



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Instrumentação em técnicas de estudo da transmissão  
neuromuscular: miografia e eletrofisiologia *in vitro***

**Lívia de Sousa Britto  
Orientadora: Dra. Márcia Gallacci**

**Botucatu  
2016**

**LÍVIA DE SOUSA BRITTO**

**INSTRUMENTAÇÃO EM TÉCNICAS DE ESTUDO DA TRANSMISSÃO  
NEUROMUSCULAR: MIOGRAFIA E ELETROFISIOLOGIA *IN VITRO***

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do  
título de Bacharel em Física Médica.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Gallacci

Botucatu  
2016

## AGRADECIMENTOS

À todos os meus professores, que de alguma forma auxiliaram na minha formação acadêmica, mas em especial à Dra. Márcia Gallacci, pela oportunidade, confiança e orientação. Agradeço também a Dra. Maeli pela dedicação e disponibilidade.

Ao Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante, pela amizade e por todo o tipo de ajuda durante a realização deste trabalho.

À Dra. Paula Aiello Tomé de Souza, pelo auxílio na execução dos experimentos.

À todos os funcionários da UNESP que contribuíram para a minha formação.

*Dedico este trabalho à minha família, mas em especial à minha mãe, que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou à concluir este curso. Obrigada por todo carinho, amor e dedicação. Amo você!*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
CTL	15 Animais do grupo controle, tratados com solução salina durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 15° dia
CTL	21 Animais do grupo controle, tratados com solução salina durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 21° dia
CTX	Crotoxina
CTX 5 15	Animais tratados com crotoxina, na concentração 5 µg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 15° dia
CTX 5 21	Animais tratados com crotoxina, na concentração 5 µg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 21° dia
CTX 10 15	Animais tratados com crotoxina, na concentração 10 µg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 15° dia
CTX 10 21	Animais tratados com crotoxina, na concentração 10 µg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 21° dia
JNM	Junção neuromuscular
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PPM	Potencial de placa motora
PPMm	Potencial de placa motora em miniatura
TNM	Transmissão neuromuscular

## RESUMO

O presente trabalho descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular obrigatório para a Conclusão do Curso de Física Médica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, o qual foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular do Departamento de Farmacologia deste Instituto, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Gallacci. O estágio de 584 horas contemplou atividades de Instrumentação, visando o aprendizado das técnicas miográfica e eletrofisiológica *in vitro*, que permitem a investigação científica do processo de transmissão neuromuscular sob a influência de xenobióticos (fármacos, venenos e poluentes ambientais), bem como, sob diversas condições fisiopatológicas (doenças, atividade física e sedentarismo). As atividades desenvolvidas no estágio incluíram desde a manipulação de animais experimentais (camundongos); técnicas de dissecação de preparações neuromusculares; preparo de soluções nutrientes, envolvendo o cálculo de concentrações; até o estudo das bases biofísicas dos processos celulares (potenciais de membrana, de ação e de placa motora) e os fundamentos de física dos equipamentos. Ainda no decorrer do estágio, participei como colaboradora de um projeto de pesquisa que visa estudar a ação da crotoxina (principal toxina da serpente *Crotalus durissus terrificus*) sobre a musculatura esquelética de camundongos. Assim, nesta monografia serão apresentadas inicialmente as atividades relacionadas ao estágio de Instrumentação e ao final será apresentado um breve relato do projeto e dos resultados por mim obtidos.

Palavras-chave: Transmissão Neuromuscular. Junção Neuromuscular. Miografia. Eletrofisiologia.

## ABSTRACT

The present work describes the activities carried out during the mandatory curricular internship to conclude the Medical Physics course at Institute of Biosciences of the University of São Paulo State "Julio de Mesquita Filho", Botucatu. The instrumentation stage was held at the Neuromuscular Junction Laboratory, Department of Pharmacology, under the supervision of Professor Márcia Gallacci Ph.D, in a total of 584 hours. The activities aimed at learning *in vitro* myographic and electrophysiological techniques, which allowed scientific research of neuromuscular transmission process, and the study of biophysical bases under the influence of xenobiotics (drugs, poisons and environmental pollutants), as well as in various pathophysiological conditions (diseases, physical activity and sedentary lifestyle). The activities included the management of experimental animals (mice); dissection techniques and isolation of neuromuscular preparation; preparation of nutrient solutions; involving the calculation of concentrations; even the study of biophysical basis of cellular processes (membrane, action and endplate potentials) and equipment physical fundamentals. Yet during the internship, I participated as a collaborator in a research project to study the action of crotoxin (main toxin of *Crotalus durissus terrificus* snake) in skeletal muscle of mice. Thus, in this monograph will be initially presented the activities related to instrumentation phase and in the end will be presented a brief report about the project and the results obtained by me.

Keywords: Neuromuscular Transmission. Neuromuscular Junction. Myography. Electrophysiology.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 ) INTRODUÇÃO.....	8
1.1) CONCEITOS BÁSICOS.....	8
1.2) ASPECTOS ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS DA JNM.....	9
1.2.1) Receptor nicotínico.....	11
1.2.2) Acetilcolina: síntese, armazenamento e degradação.....	11
1.3) ASPECTOS BIOFÍSICOS DA TNM.....	12
1.4) ASPECTOS FUNCIONAIS DA JNM.....	13
2) INSTRUMENTAÇÃO EM TÉCNICAS DE ESTUDO DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR.....	14
2.1) ESTUDO MIOGRÁFICO <i>IN VITRO</i> .....	14
2.1) ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO <i>IN VITRO</i> .....	18
3) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
4) PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.....	22
4.1) INTRODUÇÃO.....	22
4.2) OBJETIVO.....	23
4.3) METODOLOGIA.....	24
4.4) RESULTADOS.....	25
4.4.1) Microscopia óptica do músculo diafragma.....	25
4.4.2) Microscopia óptica do músculo gastrocnêmio.....	27
4.5) DISCUSSÃO.....	30
4.6) CONCLUSÃO.....	31
4.7) OBSERVAÇÃO.....	31
4.8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## 1 ) INTRODUÇÃO

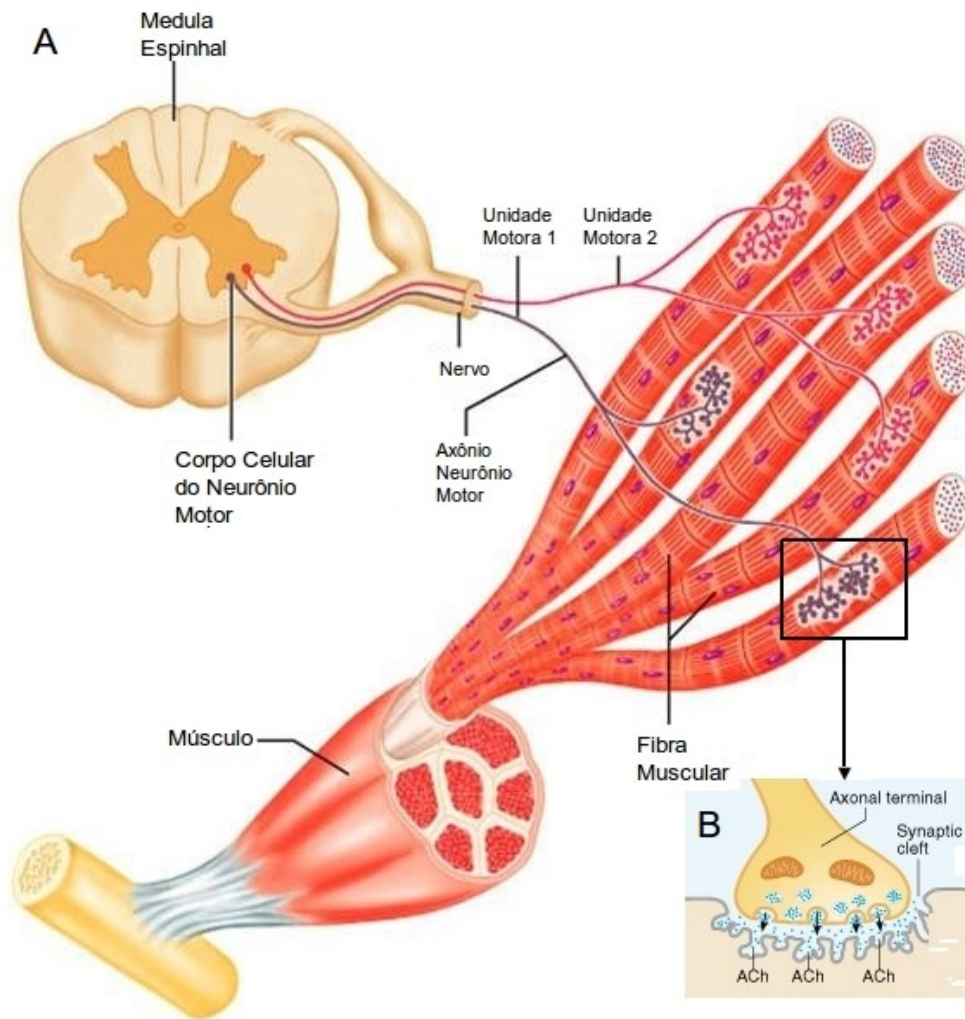
O presente trabalho descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular obrigatório para a Conclusão do Curso de Física Médica (área de Instrumentação), o qual foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular do Departamento de Farmacologia e teve por objetivo o aprendizado e o treinamento em técnicas miográfica e eletrofisiológica para o estudo da transmissão neuromuscular *in vitro*. Visando a este objetivo inicialmente foi necessário aprofundar os meus conhecimentos sobre a anatomia e fisiologia da junção neuromuscular, subsequentemente compreender o funcionamento e a física básica dos equipamentos de estudo. Deve-se destacar que no decorrer do estágio também foi possível desenvolver um projeto de iniciação científica, que teve como objetivo estudar a ação da crotoxina (principal toxina da serpente *Crotalus durissus terrificus*) sobre a musculatura esquelética de camundongos.

Sendo assim, esta monografia será dividida em 3 grandes tópicos: inicialmente serão apresentadas as bases anatômicas, funcionais e biofísicas do processo de transmissão neuromuscular, a seguir, serão apresentadas e discutidas as técnicas miográficas e eletrofisiológicas, com ênfase no estudo miográfico, mais comumente utilizado no laboratório, e, ao final, será apresentado um resumo do projeto de iniciação científica.

### 1.1) CONCEITOS BÁSICOS

A junção neuromuscular (JNM) é uma sinapse química entre o axônio de um neurônio motor e a membrana da musculatura esquelética, pertencendo à porção eferente do sistema nervoso periférico somático (Figura 1). Sua função é receber ordens do cérebro, por meio de neurônios, e estimular músculos e ossos para gerar ações motoras voluntárias, permitindo todo tipo de contato com o ambiente através da movimentação de membros e da fala, além de manter funções vitais, como a respiração.

A transmissão do impulso elétrico do nervo para o músculo é denominado transmissão neuromuscular (TNM) e desencadeia o processo de contração muscular. Este processo é sensível a ação de xenobióticos em geral, incluindo toxinas e fármacos e também pode ser afetado por outros fatores como atividade física, imobilidade e pelo desenvolvimento de doenças. Desta maneira, o conhecimento de técnicas de estudo da TNM ganha relevância para o diagnóstico de patologias e de intoxicações, para o estudo de mecanismo de ação de novos fármacos e para o avanço do conhecimento do processo de transmissão sináptica.

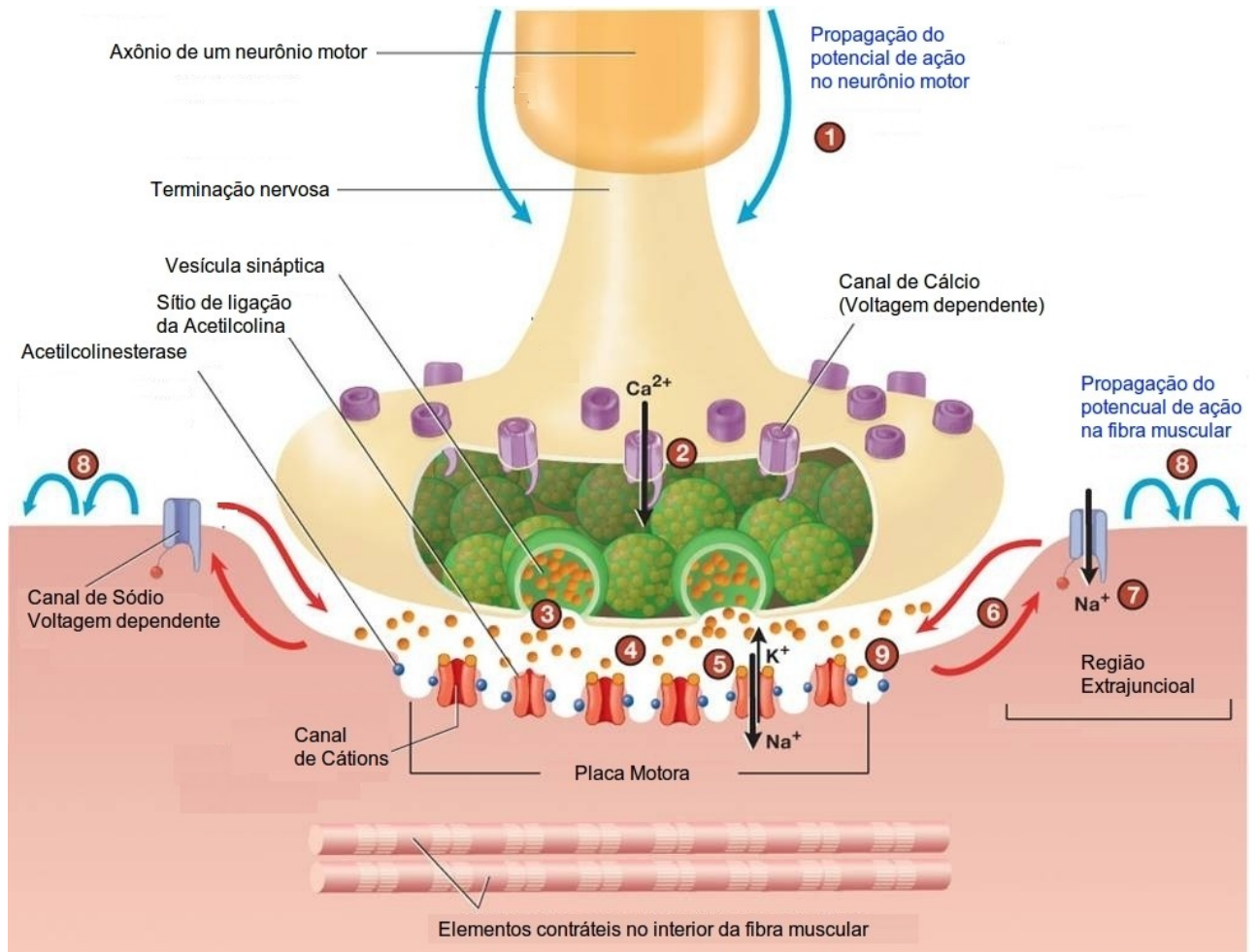


**Figura 1: A. Sistema nervoso somático e B. Sinapse neuromuscular em destaque.**

## 1.2) ASPECTOS ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS DA JNM

A Figura 2 revela a anatomia da JNM. Identifica-se nesta sinapse: a terminação nervosa contendo um grande número de vesículas, que armazenam o neurotransmissor, acetilcolina (ACh); um espaço de aproximadamente 500 Å separando os elementos pré e pós-sinápticos, que constitui a fenda sináptica, e a membrana da fibra muscular (placa motora terminal), cuja área sofre grande aumento pela formação de inúmeras dobras. Nesta membrana encontram-se os receptores colinérgicos nicotínicos (Figura 3)<sup>[1]</sup>.

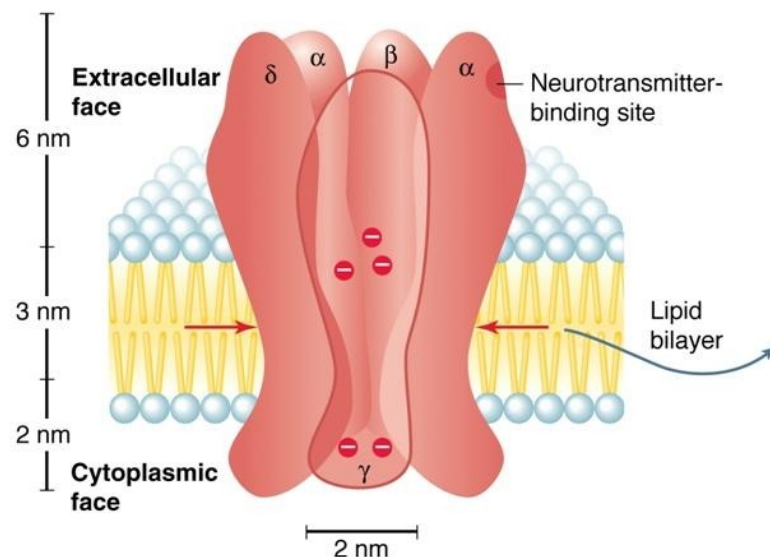
A placa motora representa uma fração extremamente pequena da fibra muscular, ocupando cerca de 0,1% de sua superfície<sup>[1]</sup>. Esta região é constituída por uma membrana muscular diferenciada que responde a estímulos químicos, ou seja, membrana quimicamente excitável. A região extrajuncional, que corresponde ao restante da fibra muscular, é rica em canais de sódio e potássio voltagem dependente, sendo, portanto, eletricamente excitável<sup>[2]</sup>.



**Figura 2: Representação esquemática da JNM com as principais etapas do processo de TNM.** 1 – Um potencial de ação ao longo de um neurônio motor é propagado para a terminação nervosa. 2 – A presença de um potencial de ação na terminação nervosa abre os canais dependentes de voltagem de  $\text{Ca}^{2+}$  e subsequentemente entra  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da terminação nervosa. 3 – O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da terminação nervosa desencadeia a liberação de ACh, por exocitose, das vesículas sinápticas. 4 – A acetilcolina se difunde através do espaço que separa as células nervosas e musculares e liga-se em receptores específicos para ela na placa motora terminal. 5 – Esta ligação provoca a abertura dos canais de cátions, levando a um movimento relativamente grande de  $\text{Na}^+$  na célula muscular em comparação com um movimento menor de  $\text{K}^+$  para fora. 6 – O resultado é um potencial da placa motora. O fluxo da corrente local ocorre da extremidade final da placa despolarizada para a região extrajuncional. 7 – Este fluxo de corrente local abre canais dependentes de voltagem de  $\text{Na}^+$  na região extrajuncional. 8 – A despolarização causada pela entrada de  $\text{Na}^+$  atinge o limiar de excitabilidade da fibra, dando início a um potencial de ação, o qual é propagado ao longo da fibra muscular. 9 – A ACh é subsequentemente destruída pela acetilcolinesterase, uma enzima localizada na membrana na placa motora terminal, terminando a resposta da célula muscular.

### 1.2.1) Receptor nicotínico

Os receptores nicotínicos são glicoproteínas pentaméricas constituídos por 4 tipos distintos de subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\epsilon$ , e  $\delta$ . A relação estequiométrica das subunidades desse receptor varia, sendo  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  em músculos desnervados ou estágio embrionário, e  $\alpha_2\beta\epsilon\delta$  em músculos adultos. Os sítios de ligação para a ACh situam-se sobre as extremidades N-terminais das subunidades  $\alpha$ , sendo necessária a ligação de duas moléculas de ACh, uma em cada subunidade, para ativar o receptor, ou seja, abrir o canal<sup>[1]</sup>. É importante notar que este receptor é exemplo de canal iônico dependente de ligante, consistindo em um canal seletivo para cátions.



**Figura 3: Receptor nicotínico.**

### 1.2.2) Acetilcolina: síntese, armazenamento e degradação

A síntese de ACh ocorre no citoplasma da terminação nervosa motora e resulta da acetilação da colina pela acetil coenzima A, reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase. A colina é transportada do líquido extracelular para a terminação nervosa por meio de um transportador de colina da membrana dependente de  $\text{Na}^+$ . A acetil coenzima A por sua vez é sintetizada nas mitocôndrias, que são encontradas em grande número na terminação nervosa. Uma vez sintetizada, a ACh é transportada do citoplasma para o interior das vesículas por intermédio de um transportador associado à vesícula que é impulsionado pelo efluxo de próton. O armazenamento de ACh é realizado através do empacotamento de “quanta de moléculas de ACh” (em geral, 10000 a 50000 moléculas em cada vesícula).

Após a liberação pela terminação nervosa, as moléculas de ACh podem ligar-se e ativar os receptores ou serem degradadas pela acetilcolinesterase, originando colina e acetato. Na junção neuromuscular, a remoção imediata de ACh é necessária para impedir sua difusão lateral e a ativação sequencial dos receptores adjacentes, o tempo necessário para hidrólise da ACh é menor que 1 ms<sup>[3]</sup>.

### 1.3) ASPECTOS BIOFÍSICOS DA TNM

Os principais sinais bioelétricos da TNM são o potencial de membrana ou potencial de repouso, potencial de ação e os potenciais locais (potencial de placa motora e o potencial de placa motora em miniatura).

O potencial de membrana ou potencial de repouso refere-se a diferença na carga entre regiões do fluido intracelular e extracelular, na ausência de estímulo elétrico. Todas as células mantêm um potencial interno negativo, entre -30mV e -80mV, dependendo do tipo de célula, e ocorre pela diferença de concentração de íons de dentro e fora da célula, principalmente Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Esta diferença de concentração é mantida graças a um mecanismo de bombeamento de íons por um transportador dependente de energia (transporte ativo), a bomba de sódio (ou Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase), forçando o Na<sup>+</sup> a sair e o K<sup>+</sup> a entrar na célula, com gasto de energia. Graças ao bombeamento, os íons K<sup>+</sup> ficam mais concentrados do lado interno e os íons Na<sup>+</sup>, do lado externo da célula. Como a membrana é mais permeável ao K<sup>+</sup> do que ao Na<sup>+</sup>, a quantidade de íons K<sup>+</sup> que saem por permeabilidade é maior do que a de íons Na<sup>+</sup> que entram por bombeamento. Como resultado, a célula perde cargas positivas e as negativas ficam em excesso, deixando o interior da membrana negativo em relação ao lado externo<sup>[4]</sup>.

Potenciais de ação são mudanças rápidas e transitórias no potencial de membrana, durante os quais o potencial se inverte e, portanto, a parte interna da célula excitável torna-se transitoriamente mais positiva que a externa<sup>[5]</sup>. Durante um potencial de ação, ocorre uma mudança de sinal de cargas elétricas nas superfícies da membrana, causada pela entrada de íons de Na<sup>+</sup> na célula, despolarizando a membrana. Com a saída de íons de K<sup>+</sup>, a distribuição original de cargas é restabelecida<sup>[6]</sup>. Porém, a concentração intracelular de Na<sup>+</sup> fica elevada, assim como a concentração extracelular de K<sup>+</sup> – o oposto do estado de repouso. A bomba de sódio é ativada para fazer com que os íons retornem a sua distribuição inicial. Este transporte é contra o gradiente de concentração da célula em relação ao meio e é realizado com gasto de energia, catalisando a transformação da molécula de ATP em ADP. Esse processo é feito às custas da retirada de três íons de Na<sup>+</sup> da célula, ao mesmo tempo que entram dois íons de K<sup>+</sup>.

Os potenciais locais, potencial de placa motora (PPM) e potencial de placa motora em miniatura (PPMm) são despolarizações restritas da região da placa motora, conseqüentes à interação do mediador químico liberado pelo nervo motor com o receptor presente na membrana pós sináptica. Esses sinais serão descritos a seguir.

#### 1.4) ASPECTOS FUNCIONAIS DA JNM

A transmissão neuromuscular se inicia quando um potencial de ação, propagado ao longo de um motoneurônio chega a terminação nervosa e despolariza a membrana pré sináptica. Essa despolarização promove a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes. Quando esses canais se abrem, a permeabilidade da membrana pré-sináptica ao  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta e esse íon flui para o meio intracelular, seguindo seu gradiente eletroquímico<sup>[7]</sup>. A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na terminação nervosa provoca a exocitose do neurotransmissor (ACh), previamente sintetizado e armazenado nas vesículas sinápticas. Uma vez liberada, a ACh se difunde através da fenda sináptica até placa motora terminal, uma região especializada da fibra muscular que contém receptores nicotínicos.

A ACh se liga às subunidades  $\alpha$  do receptor nicotínico e provoca uma alteração conformacional. O centro do canal se abre, aumentando a permeabilidade da placa motora aos íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Esses íons fluem seguindo seus respectivos gradientes eletroquímicos, com o  $\text{Na}^+$  entrando na placa motora e o  $\text{K}^+$  saindo<sup>[7]</sup>. O fluxo de íons causa uma despolarização transitória na região da placa motora, denominada potencial de placa motora (PPM). Esta despolarização se dispersa por correntes locais para a região extrajuncional da fibra muscular, que é eletro-excitável. Assim, ao atingir o limiar de excitabilidade da fibra, o PPM deflagra o potencial de ação, que se propaga pela fibra muscular, liberando cálcio do retículo sarcoplasmático. O  $\text{Ca}^{2+}$  permite o deslizamento entre os filamentos de actina e miosina, iniciando o processo de contração<sup>[7]</sup>.

Na ausência de estímulo do nervo motor, também, ocorre vazamento da acetilcolina vesicular, sendo liberada o conteúdo de uma vesícula (um quantum de ACh) a cada segundo. Tal liberação provoca uma pequena despolarização da placa motora denominada potencial de placa motora em miniatura (PPMm), cuja função não é totalmente conhecida<sup>[2]</sup>.

## 2) INSTRUMENTAÇÃO EM TÉCNICAS DE ESTUDO DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR

Os principais métodos de estudo da JNM utilizados no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular, do IBB - UNESP, incluem as técnicas miográfica e eletrofisiológica, *in vitro*, que são amplamente utilizadas para investigações fisiológica e farmacológica em tecidos isolados.

As metodologias utilizadas envolvem o uso de animais experimentais, frequentemente camundongos, e estão aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/IBB.

### 2.1) ESTUDO MIOGRÁFICO *IN VITRO*

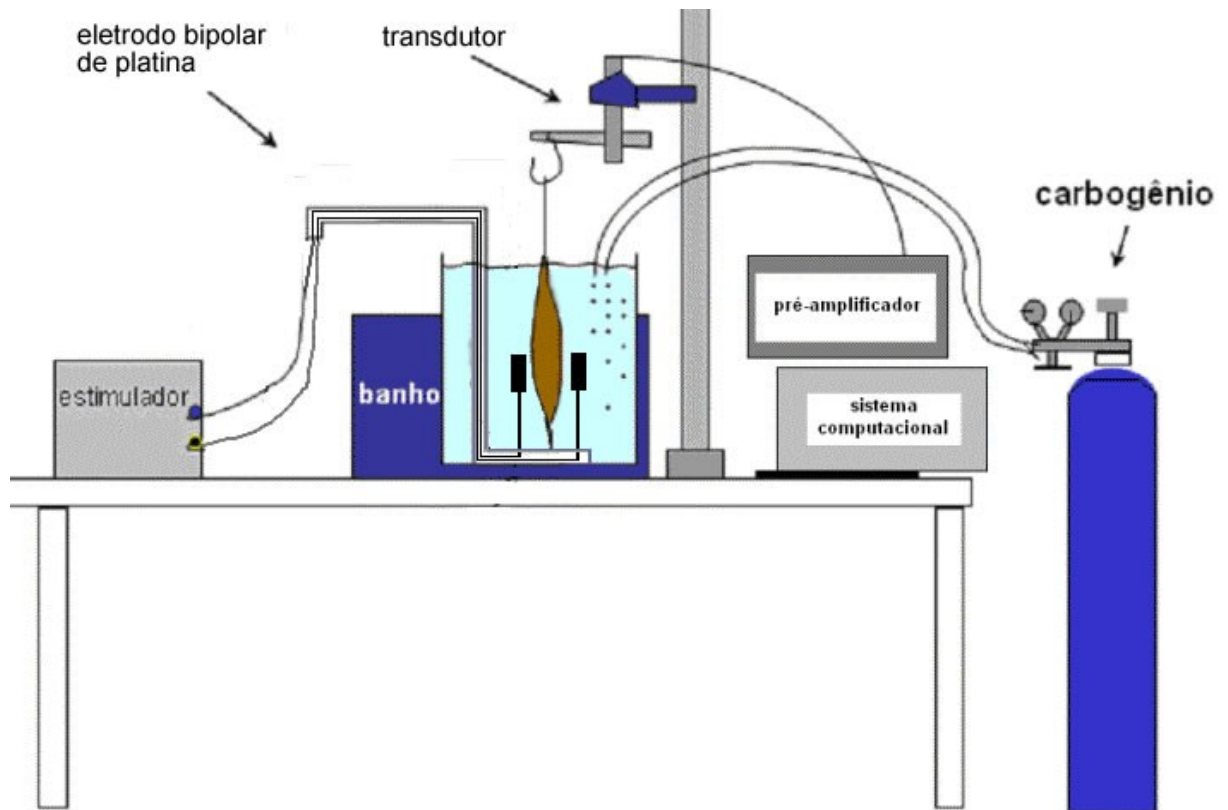
A técnica miográfica permite o estudo funcional do músculo, avaliando a contração muscular, que pode ser evocada *diretamente*, através do estímulo elétrico do músculo, para avaliar o processo contrátil propriamente dito, ou *indiretamente* por meio do estímulo do nervo motor, permitindo investigar o processo de transmissão neuromuscular. Para o estudo das contrações indiretas, são isolados os complexos mioneurais (por exemplo, frênico-diafragma ou ciático-extensor longo dos dedos, de ratos ou camundongos). No caso das contrações diretas, apenas os músculos são preservados e utilizados.

Para o registro miográfico, a preparação biológica deve ser isolada e montada verticalmente em um sistema de banho, contendo solução nutriente submetida a aeração constante, por mistura carbogênica (95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>), e mantida a temperatura controlada.

**Solução nutriente** - A solução nutriente é constituída por um conjunto de sais, que tem por finalidade manter a preparação viva. Frequentemente é utilizada a solução de Ringer, cuja a composição é descrita a seguir: em (mM/l) em água deionizada: NaCl - 135; KCl - 5; MgCl<sub>2</sub> - 2; NaHCO<sub>3</sub> -15; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1; CaCl<sub>2</sub> - 2; glicose - 11.

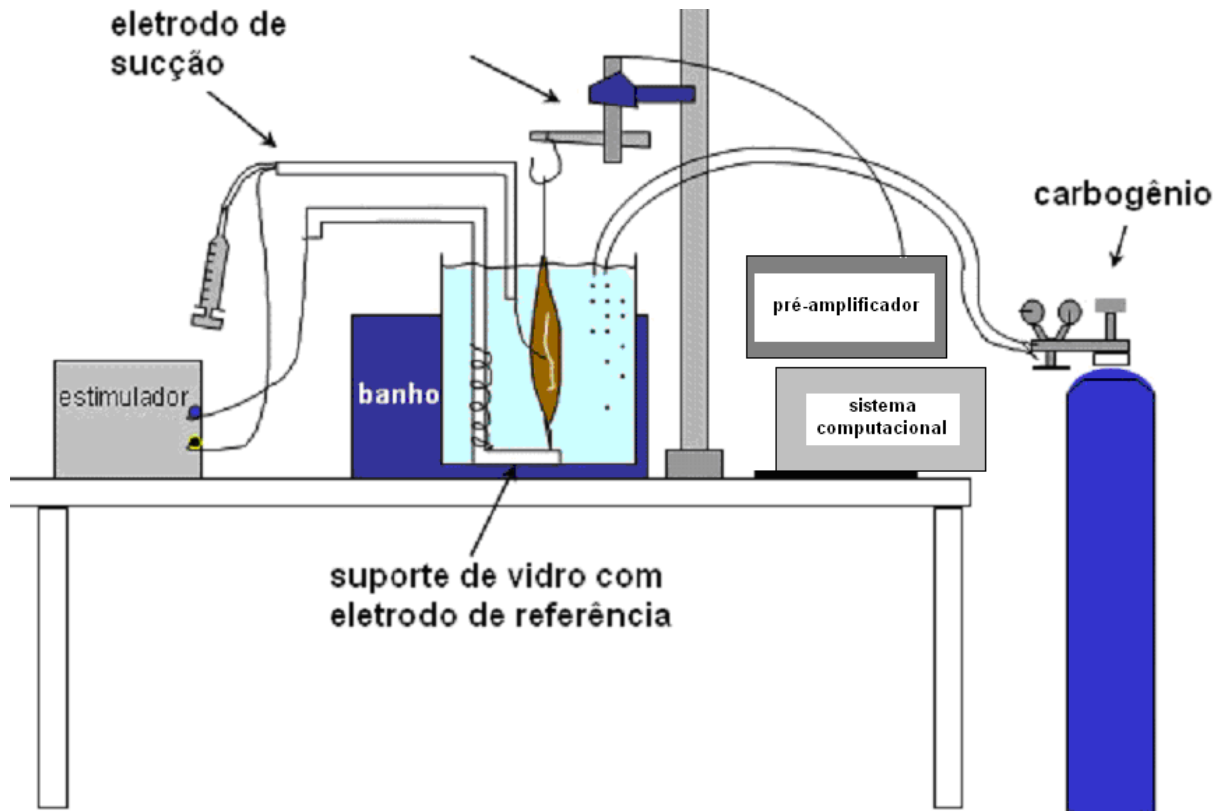
No caso do registro das contrações diretas, o músculo é alocado entre os polos de um eletrodo bipolar de platina, conectado a um estimulador elétrico, para a aplicação de pulsos elétricos retangulares. A voltagem aplicada ao eletrodo gera uma corrente elétrica conduzida pela solução nutriente presente na cuba, proporcionando a estimulação do

músculo pelo campo elétrico gerado. Com intuito de evitar alguma contribuição da contração indireta, a solução nutritiva deve conter uma concentração adequada de um bloqueador neuromuscular do tipo competitivo (por exemplo, pancurônio), que protege os receptores nicotínicos da ativação pela ACh, por ventura, liberada dos resquícios de terminação nervosa presentes na preparação (Figura 4).



**Figura 4: Sistema de registro miográfico para contrações diretas.**

No caso do registro das contrações indiretas, o nervo é aspirado por um eletrodo de platina do tipo "sucção", que está acoplado a um estimulador elétrico e o músculo é fixado em um eletrodo de referência, em forma de L (Figura 5).



**Figura 5: Sistema de registro miográfico para contrações indiretas.**

A *tensão de base* de cada preparação é estabelecida individualmente, de modo a fornecer uma resposta máxima à aplicação de *pulsos elétricos retangulares* com *intensidade* e *duração supra-máximas*. Os estímulos utilizados para evocar as contrações musculares diretas, no geral, são de maior voltagem e duração do que para evocar as contrações indiretas, pois o nervo amplifica o sinal recebido.

Para o registro das contrações musculares, diretas ou indiretas, o músculo, obrigatoriamente, deve estar conectado a um transdutor de força, o qual converte a tração desenvolvida pelo tecido de um sinal mecânico para um elétrico. Este sinal é conduzido a um pré amplificador e enviado ao sistema computacional de registro da informação.

O transdutor utilizado é do tipo isométrico, visto que nos experimentos de contração, direta ou indireta, a estimulação elétrica mantém o músculo tensionado, mas não altera o seu comprimento. Esse tipo de contração é denominada *isométrica* e normalmente se opõe a outras forças, por exemplo, na manutenção da postura contra a força da gravidade<sup>[8]</sup>.

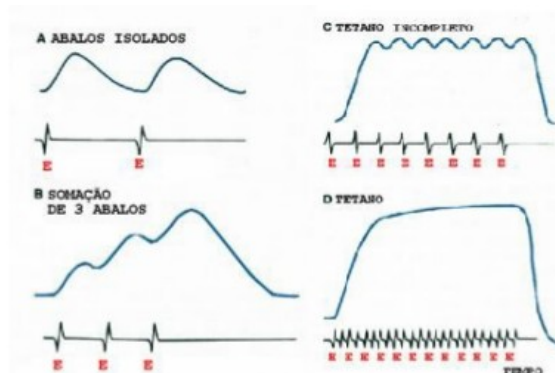
**Transdutor isométrico de força** - É um aparelho de medida que transforma uma grandeza física/química em um sinal mensurável, o transdutor de força pode ser conhecido também por extensômetro (strain gage). Uma das causas da alteração dimensional de um corpo pode resultar da presença de uma força aplicada ao corpo. O tipo tradicional de extensômetro consiste de um fio metálico que forma um zig-zag, o qual, normalmente, é circular. Quando uma tensão mecânica é aplicada, a forma da seção transversal do fio varia, ou seja, sofre uma micro deformação<sup>[9]</sup>.

A ação de uma força sobre um material condutor pode alterar não só a resistividade do material condutor como também as dimensões (comprimento, largura e área do condutor), o processo mais utilizado para medir essa micro deformação consiste em aproveitar a alteração da dimensão para variar a resistência elétrica de um fio condutor. Este fenômeno é consequência direta da equação que define a resistência de um fio condutor (elemento que liga o transdutor ao objeto mensurado):

$$R = \frac{\rho L}{A}$$

onde, R resistência elétrica de um fio para um fio condutor de material com resistividade elétrica  $\rho$ , comprimento L e área da seção transversal A<sup>[10]</sup>.

No registro miográfico as contrações musculares são classificadas em função da frequência de estimulação. Para cada estímulo, ocorre um abalo mecânico (espasmo muscular), uma breve contração seguida de relaxamento, denominada contração isolada. Se um segundo estímulo for aplicado antes que o relaxamento do primeiro abalo tenha começado, haverá uma superposição das respostas mecânicas que se denomina somação, resultando numa tensão maior. A aplicação de estímulos cada vez mais frequentes produzirá contrações musculares sustentadas e uniformes denominada tétano (Figura 6). Na contração tetânica, a força desenvolvida num tétano perfeito é 4 vezes maior quando comparada a uma contração isolada<sup>[11]</sup>. Os parâmetros são registrados no sistema computacional e para a análise são medidas as amplitudes da contração.



**Figura 6: Contrações musculares em função da frequência.** A - abalos isolados; B - Somação de 3 abalos; C - Contração tetânica incompleta; D - Contração tetânica.

## 2.1) ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO *IN VITRO*

As técnicas eletrofisiológicas são aquelas utilizadas para o registro da atividade elétrica das células dos vários tecidos orgânicos, como por exemplo, o nervoso e o muscular. Um ponto importantíssimo na evolução dessas técnicas foi a introdução dos chamados microeletrodos de vidro por Ling e Gerard em 1949. Estes microeletrodos são capilares de vidro que, estirados sob o calor, formam pontas muito finas (0,5  $\mu\text{m}$  ou menos). Os microelétrodos são preenchidos com uma solução de eletrólitos, no geral KCl (3M). Por intermédio deles pode-se puncionar a membrana celular sem lesá-la grosseiramente. Estes microeletrodos, conectados a aparelhagem adequada permitem registrar variações de voltagem ou de corrente elétrica através da membrana celular<sup>[12]</sup>.

No Laboratório de Farmacologia da JNM do IBB, a técnica eletrofisiológica utilizada visa o registro da variação de potencial elétrico transmembrana, especificamente o potencial de repouso, o PPMm e o PPM. Deve-se enfatizar que a redução no valor do potencial de repouso (despolarização) é indicativa de alteração na permeabilidade da membrana celular. Alterações na frequência dos PPMm apontam modificações da liberação espontânea de ACh. Já, variações na amplitude do PPM podem indicar alterações da liberação evocada de neurotransmissor, por ação pré sináptica, ou bloqueio dos receptores nicotínicos por ação pós sináptica.

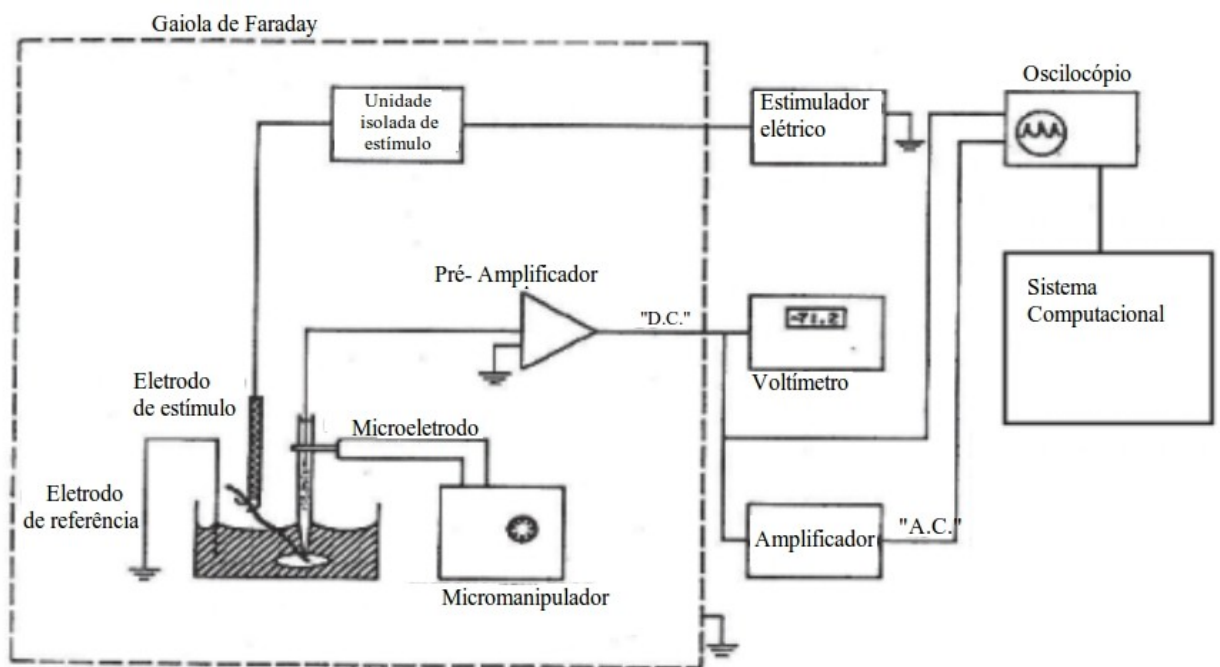
As condições básicas para a realização destes experimentos são as mesmas utilizadas no estudo miográfico. Desta forma, é necessário isolar a preparação biológica e transferir para uma cuba, no caso, a cuba é constituída por uma placa de Petri contendo no centro uma lente plano-convexa de acrílico, fixada ao fundo da placa por meio de parafina, que deve conter solução nutriente submetida a aeração constante, por mistura carbogênica (95 %  $\text{O}_2$  e 5 %  $\text{CO}_2$ ).

Para o registro da atividade bioelétrica, a membrana celular é penetrada por um microeletrodo, com o auxílio de um micromanipulador. A diferença de potencial entre o microeletrodo (inserido intracelularmente) e um eletrodo extracelular de referência, é medida por meio de um pré amplificador de alta impedância de entrada. Os potenciais bioelétricos podem ser inspecionados ou registrados por meio de diferentes equipamentos, como o osciloscópio<sup>[11]</sup>.

Os sinais celulares capturados pelo pré-amplificador são registrados simultaneamente em dois diferentes canais de um osciloscópio: um de acoplamento resistivo (“DC”), utilizado para registrar o potencial de repouso da membrana; e outro de acoplamento capacitivo (“AC”), utilizado para o registro dos PPM<sup>[13]</sup>.

**Osciloscópio** - O osciloscópio é um instrumento de medida que torna possível visualizar uma diferença de potencial elétrico em uma tela ou anteparo através do deslocamento de um ponto luminoso. Esse deslocamento do ponto luminoso é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada entre os terminais ou conectores na entrada desse instrumento. O ponto luminoso pode deslocar-se tanto na vertical quanto na horizontal de modo independente, sendo possível também o deslocamento simultâneo (composição de movimentos)<sup>[14]</sup>. É importante notar que o osciloscópio é um dos instrumentos mais utilizados para testes de circuitos eletrônicos, uma vez que nos permite visualizar a evolução de uma diferença de potencial em função do tempo ou de uma outra diferença de potencial, em qualquer ponto de um circuito<sup>[15]</sup>.

Vale ressaltar que o sistema de registro eletrofisiológico é mantido no interior de uma Gaiola de Faraday, que funciona como uma blindagem elétrica e impede a entrada de perturbações produzidas por campos elétricos e/ou eletromagnéticos externos, reduzindo a interferência elétrica do ambiente e permitindo um registro acurado dos sinais bioelétricos.



**Figura 7:** Ilustração esquemática de uma aparelhagem utilizada em registros eletrofisiológicos.

### 3) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - DE LUCIA, R., OLIVEIRA-FILHO, R M. Farmacologia integrada. 3ª ed. Revinter, 2007. 678p.
- 2 - GUYTON, A., HALL, J. Tratado de Fisiologia Médica. 12ª ed. Elsevier, 2012. 1176p.
- 3 – KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica e Clínica. 12ª ed. The Mcgraw Hill, 2014. 1242p.
- 4 - RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., GARDNER, P. Farmacologia. 8ª ed. Elsevier, 2016. 784p.
- 5 - SHERWOOD,L. Fisiologia Humana – das células aos sistemas.7ª ed. Cengage Learning. 845p.
- 6 - OKUNO, E., CALDAS, I.L., CHOW, C. Física para Ciências Biológicas e Biomédicas. Harbra, 1986. 490p.
- 7 - COSTANZO, L.S. Fisiologia. 4ª ed. Elsevier, 2011. 512p.
- 8 - Bowman, W.C., Rand, M.J. Striated muscle and neuromuscular transmission. In: Textbook of pharmacology. 2ª ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p.17.1-15.56. 1980.
- 9 - SEIDEL, A.R. Instrumentação Aplicada - Disponível em:  
<[http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos\\_automacao/setima\\_etapa/instrumentacao\\_aplicada\\_2012.pdf](http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos_automacao/setima_etapa/instrumentacao_aplicada_2012.pdf)>. Acesso em 14/03/16.
- 10 - PORTNOI, M. Extensometria: história, usos e aparelhos - Disponível em:  
<<https://www.eecis.udel.edu/~portnoi/academic/academic-files/extensometria.html>>. Acesso em 10/03/16.
- 11 - SOUZA, A.C.F. Análise do comportamento da velocidade de condução do potencial de ação em exercício isocinético com produção de fadiga muscular. Brasília, 2013.
- 12 - OLIVEIRA, A.C., GALLACCI, M. Transmissão Neuromuscular Esquelética. Aspectos morfológicos, fisiológicos e farmacológicos p. 121-159. In: ASSIS, J.L. Miastenia Grave. Sarvier, 1990.
- 13 - Salvador, G.H.M., CAVALCANTE, W.L.G, DOS SANTOS, J.I., GALLACI, M., SOARES A.M, FONTES, M.R.M. Structural and functional studies with mytoxin II from Bothrops moojeni reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A2-like Toxicon, 2013.

14 - Oliveira, N.B. Osciloscópio de raios catódicos – I. 2013 - Disponível em: <<http://www.fis.ufba.br/dfes/fis4/Fis124-Exp9a.pdf>>. Acesso em 21/04/16.

15 - Alves, M.F. ABC do osciloscópio. 2ª ed. Março de 1998.

16 - Cox B.C., Marritt A.M., Perry D.C., Kellar K.J. Transport of multiple nicotinic acetylcholine receptors in the rat optic nerve: high densities of receptors containing  $\alpha 6$  and  $\beta 3$  subunits. J Neurochem. 2008;105(5):1924-38.

17 - Tipler, P. Física Para Cientistas e Engenheiros - Volume 2. 6ª ed. LTC, 2009. 556p.

## 4) PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

O aprendizado das técnicas desenvolvidas no laboratório permitiu minha participação em um grande projeto envolvendo a caracterização neurotóxica e miotóxica da crotoxina, principal fração do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Assim, além de colaborar na realização do estudo miográfico *in vitro* da crotoxina, desenvolvi todo o estudo morfológico, visando caracterizar a miotoxicidade local e sistêmica causada por essa toxina. Os resultados desse estudo serão apresentados a seguir.

### 4.1) INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos são frequentes em regiões tropicais e subtropicais, onde representam um sério problema de saúde pública, podendo ocasionar a morte ou deixar sequelas irreversíveis nas vítimas. No Brasil, são notificados aproximadamente 29.000 casos de envenenamentos ofídicos por ano (Ministério da Saúde, 2012), sendo que quatro são os gêneros de serpentes envolvidos nestes acidentes. O gênero *Bothrops* é o principal deles, seguido pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. As serpentes do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, são terrestres, robustas e pouco ágeis. Uma característica marcante destas serpentes é que são facilmente identificadas por apresentarem uma estrutura, na extremidade caudal, que mimetiza um “guizo” ou “chocalho”. No Brasil, é encontrada apenas a espécie *Crotalus durissus*, que apresenta várias subespécies como a *C.d. terrificus*, *C.d. cascavella*, *C.d. ruruima* e *C.d. collilineatus* (Santoro et al., 1999). Essas serpentes habitam os cerrados do Brasil central, as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste e áreas do Sul, Sudeste e Norte. (Melgarejo, 2003)

A crotoxina (CTX) é a principal fração tóxica do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel Sul Americana), correspondendo a cerca de 65% do conteúdo proteico do veneno (Slotta & Frankel-Conrat, 1938). Esta proteína é composta por uma subunidade básica, com atividade fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e por uma subunidade ácida não-enzimática denominada crotapotina (Breithaupt et al., 1974). As duas subunidades atuam em sinergismo, visto que, isoladamente, a PLA<sub>2</sub> é pouco tóxica e a crotapotina é atóxica (Bon et al., 1979).

A crotoxina é classificada como uma neurotoxina miotóxica (Lomonte et al. 2003). Um dos principais sítios de ação desta proteína é a junção neuromuscular, onde promove bloqueio do processo de neurotransmissão e paralisia da musculatura esquelética (Vital

Brazil., 1966; Breithaupt et al., 1974, Gallacci et al, 2000). Associada a esta ação, a crotoxina induz intensa mionecrose sistêmica, que é caracterizada por liberação de mioglobina no sangue (rabdomiólise), a qual pode precipitar a necrose renal aguda (Azevedo-Marques et al., 1982; Gutiérrez et al., 2008).

O avanço no conhecimento das atividades biológicas da crotoxina revelou seu potencial valor terapêutico devido a ações antiinflamatória, antimicrobiana, analgésica e antitumoral (Sampaio et al., 2010). Entretanto, a sua aplicabilidade clínica é limitada pelo estabelecimento de efeitos colaterais advindos de suas atividades tóxicas. Estudos experimentais e clínicos de fase I revelam que os efeitos colaterais mais comuns após a administração subcrônica de doses toleráveis de crotoxina são diplopia, nistagmo e ptose palpebral transitórios e aumento de creatina quinase plasmática, indicador de mionecrose.

Assim, para assegurar a possível aplicabilidade terapêutica da CTX ou de novas drogas derivadas desta proteína, torna-se fundamental a caracterização de suas atividades neurotóxica e miotóxica após administrações repetidas.

## 4.2) OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo específico avaliar as consequências da administração subaguda de doses baixas de crotoxina sobre a estrutura da musculatura esquelética de camundongos, através de microscopia óptica e eletrônica. Para distinguir a atividade miotóxica sistêmica da local serão investigados as ações da crotoxina sobre o músculo gastrocnêmio (sítio de aplicação da crotoxina, portanto ação local) e músculo diafragma (possível alvo da ação sistêmica).

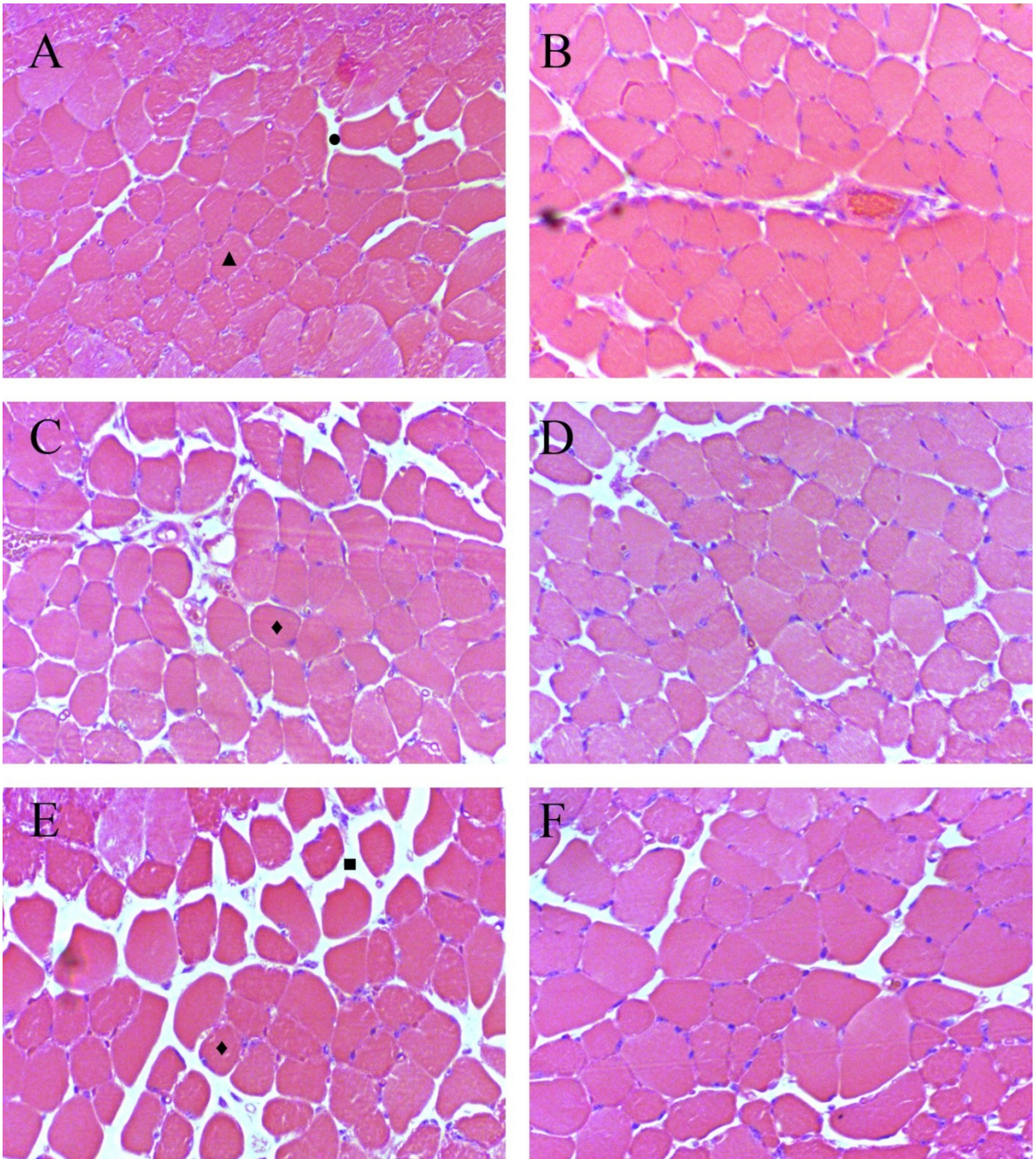
### 4.3) METODOLOGIA

Foram utilizados camundongos Swiss (40g), machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp, campus de Botucatu. Os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu e mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (12/12 h). Os animais foram agrupados da seguinte forma: Grupo Controle (CTL); Grupos Crotoxina (CTX5) e (CTX 10). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA/IBB/UNESP – 680). A crotoxina (CTX), purificada e liofilizada, foi fornecida pelo Dr. Walter Luis Garrido Cavalcante – Pós-doutorando do Departamento de Física e Biofísica, IBB, UNESP. Todas as drogas e reagentes foram de qualidade pró-análise. Os animais dos grupos CTL, CTX5 e CTX10 foram tratados, respectivamente, com a administração intramuscular de solução salina (50µl), crotoxina (5 µg em 50µl de salina) e (10 µg em 50µl de salina) por 14 dias consecutivos. Em cada grupo experimental, as administrações foram efetuadas, no músculo gastrocnêmio da pata direita. Os animais foram sacrificados no 15º e no 21º dias após o tratamento para a realização do estudo morfológico dos músculos. O camundongo foi sacrificado por deslocamento cervical e exanguinado por secção dos grandes vasos cervicais. Após toracotomia ampla, os músculos diafragma e gastrocnêmio foram removidos e tratados adequadamente para a realização do estudo morfológico específico. Para realizar a microscopia óptica fragmentos dos músculos foram tratados com solução de Bouin e fixados em historesina. Cortes transversais de 3µm de espessura, obtidos em micrótomo e submetidos a coloração hematoxilina e eosina (coloração HE), foram utilizados para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares através do sistema de análise de imagens computadorizado (Qwin, Leica Germany). Em cada músculo foram analisados cinco campos microscópicos diferentes. Para a microscopia eletrônica, pequenos fragmentos dos músculos foram coletados e imersos em glutaraldeído a 2,5%, em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) para processamento e análise ultraestrutural, conforme a técnica utilizada no Centro de Microscopia Eletrônica IB - UNESP- Botucatu.

## 4.4) RESULTADOS

### 4.4.1) Microscopia óptica do músculo diafragma

Os animais do grupo controle, tratados com salina durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 15° e 21° dia, apresentaram fibras musculares com aparência normal, com núcleo periférico e formato poligonal, porém notou-se a presença de discreto edema entre as fibras musculares (Figuras 8A e 8B). Os animais tratados com a crotoxina, na concentração 5 e 10 µg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos e sacrificados nos 15° e 21° dia, apresentaram algumas células com aspecto arredondado e edema entre as fibras musculares, que apesar de discreto, foi mais evidente do que o observado nas preparações controle (Figuras 8C, 8D, 8E e 8F). Todavia, como ilustrado nestas figuras, não foram constatadas diferenças entre as preparações quando as avaliações foram realizadas após um dia (15° dia) e após uma semana da interrupção do tratamento (21° dia).

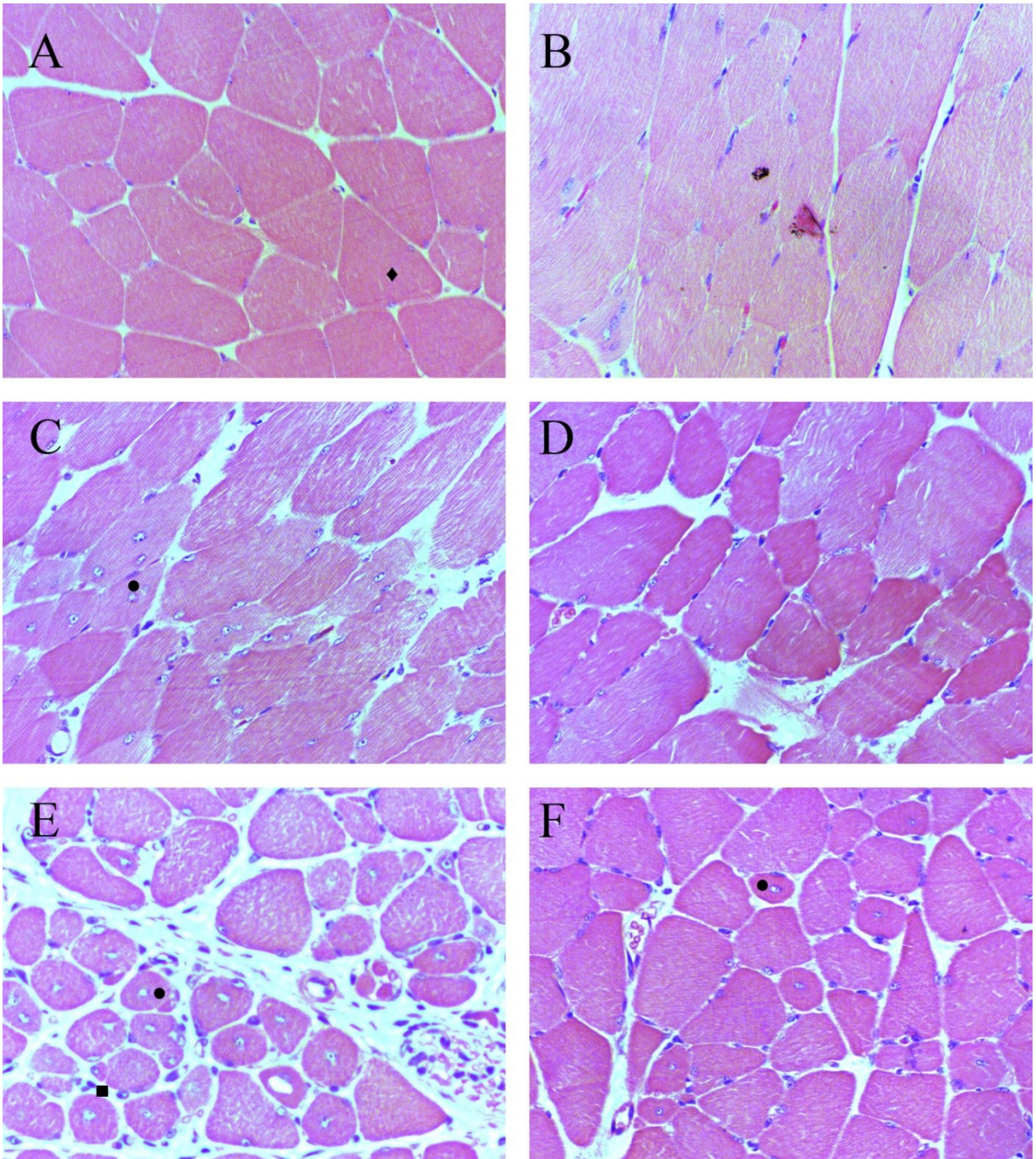


**Figura 8: Microscopia óptica do músculo diafragma em cortes transversais.** A: CTL 15; B: CTL 21; C: CTX 5 15; D: CTX 5 21; E: CTX 10 15; F: CTX 10 21. ▲ Célula com aspecto normal; ● Discreto edema entre as fibras musculares; ■ Edema; ◆ Célula com aspecto arredondado.

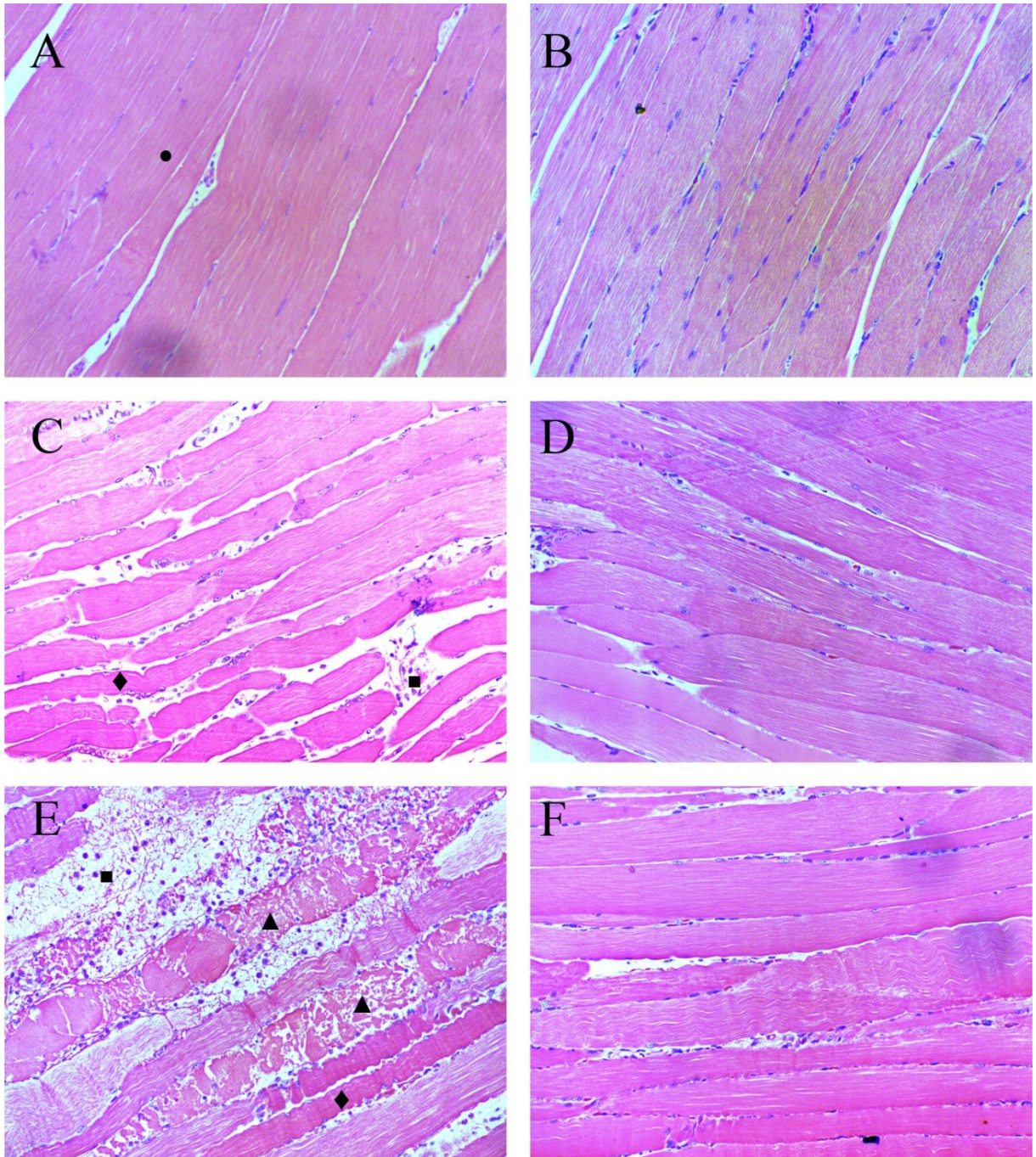
#### 4.4.2) Microscopia óptica do músculo gastrocnêmio

As preparações do grupo controle, tratados com salina durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 15° e 21° dia, apresentam como característica geral edema discreto e poucas fibras musculares com hipercontração (Figuras 9A, 10A, 9B e 10B).

As preparações dos animais tratados com a crotoxina na dose 5 µg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 15° dia, apresentaram as mesmas características do grupo controle como edema discreto e células com hipercontração, porém notou-se a presença de um grande número de células com núcleo central e algumas com infiltrado infamatório (Figuras 9C e 10C). As preparações dos animais tratados com a mesma dose de 5 µg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos e sacrificados no 21° dia, apresentam as mesmas características dos animais sacrificados no 15° dia, porém observou-se diminuição do infiltrado infamatório (Figuras 9D e 10D). Já, as preparações dos animais que receberam a maior dose de crotoxina (10 µg/kg/dia) e foram sacrificados no 15° dia, apresentaram alterações mais evidentes, como edema, hipercontração, núcleo central, infiltrado infamatório (fagocitose), áreas destituídas de miofibrila e presença de algumas células fantasmas, caracterizando o estabelecimento da mionecrose (Figuras 9E e 10E). Os animais que receberam a mesma dose de crotoxina (10 µg/kg/dia) e foram sacrificados no 21° dia apresentaram edema, hipercontração e infiltrado inflamatório menos evidentes; não foram constatadas evidências da mionecrose. Em contraste, notou-se um grande número de células com núcleo central, indicando a instalação do processo de regeneração (Figuras 9F e 10F).



**Figura 9: Microscopia óptica do músculo gastrocnêmio em cortes transversais.** A: CTL 15; B: CTL 21; C: CTX 5 15; D: CTX 5 21; E: CTX 10 15; F: CTX 10 21. ♦ Célula com aspecto normal; ● Célula com núcleo central; ■ Infiltrado inflamatório.



**Figura 10: Microscopia óptica do músculo gastrocnêmio em cortes longitudinais.** A: CTL 15; B: CTL 21; C: CTX 5 15; D: CTX 5 21; E: CTX 10 15; F: CTX 10 21. ● Célula com aspecto normal; ■ Infiltrado inflamatório; ◆ Célula com hipercontração; ▲ Área destituída de miofibrila;

#### 4.5) DISCUSSÃO

A miotoxicidade sistêmica é característica de envenenamentos por serpentes marinhas, terrestres elapídeas e algumas espécies viperídeas, tais como a subespécie da cascavel *Crotalus durissus terrificus* da América do Sul (Azevedo-Marques et al, 1987; Warrell, 1996; Branco, 1995). Além da lesão local, o envenenamento crotálico é caracterizado por dor em sítios distantes da região da mordedura. O efeito miotóxico sistêmico do veneno da *Crotalus durissus terrificus* foi demonstrado pela primeira vez por Azevedo-Marques et al.(1987) pela observação de mionecrose na perna contralateral ao sítio da mordedura de uma criança acidentada. A mionecrose sistêmica induzida por venenos e toxinas crotálicas foi subsequentemente caracterizada por Salvini et al, (2001), pela presença de fibras lesadas em vários músculos distantes do local da administração. Estudos de toxicidade subcrônica da crotoxina (administrada por 30 dias consecutivos) em cães beagle revelaram um aumento transitório da creatina quinase (CK) plasmática, marcador de mionecrose, cujo o pico ocorreu no 6º dia de tratamento e foi subsequentemente reduzido a partir do 20º dia, apesar da continuidade do tratamento Cura et al, (2002). Tais resultados indicam a reversibilidade da mionecrose e o estabelecimento de tolerância ao efeito miotóxico da crotoxina.

No presente trabalho, as administrações de crotoxina foram efetuadas no músculo gastrocnêmio e para a avaliação do efeito sistêmico o alvo utilizado foi o músculo diafragma. Todavia, os nossos resultados indicam que não houve o estabelecimento de um efeito miotóxico sistêmico, uma vez que não foram constatadas alterações evidentes das preparações musculares, provavelmente como consequência das baixas doses de crotoxina utilizadas. A mionecrose local foi avaliada diretamente no músculo gastrocnêmio, que constituiu o sítio de administração da crotoxina. Neste caso, observou-se que o efeito foi dose-dependente, ou seja, os sinais de danos musculares como, edema, células com hipercontração, células com núcleo central e infiltrado inflamatório, foram mais evidentes nos animais que receberam a maior dose de crotoxina (10 µg/kg/dia). Características semelhantes foram reportadas previamente quando da administração intramuscular da crotoxina (Gopalakrishnakone et al., 1984; Salvini et al., 2001). Os nossos resultados mostraram ainda que o efeito miotóxico consequente à administração subaguda da crotoxina é reversível, pois uma semana após a interrupção do tratamento as evidências de mionecrose foram atenuadas. Além do mais, houve indicação de processo de regeneração, caracterizado pela presença de células com núcleos centrais, como classicamente reportado para esta toxina (Gopalakrishnakone et al., 1984; Salvini et al., 2001) e para outras miotoxinas (DUOHEN et al, 1974;. Harris et al., 1980), que

não afetam a integridade da lâmina basal e dos vasos sanguíneos (Gopalakrishnakone et al., 1984).

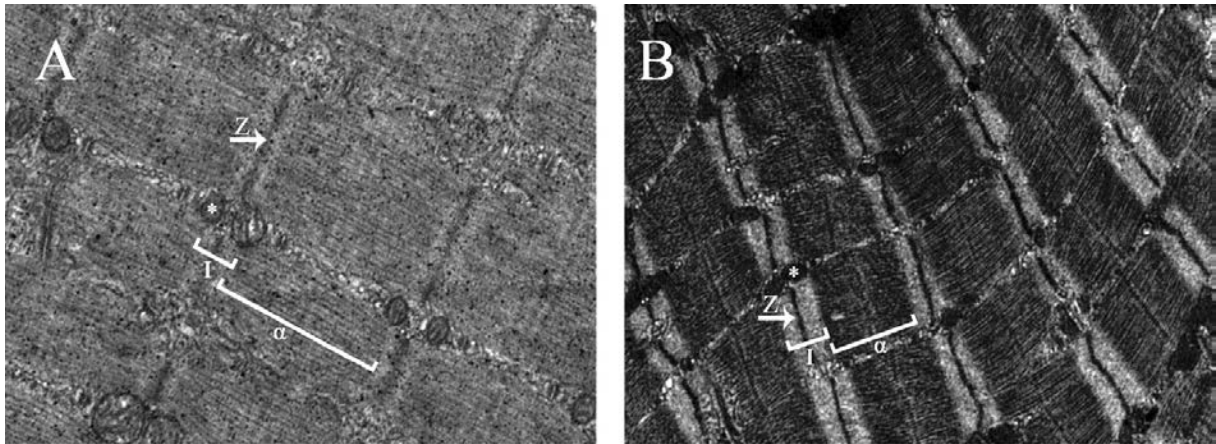
Embora os mecanismos subjacentes à mionecrose induzida pela crotoxina não estejam totalmente esclarecidos, há evidências de que este processo seja consequência da perda progressiva da integridade do sarcolema devido à hidrólise de fosfolipídios. Esta alteração inicial levaria à perda do gradiente iônico com consequente influxo de cálcio para o meio intracelular e a ativação de proteases e fosfolipases cálcio-dependentes, ampliando a lesão celular (Gopalakrishnakone et al., 1984).

#### 4.6) CONCLUSÃO

Em suma, os resultados do estudo de microscopia óptica indicam que a administração subaguda de crotoxina (10 µg/kg/dia) durante 14 dias causa uma discreta mionecrose local, reversível em uma semana, porém não induz mionecrose sistêmica detectável.

#### 4.7) OBSERVAÇÃO

O estudo de microscopia eletrônica, realizado na preparação do músculo gastrocnêmio, para avaliar o efeito local da toxina foi desenvolvido integralmente. Para a análise, foram utilizados 12 animais tratados com crotoxina na dose de 10 µg/kg/dia e sacrificados no 15º e 21º dias, sendo 6 animais do grupo controle e 6 tratados com a toxina. Estas amostras foram coletadas e encaminhadas para o Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu. Contudo, houve problemas no processamento das amostras e apenas algumas preparações dos grupos controle e tratados com crotoxina e sacrificados no 15º dia apresentaram qualidade de imagem razoáveis. Porém, como ilustrado na figura 11, a análise destas amostras não revelou diferenças estruturais significativas entre os grupos. Ressaltamos também que, no período, houve uma paralisação no Centro de Microscopia Eletrônica, devido a quebra do microscópio, e não houve tempo hábil para repetir o experimento e realizar outras análises. Sendo assim, os resultados apresentados são preliminares e não conclusivos, sendo necessário a realização de novo estudo de microscopia eletrônica para submeter o artigo à publicação.



**Figura 11: Microscopia eletrônica do músculo gastrocnêmio.** A: CTL 15; B: CTX 10 15. \*: mitocôndria;  $\alpha$ : banda A; I: banda I; Z: linha Z;

#### 4.8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, p. 631-636, 1982.

BON, C.; CHANGEAUX, J. P.; JENG, T. W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, v. 99, p. 471-481, 1979.

BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. **Eur. J. Biochem.**, v. 49, p. 333-345, 1974.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. 1946. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, n. 4, p. 3-26, 1997.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, S. F. O.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CHANG, C. C.; LEE, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like beta-bungarotoxin. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 296, n. 2, p. 159-168, 1977.

GALLACCI, M.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J.R.; VASSILIEFF V.S. Influence of temperature upon effects of crotoxin and gamma-irradiated crotoxin at rat neuromuscular transmission. **Toxicol Lett.** 2000 Apr 3;114(1-3):77- 80.

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 80-92, 2008.

KLAASSEN, C. D.; CASARETT, L. J.; DOULL, J. : the basic science of poisons. 8. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2013.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; CALDERÓN, L. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.

SLOTTA, C. H.; FRAENKEL-CONRAT, M. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v. 12, p. 505-513, 1938.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1989.

## Apêndice

### Resumos publicados em anais de congressos

Pasqueta, J., Brito, L.S., Cavalcante, W.L.G., Castro P.A.T.S., Dal Pai M., Gallacci, M. Efeitos da administração crônica de crotoxina sobre a margem de segurança da transmissão neuromuscular de camundongos. In: 67º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Carlos – SP/Brasil. 12 a 18 de julho de 2015

Pasqueta, J., Brito, L.S., Cavalcante, W.L.G., Castro P.A.T.S., Dal Pai M., Gallacci, M. Adaptação da junção neuromuscular à administração crônica da crotoxina: aspectos funcionais e morfológicos. In: XX Congresso Brasileiro de Física Médica, Rio de Janeiro – RJ/Brasil, 12 a 15 de agosto de 2015

Pasqueta, J., Brito, L.S., Cavalcante, W.L.G., Castro P.A.T.S., Dal Pai M., Gallacci, M. Efeitos da crotoxina sobre a margem de segurança da transmissão neuromuscular e a expressão gênica de receptores nicotínicos. In. XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Botucatu, 31 de agosto a 01 de setembro de 2015.