RODOLFO MELARÉ

CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* E DA TOXINA BthTX-I NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR: IMPORTÂNCIA CLÍNICA E RELATO DE UM CASO

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Bragança Paulista

2014

RODOLFO MELARÉ

CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* E DA TOXINA BthTX-I NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR: IMPORTÂNCIA CLÍNICA E RELATO DE UM CASO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA

PROF. DRA. THALITA ROCHA

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Bragança Paulista

2014

WD 410 Melaré, Rodolfo.
M462c Caracterização morfofuncional do veneno de *Bothrops jararacussu* e da toxina BthTX-I na junção neuromuscular: importância clínica e relato de um caso / Rodolfo Melaré. -- Bragança Paulista, 2014.
xiv, 39 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Thalita Rocha.

1. Acidentes ofídicos. 2. *Bothrops jararacussu*. 3. Bothropstoxina. 4. Neurotoxicidade. 5. Miotoxicidade. I. Rocha, Thalita. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

MELARÉ, Rodolfo, "Caracterização morfofuncional do veneno de Bothrops jararacussu e da toxina BthTX-I na junção neuromuscular: importância clinica e relato de um caso". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e três de janeiro de 2014 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Thalita Rocha
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Sandro Rostelato Ferreira
Universidade Paulista

Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista — Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
Campus Campinas - Unidade Cambuí — R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
Campus Campinas - Unidade Swift — R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
Campus Itatiba — R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
Campus São Paulo — R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

DEDICATÓRIA

A DEUS e NOSSA SENHORA,

A meus PAIS, Sr. Wilson Luiz Melare (in memoriam) e Sra. Maria Aparecida Bresciani Melaré (in memoriam), pela vida, carinho e educação,

à minha maravilhosa ESPOSA ***Caroline Miyuki Katayama****, pelo amor, cumplicidade, pela força, pelo exemplo e principalmente pela* ***Laura****; e finalmente,*

a minha filha ***Laura****, meu anjo, minha vida.*

Aos meus queridos Sogros Luis Takeshi Katayama e Maria Aparecida de Oliveira Katayama pelo acolhimento e carinho fraternal,

À minha querida TIA Ivone Bresciani Bachiega, pelo amor e atenção.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus Pais pela Educação e pela criação, que apesar das dificuldades nunca foi abalada;

A toda minha família que sempre lutou ao meu lado e faz com que tudo isso seja possível;

Agradeço meus professores e mestres que contribuíram para minha formação;

Aos colegas médicos com quem convivo todos os dias, em especial Dr. Caled Joudat Kadri e Dr. Murillo Antunes, pela amizade e apoio;

A Prof. Dra. Thalita Rocha por me orientar, e me acolher e pela persistência e perseverança;

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proc. 2011/00001-1) pelo fomento

Às alunas de Iniciação Científica Junia R. Brandão Franco (bolsista PIBIC/CNPq), Carolina Vespúcio Bis e Marta Rodrigues Gracia, por realizarem parte dos experimentos laboratoriais

A todos os Docentes do Grupo de Pós-Graduação Strito sensu da Universidade São Francisco;

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação da Universidade São Francisco;

A todos os mestrandos e doutorandos da UNICAMP, professores e técnicos que nos auxiliaram de braços abertos, em especial Professora Doutora Léa Rodrigues Simioni e Sr. Gildo Bernardo Leite;

Aos Residentes de Clínica Médica do Hospital Universitário pelo apoio e ajuda nas diversas etapas desse projeto.

Lista de abreviaturas

ACh - Acetilcolina

ANOVA - Análise de variância

BJ - Veneno Bruto de *Bothrops jararacussu*

BSA - Bovine serum albumine

BthTX-I - Bothropstoxina I

CD - Grupo controle

CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CEMIB - Centro multidisciplinar para investigação biológica na área de ciências em animais de laboratório

COBEA - Comitê Brasileiro de Experimentação Animal

CPK - Creatinofosfoquinase

Da - Unidade Dalton

FCM - Faculdade de Ciências Médicas

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

HE - Hematoxilina-Eosina

HRP - Enzima *horseradish* peroxidase

HUSF - Universidade São Francisco

IHC - Imunohistoquímica

JNM - Junção Neuromuscular

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MS - Ministério da Saúde

NFD - Nervo Frênico Diafragma

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salino)

pH - potencial hidrogênionico

PLA_2 - Fosfolipase A_2

SDS PAGE - dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)

SINAN - Sistema de Notificação de Agravos de Notificação

SNAP25 - *Synaptossomal-associated protein* 25 (proteína do complexo t-SNARE)

SNARE - *Soluble NSF attachment receptor*

Th1 - Grupo Toxina BthTX-I

TP - Tempo de Protrombina

TTPa - Tempo de tromboplastina parcial ativada

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

USG - Ultrassonografia

VAMP 1 - *Vesicle associated membrane protein* (proteina da membrana da vesícula sináptica)

WB - *Western Blotting*

Lista de figuras

Figura 1: Distribuição de acidentes ofídicos por gênero no Brasil. Fonte: SINAN WEB (2005).....2

Figura 2: Gêneros de serpentes de importância médica no Brasil: 1. *Bothrops;* 2. *Crotalus;* 3. *Lachesis;* 4. *Micrurus.* Fonte: Herpetofauna. Disponível em: <www.herpetofauna.com.br>. Acesso em: 25/10/2013.....2

Figura 3: Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma (NFD) de camundongo. Controle (**A**), veneno total de *B. jararacussu* 100µg/mL (**B**) e toxina BthTX-I 50µg/mL (**C**). * adição do veneno e da toxina; ** lavagem – remoção do veneno e da toxina.....14

Figura 4: Curvas de resposta contrátil dos grupos controle, veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e da toxina BthTX-I. Nota-se visual diferença entre grupos expostos ao veneno e toxina em relação ao controle; diferença estatisticamente significante entre o grupo controle e os tratamentos (*p<0,001); e entre os grupos veneno bruto e toxina BthTX-I
(#p<0,001).....15

Figura 5: Cortes histológicos dos músculos diafragma de camundongos mantidos em Tyrode (**A** – controle) e tratados com o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (**B** - 100µg/mL) e sua toxina BthTX-I (**C** - 50µg/mL). Note o padrão alongado, sarcoplasma homogêneo e núcleo periférico (*) das fibras do grupo controle (**A**). Observe a perda deste perfil morfológico nos grupos tratados (**B**-**C**) e consequente hipercontração e ausência de miofilamentos (seta). Aumento 400X.....16

Figura 6: Cortes histológicos das preparações NFD controle (Tyrode – **A**, **B**, **C**), submetidas à ação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (**D**, **E**, **F**) ou de sua toxina BthTX-I (**G**, **H**, **I**). Notar a imunomarcação positiva (fluorocromo FITC) evidenciando a presença das proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25 (seta). A, D, F: 200x; B, C, E, G, H, I: 400x.....17

Figura 7: Representação dos resultados de western blotting (WB) para as proteínas sinaptofisina (**A**), sinaptobrevina (**B**) e SNAP-25 (**C**), e para a proteína constitutiva GAPDH (**D**). Os gráficos (**E-F**) correspondem a análise quantitativa do WB, por medida de densidade de pixel de cada proteína: sinaptofisina (**Syf**), sinaptobrevina (**Syb**) e SNAP-25 (**S25**). Há diferença significativa entre as proteínas da junção neuromuscular nos grupos tratados (**BJ**; **Th1**) com o grupo controle (**CD**); * p<0,05 e # p<0,001. Não há diferença significativa entre os tratamentos para a proteína GAPDH.....18

Figura 8: As imagens **A, B** e **C** mostram os aspectos ultraestruturais da musculatura do grupo controle (NFD). **A** - Fibra muscular com núcleo periférico (N) e mitocôndrias (m) evidentes; **B** - Detalhe da fibra muscular evidenciado os sarcômeros (s) e os miofilamentos (mi). **C** - Célula de Schwann com bainha de mielina (**), neurofilamentos (n) e núcleo (N); já as imagens **D, E** e **F** evidenciam aspectos ultraestruturais da preparação NFD submetida à ação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Notar em **E** a hipercontração dos miofilamentos (mi) e em **F** a morfologia da Célula de Schwann, com alterações na mielinização. m = mitocondria; N = núcleo; n = neurofilamentos; ** = bainha de mielina.....19

Figura 9: Aspectos ultraestruturais da preparação NFD submetida à ação da toxina BthTX-I isolada do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Notar em **A** as mitocondrias (m) edemaciadas, em **B** a morfologia da Célula de Schwann com alterações na mielinização (**) e distribuição dos neurofilamentos (n), em **C** núcleo (n) apoptótico e em **D** a hipercontração dos miofilamentos (mi). N = núcleo; n = neurofilamentos; ** = bainha de mielina.....20

Figura 10: A **Figura 10A** revela a ultraestrutura da junção neuromuscular (JNM) do músculo diafragma (controle). m = mitocôndria; M = fibra muscular; seta = membrana pré-sináptica; dupla seta = membrana pós-sináptica; * = vesícula sináptica; já a **Figura 10B**, revela os aspectos ultraestruturais da junção neuromuscular (JNM) da preparação NFD submetida à ação da toxina BthTX-I isolada o veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Notar a diminuição (#) da concentração de vesículas sinápticas (*) no botão nervoso. m= mitocondria; M = fibra muscular; N = núcleo; dupla seta = membrana pós-sináptica; * = vesícula sináptica. A seta indica a possível localização da membrana pré-sináptica, não visível.....21

Figura 11: Evolução do caso. **A:** Sangramento em cavidade oral; **B:** Membro com edema, aspecto típico da Síndrome Compartimental; **C e D:** Momento da realização da fasciotomia; **E:** Aspecto em pós operatório imediato; **F:** Aspecto após fechamento completo da fasciotomia.....22

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tipo de envenenamento no Brasil.....3

Tabela 2: Atividades farmacológicas dos venenos das serpentes de importância médica no Brasil: (+) presente; (-) ausente.....3

Sumário

1. Introdução..... 1
1.1. Acientes Ofídicos..... 1
1.2. *Bothrops jararacussu*..... 4
2. Justificativa..... 7
3. Objetivos..... 8
4. Material e Métodos..... 9
4.1. Animais..... 9
4.2. Preparação Nervo Frênico Diafragma de Camundongo (NFD)..... 9
4.3. Veneno e Toxina..... 9
4.4. Anticorpos utilizados..... 9
4.5. Grupos Experimentais..... 10
4.6. Miografia..... 10
4.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão..... 11
4.8. Imunohistoquímica..... 11
4.9. Western Bloting..... 12
4.10. Análise Estatística..... 13
4.11. Relato de Caso: Metodologia..... 13
5. Resultados..... 14
6. Discussão..... 24
7. Conclusões..... 27
8. Referências Bibliográficas..... 28
ANEXO I..... 38
ANEXO II..... 39

RESUMO

Acidentes ofídicos representam importante causa de morbimortalidade no Brasil, configurando problema de saúde pública. Os acidentes com sepentes do gênero *Bothrops* representam cerca de 75 a 90% dos acidentes, sendo a espécie *Bothrops jararacussu* uma representante clássica desse gênero. Diversos estudos evidenciaram o bloqueio neuromuscular pré-sináptico causado pelo veneno bruto e por toxinas específicas. O presente trabalho objetivou documentar o efeito do bloqueio neuromuscular através da miografia, caracterizar a expressão das proteínas da vesícula sináptica e da membrana pré-sináptica através de imunohistoquímica e western bloting e avaliar a presença e integridade das vesículas, da fenda e do botão pré-sináptico a fim de elucidar o mecanismo de ação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e da toxina BthTX-I na junção neuromuscular. A morfologia da musculatura nos animais do grupo controle apresentou-se inalterada. Já os músculos das preparações tratadas com o veneno de *B. jararacussu* e com a toxina BthTX-I apresentaram edema celular, fibras hipercontraídas, sarcômeros desalinhados, além de danos às Células de Schwann e falhas na disposição da bainha de mielina. Em relação às proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25, nos experimentos realizados apenas as amostras dos grupos controle apresentaram imuno-expressão, evidenciando vesículas sinápticas intactas, bem como parte da "maquinaria proteica" para a exocitose do neurotransmissor. Os resultados nos levam a concluir que a ação neurotóxica pré-sináptica do veneno de *B. jararacussu* e das toxinas BthTX-I é resultante da perda das vesículas sinápticas antes mesmo de sua ancoragem na membrana do neurônio para exocitose do neurotransmissor, dada a diminuição destas vesículas no botão nervoso e da perda das proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25, levando ao bloqueio da resposta contrátil. Além disso, alterações no processo de mielinização, podem ser um indício de danos à estrutura do nervo em paralelo a alterações às fibras musculares, num efeito pós-sináptico independente do efeito neurotóxico observado.

Palavras chave: Acidentes ofídicos; *Bothrops jararacussu*; Bothropstoxina; neurotoxicidade; miotoxicidade.

ABSTRACT

Snakebites is an important cause of morbidity and mortality throughout the country, setting an important public health problem. Accidents involving *Bothrops* snakes represent about 75-90 % and *Bothrops jararacussu* is a classic and prevalent representative of this gender. Several studies have demonstrated the pre-synaptic neuromuscular blockade caused by crude venom and specific toxins. This study aimed to report the effect of neuromuscular blockade by myography and to characterize the expression of synaptic vesicle and presynaptic membrane proteins by immunohistochemistry and western blotting and evaluate the presence and the integrity of the synaptic vesicles, to elucidate the mechanism of action of *Bothrops jararacussu* crude venom and BthTX-I toxin at the neuromuscular junction. The morphology of the muscles in the control group was unchanged; sarcoplasm with continuous filaments, aligned sarcomeres, peripheral nuclei and intact organelles. However the muscles of the preparations treated with the venom of *B. jararacussu* and the BthTX-I toxin showed cellular edema, hypercontraction, misaligned sarcomeres and damage to Schwann cells with failure in myelination. Regarding proteins synaptophysin, synaptobrevin and SNAP-25 expression, in all experiments only the samples of the control group showed positive immuno-expression, indicating the presence of intact synaptic vesicles, as well as part of the "protein machinary" for neurotransmitter exocytosis. The results lead us to conclude that the presynaptic neurotoxic venom of *B. jararacussu* and the toxins BthTX-I results from the loss of synaptic vesicles even before its anchoring in the membrane of the neuron to neurotransmitter exocytosis, given the reduction of these vesicles in nerve button and the loss of proteins synaptophysin, synaptobrevin and SNAP-25, leading the blockade of the contractile response. Moreover, changes in the myelination process may be an indication of damage to the nerve structure in parallel to changes in the muscle fibers, as a postsynaptic effect independent of the neurotoxic effect observed.

Keywords: Snakebites; *Bothrops jararacussu*; Bothropstoxin; neurotoxicity, myotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes Ofídicos

O ofidismo representa a principal classe de acidentes por animais peçonhentos, dado o impacto na morbimortalidade, número de internações e gastos com saúde pública anualmente (Araújo *et al*., 2003; Pinho e Pereira, 2001). Calcula-se que ocorram no mundo mais de 1.840.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com cerca de 94.000 mortes, especialmente nas áreas da África Sub-Sahariana e no sul da Ásia, onde a obtenção de soros antiofídicos é precária (Kasturiratne *et al.*, 2008). Na Ásia, principalmente na Índia, Paquistão e Birmânia, os acidentes ofídicos provocam entre 25 a 35 mil óbitos por ano (Pinho e Pereira, 2001).

No Brasil, nos últimos 12 anos, foram registrados mais de 340 mil casos, sendo 70% dos casos causados pelo gênero *Bothrops* **(Figura 1).** A taxa de letalidade permanece em torno de 0,35 a 0,45% e sequelas 1,2% de todos os acidentes. Bochner e Struchiner (2003) e SINAN/MS são concordantes na importância médico-epidemiológica dos acidentes ofídicos e também no perfil da vítima acidentada; sendo, geralmente, homem, em idade produtiva, trabalhador do campo.

O Brasil apresenta uma riquíssima fauna de serpentes, sendo conhecidas em 2010, 371 pertencentes atualmente a 10 famílias: *Anomalepididae* (7), *Leptotyphlopidae* (14), *Typhlopidae* (6), *Aniliidae* (1), *Tropidophiidae* (1), *Boidae* (12), *Colubridae* (34), *Dipsadidae* (241), *Elapidae* (27) e *Viperidae* (28) (Bérnils, 2010). Os acidentes ofídicos de importância médica no Brasil são causados por quatro gêneros, sendo clinicamente descritos como: botrópico, crotálico, laquético e elapídico (Bérnils, 2010; Brasil, 2010) **(Figura 1-2; Tabela 1-2)**.

Figura 1: Distribuição de acidentes ofídicos por gênero no Brasil. Fonte: SINAN WEB (2005).

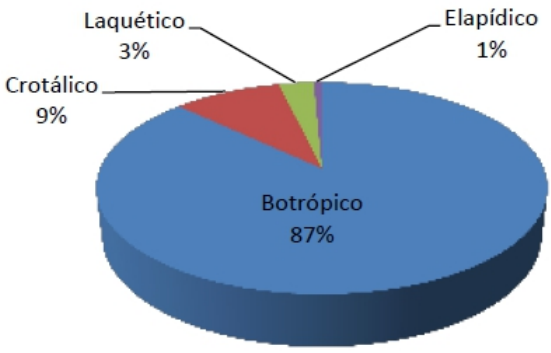

Figura 2. Gêneros de serpentes de importância médica no Brasil: **A**. *Bothrops;* **B**. *Crotalus;* **C**. *Lachesis;* **D**. *Micrurus.* Fonte: Herpetofauna. Disponível em: <www.herpetofauna.com.br>. Acesso em: 25/10/2013

Tabela 1. Tipo de envenenamento no Brasil.

Envenenamento	Nomes populares	Distribuição geográfica	Espécies
Botrópico	jararaca jararacussu urutu-cruzeiro comboia	todo território nacional	*Bothrops jararaca* *Bothrops jararacussu* *Bothrops alternatus* *Bothrops moojeni* *Bothrops neuwiedii* *Bothrops atrox* *Bothrops bilineata*
Laquético	surucucu pico de jaca	floresta amazônica mata atlântica	*Lachesis muta*
Crotálico	cascavel	Cerrado regiões áridas e semi-áridas campos abertos	*Crotalus durissus*
Elapídico	coral verdadeira	todo território nacional	*Micrurus surinamensis* *Micrurus frontalis*

Tabela 2: Atividades farmacológicas dos venenos das serpentes de importância médica no Brasil: (+) presente; (-) ausente.

	Veneno			
	Botrópico	Laquético	Crotálico	Elapídico
Inflamatória	+++	++++	-	-
Hemorrágica	+++	+++	-	-
Pró-trombótica	+++	+++	++	-
Neurotóxica	+	-	++++	++++
Miotóxica	+++	-	+++	-

Os venenos ofídicos são compostos ricos em proteínas, bem como uma variedade de substâncias orgânicas de baixo peso molecular; carboidratos e aminoácidos livres (Martínez-Vargas, 1990), cálcio, magnésio e o zinco (Tu, 1977). As proteínas constituem 90% a 95% de seu peso seco, sendo estas, principalmente,

miotoxinas e neurotoxinas, responsáveis pela atividade tóxica dos venenos (Jia *et al*., 1996; Tu, 1977).

As características clínicas do envenenamento ofídico são basicamente devidas aos efeitos proteolíticos e mionecróticos, seguidos por manifestações hemorrágicas, trombóticas e neuroparalíticas (Gold *et al.*, 2002; Guitiérrez e Lomonte, 1989). A apresentação clássica é caracterizada por sintomas no local da inoculação do veneno, sendo a dor, edema, predominantes e de intensidade variável, podendo causar rabdomiólise e síndrome compartimental por comprometimento vascular do membro afetado, levando a sequelas e até amputação do mesmo (Cardoso *et al.*, 2009).

Outras manifestações comuns abrangem quadros hemorrágicos menores ou maiores (Machado *et al*., 2010; Pinho e Burdman, 2001; Ribeiro e Jorge, 1989), insuficiência renal (Rodrigues *et al.*, 2011; Sgrignolli *et al*., 2011), e quando manifestado clinicamente, quadros de ptose palpebral e paralisia flácida, sintomas característicos dos acidentes crotálicos, mas que, tem sido observados em acidentes botrópicos, desde Vital Brazil, no início do século passado (Brazil, 1966; *apud* Rostelato-Ferreira *et al.*, 2010).

Estudos revelam semelhança na sintomatologia de acidentes crotálicos e acidentes ocorridos com *Bothrops jararacussu* fato observado por Vital Brazil no início do século passado; e ainda, outros autores relataram a neutralização da ação de veneno Botrópico com antivenenos crotálicos (Brazil, 1966; Beghini *et al*., 2005; Oshima-Franco *et al.,* 2001).

1.2. *Bothrops jararacussu*

O gênero *Bothrops* apresenta 32 espécies e subespécies que estão distribuídas nas Américas, desde o México até a Argentina (Hoge e Romano, 1972; Hoge e Romano-Hoge, 1978). São abundantes em regiões rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Têm hábitos predominantemente noturnos ou

crepusculares, e podem apresentar comportamento agressivo quando ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruídos. São conhecidas popularmente por “jararaca”, “jararacuçu”, “urutu-cruzeiro”, “cotiara”, “jararaca-do-rabo-branco”, “jararaca-pintada”, “malha-de-sapo”, “patrona”, “surucucurana”, “combóia”, “caiçara”, entre outras denominações (Melgarejo, 2003).

A espécie *B. jararacussu* destaca-se como causadora da maioria dos acidentes, sendo responsável por 93,57% dos acidentes botrópicos com identificação do animal (Cardoso e Brando,1982).

A *B. jararacussu* pode alcançar 2,2 m de comprimento e injetar até 4 mL de veneno bruto, correspondendo a 1g em peso seco (Melgarejo, 2003). Encontrada no Brasil, Paraguai, sul da Bolívia e nordeste da Argentina (Martins, 2010), é uma das mais estudadas espécies do gênero *Bothrops.*

Suas picadas induzem severo envenenamento local e sistêmico, aumento da pressão de perfusão, diurese e natriurese, descritos para as miotoxinas I (Lys49) e II (Asp49), as quais também induzem hemorragia e edema, mionecrose, sendo necessária, em alguns, casos a amputação do membro atingido (Barbosa *et al.*, 2003; Selistre *et al.*, 1990), além de choque, sangramento sistêmico e espontâneo, falência renal (Havt *et al.*, 2001) e morte (Ribeiro e Jorge, 1997).

Os estudos iniciais da *B. jararacussu* e seu veneno são datados a partir de 1903, quando foram observadas características semelhantes ao envenenamento crotálico (Brazil, 1909; 1911). Posteriormente outros estudos identificaram a presença de fosfolipases A_2 (Vidal e Stoppani, 1971) com efeito sobre a junção neuromuscular (Rodrigues-Simioni *et al*., 2004). Tal efeito neurotóxico inibe a contração muscular por ação direta ou indireta sobre o nervo (Gallacci *et al.,* 2006; Heluany *et al.*, 1992; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Ponce-Soto *et al.*, 2008), atuando sobre a porção pré-sináptica da junção neuromuscular, sem induzir seu bloqueio total, sendo também responsável pelos precoces eventos de miotoxicidade (Oshima-Franco *et al*., 2004).

A partir da purificação do veneno bruto de *B. jararacussu*, isolou-se um *pool* de proteinas que representava 30% do veneno bruto (Rodrigues-Simioni *et al*., 1983). Essa

fração inicial do veneno bruto foi denominada de *pool* IV, composto pelas sub-frações SIIISPIV e SIIISPV, que, posteriormente, receberam o nome de Bothropstoxina-II e Bothropstoxina-I, respectivamente (Homsi-Brandeburgo *et al.,* 1988).

A Bothropstoxina-I (BthTX-I - 13720 Da) é uma proteína de pH básico, cuja sequencia completa de aminoácidos corresponde a 15% do veneno bruto total de *B. jararacussu*; é formada por uma única cadeia polipeptídica, com cerca de 121 aminoácidos e sete pontes dissulfeto (Cintra *et al*., 1993; Homsi-Brandeburgo *et al*.,1988).

Considerada proteina de propriedades miotóxicas (Lomonte e Gutierrez, 1989; Homsi-Brandeburgo *et al.,* 1988), possui homologia com proteinas fosfolipásicas (Kaiser *et al.*, 1990; Van Den Bergh *et al.*, 1989; Verheij *et al.*, 1981), sendo considerada uma fosfolipase A_2 (PLA_2), de baixa atividade (Marangone *et al.*, 1984), tipo Lys49 (Arni *et al.*, 1995); dados verificados após sequenciamento dos aminoácidos e do cDNA de BthTX-I (Cintra *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1995).

A toxina BthTX-I também é capaz de bloquear a transmissão neuromuscular em preparações nervo-frênico diafragma de camundongo, induzindo paralisia por contração evocada direta e indireta (Heluany *et al*., 1992; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1995), apresentando, além da conhecida miotoxicidade, neurotoxicidade.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a prevalência de acidentes ofídicos no Brasil e no mundo, sua morbidade e mortalidade, faz-se necessário o estudo dos mecanismos de ação dos venenos e toxinas de serpentes. Sabe-se que a maioria destes compostos tem ação miotóxica. Entretanto, alguns destes, como o veneno de *B. jararacussu* e sua toxina BthTX-I, atuam sobre a junção neuromuscular, em sua porção pré-sináptica através de mecanismo ainda não elucidado, revelando uma ação também neurotóxica.

Desta forma a caracterização morfológica e funcional da junção neuromuscular torna-se uma importante ferramenta para auxiliar na compreensão do mecanismo de ação molecular de neurotoxinas pré-sinápticas.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho visa; esclarecer a ação molecular do veneno bruto de *B. jararacussu* e de sua toxina BthTX-I sobre a junção neuromuscular, especificamente sobre as vesículas sinápticas, na tentativa de descobrir se estes compostos atuam de alguma forma no arranjo das vesículas sinápticas, ou ainda nos mecanismos de exocitose e reciclagem do neurotransmissor; e, ilustrar, através de relato de caso de acidente botrópico, a importância e gravidade da entidade, e como os sintomas mionecróticos podem interferir nas manifestações neuroparalíticas.

3.1. Averiguar os efeitos do veneno bruto de *B. jararacussu* e sua toxina BthTX-I sobre a junção neuromuscular, especificamente sobre o processo de neuroexocitose na membrana pré-sináptica.

3.2. Identificar a presença ou ausência das proteínas relacionadas à junção neuromuscular, especificamente, a proteína sinaptofisina, presente na vesícula sináptica, e as proteínas sinaptobrevina (VAMP-1) e SNAP-25, constituintes do complexo SNARE presente na membrana pré-sináptica da junção neuromuscular.

3.3. Relacionar os achados aos dados miográficos, novamente obtidos, para precisa caracterização destes compostos e sua ação pré-sináptica.

3.4. Relatar caso clínico de acidente botrópico, com evolução grave, atendido e notificado no Hospital Universitário São Francisco, Bragança Paulista, referencia regional para atendimento a acidentes com animais peçonhentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos adultos machos da linhagem Swiss (CEMIB – UNICAMP), pesando entre 25 e 30g foram mantidos em gaiolas no biotério, à 25ºC, com ciclos de 12 horas de claro/escuro, e tratados com ração apropriada e água *ad libitum* até a realização dos experimentos.

Todos os experimentos estão de acordo com as normas já estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), em concordância com as regras do Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob número de protocolo 000.11.10 junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Campus da USF/Bragança Paulista **(ANEXO I).**

4.2. Preparações nervo frênico diafragma (NFD)

A experiência com o uso de amostras de hemidiafragma-nervo frênico é consolidada e largamente usada para testes relacionados à junção neuromuscular (Bulbring, 1946; Kitchen, 1984; Jones *et al*., 1999).

Os animais foram anestesiados por inalação profunda com solução de isoflurano e exsanguinados para dissecação dos hemidiafragmas (esquerdo e direito) e obtenção dos nervos frênicos correspondentes isolados.

4.3. Veneno e toxina

O veneno bruto de *B. jararacussu* e sua toxina BthTX-I foram doados pela Profa. Dra. Léa Rodrigues-Simioni do Laboratório de Junção Neuromuscular (FCM/UNICAMP).

4.4. Anticorpos utilizados

Para as reações de imunohistoquímica (IHC) e western blotting (WB) foram utilizados:

Anti-sinaptofisina produzido em coelho (Sigma Aldrich – cat. no. SAB4502906) – diluição para IHC = 1:150 e para WB = 1:1000

Anti-sinaptobrevina ou VAMP1 produzido em camundongo (Sigma Aldrich – cat. no.

S5312) – diluição para IHC = 1:300 e para WB = 1:5000

Anti-SNAP-25 produzido em cabra (Sigma-Aldrich – cat. no. SAB2500965) – diluição para IHC = 1:250 e para WB = 1:1000

Anti-GAPDH produzido em camundongo (Santa Cruz – cat. no. G-9 – SC 365062) – diluição para WB = 1:1000

Anti-coelho IgG conjugado com FITC produzido em cabra (Sigma Aldrich – cat. no. F0382) – diluição para IHC = 1:80 e HRP (cat. no. A6154) – diluição para WB = 1:1000

Anti-camundongo IgG conjugado com FITC produzido em cabra (Sigma Aldrich – cat. no. F0257) – diluição para IHC = 1:150 e HRP produzido em coelho (cat. no. A9044) – diluição para WB = 1:3000

Anti-cabra IgG conjugado com FITC produzido em coelho (Sigma Aldrich – cat. no. F7367) – diluição para IHC = 1:800 e –HRP (cat. no. A5420) – diluição para WB = 1:5000

4.5. Grupos experimentais

Foram selecionados 20 camundongos adultos machos da linhagem Swiss, totalizando 40 preparações. Destas 36 foram utilizadas, sendo divididas em 3 grupos: controle em solução Tyrode (n=12), veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (n=12) e toxina BthTX-I (n=12). Todas as preparações foram submetidas à miografia, sendo posteriormente destinadas a western blotting (n=4), imunohistoquímica (n=4) e microscopia eletrônica de transmissão (n=4).

4.6. Miografia

Após a dissecação para a retirada dos hemidiafragmas (n=36), e isolamento dos nervos frênicos correspondentes, as preparações foram colocadas em banhos contendo solução nutritiva de Tyrode (NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $MgCl_2$ 0,49; NaH_2PO_4 0,42; $NaHCO_3$ 11,9 e $C_6H_{12}O_6$ 11,1 - mM), mantidos em carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2; pH 7,5), e temperatura constante de 37°C. O músculo diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante de 5g e o nervo frênico sobreposto a um eletrodo de platina, em contato com a superfície da solução nutritiva.

A preparação foi estimulada por estimulador S48F (Grass Instruments) através do

nervo frênico indiretamente (3V, frequência de 0,1Hz com duração de 0,2ms). O registro da força de contração muscular em resposta aos estímulos supramaximais foi realizado através do transdutor isométrico Load Cell BG-10GM, acoplado a um fisiógrafo (Gould Universal Amplifer - Model RS 3400). Após 20 minutos de calibração do sistema, as contrações musculares nas condições controle (apenas solução de Tyrode, CD – n=12), bem como, nos diferentes grupos tratados (veneno bruto de *B. jararacussu*, BJ – n=12; toxina BthTX-I, Th1 – n=12) foram registradas durante 120 minutos ou até o bloqueio total.

4.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Fragmentos dos músculos (n=4) foram fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M) (pH 7.4), *overnight*. O material foi posteriormente lavado em tampão cacodilato de sódio 0,01M, 3 banhos de 10 minutos cada, em seguida pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, por 2 horas, e novamente lavado em tampão cacodilato de sódio 0,01M por 2 vezes durante 10 minutos cada, e água destilada em 3 banhos de 10 minutos cada. A contrastação em bloco foi realizada em acetato de uranila a 5%, por 1 hora. Logo após o material foi lavado, 3 banhos de 10 minutos cada, em água destilada, e desidratado inicialmente em etanol 30 e 50% (10 minutos), 70% (*overnight*), e posteriormente 3 banhos de 10 minutos em acetona 70% e 90% e 2 banhos em acetona 100%, por 30 minutos cada.

Os músculos foram embebidos em resina Epon-Araldite:acetona (1:2; 1:1; 2:1), por 1 hora, e em Epon-Araldite 100%, *overnight* em rotor, e incluídos em Epon-Araldite 100%, sendo mantidos à 60^{o}C, por 72 horas, para polimerização.

Os cortes semifinos foram coletados em lâminas de vidro e corados com Azul de Toluidina, e os cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila a 5% em tampão maleato a 0,05M, pH 5.2, e citrato de chumbo.

4.8. Imunohistoquímica (IHC)

O material biológico destinado à imunohistoquímica foi preparado para microtomia em criostato, sendo os músculos (n=4) montados sobre papel filtro com

auxílio de meio de montagem específico “OCT-Tissue Tek” e congelados em n-hexano resfriado em nitrogênio líquido.

Os criocortes (10µm) foram coletados em lâminas silanizadas, permeabilizados em etanol e metanol resfriado (-20ºC) por 10 minutos, pré-incubados em Triton X-100 (0.1%), por 15 minutos, lavados em PBS 0,05M e então incubados “overnight” em anticorpo primário + PBS/BSA 1%. As lâminas foram então lavadas (2 banhos de 15 minutos cada) para o período de incubação (2 hora) em anticorpo secundário. Os criocortes foram novamente lavados em PBS 0.05M e as lâminas montadas em gelatina glicerinada para análise ao microscópio de fluorescência.

4.9. Western Blotting (WB)

Músculos inteiros já tratados (n=4) foram congelados em nitrogênio líquido, armazenados a -80ºC, picotados e homogenados em coquetel anti-protease específico. O extrato obtido foi centrifugado (10 minutos, 3000g, a 4^{o}C), e o sobrenadante aliquotado para dosagem de proteínas pelo Método de Biureto.

Alíquotas deste “pool” de amostra, contendo 15 µg de proteína, foram aplicadas ao mini-gel de SDS-PAGE 10%. A eletroforese correu a 150V, por 110 minutos, e a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos, a 400mA, em cuba específica.

Após coloração das membranas com vermelho Ponceau (0,2% em ácido tricloroacético 0,3%), para visualização das bandas proteicas, as mesmas foram incubadas em solução de leite desnatado 5% durante 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente, para bloquear os sítios de ligação inespecíficos. As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários *overnight*.

Passado o período de incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal (6 banhos de 5 minutos cada) para posterior incubação com o anticorpo secundário-HRP, por 2 horas, à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas em solução basal e incubadas com luminol (Bio-Rad Immun-Star HRP Substrate Kit), por 3 minutos, para revelação das bandas imunoreativas e posterior quantificação utilizando-se o *software* ImageJ.

4.10. Análise estatística

Os resultados de western blotting foram representados pela média ± desvio padrão. O teste ANOVA para múltiplas comparações, seguido pelo pós-teste de Tukey, foi utilizado para avaliar a interação entre os tratamentos e a expressão de cada proteína. Já para análise pareada das medias dos resultados miograficos foi usado teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Bonferroni. Estas análises estatística foram realizadas utilizando *software* GraphPad Prism, considerando significativas as diferenças com valor de $p \leq 0,05$.

4.11. Relato de caso

O caso relatado foi atendido na Unidade de Emergência Referenciada do Hospital Universitário São Francisco, tendo sido selecionado pela peculiaridade das apresentações clínicas na admissão, bem como, na sua evolução. Os dados do paciente foram registrados e coletados com prévia autorização do Comitê de Ética Hospitalar e segue as normas do Comitê de Ética sob nº 0472.0.142.000-11 **(ANEXO II).**

5. RESULTADOS

O estudo miográfico revelou que amostras submetidas ao veneno bruto e à toxina BthTX-I apresentaram bloqueio da resposta contrátil. A **figura 3A** refere-se à amostra controle (CB), mantida em solução de Tyrode, a qual não apresentou alteração contrátil durante todo o tempo de observação (120min). Já nas amostras submetidas ao veneno total de *Bothrops jararacussu* (100µg/mL) evidencia-se bloqueio contrátil mais tardio quando comparada às amostras submetidas à toxina BthTX-I (50µg/mL) **(Figura 3B-C)**. A diferença das amplitudes dos registros miográficos é atribuída a peculiaridades de cada amostra e seus banhos, sendo os registros importantes para evidenciar e ilustrar o bloqueio contrátil.

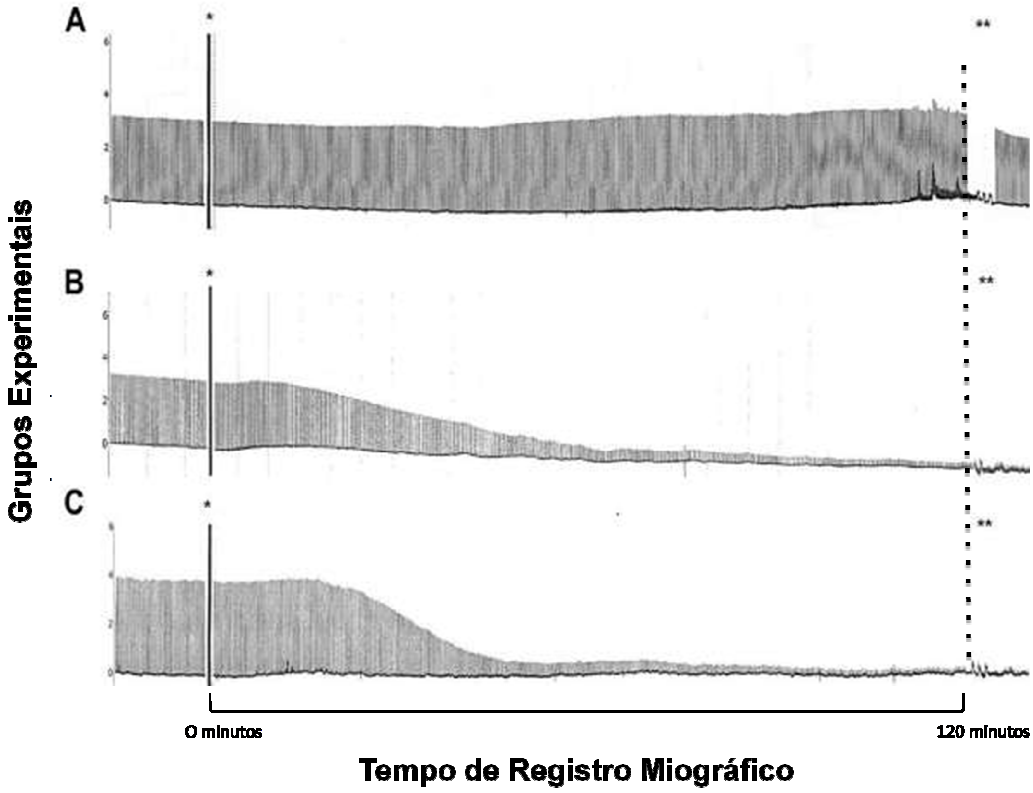

Figura 3. Registro miográfico da preparação nervo frênico diafragma (NFD) de camundongo. Controle (**A**), veneno total de *B. jararacussu* 100µg/mL (**B**) e toxina BthTX-I 50µg/mL (**C**). * adição do veneno e da toxina; ** lavagem – remoção do veneno e da toxina.

As preparações NFD incubadas com o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (100µg/mL) e com a toxina isolada BthTX-I (50µg/mL) apresentaram 50% de bloqueio da resposta contrátil após 32,88 e 13,74 minutos, respectivamente (T 50%); com tempo de bloqueio total de 86±13,4 e 30±6,3 minutos, respectivamente **(Figura 4).** A análise estatística mostra diferença significativa entre os grupos expostos ao veneno e toxina em relação ao controle ($p<0,001$); e entre o grupo veneno bruto e a toxina ($p<0,001$).

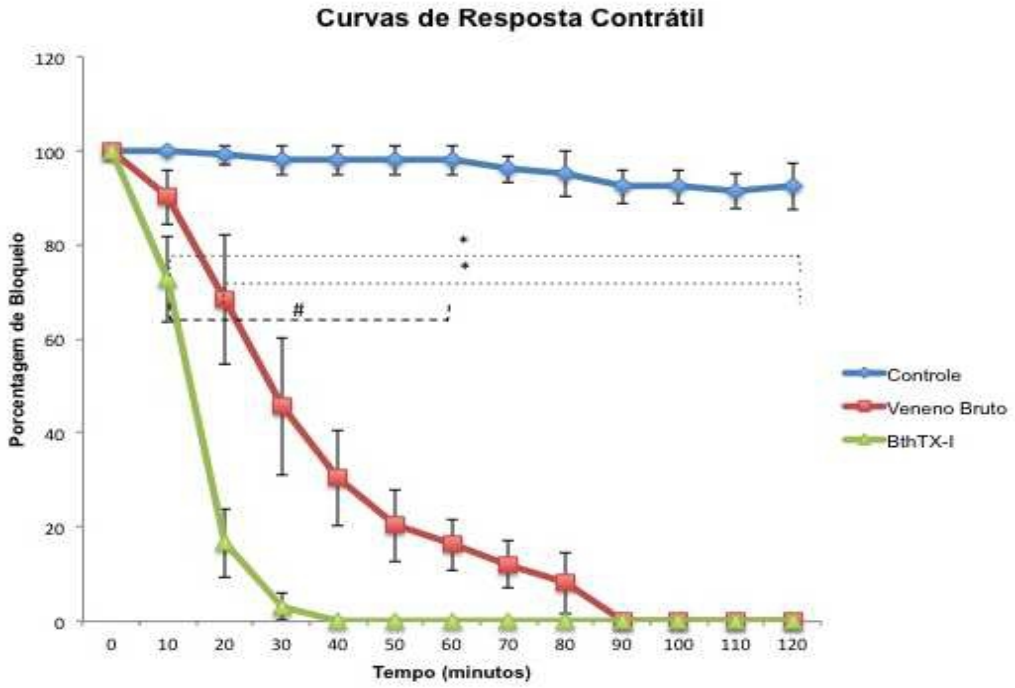

Figura 4: Curvas de resposta contrátil dos grupos controle, veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e da toxina BthTX-I. Nota-se visual diferença entre grupos expostos ao veneno e toxina em relação ao controle; diferença estatisticamente significante entre o grupo controle e os tratamentos (*$p<0,001$); e entre os grupos veneno bruto e toxina BthTX-I (#$p<0,001$).

À coloração de hematoxilina-eosina (HE) as fibras musculares nos animais do grupo controle apresentaram morfologia alongada (em corte longitudinal), com sarcoplasma com miofilamentos contínuos e núcleos periféricos (*), e ausência de

edema celular ou muscular. Nenhum dano estrutural foi observado. Enquanto nos músculos das preparações NFD tratadas com o veneno de *B. jararacussu* e com a toxina BthTX-I, observou-se a hipercontração dos miofilamentos, evidenciando lesões na membrana plasmástica; perda da continuidade das fibras e edema celular (seta), lesões do tipo delta, até a perda completa dos miofilamentos – "ghost fibers" **(Figura 5)**.

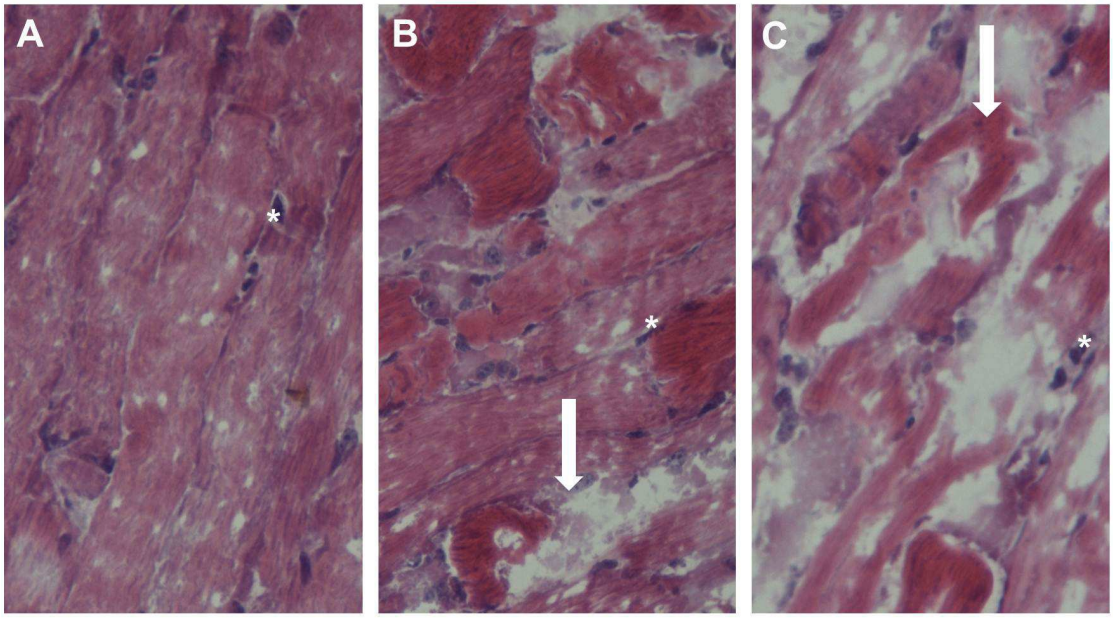

Figura 5. Cortes histológicos dos músculos diafragma de camundongos mantidos em Tyrode (**A** – controle) e tratados com o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (**B** - 100µg/mL) e sua toxina BthTX-I (**C** - 50µg/mL). Note o padrão alongado, sarcoplasma homogêneo e núcleo periférico (*) das fibras do grupo controle (**A**). Observe a perda deste perfil morfológico nos grupos tratados (**B**-**C**) e consequente hipercontração e ausência de miofilamentos (seta). Aumento 400X.

Quando submetidos aos anticorpos primários anti-sinaptofisina (localização restrita à vesícula sináptica), anti-sinaptobrevina (localização na vesícula sináptica) e anti-SNAP-25 (localização restrita à membrana pré-sináptica) apenas os cortes histológicos do músculo diafragma controle (**A-C**) apresentaram imunomarcação positiva (FITC - seta). Os cortes histológicos sob a ação do veneno de *B. jararacussu* (**D**-**F**) e da toxina BthTX-I (**G**-**I**) não apresentaram imunomarcação **(Figura 6)**.

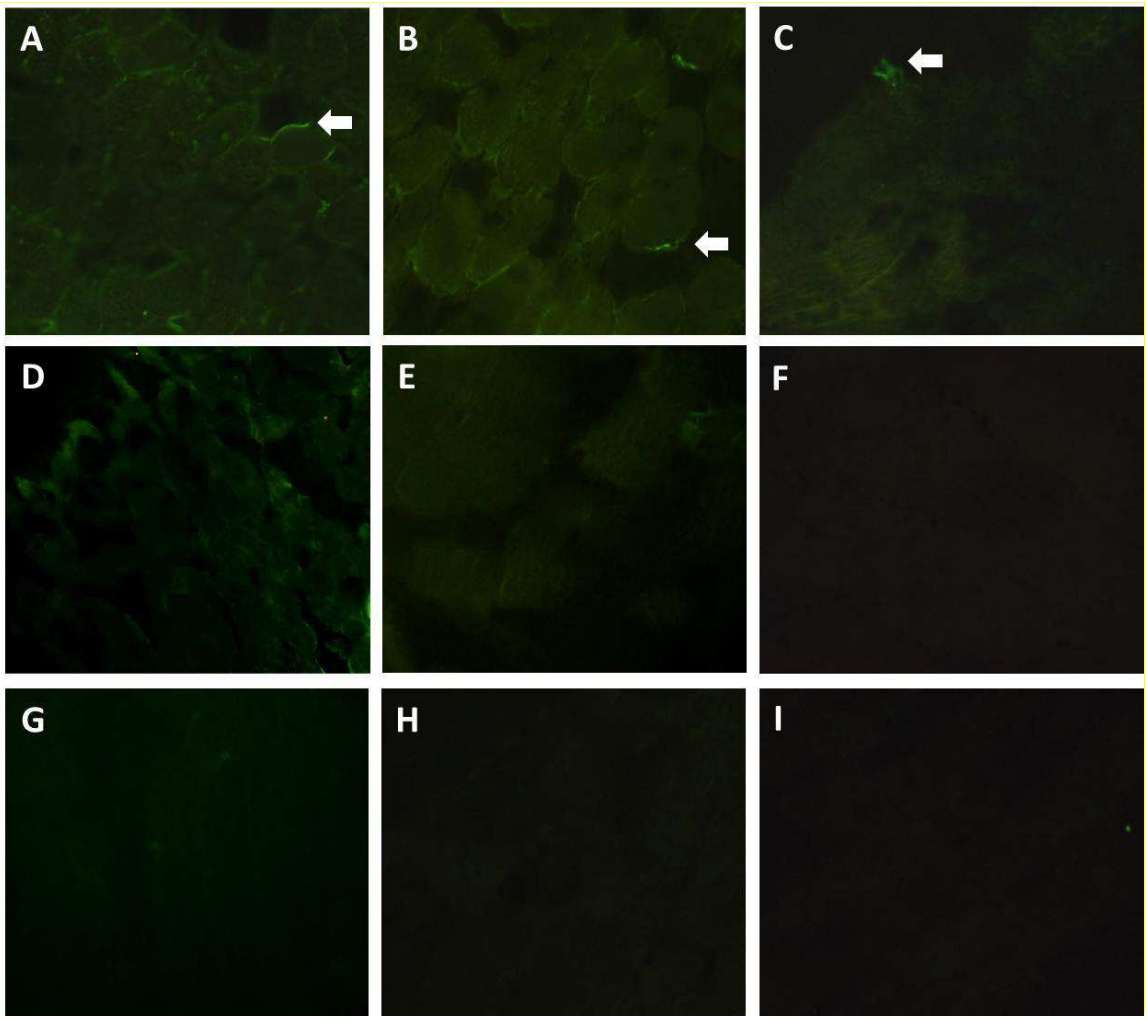

Figura 6. Cortes histológicos das preparações NFD controle (Tyrode – **A**, **B**, **C**), submetidas à ação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (**D**, **E**, **F**) ou de sua toxina BthTX-I (**G**, **H**, **I**). Notar a imunomarcação positiva (fluorocromo FITC) evidenciando a presença das proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25 (seta). A, D, F: 200x; B, C, E, G, H, I: 400x.

Em todos os experimentos realizados apenas as amostras dos grupos controle (NFD) apresentaram imuno-expressão positiva para as proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25, evidenciando de forma indireta a presença de vesículas sinápticas intactas, bem como parte da "maquinaria proteica" para a exocitose do neurotransmissor. Tais resultados também foram visualizados e quantificados por western blotting **(Figura 7)**.

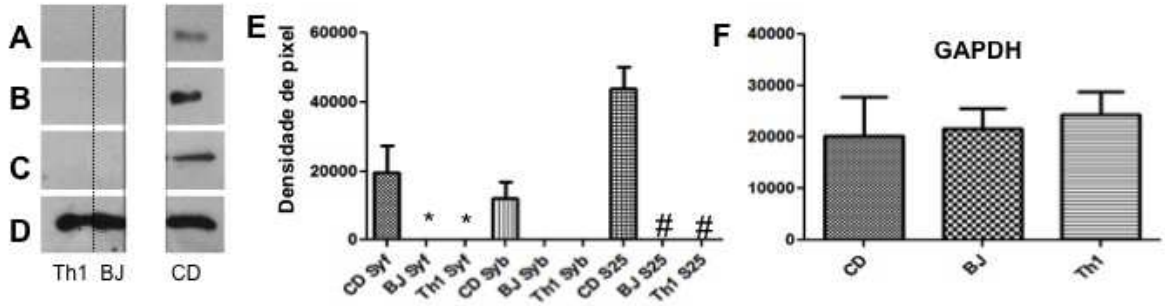

Figura 7. Representação dos resultados de western blotting (WB) para as proteínas sinaptofisina (**A**), sinaptobrevina (**B**) e SNAP-25 (**C**), e para a proteína constitutiva GAPDH (**D**). Os gráficos (**E-F**) correspondem a análise quantitativa do WB, por medida de densidade de pixel de cada proteína: sinaptofisina (**Syf**), sinaptobrevina (**Syb**) e SNAP-25 (**S25**). Há diferença significativa entre as proteínas da junção neuromuscular nos grupos tratados (**BJ**; **Th1**) com o grupo controle (**CD**); * $p<0,05$ e # $p<0,001$. Não há diferença significativa entre os tratamentos para a proteína GAPDH.

Quando analisados ultraestruturalmente os músculos diafragma dos animais controle apresentaram fibras musculares com morfologia hexagonal (em corte transversal) ou alongada (em corte longitudinal), como visto ao HE, com sarcolema íntegro, sarcoplasma dotado de sarcômeros com miofilamentos de actina e miosina contínuos, mitocôndrias e retículos sarcoplasmáticos inalterados e núcleos periféricos (*) **(Figura 8A-B)**. Nenhuma alteração morfológica foi observada nas Células de Schwann, bem como no processo de mielinização das fibras nervosas **(Figura 8C)**. Já as fibras musculares tratadas com o veneno de *Bothrops jararacussu* **(Figura 8D-F)** e com a toxina BthTX-I **(Figura 9A-D)** apresentaram edema celular, hipercontração dos miofilamentos com perda da organização dos sarcômeros, mitocôndrias e retículo sarcoplasmático edemaciados, além de danos às Células de Schwann e falhas na disposição da bainha de mielina.

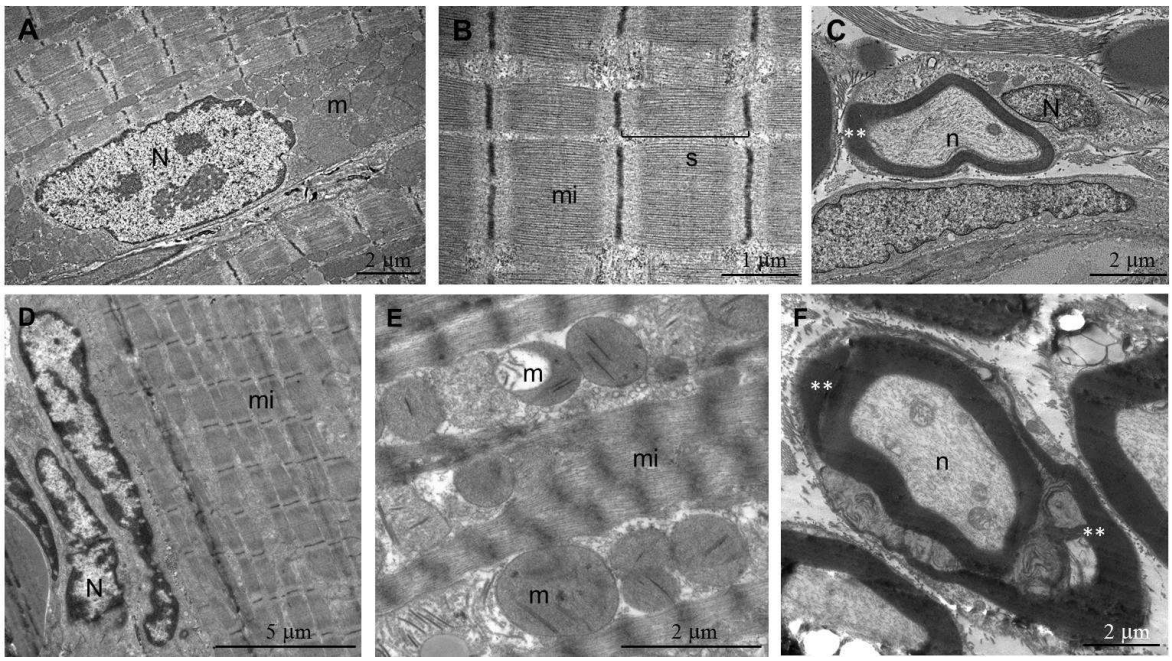

Figura 8. As imagens **A, B** e **C** mostram os aspectos ultraestruturais da musculatura do grupo controle (NFD). **A** - Fibra muscular com núcleo periférico (N) e mitocôndrias (m) evidentes; **B** - Detalhe da fibra muscular evidenciado os sarcômeros (s) e os miofilamentos (mi). **C** - Célula de Schwann com bainha de mielina (**), neurofilamentos (n) e núcleo (N); já as imagens **D, E** e **F** evidenciam aspectos ultraestruturais da preparação NFD submetida à ação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Notar em **E** a hipercontração dos miofilamentos (mi) e em **F** a morfologia da Célula de Schwann, com alterações na mielinização. m = mitocondria; N = núcleo; n = neurofilamentos; ** = bainha de mielina.

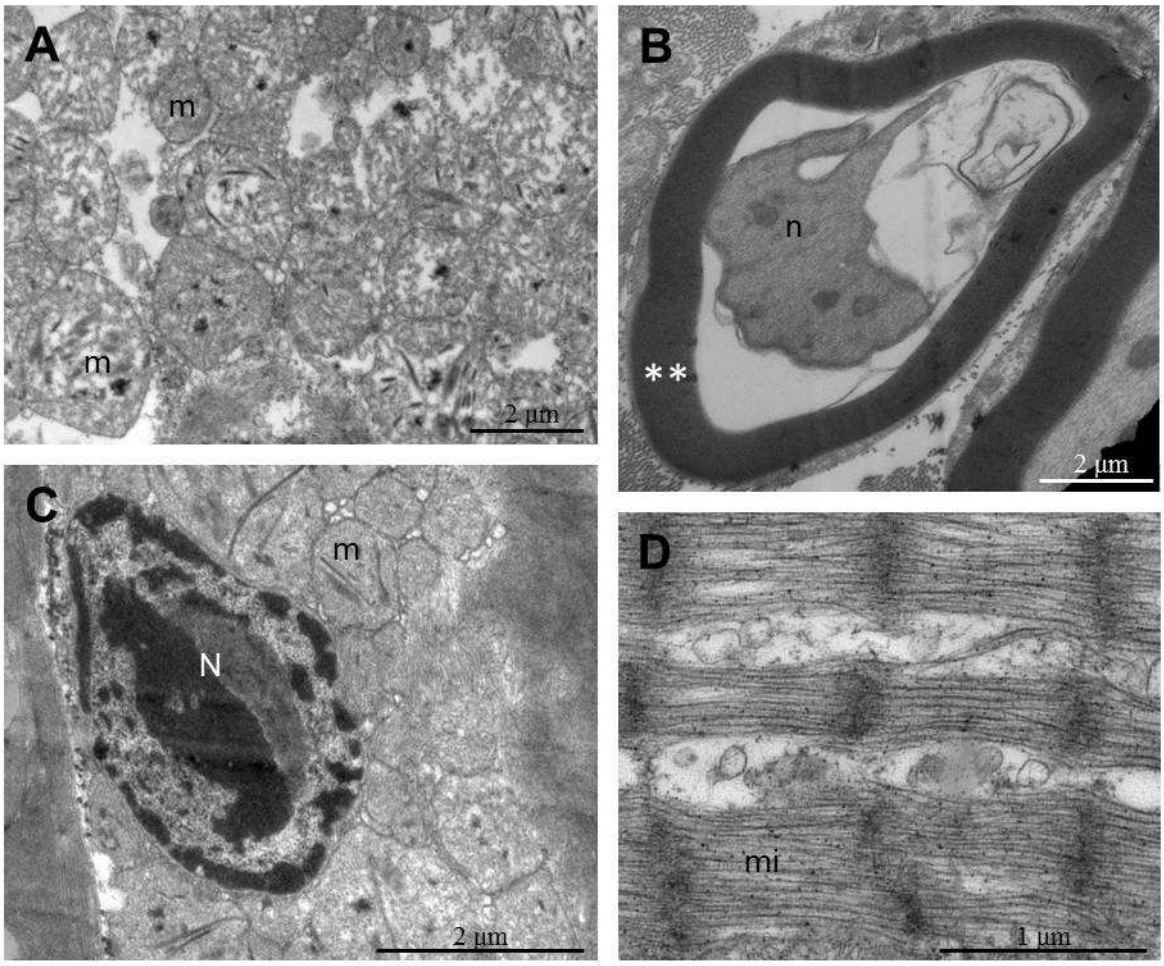

Figura 9. Aspectos ultraestruturais da preparação NFD submetida à ação da toxina BthTX-I isolada do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Notar em **A** as mitocondrias (m) edemaciadas, em **B** a morfologia da Célula de Schwann com alterações na mielinização (**) e distribuição dos neurofilamentos (n), em **C** núcleo (n) apoptótico e em **D** a hipercontração dos miofilamentos (mi). N = núcleo; n = neurofilamentos; ** = bainha de mielina.

Considerando a junção neuromuscular (JNM) no grupo controle também não foram observadas alterações em relação às membranas pré e pós-sinápticas, às organelas no axolema, neurofilamentos ou vesículas sinápticas **(Figura 10A)**. Tanto as junções neuromusculares (JNMs) nos músculos tratados com o veneno de *Bothrops jararacussu* (dados não mostrados), como as JNMs nos músculos tratados com a toxina BthTX-I apresentaram diminuição na concentração de vesículas sinápticas, bem como

alterações mitocondriais e danos na membrana pré-sináptica. Entretanto não foram observadas alterações à membrana pós-sináptica **(Figura 10B)**.

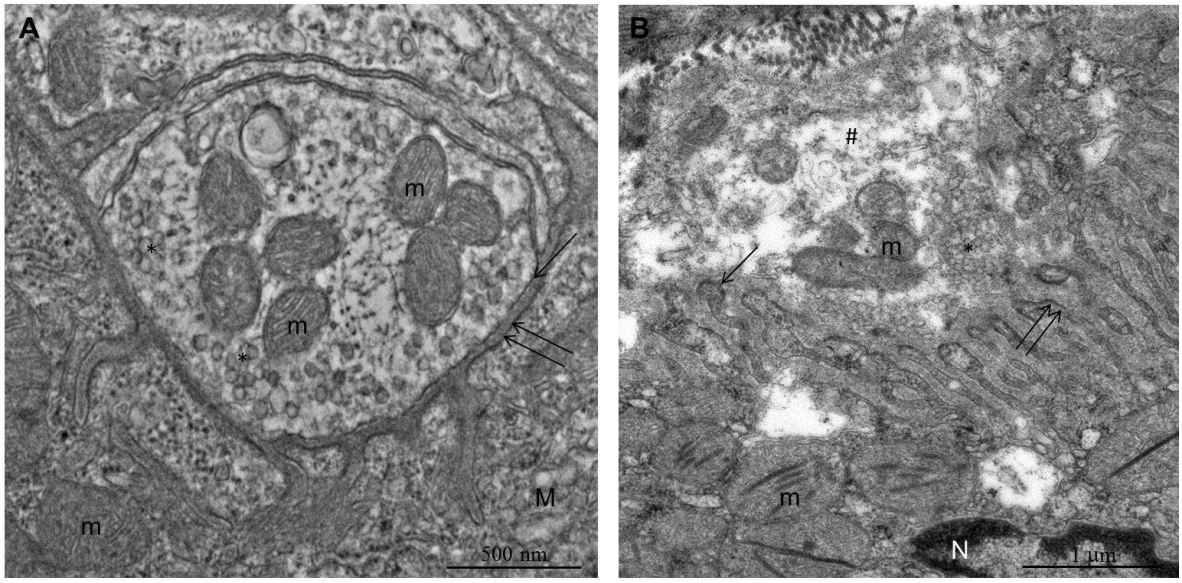

Figura 10. A **Figura 10A** revela a ultraestrutura da junção neuromuscular (JNM) do músculo diafragma (controle). m = mitocôndria; M = fibra muscular; seta = membrana pré-sináptica; dupla seta = membrana pós-sináptica; * = vesícula sináptica; já a **Figura 10B**, revela os aspectos ultraestruturais da junção neuromuscular (JNM) da preparação NFD submetida à ação da toxina BthTX-I isolada o veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Notar a diminuição (#) da concentração de vesículas sinápticas (*) no botão nervoso. m= mitocondria; M = fibra muscular; N = núcleo; dupla seta = membrana pós-sináptica; * = vesícula sináptica. A seta indica a possível localização da membrana pré-sináptica, não visível.

Relato de caso: acidente botrópico no HUSF em Bragança Paulista

O atendimento do paciente do caso relatado foi realizado conforme Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA, 2001), sendo realizada a identificação do gênero do animal causador e a classificação da gravidade para o correto e precoce emprego da soroterapia.

Paciente do sexo masculino, 59 anos, branco, casado, procedente de Piracaia deu entrada no pronto socorro do Hospital Universitário São Francisco (HUSF),

localizado em Bragança Paulista – SP, encaminhado do serviço de origem como acidente crotálico. Na admissão após reavaliar quadro, apesar de sintomatologia atípica (fraqueza muscular e prostração e taquidispneia), paciente apresentava exuberante clínica em local da picada, clínica compatível história de acidente botrópico. O acidente ocorrera há 6 horas em membro inferior direito em região tibial anterior. Referia dor de forte intensidade no local, acompanhada de edema, gengivorragia, uretrorragia, taquidispnéia, tetraparesia flácida; sem ptosis pronunciada ou relatada em exame na admissão.

Figura 11. Evolução do caso. **A:** Sangramento em cavidade oral; **B:** Membro com edema, aspecto típico da Síndrome Compartimental; **C e D:** Momento da realização da fasciotomia; **E:** Aspecto em pós operatório imediato; **F:** Aspecto após fechamento completo da fasciotomia.

Ao exame apresentava-se em regular estado geral, hidratado, corado, anictérico, acianótico, taquidispneico, afebril, orientado no tempo e no espaço, pressão arterial:

170 X 100 mmHg (< 130 x 85 mmHg), freqüência cardíaca de 94 bpm (60 a 95 bpm). Exame pulmonar, cardíaco e abdominal sem alterações. O membro inferior direito estava edemaciado 4+/4+ com dor importante a movimentação passiva, empastado e com diminuição dos pulsos pedioso e tibial posterior; o sinal de Homans era positvo e da Bandeira negativo; exame neurológico notava-se discreta perda de força simétrica nos 4 membros (tetraparesia flácida).

A hipótese diagnóstica inicial foi acidente botrópico grave, associado à síndrome compartimental. Desta forma, foi realizada analgesia, antibioticoterapia (clindamicina e gentamicina), vacina anti-tetância, soro antibotrópico e avaliação da cirurgia vascular.

Exames laboratoriais foram solicitados e evidenciaram os seguintes resultados: hemoglobina 12,3 g/dl; hematócrito 36,2 %; leucócitos 19100 (VR <12000) sem desvio; plaquetas 68000 (VR >150.000 <400.000); TTPA 1,29 (VR 24-45 segundos; relação <1,5); TP 2,29 (VR 10 a 14 segundos, TP<1,4); potássio 3,18 mEq/l (valores normais 3,5-5,5); CPK 247,40 (valores normais 60-190). Os demais exames estavam normais.

A partir da avaliação da cirurgia vascular e do USG Doppler das artérias periféricas que mostrou som bifásico (compressão arterial), foi indicada fasciotomia descompressiva de urgência do membro inferior direito (lateral/ medial).

Paciente evoluiu com normalização do tempo da coagulação após 24 horas, porém apresentou plaquetopenia durante período de internação.

Durante a internação, paciente evoluiu de forma estável, mas com limitação a movimentação ativa e passiva. No sétimo dia de internação hospitalar paciente foi submetido à limpeza, desbridamento de tecido necrótico em face lateral de membro inferior direito, aproximação de pele em face lateral e fechamento da fasciotomia medial.

Paciente teve alta com 18 dias de internação com melhora e posteriormente foi realizado enxerto autólogo retirado da região anterior da coxa direita em face lateral de membro inferior direito; evoluindo de forma favorável com reversão dos sintomas.

6. DISCUSSÃO

A estrutura da junção neuromuscular, constituída por um terminal pré-sináptico dotado de vesículas sinápticas contendo neurotransmissor (ACh), membrana pré-sináptica, uma fenda sináptica e um aparato de recepção pós-sináptico (membrana pós-sináptica) (Garner *et al.*, 2000; Murthy e De Camilli, 2003), pode sofrer alterações estruturais que influenciam nos efeitos neurotóxicos e miotóxicos de venenos e outros compostos (Rodrigues-Simioni *et al*, 1983)

A experimentação miográfica, em preparações nervo-frênico diafragma de camunsongo e *biventer cervicis* de pintainho, realizada para diversos venenos e toxinas, como: *Bothrops marajoensis* (Cavalcante *et al.*, 2011), Bmaj-9 (Galbiatti *et al.*, 2007; 2012), BmjeTX-I e BmjeTX-II (Ponce-Soto *et al.*, 2010); *Bothrops. moojeni* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1990), *Bothrops insularis* (Cogo *et al.*, 1993; 1998), *Bothrops lanceolatus* (Lôbo-Araújo *et al.*, 2002), *Bothrops neuwiedi* (Borja-Oliveira *et al.*, 2003; Zamunér *et al.*, 1996), *Bothrops pirajai* (Costa *et al.*, 1999) e *Bothrops leucurus* (Prianti *et al.*, 2003), confirma seus efeitos neurotóxicos.

O veneno de *B. jararacussu* e sua toxina BthTX-I apresentam ação pré-sináptica, como também relatado por outros autores (Gallacci *et al.*, 2006; Heluany *et al.*, 1992; Homsi-Brandeburgo *et al.*, 1988; Oshima-Franco *et al.*, 2004; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; 1995; Rostelato-Ferreira *et al.*, 2010).

Estudos de eletrofisiologia comprovam que a inibição inicial da liberação de ACh nas preparações tratadas com baixas concentrações de BthTX-I se dá através da diminuição da frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura, com aumento do conteúdo quantal, mas sem alteração no potencial de repouso da membrana (Oshima-Franco *et al.,* 2004).

Como observado no presente estudo o veneno de *B. jararacussu* e a toxina BthTX-I, alteram a ultraestrutura das mitocôndrias no axolema, gerando edema ou perda das cristas mitocondriais, reduzem o número de vesículas sinápticas e alteram a mielinização produzida pelas Células de Schwann.

As demais alterações histológicas observadas nos músculos diafragma, nas preparações NFD, após experimentação com o veneno bruto de *B. jararacussu* e sua

toxina BthTX-I, respectivamente, como edema celular, hipercontração de miofilamentos e dos sarcômeros, e dano às mitocôndrias e retículo sarcoplasmático confirmam os efeitos mionecróticos do envenenamento botrópico (Pellegrini e Brazil, 1976), bem como outros resultados já publicados em experimentação animal (Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Barbosa *et al*, 2003; Homsi-Brandeburgo *et al.*, 1988; Neto e Marques, 2005; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Selistre *et al.*, 1990), levando as fibras musculares à necrose (De Roodt *et al.*, 2003; Gay *et al.*, 2005; Maruñak *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1992).

O caso clínico relatado ilustra a agressividade dos efeitos proteolíticos e mionecróticos dos venenos botrópicos, sendo a dor e o edema resultados dos efeitos inflamatórios secundários à mionecrose, levando à complições graves como a síndrome compartimental no membro afetado, com risco até de perda do membro. A exuberância dos efeitos mionecróticos neste acidente por *B. jararacussu*, sobrepõe-se aos efeitos neuroparalíticos, tornando seus sintomas de caráter subclínico.

Considerando o processo de exocitose sabe-se que há uma série de proteínas essenciais para a liberação do neurotransmissor (Takamori *et al*, 2006), como a sinaptofisina (glicoproteína de membrana encontrada na vesícula sináptica, relacionada à integridade das vesículas), e as proteínas SNARE: sinaptobrevina (VAMP), sintaxina 1 e SNAP-25 (SNAP-25 e sintaxina presentes na membrana pré-sináptica e sinaptobrevina presente na membrana das vesículas) (Dumitru e Amato, 2008).

Os resultados de imunohistoquímica e western blotting mostraram-se positivos para as preparações NFD dos grupos controle, evidenciando a integridade das vesículas sinápticas, pela presença de sinaptofisina e sinaptobrevina e do aparato ancorador da membrana pré-sináptica, pela presença de SNAP-25.

Já as preparações NFD tratadas com o veneno de *B. jararacussu* e sua toxina BthTX-I não apresentaram marcação para as proteínas estruturais da vesícula, sinaptofisina e sinaptobrevina, nem tão pouco da proteína ancoradoura SNAP-25, evidenciando a possível perda da integridade das vesículas sinápticas ainda no terminal sináptico e não na fenda sináptica.

Dados da literatura afirmam que venenos e neurotoxinas induzem a hidrólise de fosfolipídios da superfície do neurônio inibindo a liberação dos neurotransmissores

(Howard e Wu, 1976; Rigoni *et al*., 2005). Entretanto, o que foi observado neste trabalho assemelha-se ao descrito para a toxina botulínica, que internaliza na vesícula sináptica e atua diretamente sobre as proteínas sinaptopbrevina, SNAP-25 e sintaxina (inseridas na membrana pré-sináptica) clivando-as e impedindo a liberação do neurotransmissor da vesícula sináptica (Rossetto *et al*, 2006). No presente estudo a ação é limitada à vesícula sináptica, sem prejuízo ao complexo t-SNARE. Tais permitiram o maior entendimento do mecanismo de ação destes venenos e toxinas e confirma, estruturalmente e molecularmente, os efeitos neurotóxicos observado farmacologicamente.

O bloqueio da junção neuromuscular observado é resultado da não eliminação dos neurotransmissores na fenda sináptica (Kini, 1997; Montecucco e Rosseto, 2000; Schiavo *et al.*, 2000) uma vez que estes compostos atuam sobre a vesícula sináptica, de alguma forma sobre as proteínas estruturais sinaptofisina e sinaptobrevina, impedindo sua ancoragem à membrana pré-sináptica ou induzindo sua não formação ou ruptura no interior do terminal nervoso.

O caso clínico relatado, típico da apresentação clínica dos acidentes botrópicos, ilustra uma das complicações mais graves da entidade, a síndrome compartimental, que pode evoluir com perda de massa muscular, neuropatia e amputação do membro afetado (Bucaretchi *et al.,* 2010; FUNASA, 2001). Ocorre pela compressão do feixe vásculo-nervoso em conseqüência ao edema que afeta o membro acometido, evoluindo com isquemia das extremidades.

Clinicamente se manifesta por intensa dor agravada por qualquer movimento de distensão muscular, parestesia, diminuição da temperatura do segmento distal, cianose e déficit motor (FUNASA, 2001; Luciano *et al.,* 2009).

Em Bragança Paulista, local de ocorrência do caso relatado, no mesmo período foram relatados 255 casos de acidentes ofídicos, sendo 57% dos acidentes causados pelo gênero *Bothrops*. A taxa de letalidade permanece em torno de 0,35 a 0,45% e sequelas 1,2% de todos os acidentes. O observado no município de Bragança Paulista corrobora com o descrito por Bochner e Struchener (2003) e SINAN/MS, ressaltando a importância médico-epidemiologica dos acidentes ofídicos no Brasil.

7. CONCLUSÕES

Tais resultados nos levam a concluir que a ação neurotóxica pré-sináptica do veneno de *B. jararacussu* e da toxina BthTX-I é resultante também da perda das vesículas sinápticas antes mesmo de sua ancoragem na membrana do neurônio para exocitose do neurotransmissor, dada a visível diminuição na densidade destas vesículas no botão nervoso e da perda das proteínas sinaptofisina, sinaptobrevina e SNAP-25, levando ao bloqueio da resposta contrátil, evidenciado pela miografia. Além disso, alterações na ultraestrutura da Célula de Schwann, bem como no processo de mielinização, podem ser uma um indício de danos à estrutura do nervo em paralelo a alterações às fibras musculares, num efeito pós-sináptico independente do efeito neurotóxico observado.

Como demonstrado na literatura, o efeito do veneno e de neurotoxinas sobre o axolema precede o efeito sobre o sarcolema, mas como apresentado no caso clínico, a intensidade do efeito mionecrótico, principalmente, quando submetido somente à toxina, é suficiente para tornar, *in vivo*, o efeito neuroparalítico subclínico.

8. Referências Bibliográficas

ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação SINAN – WEB (Acesso em 10 de Agosto de 2013 e Outubro de 2013. Disponível no site: http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinan/animaisp/bases/animaisbr.def
.

Andrião-Escarso, S. H.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M.; Ângulo, Y.; Díaz, C.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M.; Giglio, J. R. Myotoxic phospholipases A(2) in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie** 82:755-763, 2000.

Araújo, F. A. A.; Santalúcia, M.; Cabral, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier**, 2003.

Arni, R. K.; Ward, R. J.; Cintra, A. C. O.; Giglio, J. R. Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon** 33:383-386, 1995.

Barbosa, A. M.; Do Amaral, R. O.; Teixeira, C. F.; Hyslop, S.; Cogo, J. C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** 42:515-523, 2003.

Beghini, D. G.; Da Cruz-Holfing, M. A.; Randazzo-Moura, P.; Rodrigues-Simioni, L.; Ovello, J. C.; Hyslop, S.; Marangoni, S. Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon** 46:604-611, 2005.

Bérnils, R. S. Brazilian reptiles – List of species. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2010 (Acesso em: 21 jun. 2013. Disponível em (http://www. sbherpetologia.org.br).

Bochner, R.; Struchiner, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública** 19:7-16, 2003

Borja-Oliveira, C. R.; Durigon, A. M.; Vallin, A. C. C.; Toyama, M. H.; Souccar, C.; Marangoni, S.; Rodrigues-Simioni, L. The pharmacological effects of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 36:617-624, 2003.

BRASIL. Guia de vigilância epidemiológica. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

Brazil, V. Serumtherapia antiophidica. **Rev. Med. S. Paulo**. 12, 293-307, 1909.

Brazil, V. La defense contre lóphidism. **Pocai & Weiss: São Paulo**, 1911.

Brazil, O.V. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan.** 51, 211-223, 1966.

Bucaretchi, F.; Capitani, E. M.; Hyslop, S.; Mello, S. M.; Madureira, P. R.; Zanardi, V.; Ferreira, D. M.; Meirelles, G. V.; Fernandes, L. C. R. Compartment syndrome after *Bothrops jararaca* snakebite: monitoring, treatment, and outcome. **Clinical Toxicology**; 48: 57-60, 2010.

Bulbring, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.** 1: 38–61, 1946.

Cardoso, J. L.; França, F. O.; Fan, H. W.; Malaque, C. M.; Haddad Jr, V. **Animais Peçnhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo:Savier/FAPESP; 2009.

Cardoso, J. L. C.; Brando, R. B. Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento. **São Paulo: Livraria e Editora Santos**, 1982.

Cavalcante, W. L.; Hernandez-Oliveira, S.; Galbiatti, C.; Randazzo-Moura, P.; Rocha, T.; Ponce-Soto, L.; Marangoni, S.; Pai-Silva, M. D.; Gallacci, M.; Da Cruz-Höfling, M. A.; Rodrigues-Simioni, L. Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom.

J. Venom Res. 2:37-41, 2011.

Cintra, A. C. O.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Giglio, J. R. Bothropstoxin I: amino acid sequence and function. **J. Prot. Chem.** 12:57-64, 1993.

Cogo, J. C.; Prado-Franceschi, J.; Cruz-Höfling, M. A.; Corrado, A. P.; Rodrigues-Simioni, L. Effects of *Bothrops insularis* on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon** 31:1237-1247, 1993.

Cogo, J. C.; Prado-Franceschi, J.; Giglio, J. R.; Corrado, A. P.; Cruz-Höfling, M. A.; Donato, J. L.; Leite, G. B.; Rodrigues-Simioni, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A_2 fraction. **Toxicon** 36:1323-1332, 1998.

Costa, P. D.; Toyama, M. H.; Marangoni, S.; Rodrigues-Simioni, L.; Da Cruz-Höfling, M. A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon** 37:1143-1153, 1999.

De Roodt, A. R.; Litwin, S.; Vidal, J. C. Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. **Toxicon** 41:949–958, 2003.

Dumitru D.; Amato, A. A. Neuromuscular Junction Disorders. In: Amato, A.A.; Amato, A.; Russell, **J. Neuromuscular Disorders**, p832, 2008.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

Galbiatti, C; Leite, C. G.; Ponce-Soto, L.; Marangoni, S.; Bonfim, V. L.; Rocha, T.; Cruz-Höfling, M. A.; Rodrigues-Simioni, L. Biological characterization of the Bmaj-p toxin from *Bothrops marajoensis* venom. **Anais do 39o Congresso Brasileiro de Farmacologoa e Terapêutica Experimental.** Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2007.

Galbiatti, C.; Rocha, T.; Randazzo-Moura, P.; Ponce-Soto, L. A.; Marangoni, S.; Cruz-Höfling, M. A.; Rodrigues-Simioni, L. Pharmacological and partial biochemical characterization of Bmaj-9 isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. **JVAT**

18:62-72, 2012.

Gallacci, M.; Oliveira, M.; Dal Pai-Silva, M.; Cavalcante, W. L.; Spencer, P.J. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Exp. Toxicol. Pathol.** 57:239-245, 2006.

Garner, C. C.; Kindler, S.; Gundelfinger, E. D. Molecular determinants of presynaptic active zones. **Curr. Opin. Neurobiol.** 10: 321-327, 2000.

Gay, C. C.; Leiva, L. C.; Maruñak, S.; Teibler, P.; Acosta de Pérez, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon** 46:546-554, 2005.

Gold, B. S.; Dart, R. C.; Barish, R. A. Bites of venomeus snakes. **N. Engl. J. Med.** 347:347-356, 2002.

Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan.** 51: 211-223, 1989.

Havt, A.; Fonteles, M. C.; Monteiro, H. S. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA2 and PAF blockers. **Toxicon** 12:1841-1846, 2001.

Heluany, N. F.; Homsi-Brandeburgo, M. I.; Giglio, J. R.; Prado-Franceschi, J.; Rodrigues-Simioni, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon** 30:1203-1210, 1992.

Hoge, A. R.; Romano, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem. Inst. Butantan** 36:109-207, 1972.

Hoge, A. R.; Romano-Hoge, S. A. R. W. L. Poisonous snakes of the world. Part I. Checklist of the pit vipers, *Viperoidea, Viperidae, Crotalinae*. **Mem. Inst. Butantan** 42/43:179-309, 1978.

Homsi-Bradenburgo, M. I.; Queiroz, L. S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Giglio, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** 26:626-627, 1988.

Howard, B. D.; Wu, W. C. Evidence that beta-bungarotoxin acts at the exterior of nerve terminals. **Brain Res.** 103:190–192, 1976.

Jia, L. G.; Shimokawa, K. I.; Bjamson, J. B.; Fox, J. W. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon** 34:1269-1276, 1996.

Jones, R. G. A.; Lee, L.; Landon, J. The effects of specific antibody fragments on the 'irreversible' neurotoxicity induced by Brown snake (Pseudonaja) venom. **Br. J. Pharmacol.** 126, 581-584, 1999.

Kaiser, I.; Gutiérrez, J. M.; Plummer, D.; Aird, S. D.; Odell, G. V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.** 278, 319-325, 1990.

Kasturiratne, A.; Wickremasinghe, A. R.; De Silva, N.; Gunawardena, N. K.; Pathmeswaran, A.; Premaratna, R.; Savioli, L.; Lalloo, D. G.; De Silva, H. J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.** 5:e218, 2008.

Kini, R. M. Venom Phospholipase A2 Enzymes. John Wiley & Sons, Chichester. Kularatne, S. A. 2002. Common krait (*Bungarus caeruleus*) bite in Anuradhapura Sri Lanka. A prospective clinical study, 1996–98. **Postgrad. Med. J.** 78:276–280, 1997.

Kitchen, I. Neuromuscular blocking drugs and the rat phrenic nerve hemidiaphragm preparation, **In: Textbook of In Vitro Pharmacology, Blackwell, Oxford**, p.7983, 1984.

Lôbo de Araújo, A.; Donato, J. L.; Leite, G. B.; Prado-Franceschi, J.; Fontana, M. D.; Bon, C.; Rodrigues-Simioni, L. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. **Toxicon** 40:1283-1289, 2002.

Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon** 27:725-733, 1989.

Luciano, P. M.; Silva, G. E. B.; Azevedo-Marques, M. M. Acidente botrópico fatal. **Medicina** (Ribeirão Preto); 42:61-65, 2009.

Machado, A. S.; Barbosa, F. B.; Mello Gda, S.; Pardal, P. P. Hemorrhagic stroke related to snakebite by bothrops genus: a case report. **Rev Soc Bras Med Trop** 43:602-4. 2010.

Martins, M. *Bothrops jararacussu*. In: IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. 2010.

Maruñak, S. L.; Acosta de Pérez, O.; Ruíz de Torrent, R. M.; Teibler, G. P.; Koscinczuk, P.; Sánchez Negrette, M. Actividades hemorrágica, edematizante, proteolítica y mionecrótica de venenos de *Bothrops alternatus* (víbora de la Cruz). **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.** 49:149–154, 1999.

Marangone, J. M.; Merutka, G.; Cho, W.; Welches, W.; Kezdy, F. J.; Heinrikson, R. L. A new class of phospolipases A2 with lysine in place of aspartate 49. **J. Biol. Chem.** 259:13.839-13.843, 1984.

Martínez-Vargas, A. Z. Quimica y Farmacologia del Veneno de Serpientes (I parte). **Revista de Química**. 4:,1990.

Melgarejo, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Cardoso et al. (Orgs.). São Paulo**: Sarvier: p.33-61, 2003.

Montecucco, C.; Rossetto, O. How do presynaptic PLA_2 neurotoxins block nerve terminals? Trends Biochem**. Sci.** 25:266–270, 2000.

Murthy, N. V.; De Camilli, P. Cell Biology of the Presynaptic Terminal. **Ann. Rev. Neurosc.** 26:701-728, 2003.

Neto, H. S.; Marques, M. J. Microvessel damage by *B. jararacussu* snake venom: pathogenesis and influence on muscle regeneration.**Toxicon** 46:814-819. 2005.

Oshima-Franco, Y.; Leite, G. B.; Silva, G. H.; Cardoso, D. F.; Hyslop, S.; Giglio, J. R.; Da Cruz-Holfing, M. A.; Rodrigues-Simioni, L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon** 39:1477-1485, 2001.

Oshima-Franco, Y.; Leite, G. B.; Belo, C. A.; Hyslop, S.; Prado-Fraceschi, J.; Cintra, A. C.; Giglio, J. R.; Cruz-Holfing, M. A.; Rodrigues-Simioni, L. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 95:175–182, 2004.

Pellegrini Filho, A.; Brazil, V. O. Origem da paralisia respiratória causada pela peçonha de Micrurus frontalis. **Ciênc. Cultura** 28:199, 1976.

Pinho, F. M. O.; Pereira, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 47:24-29, 2001.

Pinho, F. M.; Burdmann, E. A. Fatal cerebral hemorrhage and acute renal failure after Young Bothrops jararacussu snake bite. **Ren. Fail** 23:269-77, 2001.

Ponce-Soto, L. A.; Gutiérrez, J. M.; Marangoni, S.; Lomonte, B. Systemic and local myotocity induced by snake benom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon** 51:80-92, 2008.

Ponce-Soto, L. A.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S. Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the new basic PLA_2 isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) snake venom. **Protein J.** 29:103-113, 2010.

Prianti Jr., A. C.; Ribeiro, W.; Lopes-Martins, R. A.; Lira-Da-Silva, R. M.; Prado-Franceschi, J.; Rodrigues-Simioni, L.; Cruz-Höfling, M. A.; Leite, G. B.; Hyslop, S.; Cogo, J. C. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon** 41:595-603, 2003.

Ribeiro L. A.; Jorge, M. T. Changes in blood coagulation time in patients bitten by Young and adult *Bothrops jararaca* snakes. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo** 44:143-145. 1989.

Ribeiro, L. A.; Jorge, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops:* série de 3.139 casos**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 30:475-480, 1997.

Rigoni, M.; Caccin, P.; Gschmeissner, S.; Koster, G.; Postle, A. D.; Rossetto, O.; Schiavo, G; Montecucco, C. Equivalent effects of snake PLA_2 neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. **Science** 310:1678–1680, 2005.

Rodrigues, S. L.; Florido Mendes, G. E.; Carlos, C. P.; Burdmann, E. A. Acute kidney injury caused by *bothrops jararaca* snake venom. **Nephron. Clin. Pract.** 2011;119:c131-136.

Rodrigues-Simioni, L.; Borgese, N.; Ceccarelli, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neurosci.** 10:475-489, 1983.

Rodrigues-Simioni, L.; Hawgood, B. J.; Smith. I. C. H. Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. **Toxicon** 28:1479-1489, 1990.

Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A. C. O.; Giglio, J. R.; Jiang, M. S.; Fletcher, J. E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A_2 myotoxin. **Toxicon** 11:1479–1489, 1995.

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.

Rossetto, O.; Morbiato, L.; Caccin, P., Rigoni, M.; Montecucco, C. Presynaptic enzymatic neurotoxins. **Journal of Neurochemistry**, 97:1534–1545, 2006.

Rostelato-Ferreira, S.; Leite, G. B.; Cintra, A. C.; Da Cruz-Höfling, M. A.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. Heparin at low concentration acts as antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I neurotoxic and myotoxic actions. **J Venom Res.** 15:54-60, 2010.

Sanchez, E. F.; Freitas, T. V.; Ferreira-Alves, D. L.; Velarde, D. T.; Diniz, M. R.; Cordeiro, M. N.; Agostini-Cotta, G.; Diniz, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon** 30:95–103, 1992.

Schiavo, G.; Matteoli, M.; Montecucco, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiol. Rev.** 80:717–766, 2000.

Selistre, H. S.; Queiroz, L. S.; Cunha, O. A.; De Souza, G. E.; Giglio, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**. 28:261-273, 1990.

Sgrignolli, L. R.; Mendes, G. E. F.; Carlos, C. P.; Burdmann, E. A. Acute Kidney Injury Caused by *Bothrops* Snake Venom. **Nephron. Clin. Pract.** 119:c131–c137, 2011.

Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Grønborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brügger, B.; Ringler, P.; Müller, S. A.; Rammner, B.; Gräter, F.; Hub, J. S.; De Groot, B. L.; Mieskes, G.; Moriyama, Y.; Klingauf, J.; Grubmüller, H.; Heuser, J.; Wieland, F.; Jahn, R. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. **Cell** 127:831-846, 2006.

Tu, A. T. Venoms: Chemistry and Molecular Biology. **NewYork**: Wiley, 1977.

Van Den Bergh, C.; Slotboom, A. J.; Verheij, H. M.; De Haas, G. H. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A2 and their importance for enzymatic activity. **J. Cell. Biochem**. 39:379-390, 1989.

Verheij, H. M.; Slotboom, A. J.; De Haas, G. H. Structure and function of phospholipase A2**. Rev. Physiol. Biochem. Pharmac**. 91:91, 1981

Vidal, J. C.; Stoppani, A. O. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch. Biochem. Biophys.** 145:543-56. 1971.

Ward, R. J.; Monesi, N.; Arni, R. K.; Larson, R. E.; Paco-Larson, M. L. Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin-I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu.* **Gene** 156:305-306, 1995.

Zamunér, S. R.; Prado-Franceschi, J.; Rodrigues-Simioni, L. The screening of *Bothrops* venoms for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparation. **Toxicon** 34:314-315, 1996.

ANEXO I:

UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 22 de Novembro de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Aspectos Moleculares da Junção Neuromuscular sob o Efeito de Venenos e Toxinas Botrópicas com Ação Pré – Sináptica.

ÁREA DE CONHECIMENTO: Saúde e Biológicas

Autor(es): Prof(a). Dr (a). Thalita Rocha
Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.11.10

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária do dia **18/11/2010** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Carlos Augusto Real Martinez
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Ars CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

ANEXO II:

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Bragança Paulista, 24 de Novembro de 2011

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Complicação grave de acidente botrópico: relato de caso.

Curso: Medicina

Grupo: III

Autor (es): Prof. Murillo de Oliveira Antunes; Eduardo Bazanelli Junqueira Ferraz;Maria Cristina Cesar;Nathalia Dias dos Santos;Rafaeli Duarte de Medeiros;Rodolfo Melare

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo CAAE: 0472.0.142.000-11

Prezado (a) (s) Pesquisador (a) (s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária dia **24/11/2011** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,

Marcelo Lima Ribeiro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF
Universidade São Francisco

Qualquer alteração no protocolo de pesquisa, deve ser comunicado e enviado ao CEP_USF.
Ao término do desenvolvimento do estudo o (a) pesquisador (a) responsável deverá enviar ao CEP-USF o relatório consolidado de conclusão do mesmo.

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Ars CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036