Creatino Quinase (CK)

A quantificação da enzima CK liberada pela preparação *biventer cervicis* foi usada como indicador da ação miotóxica da peçonha e frações sobre as fibras musculares. Durante os experimentos para registrar as contrações musculares (ver acima), alíquotas de 0,2 ml do meio nutritivo foram retiradas do banho durante o período de repouso (estabilização da preparação) e 10, 20, 40, 80 e 120 minutos após a adição da peçonha nas concentrações utilizadas conforme descrito no item 4.9.1. Para o grupo controle, amostras de 0,2 ml foram retiradas do banho nos tempos acima indicados, sem a adição de peçonha (completando-se, no entanto o volume da cuba com solução de Krebs). A atividade da CK foi dosada com kit comercial CK NAC (Laborlab S/A, Guarulhos, SP), conforme orientações do fabricante. Para a leitura da absorbância (340 nm) foi utilizado espectrofotômetro BIO 2000 (BIOPLUS, Barueri, SP).

4.13 Análise Morfológica

As alterações morfológicas foram avaliadas em músculo incubado com peçonha (concentrações variadas) e frações durante 120 minutos. Terminada a incubação, os tecidos foram fixados em formol 10%, seguindo-se procedimentos de rotina para desidratação (álcool 50, 70 e 100%, respectivamente) e inclusão em parafina e/ou paraplast. Secções de 5 μm foram obtidas em micrótomo SPENCER 820 (Lupe, São Paulo, SP), montadas em lâminas de microscopia, coradas com hematoxilina-eosina e fotografadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 system Cool Pix 5400 (Nikon Instruments. Inc., NY, USA).

A proporção de fibras danificadas (índice de mionecrose) foi expressa como porcentagem do total de fibras contadas por campo histológico (dez campos não sobrepostos e aleatórios, num total de 10 cortes por tecido).

4.14 Análise Estatística

Conforme necessário, os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). A significância da diferença entre os grupos controle e tratados com peçonha ou fração foi determinada com o teste t-Student, ou por ANOVA seguida pelo teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas. Foram considerados estatisticamente significativos valores com $p<0.05$.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudo Miográfico

5.1.1 Preparação *biventer cervicis* de Pintainho

A peçonha total de *P. patagoniensis* foi ensaiada em três diferentes concentrações (5, 10 e 40 μg/mL) a 37ºC sob estimulação elétrica indireta e nas concentrações de 5 e 40 μg/mL sob estimulação elétrica direta. Foi observado que todas as concentrações de peçonha testadas promoveram bloqueio das contrações musculares após o período de estabilização das preparações. O bloqueio neuromuscular mostrou-se invariavelmente irreversível e dose-tempo-dependente.

Os músculos estimulados indiretamente frente à concentração de 5 μg/mL (n=3) apresentaram bloqueio de 50% aos 20 minutos de incubação e alcançaram 100% de bloqueio aos 120 minutos. Já na concentração de 10 μg/mL (n=3) a preparação apresentou 50% de bloqueio das contrações musculares por volta de 30 minutos e progrediu para 100% de bloqueio aos 120 minutos de incubação. E a concentração de 40 μg/mL (n=3) do veneno de *P. patagoniensis* promoveu 50% de bloqueio aproximadamente aos 25 minutos de incubação e bloqueou totalmente as contrações musculares aos 90 minutos (Figuras 3 e 4).

As preparações *biventer cervicis* de pintainho foram previamente tratadas com d-tubocurarina na concentração de 8 μg/mL (necessária para curarização total) para realização dos experimentos com estimulação elétrica direta. Na concentração de 5 μg/mL, o bloqueio das contrações musculares foi de 47% aos 90 minutos permanecendo assim ao término dos 120 minutos de incubação. Já para a concentração de 40 μg/mL, 50% das contrações

musculares foram bloqueadas em torno de 40 minutos de incubação progredindo para 82% ao término dos experimentos (Figuras 5 e 6).

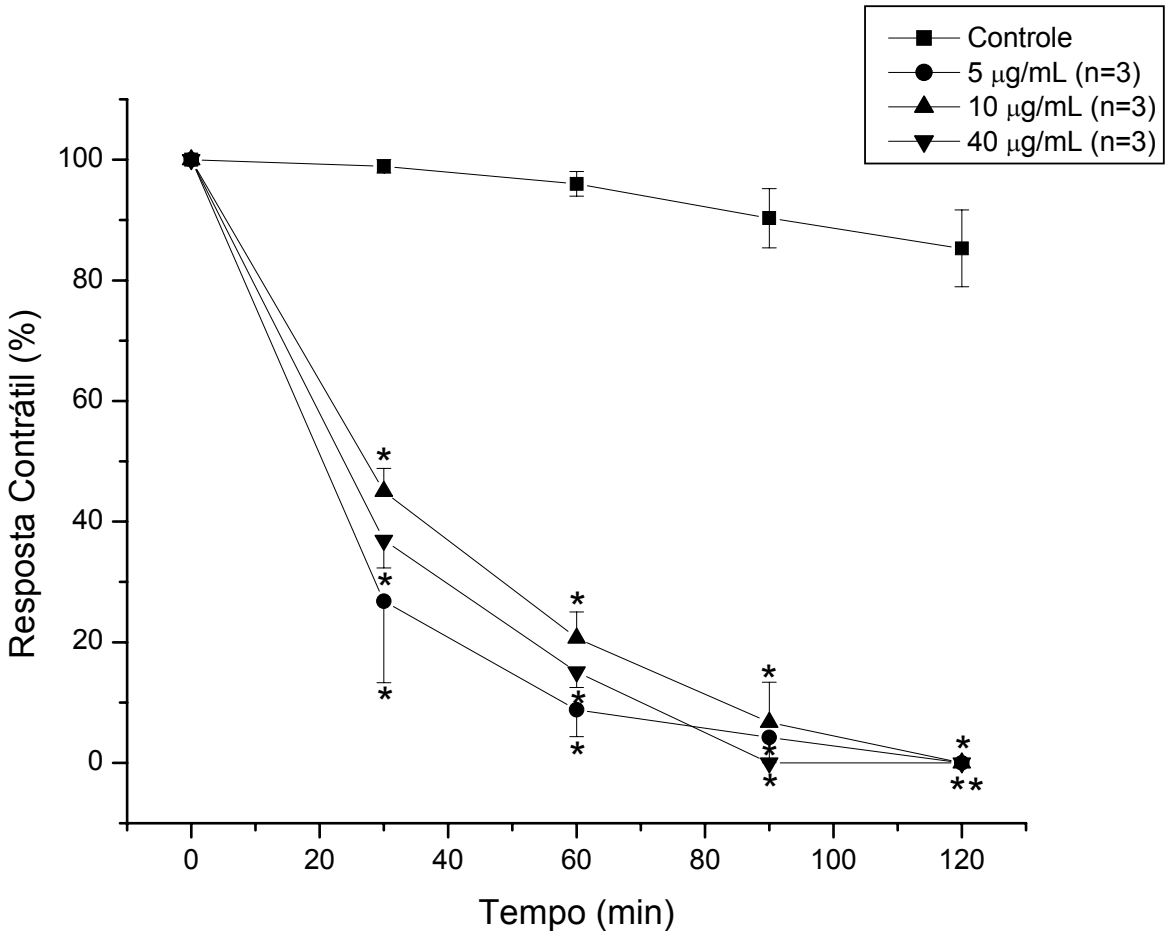


Figura 3. Efeito induzido pela peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC. Gráfico das respostas contráteis em função do tempo comparando as preparações tratadas com 5, 10 e 40 μg/mL da peçonha de *P. patagoniensis* com o controle. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as doses de 5 e 10 μg/mL. No gráfico cada ponto representa a média ± erro padrão da média. * $p<0.05$ em relação ao controle.

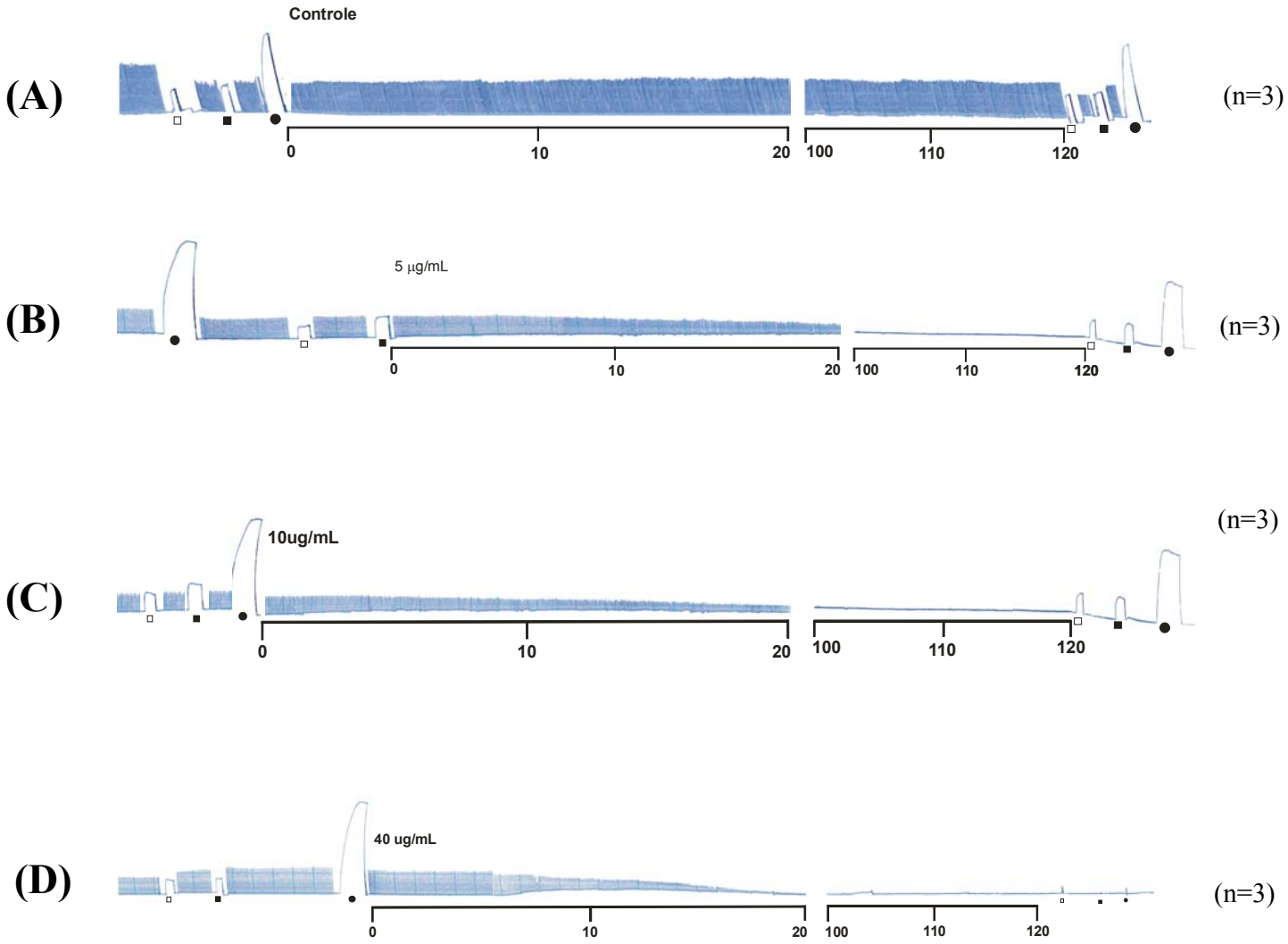


Figura 4. Efeito da peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC. Em A, o registro miográfico representativo da preparação em solução nutritiva de Krebs (controle). Em B, o registro miográfico representativo da preparação incubada com a dose de 5 µg/mL da peçonha de *P. patagoniensis*. Em C, o registro miográfico representativo da preparação incubada com a dose de 10 µg/mL e, em D, o registro miográfico representativo da preparação incubada com a dose de 40 µg/mL da peçonha de *P. patagoniensis.* As respostas a ACh (□ 55 µM e ■ 110 µM) e ao K^+ (● 13,4 mM) foram obtidas antes e após a incubação com a peçonha.

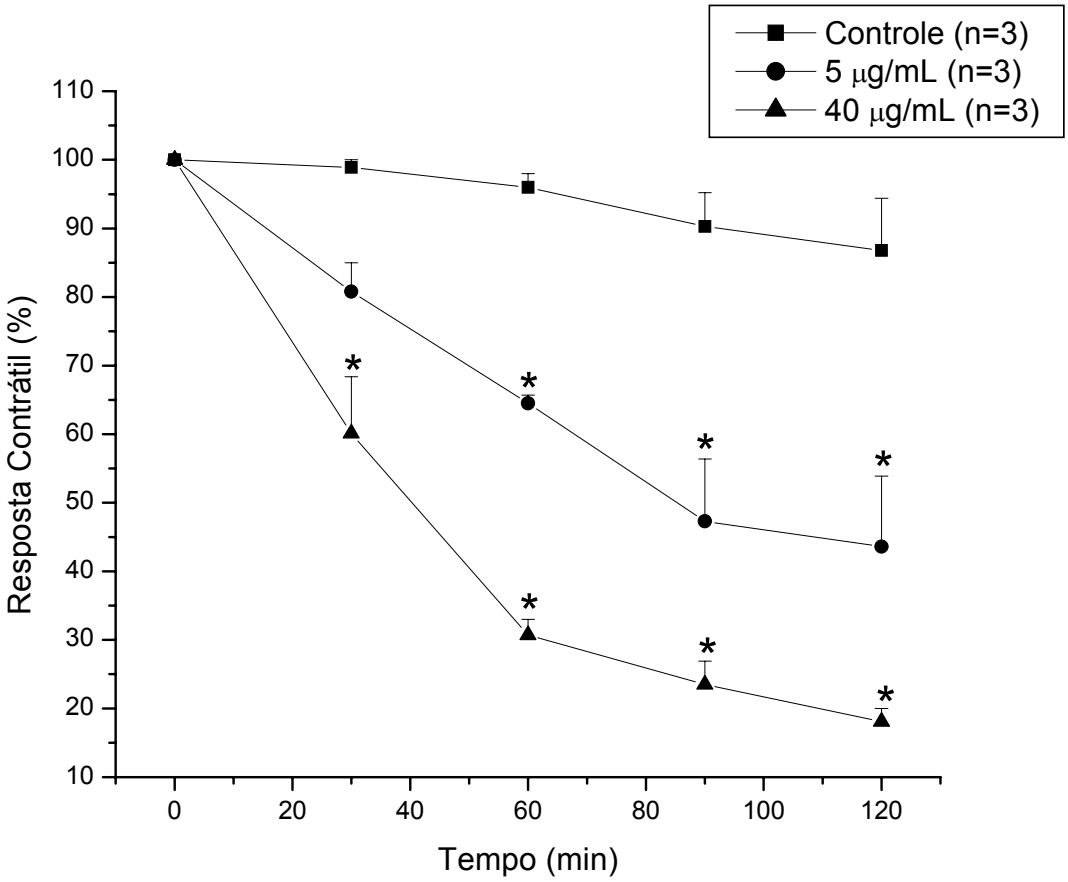


Figura 5. Efeito induzido pela peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica direta, a 37ºC. Gráfico das respostas contráteis em função do tempo comparando as preparações tratadas (5 e 40 μg/mL) com o controle. No gráfico cada ponto representa a média ± erro padrão da média de 3 experimentos. * $p<0.05$ em relação ao controle.

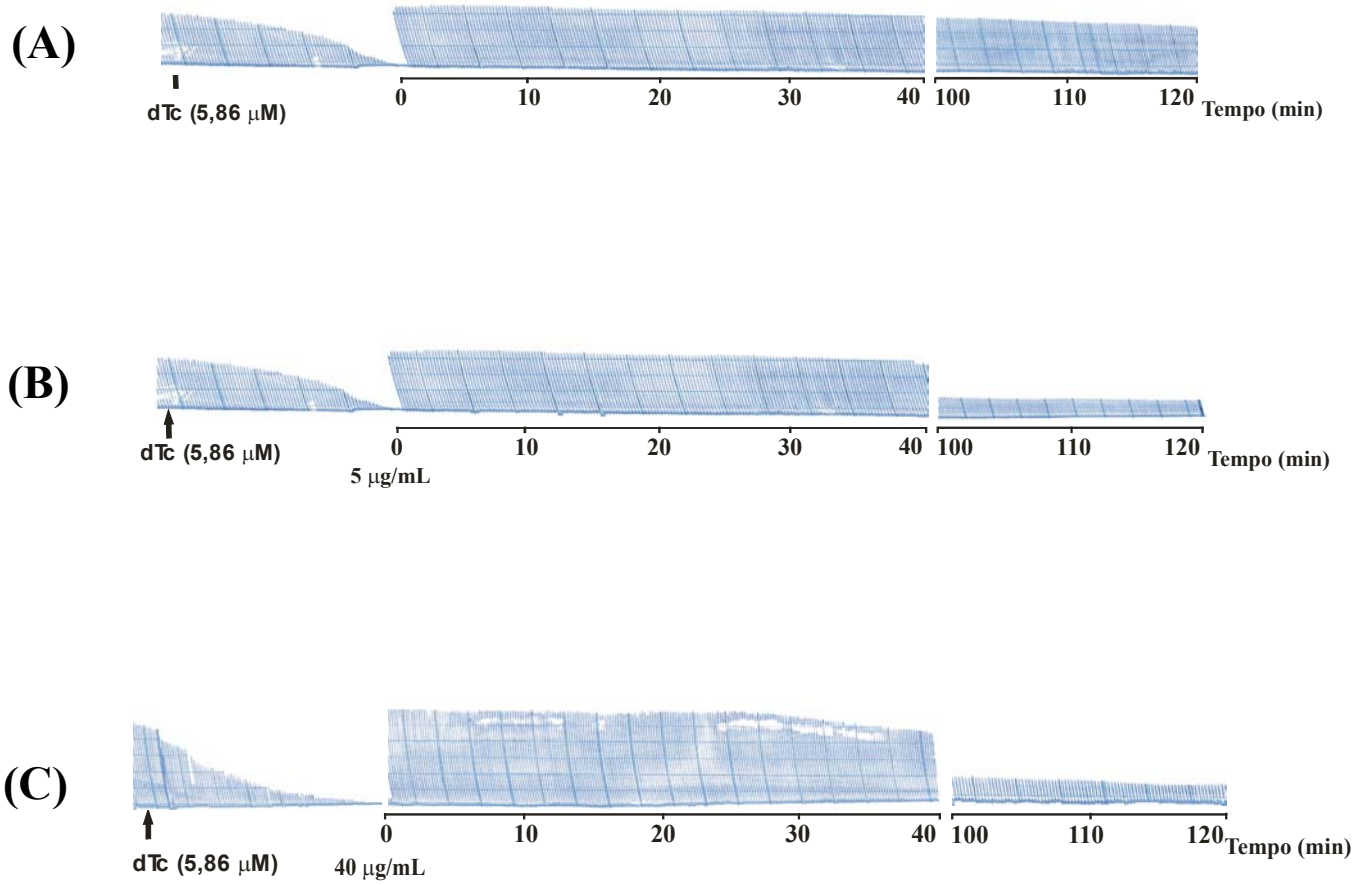


Figura 6. Efeito da peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica direta, a 37ºC. Em A, o registro miográfico representativo da preparação em solução nutritiva de Krebs (controle). Em B, o registro miográfico representativo da preparação incubada com a dose de 5 μg/mL da peçonha de *P. patagoniensis*. Em C, o registro miográfico representativo da preparação incubada com a dose de 40 μg/mL.

5.1.2 Resposta Contraturante a Acetilcolina (ACh) e Potássio (K^+)

A tabela 1 demonstra o efeito da peçonha de *P. patagoniensis* sobre as contraturas musculares evocadas em resposta a adição de ACh e K^+ antes e após a incubação com a toxina em preparações *biventer cervicis* de pintainho.

A incubação da preparação com as concentrações de 5 e 10 μg/mL da peçonha de *P. patagoniensis*, de modo geral, manteve total ou parcialmente a resposta contraturante ao K^+ e à adição de ACh. No entanto, na concentração de 40 μg/mL, tanto a contratura induzida pela ACh [76,2 ±19.4% de bloqueio (55 μM) e 89.2 ±6.8% de bloqueio (110 μM)], como pelos íons K^+ (85 ± 7.2% de bloqueio), mostraram-se, com freqüência, parcialmente inibidas ($p<0.05$).

Tabela 1. Efeito da peçonha de *Philodryas patagoniensis* sobre as contraturas musculares produzidas em resposta a acetilcolina (ACh) e potássio (K^+) em preparações *biventer cervicis* de pintainho.

		Antes (%)	Depois (120') (%)
ACh (55 μM)	Controle (n=3)	100±0	111.1±8.0
	5 μg/mL (n=3)	100±0	123 ± 23.1
	10 μg/mL (n=3)	100±0	111,6±21.8
	40 μg/mL (n=3)	100±0	23.8±19.4 *
ACh (110 μM)	Controle (n=3)	100±0	99.5±5.2
	5 μg/Ml (n=3)	100±0	101,6±15.1
	10 μg/mL (n=3)	100±0	68.3±14.3
	40 μg/mL (n=3)	100±0	10.8±6.8 *
K^+ (13,4 mM)	Controle (n=3)	100±0	112.8±9,0
	5 μg/mL (n=3)	100±0	115.3±15.3
	10 μg/mL (n=3)	100±0	74.5±16.8
	40 μg/mL (n=3)	100±0	15,0±7.2 *

Os valores representam a média ± E.P.M. da porcentagem de reposta da contratura após 120 minutos de incubação com a peçonha. * $p<0.05$.

5.1.3 Determinação de Creatino Quinase (CK)

A determinação dos níveis de CK liberada no meio de incubação usando-se as diversas doses em estudo do veneno total foi obtida por meio de alíquotas retiradas do líquido presente no banho. A concentrações de 5, 10 e 40 μg/mL do veneno total apresentaram alteração significativa nos valores de CK em relação ao valor controle (Figura 7), quando estimuladas indiretamente.

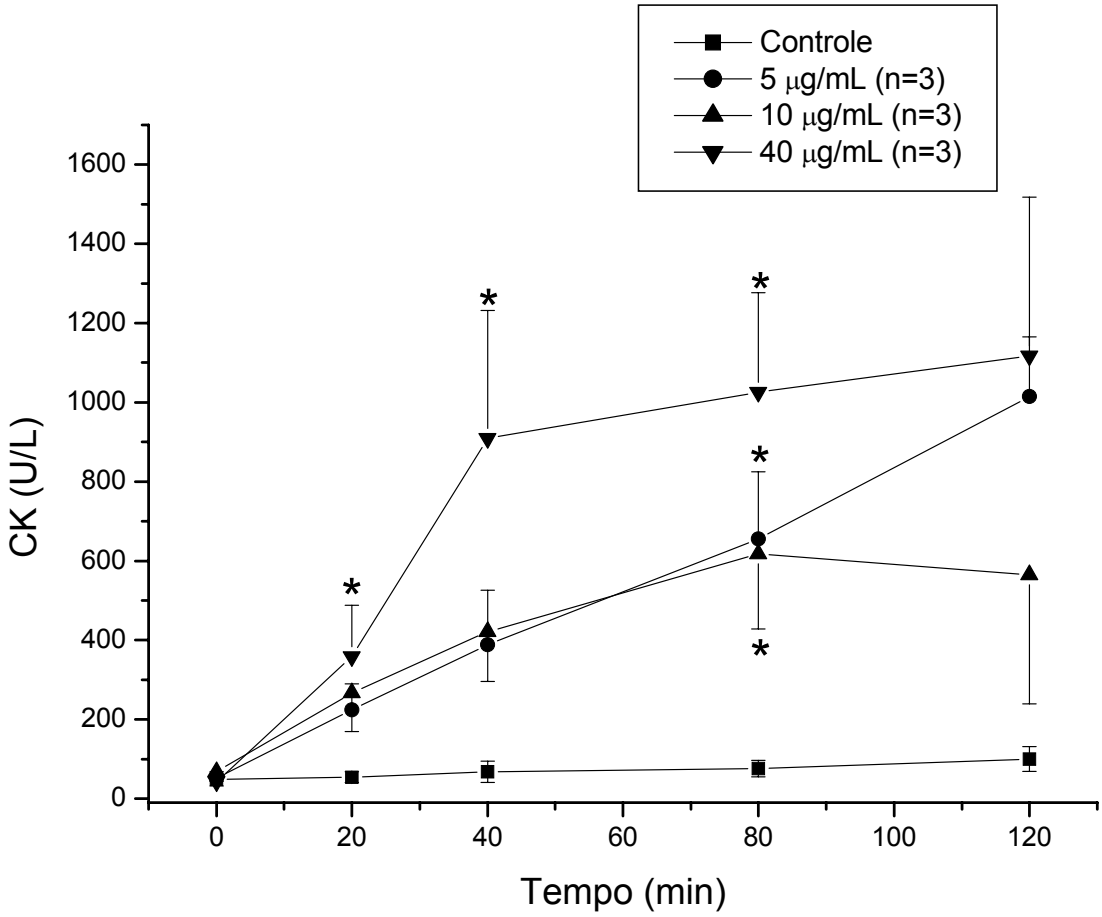


Figura 7. Curva de liberação de CK induzida pela ação da peçonha de *Philodryas patagoniensis* em preparação *biventer cervicis* de ave sob estimulação elétrica indireta. Gráfico representativo da liberação de CK induzida pelas concentrações de 5, 10 e 40 μg/mL da peçonha de *P. patagoniensis*. Nos gráficos cada ponto representa a média ± erro padrão da média. * $p<0.05$ em relação ao controle.

Nas preparações estimuladas diretamente, observou-se que houve um aumento crescente nos níveis de creatino quinase apenas para as preparações tratadas com a concentração de 40 μg/mL, revelando valores estatisticamente significativos em relação ao controle como demonstrado na Figura 8.

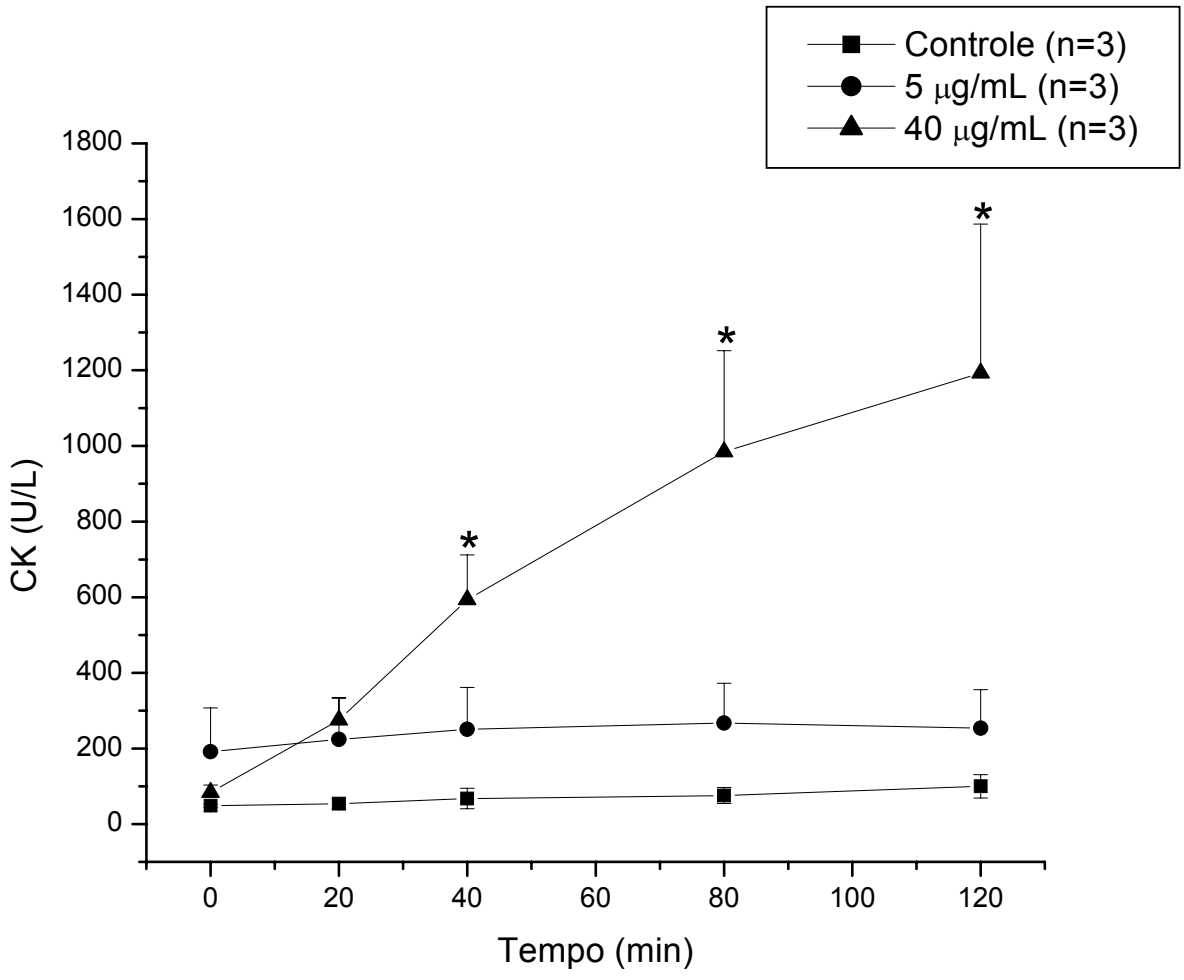


Figura 8. Curva de liberação de CK induzida pela ação da peçonha de *Philodryas patagoniensis* em preparação *biventer cervicis* de ave sob estimulação direta. Gráfico representativo da liberação de CK induzida pelas concentrações de 5 e 40 μg/mL da peçonha de *P. patagoniensis.* Nos gráficos cada ponto representa a média ± erro padrão da média. * $p<0.05$ em relação ao controle.

5.2 Estudo Eletrofisiológico

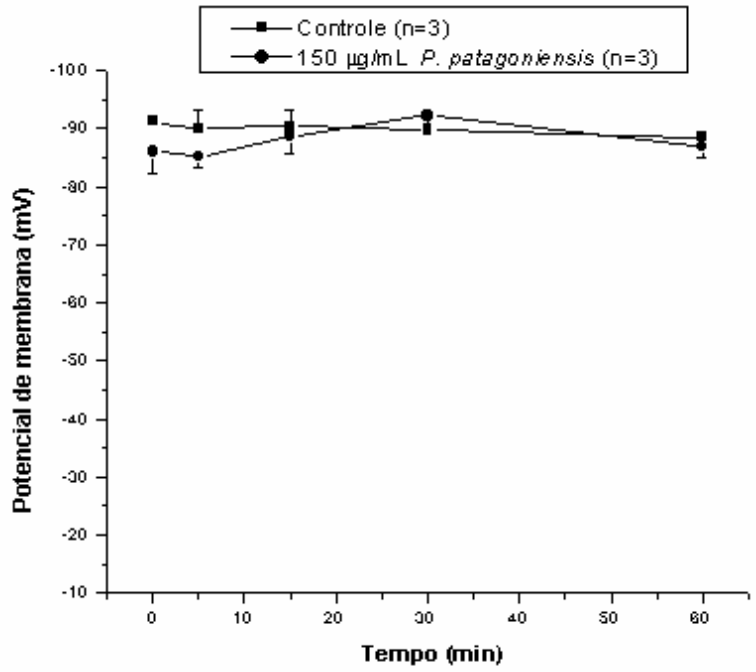
5.2.1 Medida e Análise do Potencial de Membrana (PM)

As medidas do PM de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo em solução nutritiva (controle: Tyrode) e de preparações incubadas com 150 μg/mL do veneno total de *P. patagoniensis* foram obtidas nos tempos 0, 5, 15, 30 e 60 minutos na região de placa terminal e distante dela (fibra muscular) (Figura 9).

As preparações controle se comportaram de modo homogêneo mantendo os valores dos PM ao longo dos 60 minutos dentro do esperado (88.6 ± 0.6 mV) na região de placa e, 91 ± 1.8 mV, na região fora da placa.

As preparações incubadas com 150 μg/mL da peçonha de *P. patagoniensis* quando comparadas ao controle Tyrode não mostraram alterações significativas nos valores do PM em ambas as regiões: placa e fora de placa e mantiveram-se ao longo dos 60 minutos de incubação com valores de 87 ± 2.1 mV e 90.5 ± 1.1 mV, respectivamente.

(A)



(B)

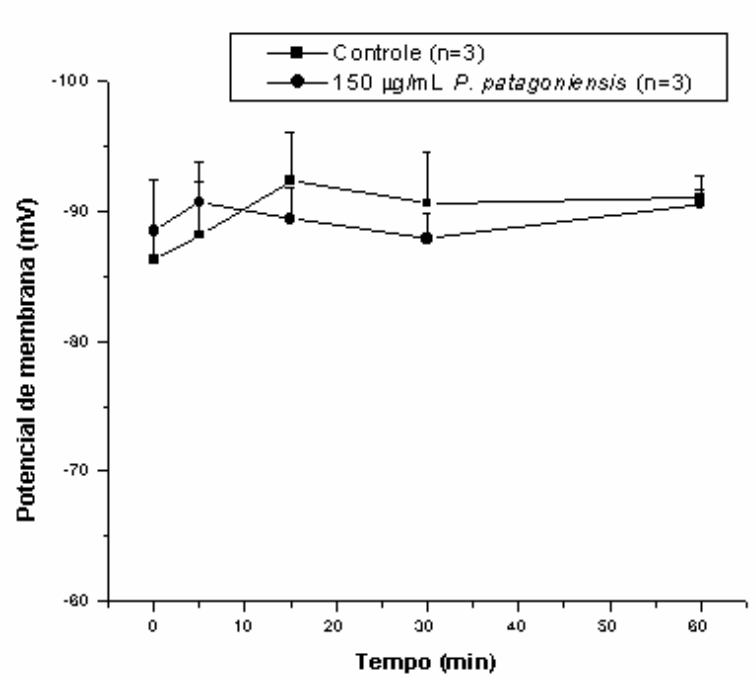


Figura 9. Potenciais de membrana (diafragma de camundongo) frente a peçonha de *P. patagoniensis* (150 µg/mL). Em (A) gráfico representativo dos potenciais de membrana na região de placa terminal. Em (B) gráfico demonstrativo dos potenciais de membrana na região de fibra muscular. No gráfico cada ponto representa a média ± erro padrão de 3 experimentos.

5.2.2 Medida e Análise do Potencial em Miniatura de Placa Terminal (Pmpt)

As medidas dos pmpts de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo em solução nutritiva (controle: Tyrode) e de preparações incubadas com 150 μg/mL do veneno bruto de *P. patagoniensis* foram obtidas nos tempos 0, 5, 15, 30 e 60 minutos na região de placa terminal (Figuras 10 e 11).

Em 5 minutos de incubação com a peçonha (150 μg/mL) ocorre um aumento da freqüência (pmpt/min) dos pmpts, bem como um aumento da amplitude dos mesmos. Em 15 minutos após adição do veneno verifica-se um aumento da freqüência inicialmente com diminuição ao passar do tempo e um aumento da amplitude dos pmpts. Já em 30 minutos de incubação, nota-se um aumento da amplitude com posterior queda e diminuição da freqüência e em 60 minutos decorridos da incubação com a toxina, observa-se um aumento da amplitude seguido por queda da freqüência e da amplitude dos pmpts.

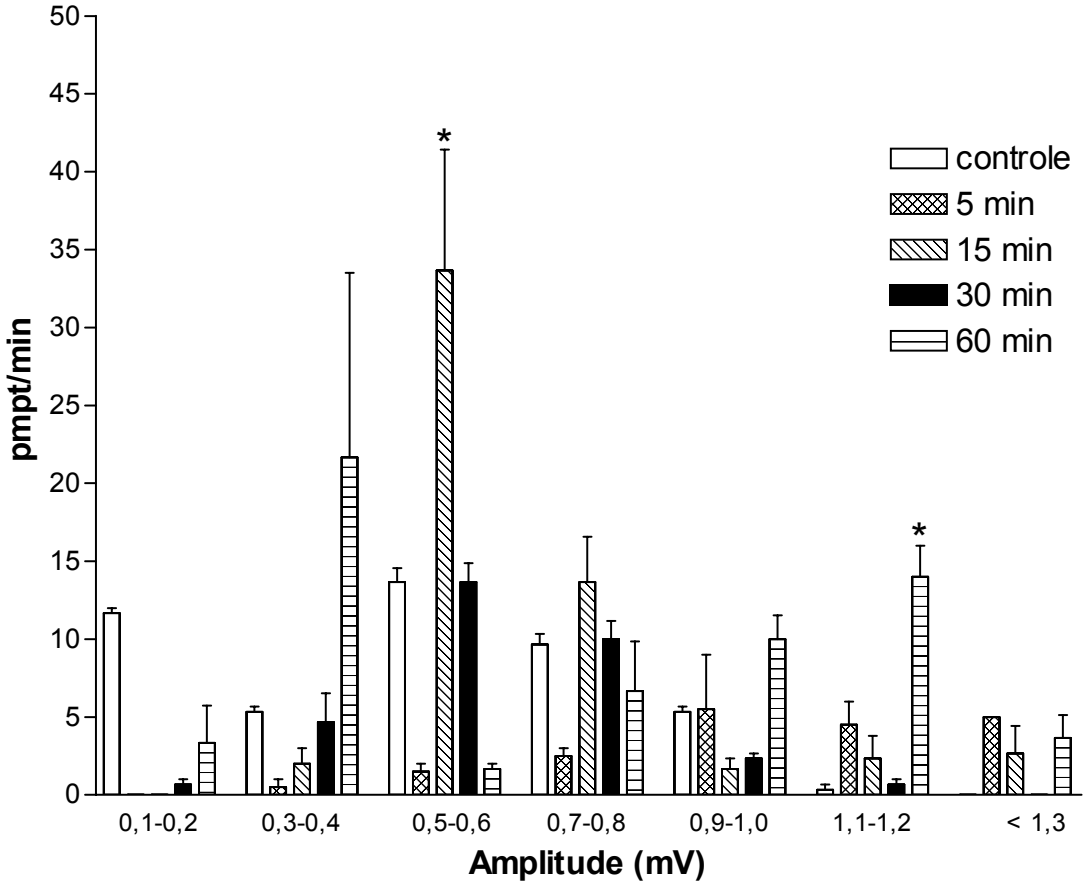


Figura 10. Efeito da peçonha de *P. patagoniensis* (150 μg/mL) sobre a freqüência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura em preparação diafragma de camundongo em diferentes tempos. O histograma representa a média ± o erro padrão de 3 experimentos. *p<0.05 em relação ao controle.

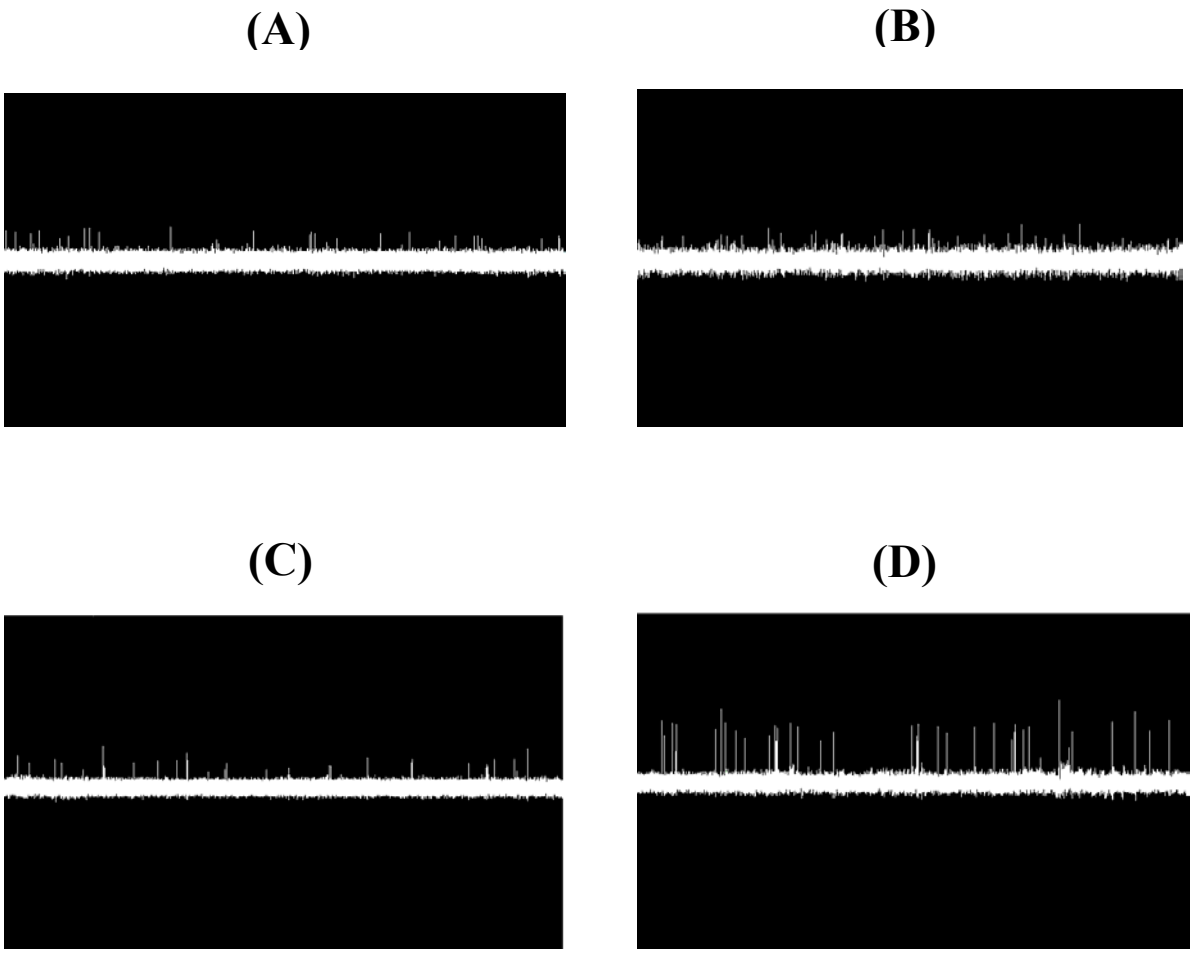


Figura 11. Efeito do veneno de *Philodryas patagoniensis* sobre potenciais em miniatura de placa terminal (pmpt) em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. A) Controle. (B), (C) e (D), 15, 30 e 60 minutos, respectivamente, após adição de veneno (150 μg/mL). Verifica-se um aumento da freqüência e da amplitude dos pmpts tempo-dependente.

5.3 Análise histológica

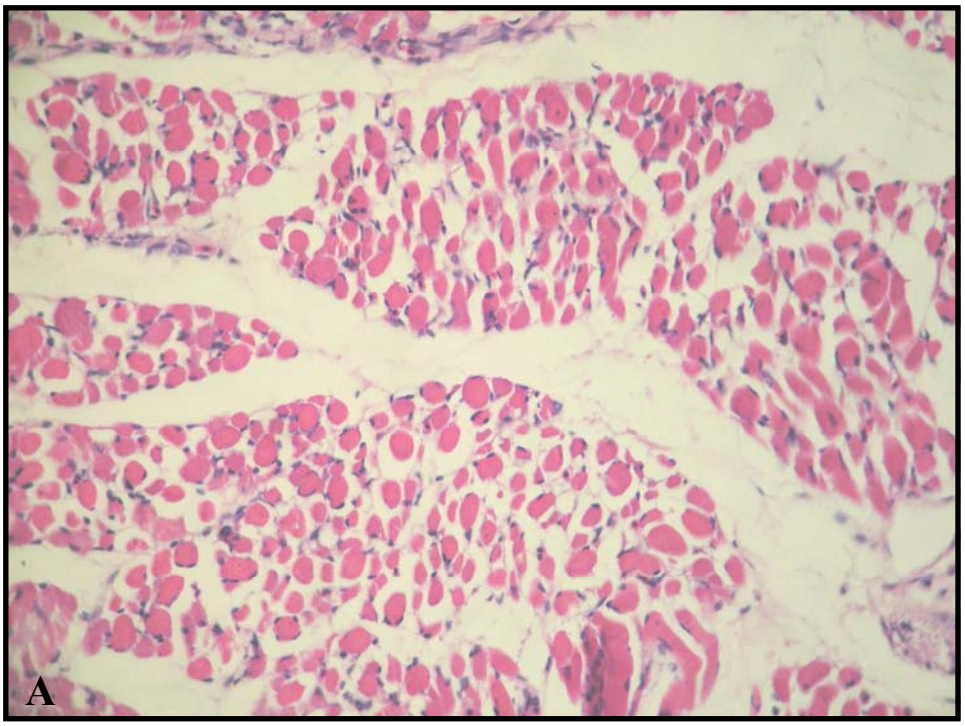
Após a realização dos experimentos de estudo eletromiográfico, os músculos utilizados foram retirados terminada a incubação, passando, dessa forma, para procedimento histológico de rotina. As alterações morfológicas foram avaliadas em músculo incubado com peçonha (5, 10 e 40 μg/mL) durante 120 minutos.

Os músculos *biventer cervicis* incubados durante 120 minutos apenas com solução nutritiva de Krebs (controle) mostraram estruturas normais, núcleos periféricos, diâmetro das fibras musculares normais e similares e membrana celular sem rupturas (Figura 12).

Nos músculos *biventer cervicis* incubados com peçonha de *P. patagoniensis* observou-se lesões que se tornaram mais evidentes nas concentrações mais altas de peçonha. Na concentração de 5 μg/mL, grande parte das fibras musculares apresentaram perda do arranjo poligonal das células e notou-se a presença de células ligeiramente edemaciadas (Figura 13).

Já para as concentrações de 10 (Figura 14) e 40 μg/mL (Figura 15) de peçonha total utilizadas, observou-se uma progressão intensa no que se diz a respeito a evolução da mionecrose, mostrando desde células com formação de pequenas vesículas em seu interior até um quadro de mionecrose intensa, com células com ruptura de membrana e provável perda de seu conteúdo citoplasmático, lesões do tipo delta, células com aparência amorfa, etc.

A partir da quantificação de células lesadas, pôde-se verificar que a lesão (mionecrose) mostrou-se dose-dependente como demonstrado na figura 16.



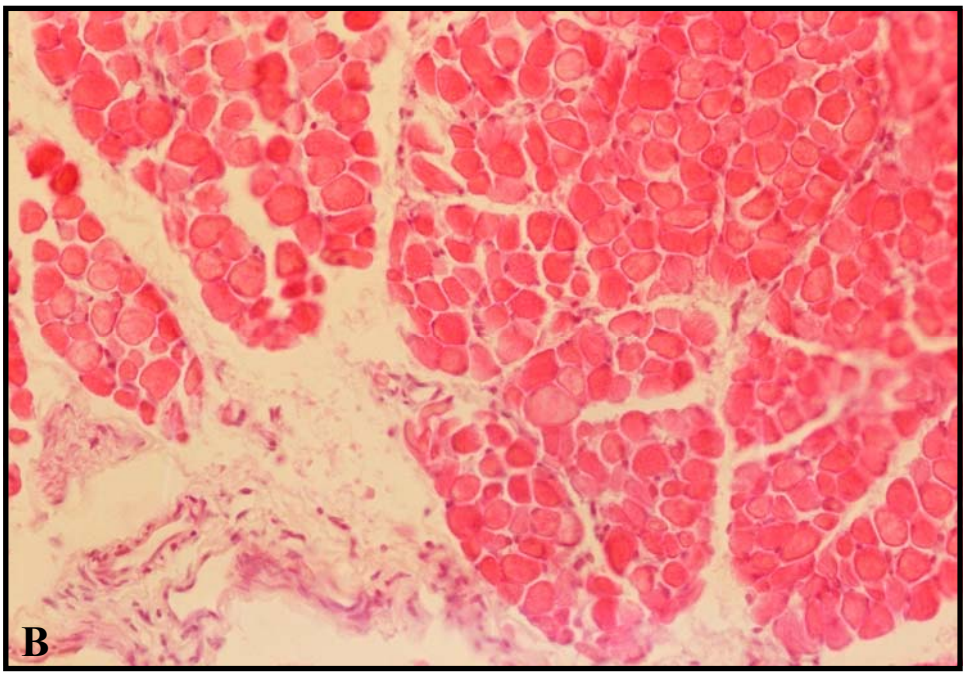


Figura 12 (A, B). Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com solução de Krebs (controle) durante 120 minutos. As fibras musculares mostram-se de aspecto normal em corte transversal, agrupadas, com núcleos periféricos e arranjo poligonal das células. HE. 400X.

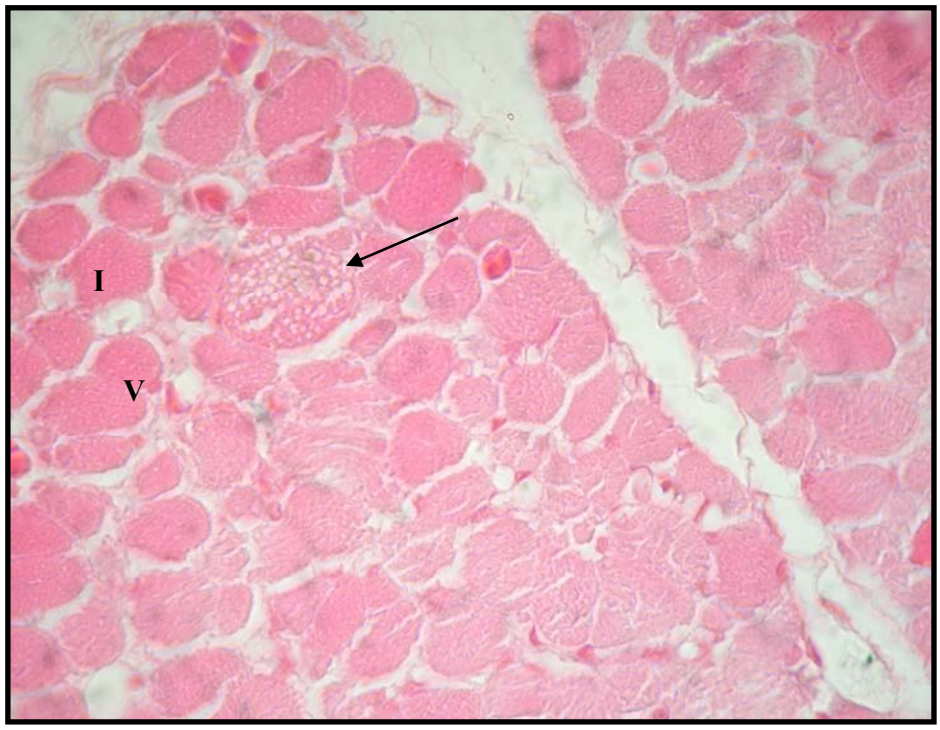


Figura 13. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de ave incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos. Tratamento com 5 µg/mL de *P. patagoniensis*. Note a presença de fibras intumescidas **(I)**, células com formação de vesículas **(V)** e células mionecróticas **(seta)**. H.E. 1000X.

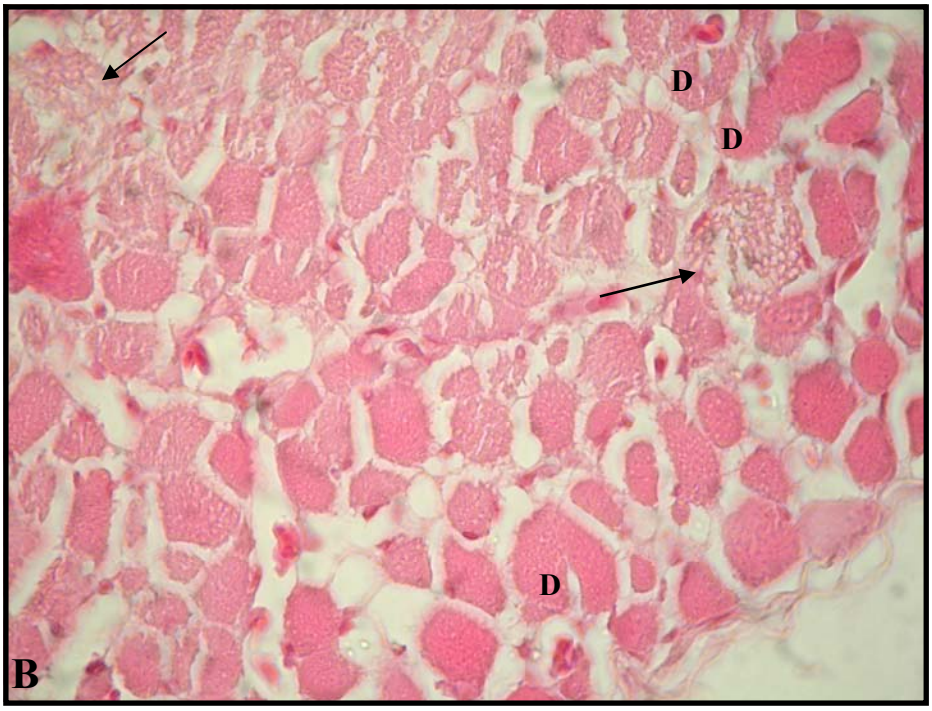


Figura 14 (A, B). Morfologia do músculo *biventer cervicis* de ave incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos Tratamento com 10 µg/mL de *P. patagoniensis*. Observa-se células com perda total ou parcial do aspecto poligonal, células com formação de vesículas **(V)**, bem como fibras intumescidas **(I)** e áreas de intensa mionecrose **(seta)**. Nota-se ainda lesões do tipo delta **(D)**. HE. 1000X.

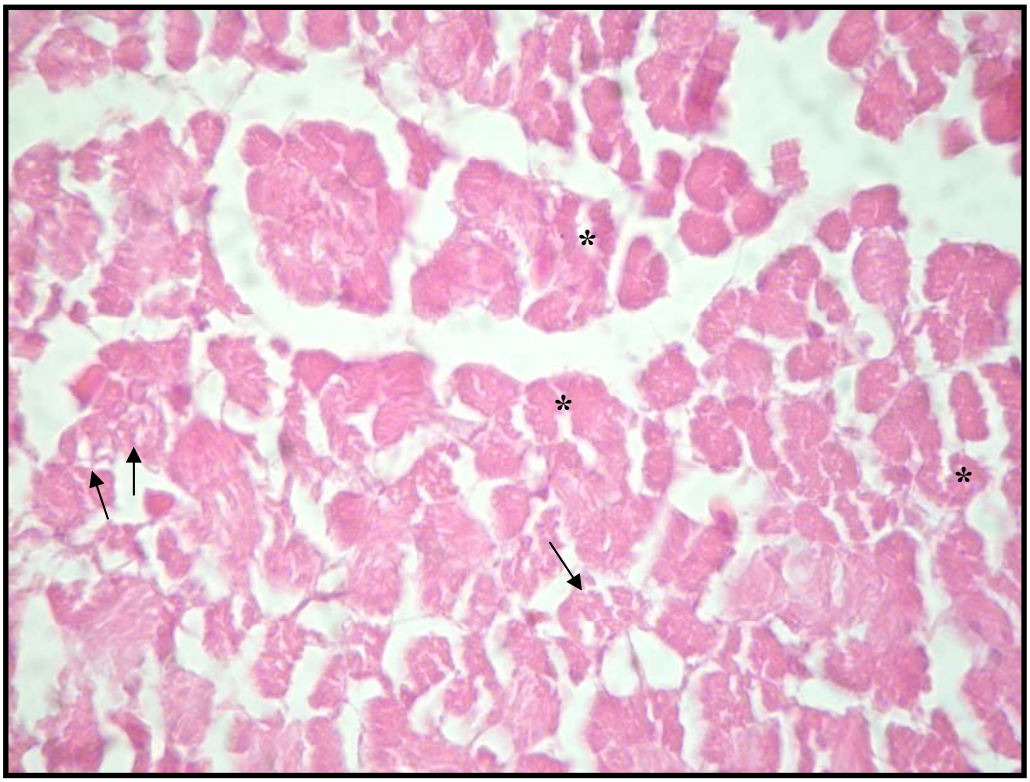


Figura 15. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de ave incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos. Tratamento com 40 µg/mL do veneno de *P. patagoniensis*. Observa-se células com perda total do aspecto poligonal, células amorfas, com ruptura de membrana **(*)** caracterizando intensa mionecrose **(setas)**. H.E. 1000X.

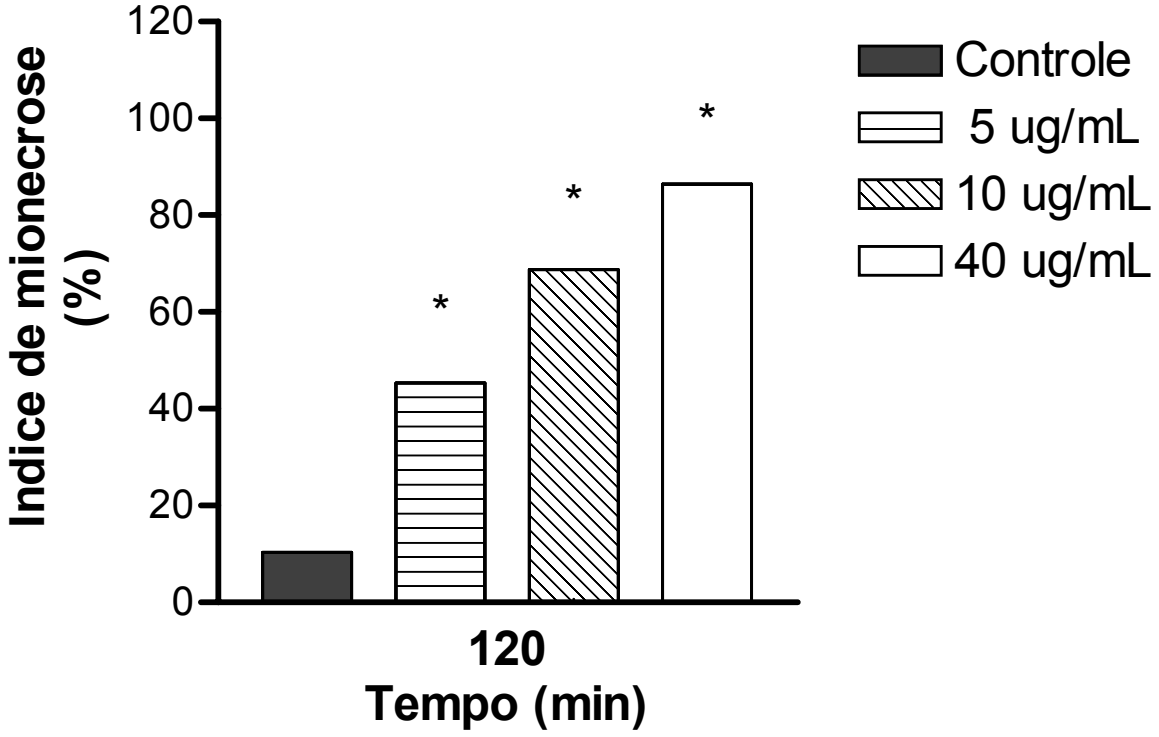


Figura 16. Índice de mionecrose de músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com peçonha de *Philodryas patagoniensis*. Nota-se um aumento crescente na proporção de fibras lesadas com aumento das concentrações testadas em relação ao controle. *p<0.001.

5.4 Estudo Bioquímico

5.4.1 Ensaio Cromatográfico de Fase Reversa em RPC Source 15.

O veneno total foi dissolvido em ATF 0,1%, centrifugado, descartando-se o precipitado e utilizando-se o sobrenadante. Em seguida foi eluído, usando-se um gradiente linear contínuo (0-60%), seguindo-se de um platô (60%) e gradiente linear descontínuo de 60-100% de ACTH 66% em 0,1% de ATF. O perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. Foram obtidos quatro picos principais (Figura 17). Apenas o pico III promoveu atividade neuromuscular evidente em preparação *biventer cervicis* de pintainho.

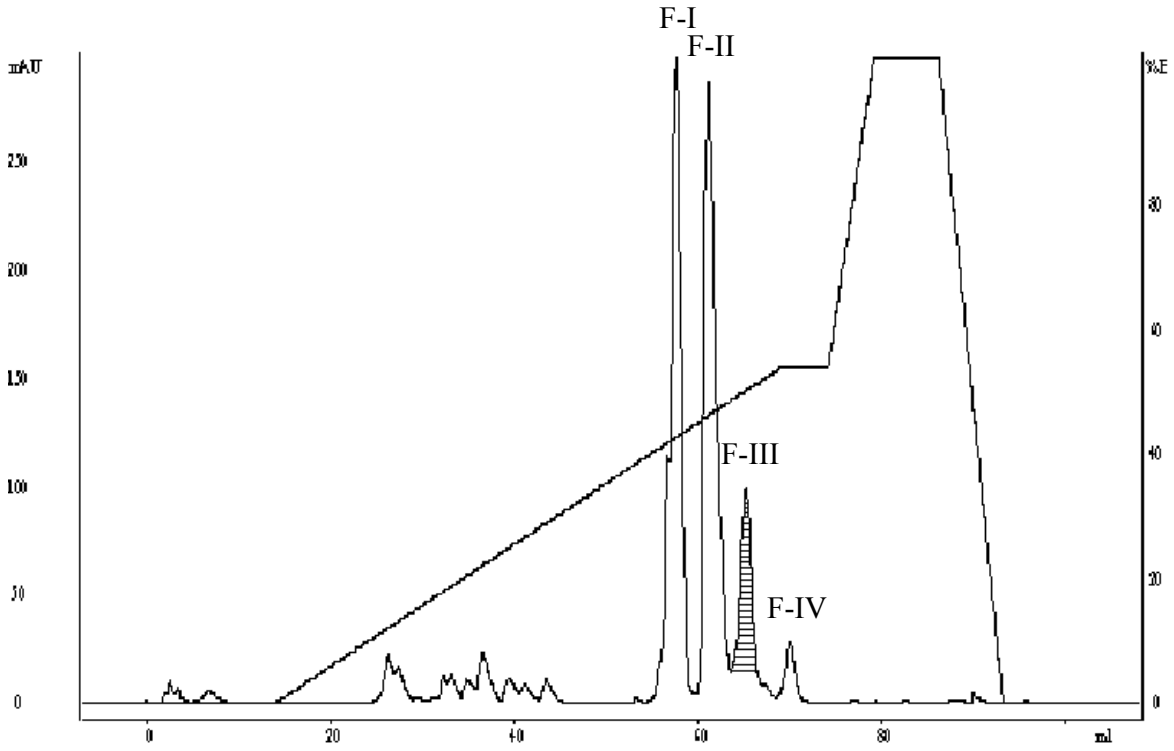


Figura 17. Perfil Cromatográfico obtido pelo fracionamento do veneno de *Philodryas patagoniensis* em RPC Source 15. Note a obtenção de 4 picos principais. O pico III (F-III) mostrou-se ativo na junção neuromuscular.

5.4.2 Ensaio Cromatográfico em HPLC de Coluna Fase Reversa C4

A fração correspondente ao pico III eluída da cromatografia do veneno total em RPC de fase reversa Source 15 foi submetida a uma recromatografia em coluna do tipo Symmetry 300 ^{TM} C4 5 μm ST 4,6/250 (Waters) em HPLC de fase reversa por ter apresentado atividade neuromuscular. Para este protocolo utilizou-se um gradiente descontínuo (0-100%) de ACTH 66% em ATF 0,1%. O perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. Três picos principais foram obtidos deste processo cromatográfico (Figura 18).

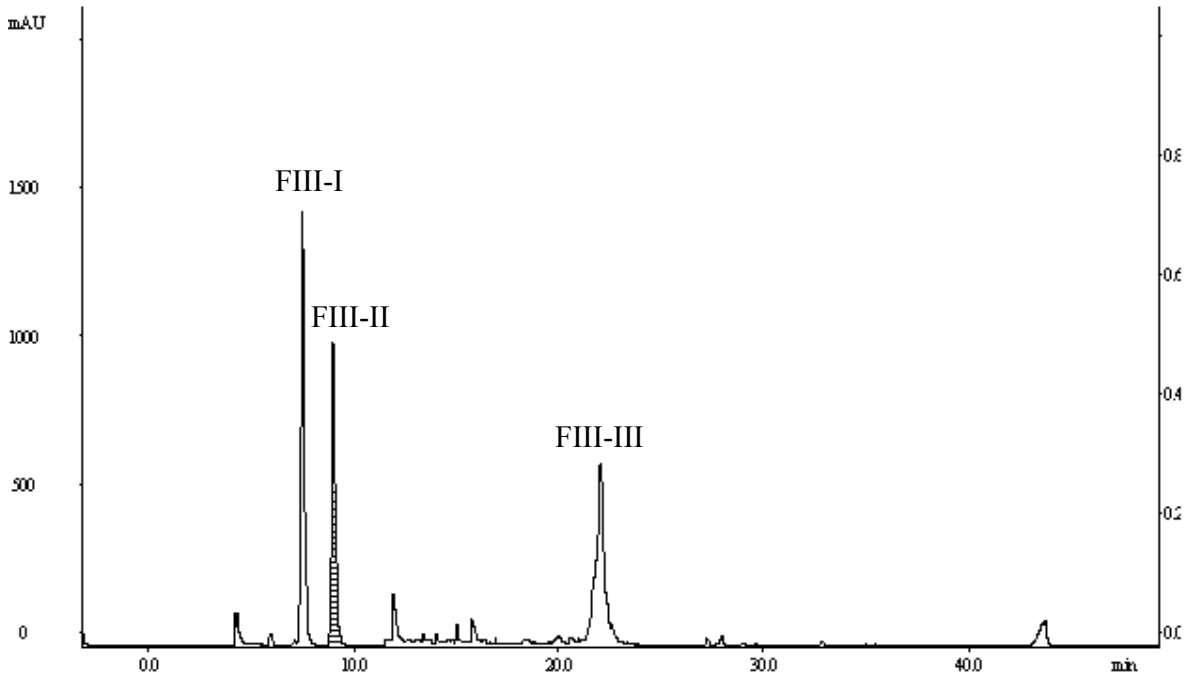


Figura 18. Perfil cromatográfico da Fração III (HPLC) obtida a partir da peçonha fracionada (RPC) da serpente *Philodryas patagoniensis*. Nota-se a presença três picos principais. O pico II (FIII-II) mostrou-se ativo na junção neuromuscular.

5.4.3 Eletroforese

A figura 19 mostra os perfis eletroforéticos das frações obtidas da peçonha de *P. patagoniensis*. Para as fração I (FI) de *P. patagoniensis*, a maioria das proteínas tinha massa molecular entre 25 e 200 KDa, apresentando uma banda de coloração bastante forte em torno de 97-116 KDa (seta preta). A Fração II (FII) de *P. patagoniensis* apresentou a maioria das proteínas com massa molecular entre 21 e 66 KDa. Uma banda, particularmente melhor corada foi visualizada em torno de 46 KDa (seta preta grossa). Para as frações III (FIII) e IV (FIV), a maioria das proteínas apresentaram peso molecular entre 21 e 45 KDa e foram expressas mais fracamente quando comparadas as proteínas das frações I e II. Nas frações II e IV pode-se verificar que em ambas aparecem proteínas de peso molecular semelhante em torno de 25 KDa (seta dupla preta). E para as frações II e III pôde-se observar, também uma semelhança entre proteínas de massa molecular em torno de 21 KDa (seta dupla preta).

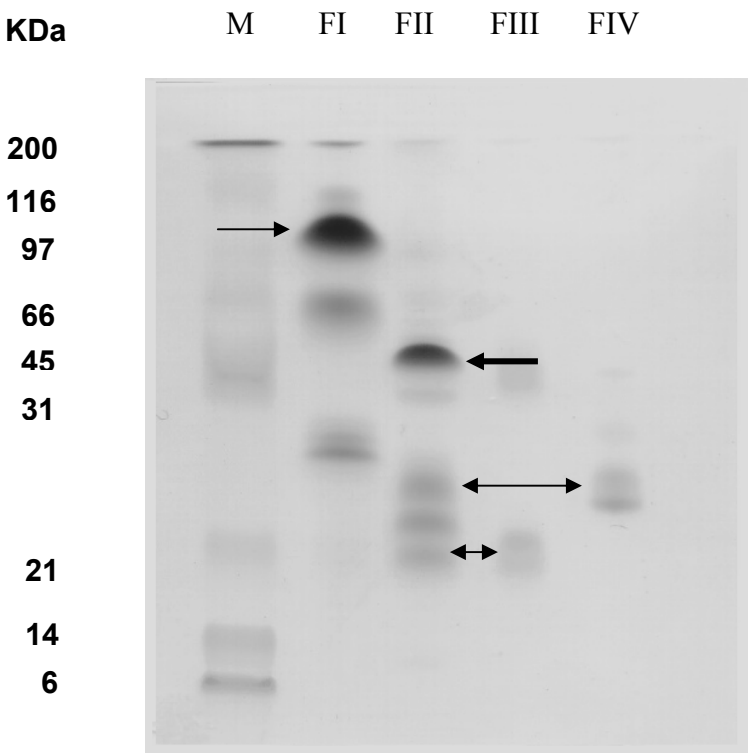


Figura 19. Perfis eletroforéticos das frações da peçonha de *P. patagoniensis*. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida com 30 µl de amostra e a coloração foi feita com azul brilhante de Coomassie R250. M representa o marcador de massa molecular.

5.4.4 Atividade Proteolítica e Dosagem de Proteínas

Na tabela 2 vê-se a medida da concentração protéica para as quatro frações obtidas do veneno bruto de *P. patagoniensis* bem como atividade proteolítica de cada uma delas.

Tabela 2. Dosagem de proteínas e atividade proteolítica das quatro frações obtidas a partir do fracionamento da peçonha de *P. patagoniensis*.

Frações *P. patagoniensis*	Dosagem de proteínas (mg)	Atividade proteolítica total	U/mg
I	0,432	9,5	21,9
II	0,357	19,25	53,9
III	0,165	14,5	87,8
IV	0,097	14,5	149,5

5.5 Estudo Miográfico Preliminar das Frações Obtidas a Partir do Veneno Total de *P. patagoniensis*.

5.5.1 Preparação *biventer cervicis* de Pintainho

A fração III obtida a partir da cromatografia do veneno total de *P. patagoniensis* (*vide* item 4.5.1) foi ensaiada na concentração de 5 μg/mL a 37ºC sob estimulação elétrica indireta. Foi observado que a dose testada promoveu 50% bloqueio das respostas contráteis em torno de 50 minutos de incubação estendendo-se para 100% de bloqueio aos 80 minutos (Figura 20).

Após a realização do teste miográfico com as frações obtidas do veneno de *P. patagoniensis*, verificou-se que a fração III apresentou intensa atividade neuromuscular. A partir deste resultado, realizou-se a recromatografia da Fração III obtendo-se então, três picos principais como descrito no item 4.5.2. A sub-fração FIII-II foi testada miograficamete revelando também atividade neuromuscular como demonstrado na figura 21. A preparação apresentou 50% de bloqueio das respostas contráteis por volta de 35 minutos de incubação com a sub-fração, que se estendeu para 100% de bloqueio aos 40 minutos.

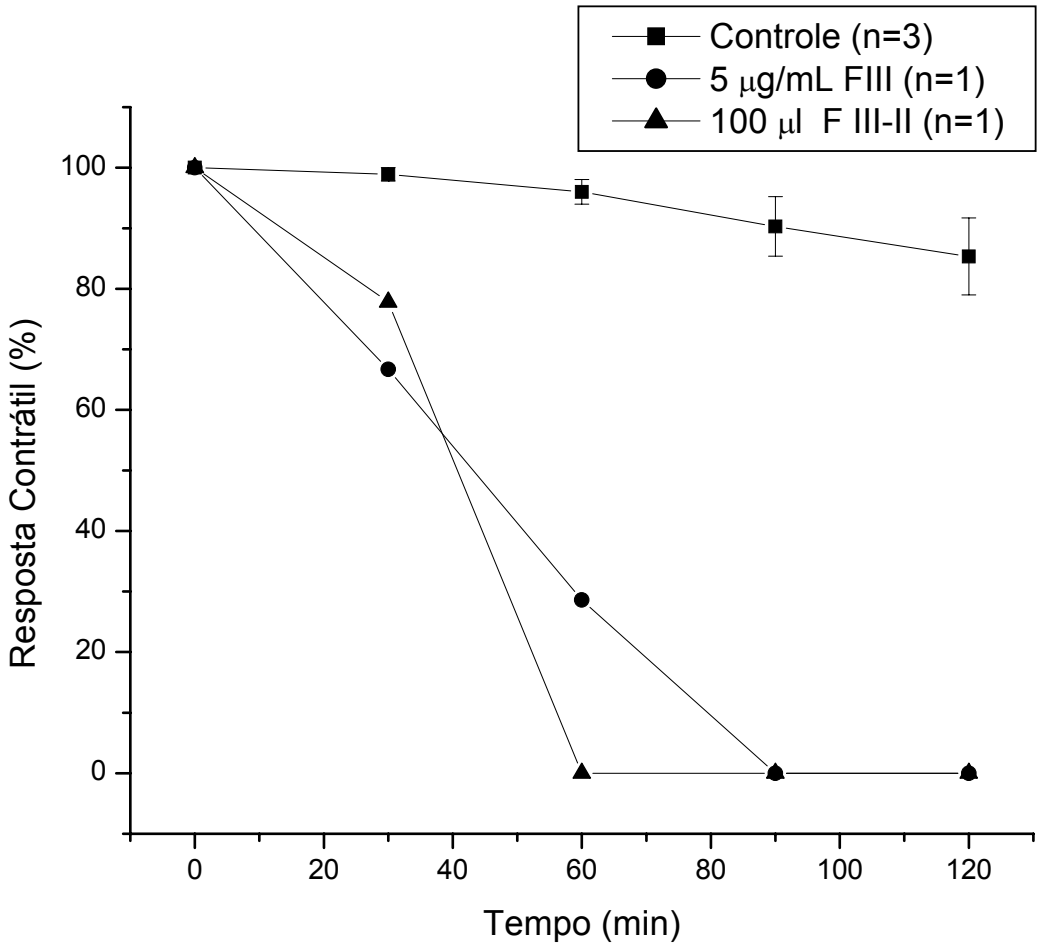


Figura 20. Efeito induzido pela Fração III (5 μg/mL) e Sub-fração III-II da peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC. Gráfico das respostas contráteis em função do tempo comparando as preparações tratadas com o controle.

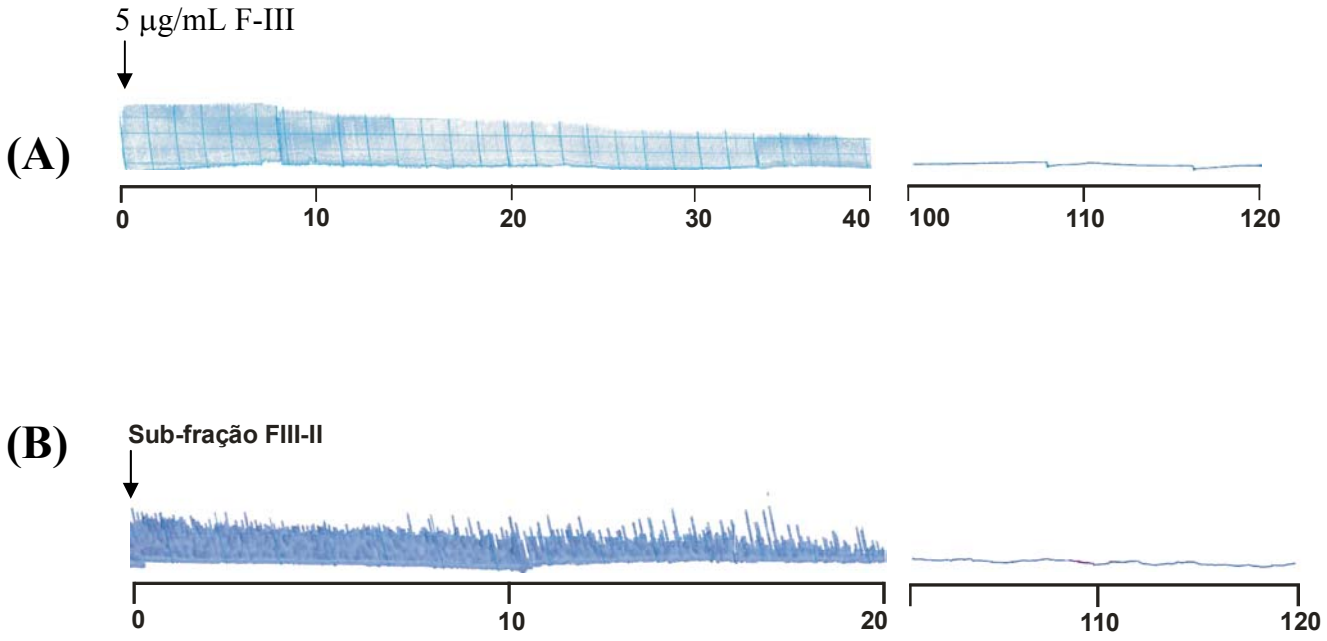


Figura 21. Efeito da Fração III (5 µg/mL) e da sub-fração III-II de *P. patagoniensis* sobre a preparação *biventer cervicis* de pintainho sob estimulação elétrica indireta, a 37ºC. Em (A), o registro miográfico representativo da preparação incubada com a dose de 5 µg/mL da Fração III obtida da peçonha de *P. patagoniensis*. Em (B), o registro miográfico representativo da preparação incubada com 100 µl da Sub-fração III-II obtida da peçonha de *P. patagoniensis*.

5.6 Dosagem de Creatino Quinase (CK) Frente à Incubação com a Fração III e Sub-fração III-II

No controle os níveis de creatino quinase se mostraram constantes durante os 120 minutos de incubação. Em relação à fração III (5 μg/mL), a dosagem de creatino quinase sofreu ligeiro aumento durante os 120 minutos de incubação (48.57 – 99.82 U/L). Já para sub-fração III-II, a dosagem de CK mostrou-se crescente durante os 120 minutos de incubação (72.85 – 825.7 U/L) como demonstrado na Figura 22.

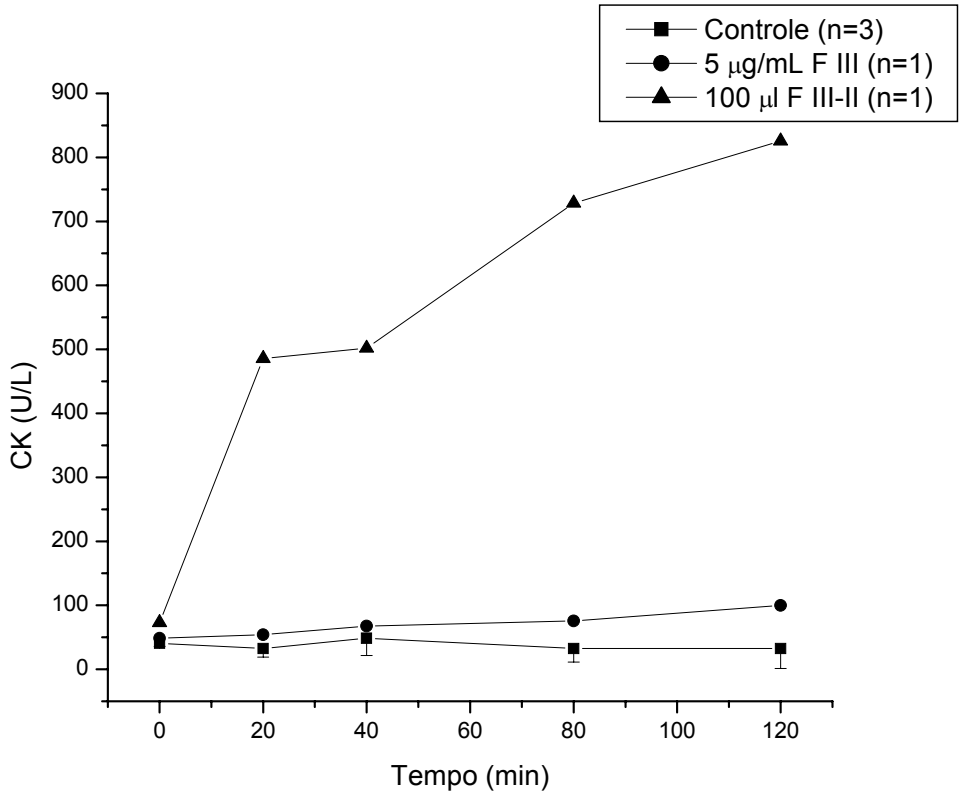


Figura 22. Curva de liberação de CK induzida pela ação da Fração III e Sub-fração III-II obtida da peçonha de *Philodryas patagoniensis* em preparação *biventer cervicis* de ave sob estimulação indireta. Gráfico representativo da liberação de CK induzida pela concentração de 5 μg/mL (F-III) e 100 μl (FIII-II) da peçonha de *P. patagoniensis.*

5.7 Análise Histológica

Após a realização dos experimentos de estudo eletromiográfico, os músculos utilizados foram retirados, passando, dessa forma, para procedimento histológico de rotina. As alterações morfológicas foram avaliadas em músculo incubado com fração III (5 μg/mL) e sub-fração III-II durante 120 minutos (Figuras 23 e 24).

A preparação incubada com 5 μg/mL da Fração III mostrou-se células muito edemaciadas (Figura 23). Já o músculo incubado com a sub-fração III-II revelou grande parte das fibras musculares com perda do arranjo poligonal das células. Observaram-se também células altamente degeneradas e um quadro de mionecrose intensa (Figura 24).

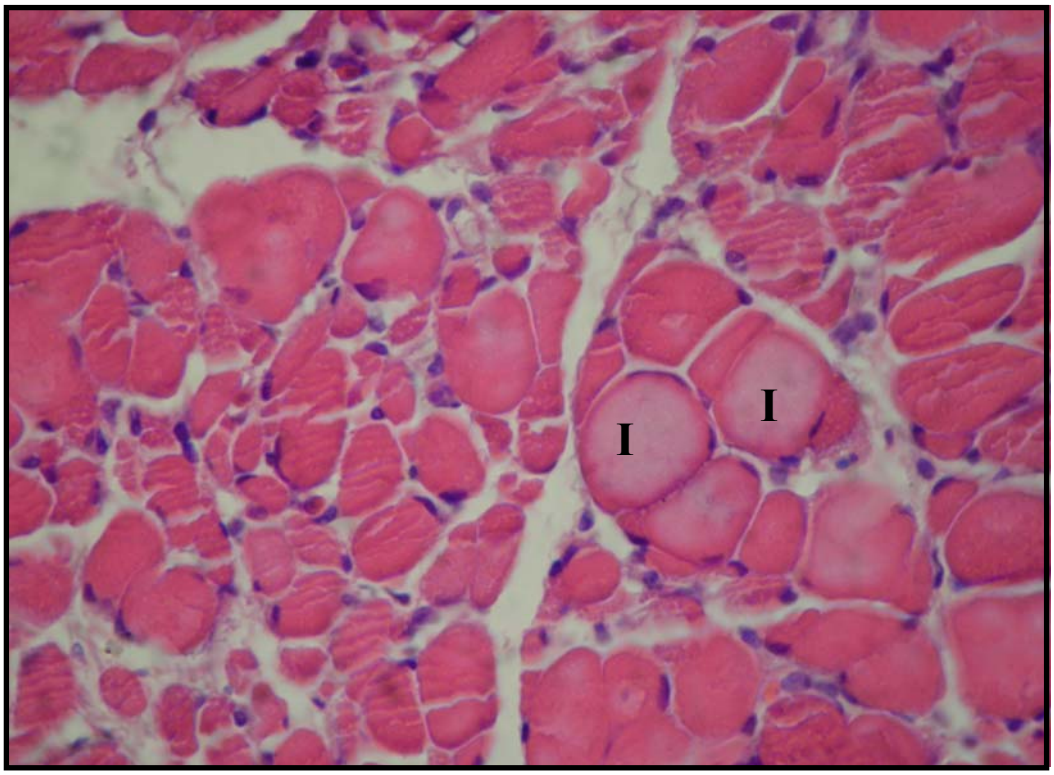


Figura 23. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com a fração III de *P. patagoniensis*. Nota-se a presença de fibras intumescidas **(I).** H.E. 1000X.

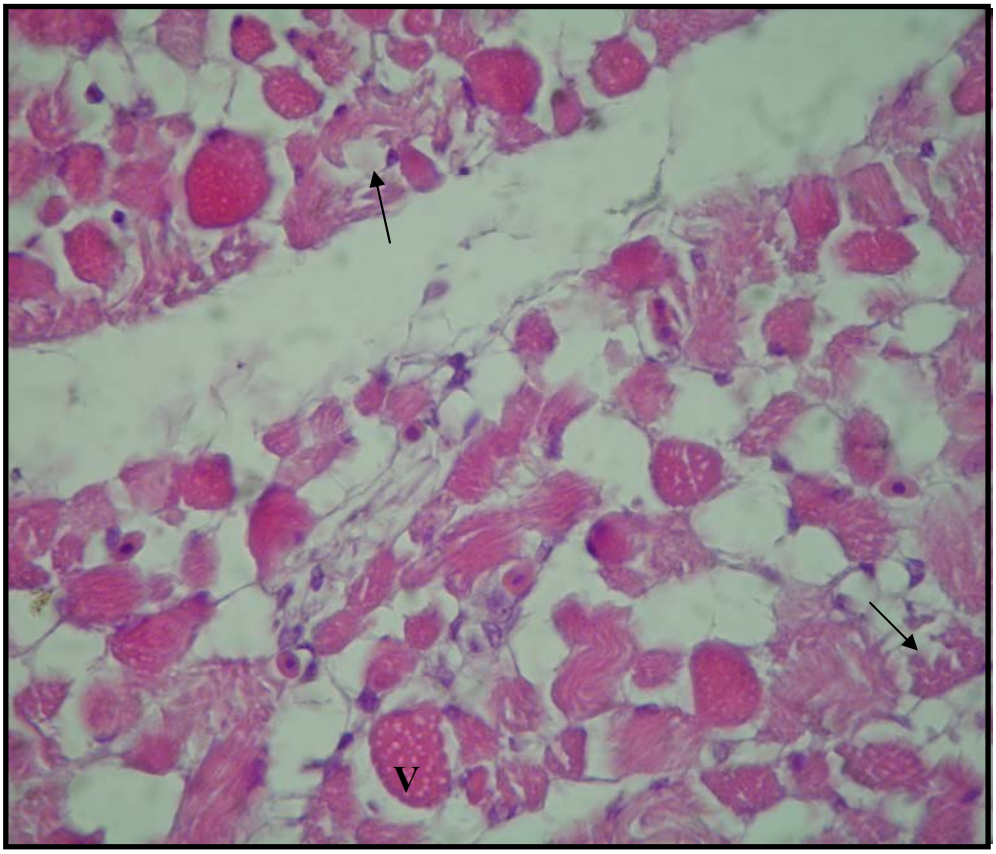


Figura 24. Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com a fração III e sub-fração III-II de *P. patagoniensis*. Nota-se a presença de vesículas no interior das células **(V)** e intensa área mionecrótica **(setas)**, com presença de células amorfas. H.E. 1000X.

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O gênero *Philodryas* possui 15 espécies distribuídas pela América do Sul. Embora freqüentemente consideradas como serpentes não-peçonhentas, várias espécies deste gênero são capazes de causar envenenamento em humanos (PRADO-FRANCESCHI; HYSLOP, 2002). Acidentes por espécies de *Philodryas* têm sido reportados na Argentina (ORDUNA *et al*., 1994), Brasil (NICKERSON; HENDERSON, 1976; SILVA; BUONONATO, 1983/84; NISHIOKA; SILVEIRA, 1994; ARAÚJO; DOS SANTOS, 1997) e Chile (SCHENONE *et al*., 1954 apud PEICHOTO *et al*., 2003; SCHENONE; REYES, 1965 apud PEICHOTO *et al*., 2003).

Em experimentos realizados com preparação nervo frênico-diafragma isolado de camundongos verificou-se que as peçonhas de *P. patagoniensis* (SANTOS, 2004) e de *P. olfersii* (PRADO-FRANCESCHI *et al*, 1996) não afetaram as respostas miográficas, ou seja, não interferiram na amplitude de resposta das contrações musculares. Este fato foi também observado por Heleno *et al*. (1997) testando-se a peçonha de *M. bifossatus*. Por outro lado, a peçonha de *P. patagoniensis* induz bloqueio das respostas contráteis em preparação *b. cervicis* de pintainho (SANTOS, 2004) de forma muito semelhante ao efeito relatado para *P. olfersii* (PRADO-FRANCESCHI *et al.,* 1996, 1998), resultados esses que corroboram com o observado no presente trabalho. Segundo Santos (2004), esta diferença na ação sobre espécies diferentes de animais (mamíferos e aves) poderia estar ligada a uma seletividade para o tipo de presa da dieta alimentar dessas serpentes.

Lavagens sucessivas com solução de Krebs não reverteram o bloqueio da resposta muscular, fato esse sugestivo de que a peçonha age de forma irreversível sobre o músculo *biventer cervicis* de aves, assim como demonstrado em experimentos realizados por Cogo *et al*. (1993, 2006) utilizando veneno total da serpente *Bothrops insularis* e uma toxina isolada deste veneno (BinTX-I).

Observou-se que as respostas musculares evocadas por estímulo indireto sofreram bloqueio total em um espaço de tempo muito menor que o bloqueio verificado nas preparações estimuladas diretamente (na presença de d-tubocurarina), sugerindo a presença de um componente neurotóxico na peçonha da serpente *P. patagoniensis*. Esses resultados se

assemelham aos achados de Oshima-Franco *et al.*, (2004) para Bothropstoxin-I, uma miotoxina isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* e de Rodrigues-Simioni *et al*. (2004) para os venenos de *Bothrops insularis* e *Bothrops neuwiedi*.

As neurotoxinas, presentes em peçonhas, podem agir pré-juncionalmente na membrana do terminal do nervo (goteira) ativando ou bloqueando os canais iônicos presentes nesta região, ou mesmo interferindo na liberação da ACh na exocitose, ou pode agir atuando pós-juncionalmente, agindo nos receptores nicotínicos colinérgicos da membrana pós-sináptica bloqueando ou ativando esses receptores. Pode ainda atuar na acetilcolinesterase presente na fenda sináptica, inibindo a sua ação.

Dois tipos de neurotoxinas pré-sinápticas foram reconhecidas: as neurotoxinas facilitadoras da neurotransmissão, que são destituídas de atividade enzimática e que bloqueiam o canal de potássio voltagem-dependente (ex: dendrotoxinas, HARVEY *et al*., 1984) ou inibem a acetilcolinesterase (ex: fasciculinas, RODRIGUEZ-ITHURRALDE *et al.,* 1973), e as β-neurotoxinas, que se caracterizam por sua atividade PLA_2.

Muitas neurotoxinas, além de agir nos nervos, podem atuar diretamente na membrana muscular, desestruturando–a e promovendo a destruição da célula. Assim, algumas neurotoxinas apresentam geralmente em doses maiores, ação miotóxica, inibindo a excitabilidade da membrana das fibras musculares (VITAL BRAZIL, 1982). A ação miotóxica pode ocorrer diretamente sobre a fibra muscular danificando-a (HARRIS *et al*., 1980; GUTIÉRREZ *et al*., 1984), ou indiretamente ocasionando isquemia e levando o tecido à necrose (OWNBY *et al*., 1982; GUTIÉRREZ *et al*., 1984).

Algumas β-neurotoxinas (PLA_2 neurotóxicas pré-sinápticas isoladas de venenos ofídicos), tais como a notexina (HARRIS; MACDONNEL, 1981) e a crotoxina (HAWGOOD; SMITH, 1989), exibem também considerável miotoxicidade, apesar de seu efeito neurotóxico pré-sináptico ser predominante em seu mecanismo de ação. Zamuner (1997) observou que o veneno de *Bothrops neuwiedi*, em altas concentrações (200 μg/mL), aumentava a liberação de CK, através da dosagem da solução nutritiva que banhava o músculo isolado de ave incubado com o veneno. Além disso, o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, em altas concentrações (10-100 μg/mL), exibiu efeitos miotóxicos, como

contratura e bloqueio da resposta ao potássio em preparação de ave e bloqueio das contrações à estimulação direta em preparações curarizadas de ave e camundongo (BORJA-OLIVEIRA, 2002).

A preparação *b. cervicis* de pintainho, em experimentos *in vitro*, permite diferenciar o mecanismo de ação de uma neurotoxina como pré ou pós-sináptica. A presença de contratura à adição de agonistas colinérgicos, após bloqueio da resposta contrátil evocada induzida pela ação do veneno, pode indicar uma atividade em sítios pré-sinápticos. A atividade pós-sináptica, por sua vez, pode ser identificada pela ausência de resposta contraturante aos agonistas colinérgicos e a estimulação elétrica sem afetar as respostas ao aumento da concentração de potássio ou a estímulo direto (BARRET; HARVEY, 1979).

Assim como descrito por Harvey *et al.* (1994), espera-se que neurotoxinas pré-sinápticas produzam bloqueio das contrações evocadas indiretamente sem abolir as respostas contraturantes à acetilcolina e ao potássio e/ou induzir contraturas em preparações *b. cervicis* de ave.

Como indicativo de uma possível ação pré-sináptica tem-se que após o bloqueio neuromuscular total, as preparações continuaram respondendo com contratura a adição de acetilcolina e ao potássio, isto em baixas doses do veneno. Exceto na mais alta concentração testada (40 μg/mL) isto não foi observado. Por outro lado, o bloqueio da resposta ao potássio, em alta concentração da peçonha, é um indício de que o veneno também atua diretamente sobre a membrana e no mecanismo contrátil muscular. Esse mesmo fato foi observado por Prado-Franceschi *et al.* (1996) estudando o veneno de *P. olfersii* sobre preparação *b. cervicis* de ave.

Além disso, nossa observação de que o bloqueio produzido também é irreversível em preparações previamente curarizadas (estimulação direta), de certa forma, reforça estas observações. Esses dados apontam para a presença, no veneno, de componente ativo na junção neuromuscular, na região pré-sináptica, não relacionado à sua interação com receptores colinérgicos.

A inibição da resposta à estimulação direta, nas preparações musculares de pintainho também corrobora a indicação de que o veneno de *P. patagoniensis* possa ter ação miotóxica.

O bloqueio da contratura em resposta ao potássio observado nos experimentos realizados (40 μg/mL), pode ser justificado pela provável atividade miotóxica do veneno, que foi investigada através de estudo morfológico e pela determinação de CK liberada na solução nutritiva que permeia a preparação.

Embora desprovida de atividade fosfolipásica relevante quando comparada às peçonhas botrópica e crotálica (SANTOS, 2004; ASSAKURA *et al*., 1992, WEINSTEIN; KARDONG, 1994), observamos alterações estruturais significantes acompanhadas de elevação na concentração de CK no banho das preparações musculares. De modo geral, a liberação desta enzima foi proporcional à concentração da peçonha testada, de modo que as lesões observadas no estudo histológico explicam este aumento. É possível que o bloqueio observado esteja relacionado à mionecrose e ao rompimento das fibras musculares, impossibilitando-as de realizar a contração muscular normal. É possível também que a alta atividade proteolítica da peçonha (PEICHOTO *et al*., 2003; TORRENT *et al.,* 2001; SANTOS, 2004) tenha contribuído tanto para o bloqueio neuromuscular como para mionecrose e dano tecidual observados. Esses resultados confirmam os achados de Peichoto *et al*. (2003) que estudaram a ação do veneno de *P. patagoniensis* em músculo gastrocnêmio de ratos e com os achados de Prado-Franceschi *et al.* (1998) sobre o veneno de *P. olfersii* em músculo *b. cervicis* de ave.

No estudo eletrofisiológico realizado com músculo diafragma de camundongo, não foi observada atividade despolarizante no terminal nervoso nem na fibra muscular, evidenciado pelos registros de potencial de membrana, demonstrando que o veneno não foi capaz de promover redução e/ou abolição significativa do potencial de membrana.

Indicando ainda a ação pré-juncional do veneno de *P. patagoniensis* pôde-se observar um aumento sutil e transitório da freqüência dos pmpts nos experimentos também realizados com diafragma isolado de camundongo incubado com o veneno estudado.

A liberação de ACh nos terminais nervosos é um processo altamente controlado que necessita da entrada precisa de cálcio (Ca^{+2}) nos terminais nervosos através dos canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes presentes na membrana pré-sináptica (AUGUSTINE *et al*., 1987).

Considera-se o efeito no aumento da freqüência dos pmpts como um aumento na liberação espontânea de ACh. A explicação mais simples para este fenômeno seria que a toxina produziria uma perturbação suficiente no axônio da membrana, a qual levaria a um aumento na permeabilidade aos íons Ca^{+2} (ABE *et al*., 1976). Outra explicação sugere que o aumento de Ca^{+2} intracelular estaria associado a uma inibição do mecanismo de remoção do Ca^{+2} do terminal pela mitocôndria (WAGNER *et al*., 1974).

Porém, investigações eletrofisiológicas mais recentes têm indicado que este estágio facilitador pode estar também associado ao bloqueio de alguns tipos de canais de K^{+} (ROWAN; HARVEY, 1988) dentro do terminal nervoso motor. O bloqueio desses ocasionaria um retardo na repolarização do terminal nervoso motor após o potencial de ação. Isto faria com que os canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes se abrissem por um período maior que o normal, aumentando o influxo de Ca^{+2} para o terminal nervoso para disparar uma grande quantidade de neurotrasmissor (PENNER; DREYER, 1986).

Os resultados preliminares (n=1) realizados com a fração III e sub-fração III-II obtidas do veneno de *P. patagoniensis* sugestionam que:

A fração isolada neste estudo, apresentou atividade bloqueadora semelhante a do veneno total, permanecendo presente tanto para a fração III como para sub-fração III-II.

O estudo comparativo realizado por Rocha *et al.* (2003) demonstrou que a maioria dos componentes das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* são glicoproteínas, e que apresentam atividades similares, com variações na intensidade e na cinética das ações. Acosta *et al.* (2003) mencionam que a toxicidade (DL_{50}) das peçonhas destas duas espécies de *Philodryas* é comparável a de várias espécies do gênero *Bothrops*; destaca ainda a grande diferença verificada ao se comparar a atividade proteolítica destas peçonhas com as botrópicas (143 U/mg de peçonha de *P. patagoniensis* e 20 U/mg de peçonha de *Bothrops alternatus*). A alta atividade proteolítica das peçonhas de *Philodryas* também tem sido comprovada por outros (PEICHOTO *et al.,* 2003, TORRENT *et al*., 2001; SANTOS, 2004). Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com estes autores, demonstrando que as frações isoladas do veneno de *P. patagoniensis* possuem elevada atividade proteolítica.

A eletroforese das frações de *P. patagoniensis* revelou que a maioria das bandas ocorreram entre 20 e 66 KDa, com algumas bandas claras acima e abaixo desta escala. Uma miotoxina de 20 KDa isolada do veneno de *P. olfersii* foi relatada por conter aproximadamente 25% do índice de proteína do veneno (absorbância 280 nm) (PRADO-FRANCESCHI *et al*., 1998). Estudos mais detalhados em relação às frações de *P. patagoniensis* são necessários para se estabelecer um melhor estudo comparativo.

As análises histológicas apresentaram características clássicas da miotoxicidade, com resultados semelhantes àqueles encontrados pelos estudos realizados com *P. patagoniensis* (PEICHOTO *et al*., 2003) e *P. olfersii* (PRADO-FRANCESCHI *et al*., 1996, 1998; ACOSTA *et al*., 2003).

Embora nossas observações forneçam evidências para um componente neurotóxico presente na peçonha de *P. patagoniensis*, não permite ainda agrupar definitivamente esta espécie com outras espécies de serpentes, particularmente Elapidaes e Hydrophidaes, sabidos por possuir venenos neurotóxicos.

Esta neurotoxina presente no veneno de *P. patagoniensis*, possui uma atividade muito discreta se comparada com a ação total de todos os componentes do veneno. Isto pode estar relacionado à presença desta em baixíssima concentração e que seu efeito possa estar sendo mascarado pela ação de outros componentes no veneno presentes em concentrações maiores.

7. CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os estudos realizados até o momento nos permitiram concluir que:

1) O bloqueio neuromuscular produzido pelo veneno de *P. patagoniensis*, em baixas concentrações (5 e 10 μg/mL), na vigência da resposta à acetilcolina e ao potássio, sugere uma ação preferencial em sítios pré-sinápticos.

2) O veneno total de *P. patagoniensis* também demonstra possuir miotoxicidade em altas doses (40 μg/mL), considerando-se a inibição da resposta contraturante ao potássio e o bloqueio parcial da resposta de preparações curarizadas, bem como aumento na liberação de creatino quinase e características miotóxicas evidenciadas pelo estudo morfológico.

3) Considerando a preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, o veneno de *P. patagoniensis* não possui atividade despolarizante no terminal nervoso motor nem na fibra muscular, fato que demonstra um estudo mais detalhado da atividade deste veneno, uma vez que promove aumento transitório da freqüência dos potencias em miniatura de placa terminal em diafragma isolado de camundongo, evidenciando mais uma vez a ação pré-juncional do veneno de *P. patagoniensis.*

Os resultados preliminares (n=1) das frações obtidos neste estudo sugestionam que:

1) A fração III, bem como a sub-fração III-II isoladas do veneno de *P. patagoniensis* apresentam efeitos na neurotransmissão e na contração muscular semelhante evidenciado pelo veneno total, no que se refere ao bloqueio das contrações musculares em preparações *biventer cervicis* de ave estimuladas indiretamente.

2) A sub-fração III-II revelou um aumento na liberação de creatino quinase, demonstrando que requer estudos acerca desta informação.

3) A fração isolada FIII possui alta atividade proteolítica, podendo esta ser responsável pelos efeitos destrutivos observados no estudo histológico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABE, T.; LIMBRICK, A.R.; MILEDI, R. Acute muscle desnervation induced by beta-bungarotoxin. ***Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.***, v.194, p.545-553, 1976.

ACOSTA, O. et al. Hemorrhagic activity of Duvernoy´s gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. ***Toxicon***, v.41, p.1007-1112, 2003.

BORJA-OLIVEIRA, C. R. **Estudo comparativo da neurotoxicidade de venenos de *Bothrops neuwiedi* de diferentes procedências e isolamento parcial de um componente neurotóxico do veneno mais ativo.** 1998. 65f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

ARAUJO, M.E.; DOS SANTOS, A.C.M.C.A. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* serpentes; Colubridae. ***Rev. Soc. Bras. Med. Trop***., v.30, n.6, p.517-519, 1997.

ASSAKURA, M.T. et al. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake). ***Toxicon***, v.30, p.427-438, 1992.

ASSAKURA, M.T.; SALOMÃO, M.G., PUORTO, G. *et al*. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas ofersii* (green snake). ***Toxicon***, v. 32, n.7, p.819-31, 1994.

AUGUSTINE, G. J.; CHARLTON, M. P.; SMITH S. J. Calcium action in synaptic transmiter release. ***Annu Rev Neurosci***, v.10, p.633-693, 1987.

BARRAVIERA, B. **Estudo clínico dos acidentes ofídicos.** Rio de Janeiro: EPUB, 1999, 46p.

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

BORJA-OLIVEIRA, C. R. **Ação neurotóxica do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) em preparações neuromusculares isoladas – purificação, caracterização parcial e seqüência da porção amino-terminal de duas PLA2**

neurotóxicas pré-sinápticas, neuwieditoxinas I e II. 2002. 135f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BRAZIL, O.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo das glândulas das serpentes aglyphas. ***Mem. Inst. Butantan***, v. 3, p.301-325, 1926.

BROADERS, M.; FARO, C.; RYAN, M.F. Partial purification of acetylcholine receptor binding components from the Duvernoy´s secretion of Blanding´s treesnake (*Boiga blandingi*) and the mangrove snake (*Boiga dendrophila*). ***J. Nat. Toxins***, v. 8, p.155-166, 1999.

BÜLBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diafhragm preparation of the rat. ***Br. J. Pharmacol***., v. 1, n.38, 1946.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIANS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. ***Toxicon,*** v.11, p.1279-1303, 1991.

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

COGO, J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.M.F.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A_2 from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). ***Biochimie,*** v.88, p.1947-1959, 2006.

DE LISLE, H. F. Venomous colubrid snakes. ***Bull Chicago Herp. Soc***., v.17, p.1-17, 1982.

FATT, P.; KATZ, B. An analysis of the end-plate potential recorded with a intra-cellular electrode. ***J. Physiol***, v.115, p. 320-370, 1951.

FONTANA, M. D.; HELENO, M.G.; VITAL BRAZIL, O. Mode of action of Duvernoy´s gland extracts from the colubrid *Dryadophis bifossatus* in the chick *biventer cervicis* nerve-muscle preparation. ***Toxicon***, v.34, p.1187-1190, 1996.

GANS, C. Reptilian venomseg: some evolutionary considerations. In: Biology of the Reptilia, London: Academic Press. ***Physiology B***, v.8, p.1-41, 1978.

GINSBORG, B.L.; WARRINER, J. The isolated chick *biventer cervicis* nerve muscle preparation. ***Br. J. Pharmacol***., v.15, p.410-415, 1960.

GUIMARÃES, B. **Serpentes, escorpiões & aranhas: identificação, prevenção e tratamento**. São Paulo: ESPE, 1972.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G.V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. ***Toxicon***, v.22, p.115-128, 1984.

HARDING, K. A. A brief review of colubrid snakebite. ***ASRA J.***, v.2, p.65-72, 1984.

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

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.** Oxford: Pergamon Press, 1980. p.569-578.

HARTMANN, P.A.; MARQUES, O.A.V. Diet and habitat use of two sympatric species of *Philodryas* (Colubridae), in south Brazil. ***Amphibia-Reptilia***, v.26, p.25-31, 2005.

HARVEY, A.L.; ANDERSON, A.L.; MONGUA, P.M.; KARLSSON, E. Toxins from mamba venoms that facilitate neuromuscular transmission. ***J. Toxicol. Toxin. Rev***., v.3, p.91-137, 1984.

HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A.; THOMSON, E.; FAIZ, A.; PRESTON, S.; HARRIS, J.B. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. ***Toxicon***, v.32, p.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***, v.27, p 272-276, 1989.

HELENO, M.G.; GRÉGIO, A.M.; HYSLOP, S.; FONTANA, M.D.; VITAL BRAZIL, O. Partial purification of a neurotoxic component from a Duvernoy´s gland extract of the aglyphous *Mastigodryas bifossatus*. ***J. Anim. Venom. Toxins*** 3, poster 64, 1997.

HILL, R.E., MACKESSY S.P. Venom yields from several species of colubrid snakes and differential effects of ketamine. ***Toxicon***, v.35, p.671-678, 1997.

HILL, R.E.; MACKESSY, S.P. Characterization of venom (Duvernoy´s secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. ***Toxicon***, v.38, p.1663-1687, 2000.

JANSEN, D.W. The myonecrotic efecct of Duvernoy´s gland secretion of the snake *Thamnophis elegans vagrans*. ***J. Herpetol***., v.21, p.81-83, 1987.

JAUME, M.L. Notas sobre mordeduras tóxicas de serpientes (Reptilia – Serpentes – Colubridae). ***Rev. Cub. Med. Trop***., v.35, p.224-230, 1983.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. ***Rev. As. Med. Bras***., v.36, n.2, p.66-77, 1990.

KARDONG, K.V.; LAVIN-MURCIO, P. Venom delivery of snakes as high pressure and low pressure systems. ***Copeia***, v.3, p.644–650, 1993.

KOCHVA, E. Oral glands of the Reptilia. In: Biology of the Resptilia, New York: Academic Press. ***Physiology B***., v.8, p.43-171, 1978.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. ***Toxicon***, v.25, p.65-106, 1987.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. ***J. Gen. Physiol***., v. 32, p. 291-310, 1947.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature***, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEITE, L.C.C.; FURTADO, F.D.; CORREA, T.C.; RAW, I. Characterization of the snake venoms from seven brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion-exchange chromatography. ***Comp. Biochem. Physiol.***, v.102B, p.515-520, 1992.

LEVINSON, S.R.; EVANS, M.H.; GROES, F. A neuromuscular component of the Duvernoy´s secretion from Blanding´s tree snake (*Boiga blandingi*) ***Toxicon***, v.14, p.307-312, 1976.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with Folin-phenol reagent***. J. Bio. Chem***., v.193, p.265-275, 1951.

MACKESSY, S.P. Toxinology of colubrid snakes: biology, venomseg, and envenenomation. ***J. Toxicol. – Toxin Rev***., v.21, p.1-201, 2002a.

MACKESSY, S.P. Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. ***J. Toxicol. Rev.***, v.21, p.33–63, 2002b.

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

MARTINS, N. Das opisthoglyphas brazileiras e seu veneno. ***Col. Trab. Inst. Butantan***, v.1, p. 425-456, 1917.

MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, 1999.

MCKINSTRY, D.M. Evidence of toxic saliva in some colubrid snakes of the United States. ***Toxicon*** v.16, p.523-534, 1978.

MCKINSTRY, D.M. Morphological evidence of toxic saliva in colubrid snakes. A checklist of world genera. ***Herpetol. Rev.***, v.14, p.12-15, 1983.

MINTON, S.A. Are there any nonvenomous snakes? Na update on colubrid envenoming. ***Adv. Herpetoculture***, v.4, p.127-134, 1996.

MINTON, S.A. Venomous bites by nonvenomous snakes: an annotated bibliography of colubrid envenenomation. ***J. Wild. Med***., v.1, p.119-127, 1990.

MINTON, S.A. Beware: nonpoisonous snakes. ***Clin. Toxicol***., v.15, p.259-265, 1979.

MINTON, S.A. A list of colubrid envenomations. ***Ky. Herpet.***, v.7, p.4-5, 1976.

MUSEU DO INSTITUTO BUTANTAN. Principais Serpentes Brasileiras: Serpentes não-peçonhentas: Banco de dados. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/museu/br/serp_serpbras01.pdf>. Acesso em: 21 de janeiro de 2007.

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.***, v.153, p.175, 1976.

NICKERSON, M.A., HENDERSON, R.W. A case of envenomations by the South American colubrid, *Philodryas olfersii*. ***Herpetologica***, v.32, p.197–198, 1976.

NISHIOKA, S. A., SILVEIRA, P.V.P. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. ***Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo***, v.36, p.279–281, 1994.

ORDUNA, T.A., MARTINO, O.A.L., BERNACHEA, P., MAULEN, S. Ophidism produced by snakebite of genus *Philodryas*. ***Prensa Med. Argentina***, v. 81, p.636–638, 1994.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; DAL BELO; C.A.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The presynaptic activity of Bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. ***Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology***, v.95, p.175-182, 2004.

OWNBY, C.L., GUTIÉRREZ, J.M.; COLBERG, T.R.; ODELL, G.V. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from praire rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. ***Toxicon***, v.20, p.877-885, 1982.

PEICHOTO, M.E.; LEIVA, L.C.; ACOSTA, O.; MARUNAK, S.; RUIZ, R.;TEIBLER, P. **Caracterización del veneno de *Philodryas patagoniensis* del nordeste de Argentina.** Universidad Nacional del Nordeste: Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen: E-068, 2003.

PENNER, R.; DREYER, F. Two different presynaptic calcium current in Mouse nerve terminals. ***Pflugers Arch***, v.406, p.190-197, 1986.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. ***Rev. Ass. Méd. Brasil***., v.47, n.1, p.24-29, 2001.

PIRES, L.S. **Estudo epidemiológico de acidentes ofídicos na cidade de São José dos Campos (SP) e municípios adjacentes**. 2004. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.

PETERS, J.A.; OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the Neotropical Squamata. Part I. Snakes. Bull. US Nat. Mus. 297 (i-viii), 1-347,1970. Apud: PEICHOTO *et al*. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: its effects on blood coagulation. ***Toxicon***, v.45, p.527-534, 2005.

PUORTO, G.; FRANÇA, F.O.S. **Serpentes não peçonhentas e Aspectos clínicos dos acidentes** In: CARDOSO, J.L.C. *et al*. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003.

PRADO-FRANCESCHI, J. HYSLOP, S. South American colubrid envenomations***. J. Toxicol – Toxin. Rev***. v.21, p.87-113, 2002.

PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S., COGO, J.C.; ANDRADE, A.L.F.; ASSAKURA, M.T.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The effects of Duvernoy´s gland secretion from the xenodontine colubrid snake *Philodryas olfersii* on striated muscle and the neuromuscular junction: partial characterization of a neurotoxic fraction ***Toxicon***, v.34, p.459-466, 1996.

PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S.; COGO, J.C.; ANDRADE, A.L.F.; ASSAKURA, M.T.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Characterization of a myotoxin from the Duvernoy´s gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects in striated muscle and the neuromuscular junction ***Toxicon***, v.36, p.1407-1421, 1998.

RIBEIRO, L.A., PUORTO, G.; JORGE M.T. Bites by the colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. ***Toxicon***, v.37, p.943-948, 1999.

ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F. Comparative study of venom of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). ***J.Venom.Anim.Toxins.incl.Trop.Dis***., v.9, n.2, p.368, 2003.

ROCHA, M.B. & MOLINA, F.B. **Considerações preliminares sobre a biologia e manejo de *Philodryas patagoniensis*, parelheira, em cativeiro (Colubridae, Ophidia)**, In: resumes do XIV Congress. Brasil. De Zoologia, 134, 1987.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; ZAMUNÉR, S.R.; COGO, J.C.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; CORRADO, A.P. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). ***Toxicon***, 43, 633-638, 2004.

RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D.; SILVEIRA, R.; BARRETO, L. DAJAS, F. Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. ***Neurochem. Int***., v.5, p.267-274, 1973.

ROWAN, E.G.; HARVEY, A.L. Potassium channel blocking actions of β-bungarotoxin and related toxins on mouse and frog motor nerve terminals. ***Br J Pharmacol***, v.94, p.839-847, 1988.

SANTOS, L. P. **Estudo da ação neuromuscular de variadas concentrações de peçonha da colubrídea opistóglifa *Philodryas patagoniensis* em preparações musculares de aves e mamíferos.** 2004. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.

SAZIMA, M.V., HADDAD, C.F.B. **Répteis da Serra de Japi: notas sobre história natural.** In: Morellato, L.P. (Ed) História Natural da serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma

Área Florestal do Sudeste do Brasil. Editora da Unicamp FAPESP, São Paulo, p.212-236, 1992.

PEICHOTO, M.E., TEIBLERB, P., RUIZ, R.; LEIVA, L.; ACOSTA, O. Systemic pathological alterations caused by *Philodryas patagoniensis* colubrid snake venom in rats. ***Toxicon,*** v.48, p.520–528, 2006.

SILVA, M.V.; BUONONATO, M.A. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. In: ***Memórias do Instituto Butantan*** v.47/48, p.121-126, 1983/1984.

SILVA JR., N.J. **Fundamentos de Ofiologia**. Universidade Católica de Goiás: UCG, 1997.

SLYPEN, F. Venomous or not? ***Litt. Serpentarium*** v.4, p.42-56, 1984.

SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos - Reconhecimento, Distribuição geográfica, Produção de soros, Clínica e tratamento dos envenenamentos**. Rio de Janeiro: ATHENEU, 1990.

SOUZA-FILHO, S.P.; COGO, J.C.; PUORTO, G. **Obtenção do veneno de serpentes não peçonhentas opistóglifas** In: 3º Encontro de Iniciação Científica, UNIVAP, São José dos Campos, Resumos do 3º Encontro de Iniciação Científica, v.1, p.86, 1999.

TAUB, A.M., Comparative studies on Duvernoy's gland of colubrid snakes. ***Bull. Am. Mus. Nat. Hist.***, v.138, p.1-50, 1967.

TORRENT, R.; LEIVA, L.C.A.; ACOSTA DE PÉREZ, O. Efecto proteolítico de venenos de serpientes del gênero *Bothrops* (yarará) de la Argentina y su neutralización por un antiveneno bivalente***. Acta Toxicol. Agent***., v.9, n.1, p. 9-12, 2001.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA. CalPhotos: Browse Reptile Photos by Scientific Names. Disponível em:<http//:www.calphotos.berkeley.edu/.../0906/1082.jpeg>. Acesso em: 21 de dezembro de 2006.

VIDAL, N. Colubroid systematics: evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. ***J. Toxicol. – Toxin Rev***., v.21, p.21-41, 2002.

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

WAGNER, G.M.; MART, P. E.; KELLY, R.B. β-bungarotoxin inhibition of calcium accumulation by rat mitochondria. ***Biochem Bioph Res Comm***, v.58, p.475-481, 1974.

WEINSTEIN, S.A.; KARDONG, K.V. Properties of Duvernoy's secretion from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. ***Toxicon***, v.32, p.1161-1185, 1994.

WEINSTEIN, S.A; SMITH, L.A. Chromatographic profiles and properties of Duvernoy's secretions from some boigine and dispholidine colubrids. ***Herpetologica***, v.49, p.78-94, 1993.

WEINSTEIN, S.A; STILES, B.G.; MCOID, M.J., SMITH, L.A., KARNDONG, K.V. Variation of the lethal potencies and acetylcholine receptor binding activity of Duvernoy's secretions from the brown tree snake, *Boiga irregularis*. ***Merrem. J. Nat. Toxins***, v.2, p.198-198, 1993.

YOUNG, R.A. Effects of Duvernoy's gland secretion from the eastern hognose snake, *Heterodon platyrhinos*, on smooth muscle and neuromuscular junction. ***Toxicon***, v.30, p.775-779, 1992.

YOUNG, R.A. *In vitro* activity of Duvernoy's gland secretions from the African boomslang, *Dispholidus typus*, on nerve-muscle preparations***. J. Venom. Anim. Toxins***, v.2, p.52-58, 1996.

ZAMUNER, S.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. **Capacidade neutralizante de antiveneno comercial sobre as atividades neurotóxica e miotóxica de venenos botrópicos**.1997. Dissertação (Mestrado em farmacologia), Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

ANEXO – Comitê de Ética em Pesquisa (UNIVAP)

Fundação Valeparaibana de Ensino

UniVap
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.° L099/2005/CEP, intitulado *"Ação neuromuscular da peçonha de Colubridea opistoglifa philodryas patagoniesis em preparação de aves e mamíferos: caracterização dos componentes ativos"*, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Carlos Cogo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 02 de dezembro de 2005.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

Av. Shishima Hifumi, 2911 – URBANOVA – CEP. 12.244-000 – PABX (12) 3947.1121 – FAX.(12) 3947.1149 - Caixa Postal 82 - S.J.Campos-SP