

# ESTUDO DA MIOTOXICIDADE INDUZIDA PELO VENENO DE *Bothrops jararaca*: ANÁLISE QUANTITATIVA DE FIBRAS LESADAS

**Roberta Silva Carreiro<sup>1</sup>, José Carlos Cogo<sup>2</sup>, Antônio Carlos Guimarães Prianti Jr.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Mestranda em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos –SP. e-mail: [robertacarreiro@yahoo.com.br](mailto:robertacarreiro@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Serpentário, Centro de Estudos da Natureza (CEN). Universidade do vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos –SP. e-mail: [jccogo@univap.br](mailto:jccogo@univap.br)

<sup>3</sup> Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D II). Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos –SP. e-mail: [prianti@univap.br](mailto:prianti@univap.br)

**Palavras-chaves:** veneno, *Bothrops jararaca*, miotoxicidade.

**Área de conhecimento:** Ciências Biológicas

**Resumo** – A serpente *Bothrops jararaca* (Bjar) é encontrada em quase todo território nacional sendo responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos registrados no país. Neste trabalho, os objetivos foram estudar quantitativamente a extensão da lesão promovida pela ação da peçonha da serpente Bjar em fibras musculares, bem como verificar a liberação sérica de creatino quinase total (CK) e analisar a morfologia das células musculares. A liberação de CK mostrou-se crescente durante os 120 minutos de incubação, e de forma mais intensa para a dose de 80 µg/ml do veneno bruto de Bjar durante 30 e 60 minutos de incubação. A análise histológica nos músculos incubados com 10, 20, 40 e 80 µg/ml de Bjar foi caracterizada por apresentar lesões típicas do envenenamento botrópico. O número de fibras lesadas foi dado pelo número total de células lesadas e expresso como porcentagem do número total de células e revelou-se dose-tempo-dependente. Concluímos, dessa forma, que a peçonha de Bjar tem ação miotóxica à semelhança de outras serpentes botrópicas.

## Introdução

No Brasil são relatados aproximadamente 20.000 acidentes por serpentes peçonhentas, com mais de 100 mortes anuais [1].

*Bothrops* é o gênero mais agressivo de tanatofídeos brasileiros, sendo responsável por praticamente 90% dos acidentes [2].

As peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* contêm diferentes toxinas e natureza protéica, algumas com atividade enzimática, que podem atuar conjuntamente e são responsáveis pelos principais efeitos lesivos sistêmicos e locais [3]. Já foram isolados vários componentes dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* como fatores hemorrágicos [4], enzimas responsáveis por promover distúrbios de coagulação [5], enzimas proteolíticas [6] e miotoxinas [7].

Classicamente, as miotoxinas são responsáveis pelas manifestações dos principais sintomas do envenenamento botrópico.

É considerado miotoxinas o componente do veneno que tem ação direta e específica sobre o músculo esquelético e que pode levar a degeneração e morte celular (mionecrose) [8].

Várias pesquisas demonstram que a maioria das miotoxinas dos venenos botrópicos

apresentam estrutura de fosfolipase A<sub>2</sub>. As PLA<sub>2</sub> são enzimas que hidrolisam a ligação éster do carbono 2 dos glicerofosfolipídios resultando em fosfolipídio e ácido graxo, assim produzindo o efeito farmacológico mais característico do envenenamento botrópico, a miotoxicidade local e sistêmica [9].

Os objetivos deste trabalho foram estudar quantitativamente a extensão da lesão promovida pela ação da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* em fibras musculares, bem como verificar a liberação sérica de creatino quinase total (CK) e analisar a morfologia das células musculares.

## Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D II) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) em São José dos Campos, São Paulo após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob nº L010/2005/CEP.

### Veneno

O veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi cedido pelo Dr. José Carlos Cogo, responsável

pelo Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) – UNIVAP. IBAMA nº 02027.013960/99-06.

#### Preparação *biventer cervicis* de pintainho

Após os animais terem sido anestesiados com 0,1 mL de cloridrato de Xilazina e 0,1 mL de cloridrato de Ketamina por via intraperitoneal e sacrificados com administração intracardiaca de solução de KCl a 10%, isolou-se os músculos *biventer cervicis* de acordo com a técnica descrita por GINSBORG & WARRINER (1960) [10]. Os músculos foram colocados em 5 mL de solução de Krebs [(mM) NaCl – 118,6; KCl – 4,69; CaCl<sub>2</sub> – 1,88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,17; MgCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O – 1,42; NaHCO<sub>3</sub> – 14,99; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> – 11,65] - pH 7,4 e mantidos incubados a temperatura de 37 °C, arejados com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Concentrações de 10, 20, 40 e 80 µg/ml de peçonha total foram adicionados ao banho para observação de seus efeitos. Nos experimentos controle foram adicionados à preparação, 0,2 mL de solução de Krebs.

#### Dosagem de creatino quinase total (CK)

Para a dosagem de Creatino quinase Total (CK), alíquotas de 20 µl do banho onde foram incubados os músculos de aves foram retiradas nos intervalos de tempo 0, 30, 60 e 120 minutos de incubação. Isto foi feito tanto para o grupo controle (sem adição de peçonha) quanto para os grupos nos quais foram adicionadas as peçonhas de Bjar nas diversas doses estudadas.

Para a dosagem de CK, utilizou-se o KIT CK-NAC, Laborlab (reativo de trabalho) no qual uma Unidade Internacional (UI) correspondeu à formação de creatina (1 µmol) por minuto dentro das condições estipuladas pelo KIT.

A mensuração da liberação de CK foi realizada utilizando o aparelho espectrofotômetro BIOPLUS – 2000 e a absorbância foi lida a 340 nm.

#### Técnica Histológica

A preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho utilizada no estudo bioquímico foi fixada em formol 10% por um período de 24 a 48 horas e posteriormente submetida a realização da técnica histológica de rotina para análise morfológica das células musculares. A coloração foi feita com hematoxilina e eosina. Os cortes foram observados e fotografados em um microscópio óptico (Olympus CH30) utilizando-se para isso o filme Kodak Professional BW400CN (preto e branco).

#### Determinação do Índice de mionecrose

A determinação do Índice de mionecrose (Análise quantitativa de fibras musculares lesadas) foi realizada utilizando-se as lâminas confeccionadas como descrito anteriormente. O dano morfológico (índice de mionecrose) foi quantificado pela contagem do número total de células lesadas e expresso como porcentagem do número total de células em três áreas não superpostas, não adjacente de cada três cortes histológicos de um mesmo músculo. Isso foi realizado para todos os músculos utilizados nas preparações.

Índice de mionecrose = (número de células lesadas/número total de células) X 100.

Foram consideradas células lesadas as que apresentaram alterações como: mionecroses caracterizadas por vacúolos, fibras intumescidas, lesões do “tipo delta” e degeneração de miofibrilas.

Os resultados foram expressos em Média ± SEM. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey para comparação múltipla. Foram considerados significativos valores para p<0,01 (1%) e p<0,05 (5%).

## Resultados

#### Análise bioquímica

A liberação de CK no líquido do banho se mostrou crescente durante 120 minutos de incubação para as várias doses da peçonha de Bjar utilizadas (10, 20, 40 e 80 µg/ml), mostrando valores significativos estatisticamente apenas na dose de 80 µg/ml durante 30 e 60 minutos de incubação (Figura 1).

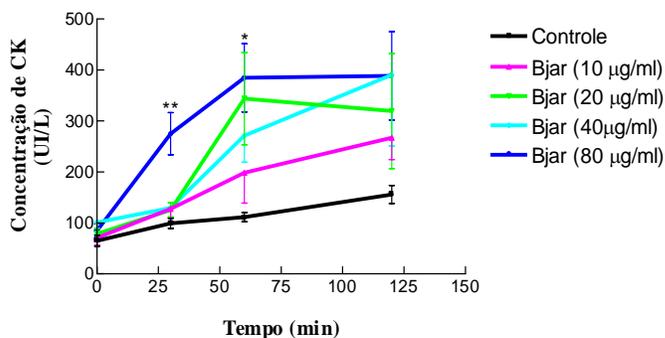


Figura 1. Curva de liberação de creatino quinase total (CK) pela ação da peçonha de Bjar em preparação *biventer cervicis* isolado de Pintainho (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

### Índice de mionecrose

Os músculos controle incubados durante 30, 60 e 120 minutos em solução nutritiva de Krebs não apresentaram nenhuma lesão muscular. Já os músculos incubados com as diferentes doses de Bjar apresentaram lesão muscular como apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Índice de mionecrose do músculo *biventer cervicis* durante 30, 60 e 120 minutos de incubação para as doses de 10, 20, 40 e 80 µg/mL do Bjar.

Dose de Bjar (µg/mL)	30'	60'	120'
10	21,16 ±1,38 *	25,37 ±0,96 *	43,27 ±2,58 *
20	33,62 ±1,19 *	23,80 ±1,60 #	35,60 ±1,30 *
40	40,05 ±0,85 *	44,45 ±2,01 *	41,68 ±1,55 *
80	56,00 ±1,42 *	47,40 ±3,85 *	63,48 ±2,22 *

Os valores correspondem a média ± e erro padrão da média. \* p < 0,001, # p < 0,05.

### Análise morfológica

O músculo *biventer cervicis* controle foi analisado após 30, 60 e 120 minutos de incubação em solução nutritiva de Krebs. As fibras musculares mostraram-se íntegras, em corte transversal, núcleos periféricos e preservação da disposição poligonal das células.

As preparações incubadas durante 120 minutos com as diversas doses de peçonha estudadas (10, 20, 40 e 80 µg/mL) apresentaram diferentes estágios do processo mionecrótico, culminando com aglutinação de miofibrilas e/ou sua desintegração, bem como células com formação de vesículas em seu interior, células intumescidas e degeneração da membrana celular (Figura 2 e 3).

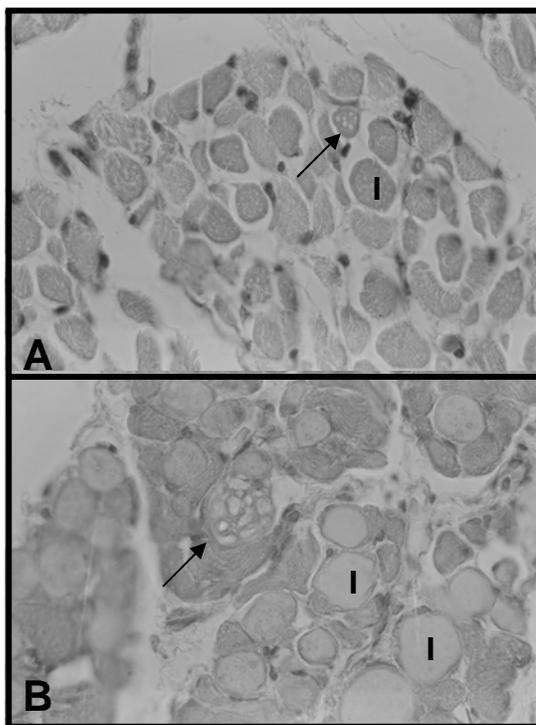


Figura 2. Morfologia do músculo *biventer cervicis* incubado durante 120 minutos com 10 µg/mL (A) e 20 µg/mL do Bjar (B). Em ambos os tratamentos observa-se células mionecróticas (setas) e células intumescidas (I). H.E. Aumento: 1000X.

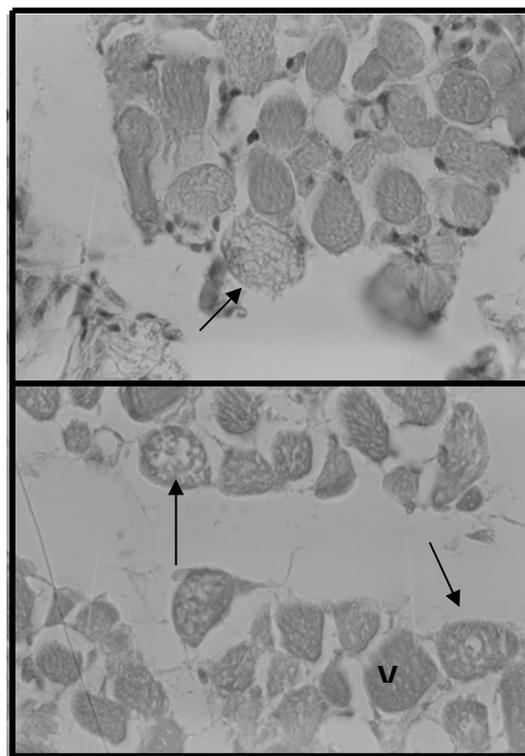


Figura 3. Morfologia do músculo *biventer cervicis* incubado durante 120 minutos com (A) 40 µg/mL e (B) 80 µg/mL do Bjar. Para as duas doses supracitadas pode-se notar uma intensa área de células mionecróticas (**setas**). Verifica-se ainda a presença de células com formação de vesículas (**V**). H.E. Aumento: 1000X.

### Discussão

Os resultados obtidos demonstraram que a peçonha de *Bothrops jararaca* causa alterações bioquímicas e morfológicas sobre a fibra muscular esquelética.

A peçonha de Bjar à semelhança com a de *B. leucurus* [11] em músculo de ave; *B. jararacussu* [12] e *B. asper* em ratos [13] apresentou atividade miotóxica dose-tempo-dependente referente à liberação de creatino quinase total. A mionecrose observada é decorrente da ação de miotoxinas, uma das conseqüências do envenenamento botrópico [14].

Como um marcador bioquímico quantitativo de dano muscular esquelético, a liberação de CK promoveu um parâmetro adicional para confirmar os resultados histológicos e, realmente, houve uma correlação positiva entre os níveis de CK e as alterações patológicas observadas nas preparações nas quais foram adicionadas as diversas doses de peçonha total estudadas. As análises histológicas apresentaram as características clássicas da miotoxicidade induzida pelo veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, com resultados semelhantes aos encontrados pelos estudos realizados com *B. jararacussu* [15, 12]; *B. asper* [16], *B. leucurus* [11], *B. insularis* [17, 18] e com uma miotoxina básica isolada do veneno de *B. alternatus* [3].

Finalizando, os resultados obtidos neste trabalho nos permite afirmar que a peçonha de *Bothrops jararaca* apresenta semelhanças à de outras serpentes botrópicas, no que se refere à presença de miotoxinas, componentes característicos dos venenos desse gênero.

### Referências

[1] **MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS**, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde (1999).  
[2] BORGES, R. C. **Serpentes Peçonhentas Brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimentos em caso de acidentes**/ Roberto Cabral Borges. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.  
[3] MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G. *et al.* Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v.29, nº 6, p.713-723, 1991.  
[4] MANDELBAUM, F. R., ASSAKURA, M. T., REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararacá-pintada). **Toxicon**, v.22. p.193-206; 1984.  
[5] NAHAS, L., KAMIGUTI, A. S., BARROS, M. A. R. Thrombin-Like and factor X activator components of

*Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost.**, v.41, p. 314-328; 1979.

[6] ASSAKURA, M. T., REICHL, A. P., ASPERTI, M. C., MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v.23, p 691-706; 1985.

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

[8] MEBS, D. & OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venom: their biochemical and biological activities. **Pharmac Ther.**, v.48, p223-236; 1990.

[9] KINI, R. M. Phospholipase A<sub>2</sub> – **A complex multifunctional protein puzzle. In: venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Structure, function and mechanism.** Kini, R. M. John Wiley and Sons, New York . p1-28; 1997.

[10] GINSBORG, B. & WARRINER, J. The isolated chick *biventer cervicis* nerve muscle preparations. **Brit. J. Pharmacol**, v.15, p.410, 1960.

[11] PRIANTI-JR., A. C. G.; RIBEIRO, W.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; 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**, v.41, p.595-603, 2003.

[12] CALIL-ELIAS, S., THATTASSERY, E., MARTINEZ, A.M.B., MELO, P.A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine Kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.35, nº10, p.1233-1235, 2002.

[13] RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LEÓN, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* venom: Effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa<sub>2</sub>EDTA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, nº 5 e 6, p.313-319, 2000.

[14] GUTIÉRREZ, J.M; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Do Inst. Butantan**, v.51, p.211-223; 1989.

[15] QUEIROZ, L.S., NETO, H.S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 22, nº 3, p. 339-346, 1984.

[16] GUTIÉRREZ, J. M., ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, v. 18, p.603-610, 1980.

[17] 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.

[18] COGO, J.C., PRADO-FRANCESCHI, J & RODRIGUES-SIMIONI, L. Efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops insularis* na preparação nervo-frênico diafragma isolado de camundongo. **Mem. do Inst. Butantan**, v.52, p.78, 1990.