

# ACÇÃO NEURO-MUSCULAR DO VENENO CROTÁLICO

## DADOS PRELIMINARES

MARIA DORVALINA SILVA\*, LUIZ ANTÔNIO L. RESÊNDE\*\*, ANETE KIMUNI UEDA\*\*\*,  
BENEDITO BARRAVIERA\*\*\*\*, R. P. MENDES\*\*\*\*\*, MÁRIO RUBENS G. MONTENEGRO\*\*\*\*\*

---

**RESUMO** - Estudamos 6 pacientes, 2 cães e um coelho com intoxicação crotálica. Avaliamos a condução nervosa periférica sensitiva e motora, a transmissão neuro-muscular e eletromiografias. As biópsias de músculo foram processadas por histoquímica. Os 6 pacientes apresentaram mononeuropatia sensitiva no nervo periférico adjacente ao local da inoculação do veneno e encontramos evidências histoquímicas de miopatia mitocondrial. Os defeitos da transmissão neuro-muscular foram mínimos. A maioria dos autores admite que veneno crotálico determina síndrome miastênica. Nossos achados indicam que ptose palpebral, facies miastênico e fraqueza muscular observados após acidente crotálico, correspondem provavelmente a miopatia mitocondrial, muitas vezes transitória e reversível.

**PALAVRAS-CHAVE:** veneno crotálico, mononeuropatia sensitiva, miopatia mitocondrial.

### **Neuromuscular action of crotalid venom: preliminar data**

**ABSTRACT** - We studied 6 patients and 2 dogs that have been bitten by South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* and one rabbit inoculated with crotalid venom. We analyzed sensory and motor peripheral nerve conduction, repetitive stimulation for studying neuromuscular transmission and electromyographies. Muscle biopsies were processed by histochemistry. All patients had peripheral mononeuropathy of the closest sensitive nerve to the area of snakebite. The neuromuscular transmission alterations were minimal. Muscle histochemistry of 4 patients, 2 dogs and 1 rabbit showed findings of mitochondrial myopathy. The majority of authors admit that crotalid venom causes myastenic syndrome. Our findings suggest that palpebral ptosis, myastenic facies and muscular weakness observed after crotalid poisoning are, probably, due to transient and reversible mitochondrial myopathy. As far as we know, this is the first report on the ability of the venom of this rattlesnake to cause local sensitive mononeuropathy and the first muscle histochemistry showing mitochondrial myopathy in humans poisoned by crotalid venom.

**KEY WORDS:** crotalid venom, sensory mononeuropathy, mitochondrial myopathy.

---

No Brasil, acidentes causados por cascavel são de grande importância devido à sua elevada prevalência em determinadas regiões<sup>3,4</sup>. Comumente originam quadros clínicos graves, às vezes

---

Estudo realizado nos Departamentos de Neurologia, Moléstias Infecciosas e Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP: \*Médica Assistente do Setor de Eletro-neuromiografia; \*\*Professor Assistente-Doutor de Neurologia; \*\*\*\*Professor Adjunto de Moléstias Infecciosas; \*\*\*\*\* Professor Titular de Moléstias Infecciosas; \*\*\*Professora Assistente-Doutora e \*\*\*\*\*Professor Emérito de Patologia. Aceite: 19-setembro-1995.

Dr. Luís Antônio de Lima Resende - Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - 18618-000 Botucatu SP - Brasil.

fatais, acometendo indivíduos na fase produtiva da vida. O veneno crotálico apresenta efeitos tóxicos sobre a coagulação sanguínea<sup>19</sup>, rins<sup>16</sup>, fígado<sup>5</sup>, coração<sup>26</sup> e sistema neuro-muscular<sup>1,18,22</sup>. As pesquisas existentes sobre a ação neuro-miotóxica deste veneno são, em sua maioria, experimentais<sup>6,14,17,21,23,27-29</sup>. Na literatura consultada sobre acidentes crotálicos em humanos, os estudos eletrofisiológicos da condução nervosa periférica, da transmissão neuro-muscular e histoquímica de músculo são raros<sup>12,18</sup>.

Neste estudo documentamos, pela primeira vez, uma mononeuropatia sensitiva decorrente do efeito tóxico local do veneno da cascavel e, que seja de nosso conhecimento, também é a primeira vez que se documenta, em seres humanos, através da histoquímica, uma miopatia mitocondrial relacionada à intoxicação crotálica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Casos clínicos

Estudamos 6 pacientes picados por *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) admitidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de junho-1993 a março-1995, após aprovação do plano de pesquisa pela Comissão de Ética. Incluímos pacientes em condições clínicas estáveis, respiração espontânea, sem catéteres endovenosos, que autorizaram os estudos após esclarecimentos minuciosos. Estudamos 2 cães vítimas de acidente crotálico, atendidos no Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu, após consentimento dos proprietários. Um coelho de 30 dias foi inoculado com 10 microgramas/Kg de peso do veneno, por via subcutânea. Nos 9 casos descritos as serpentes foram identificadas como *Crotalus durissus terrificus*. Nos pacientes humanos determinamos, diariamente, os níveis séricos de creatino-fosfoquinase (CPK), desidrogenase láctica (DHL) e transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO), nos 5 primeiros dias após os acidentes.

### Estudos eletrofisiológicos

Os pacientes humanos foram submetidos a avaliações eletroneuromiográficas (ENMG) em aparelho Nihon Kohden de 2 canais modelo Neuropack 2000, num intervalo de 24 a 72 horas após a inoculação do veneno. Estudamos a condução sensitiva por técnica antidrômica, com eletrodos de anel (membros superiores) e eletrodos de superfície (membros inferiores), avaliando os 4 membros, procurando comparar nervos homólogos de modo simétrico. Estudamos a condução motora em pelo menos três membros, com eletrodos de superfície. Ondas F foram obtidas em todos os nervos motores estudados. Fizemos estimulações repetitivas a 3, 15 e 20 Hz em pelo menos um nervo motor, com estímulo elétrico 20% superior ao estímulo supra-máximo. Realizamos eletromiografias dos músculos *deltoideus* e *tibialis anterior* com eletrodos co-axiais. Todas as técnicas eletrofisiológicas foram feitas de acordo com Kimura<sup>20</sup>.

### Estudos histopatológicos

Três pacientes foram biopsiados no músculo *biceps brachii* direito (em locais não adjacentes às picadas) e um no músculo *tibialis anterior* (em local próximo à inoculação), com intervalo de 4 a 9 dias após os acidentes. As demais vítimas não concordaram com o procedimento. Os cães e o coelho foram biopsiados no *tibialis anterior* direito, em locais distantes das picadas, 2 dias após a intoxicação. A distância ou proximidade da biópsia relacionada à picada foi proposital. As amostras de músculo medindo aproximadamente 0,2 x 0,5 cm foram congeladas em n-hexana resfriada com nitrogênio líquido a -70°C e transferidas para câmara de criostato (International Equipment Company) a -20°C, onde ficaram por 40 minutos. A seguir foram fixadas em suporte metálico com Tissue-Tek-OCT. Cortes de 6 a 8 micra de espessura foram estudados de acordo com as seguintes técnicas histológicas e histoquímicas, descritas por Dubowitz<sup>11</sup>: hematoxilina-eosina (HE), tricômico de Gomori modificado, miosina ATP ase após pré-incubação em pH 9,4, 4,6 e 4,3, NADH-TR, desidrogenase succínica (SDH), esterase inespecífica, oil-red-O, PAS e fosfatase alcalina.

Os estudos eletrofisiológicos e histopatológicos foram realizados após administração do soro anti-ofídico aos pacientes e aos cães.

## RESULTADOS

Todos os pacientes eram brancos, do sexo masculino. Quatro foram picados em membros inferiores e 2 em membros superiores. O Caso II apresentava, anteriormente à picada, hipostasia bilateral de

membros inferiores de predomínio distal, mas no local da inoculação, referiu anestesia. O Caso VI apresentou quadro ENMG de radiculopatia C5 direita antiga. Sonolência, ptose palpebral, oftalmoparesia e diminuição da força muscular foram as alterações clínicas mais significativas nos humanos.

Os achados mais característicos nos cães foram oftalmoplegia, midríase bilateral e acentuada diminuição de força muscular. No coelho, sonolência e oftalmoplegia.

Todos os casos, exceto o coelho, apresentaram urina escura. Os níveis séricos mais elevados de CPK e TGO ocorreram aproximadamente 24 horas após os acidentes. Os níveis de DHL atingiram o pico em torno de 96 horas. Somente o Paciente II desenvolveu insuficiência renal aguda.

Os dados clínicos e laboratoriais dos 6 pacientes e 2 cães estão resumidos na Tabela 1.

Os estudos da condução sensitiva revelaram, em todos os pacientes, uma mononeuropatia localizada no nervo sensitivo mais próximo ao local da inoculação do veneno (Fig 1A, B e Tabela 2). O Paciente II era portador de uma polineuropatia axonal, provavelmente secundária a alcoolismo crônico e exposição a agrotóxicos. Mesmo assim, o comprometimento do nervo sensitivo mais próximo do local da picada, foi maior que o de outros nervos.

Os estudos da condução motora, onda F e estimulação repetitiva a 3 Hz foram normais em todos os casos. A 15 e 20 Hz, a estimulação repetitiva demonstrou pseudo-facilitação em todos os pacientes (Fig 1C) e facilitação verdadeira, discreta, nos Casos I e III (Fig. 1D).

A eletromiografia revelou aumento da atividade de inserção no Paciente I, ondas agudas positivas em todos os casos, potenciais de unidades motoras de forma, amplitude, duração e frequência

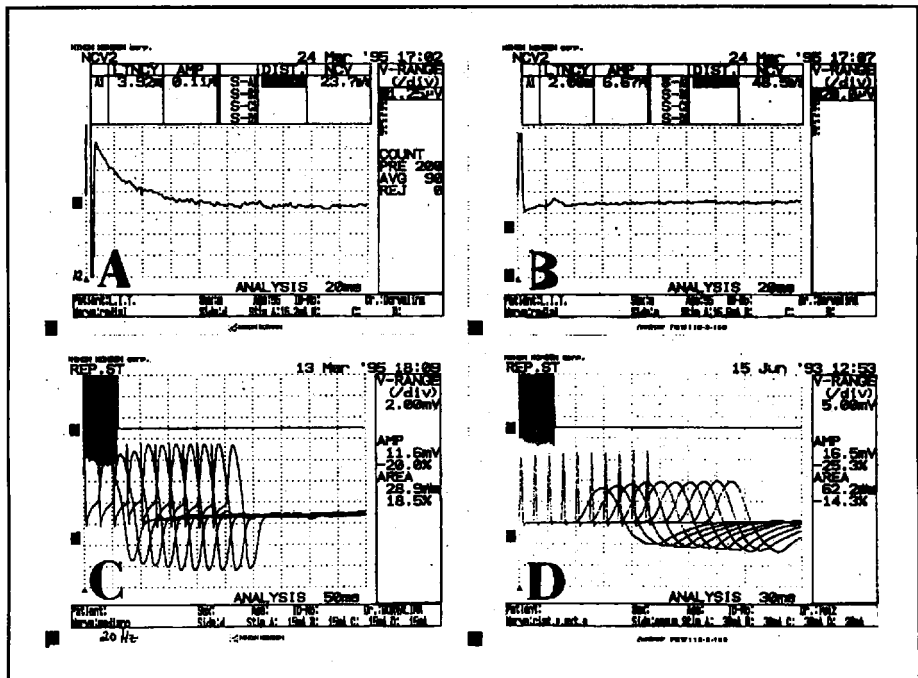
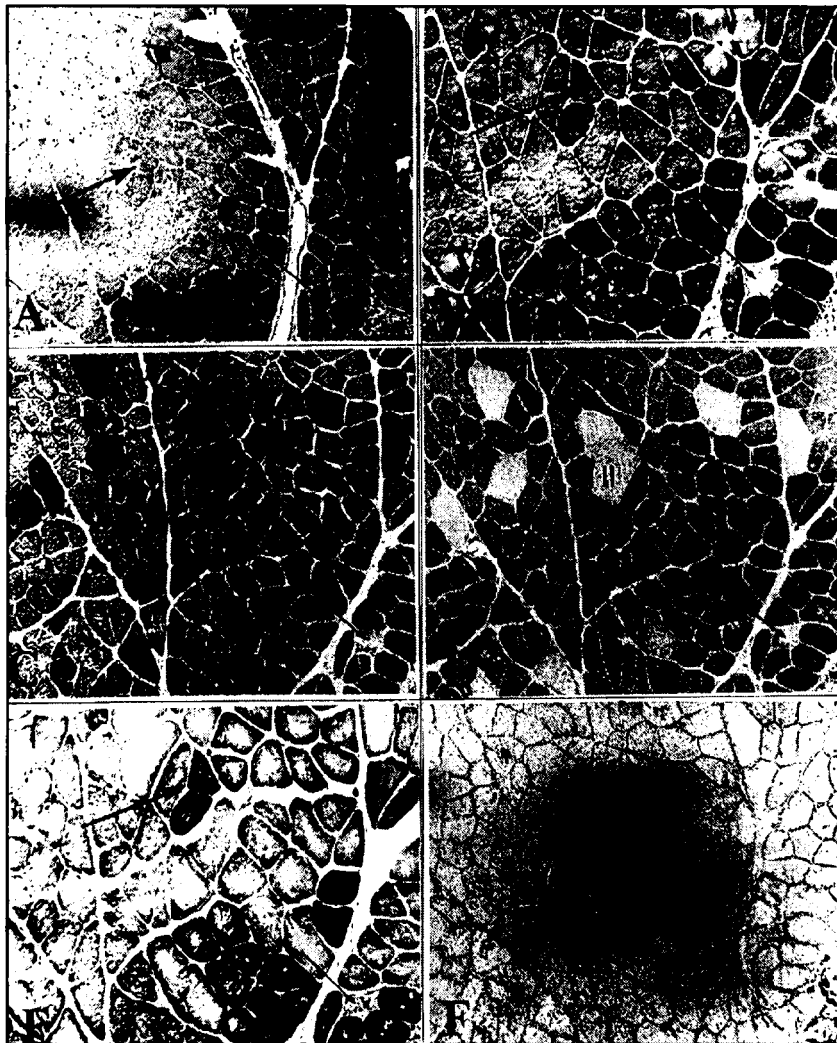


Fig 1. Mononeuropatia do nervo radial direito (A), e nervo radial esquerdo normal (B), em paciente com picada na região dorsal do polegar direito (Caso VI). Pseudo-facilitação (C, Caso V) e facilitação verdadeira (D, Caso I).

de recrutamento normais, com traçado interferencial em todos os casos, exceto nos Pacientes II e VI, que apresentaram traçados neurogênicos devidos a polineuropatia axonal e radiculopatia C5, respectivamente (Tabela 2).

Os achados histopatológicos encontrados nos pacientes, nos cães e no coelho foram semelhantes. Ao HE, observou-se grande variação no diâmetro das fibras musculares, núcleos internos, e fibras necróticas envoltas por discreto infiltrado inflamatório (Fig 2A). Ao tricrômico de Gomori modificado destacaram-se as fibras granulares (ragged-red) (Fig 3). Alterações oxidativas e acúmulo

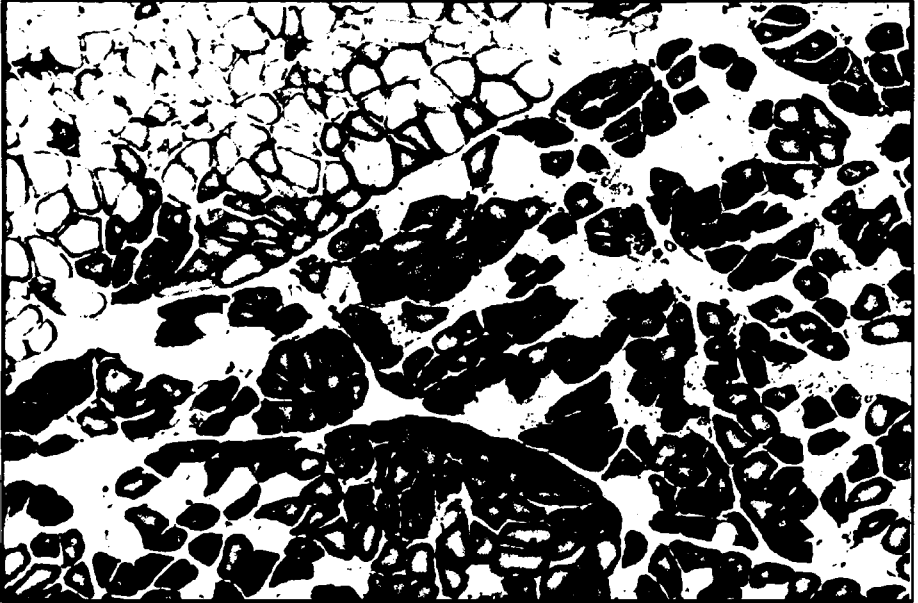


*Fig 2. Mesmos fascículos e fibras musculares numa sequência de reações. A, HE; B, tricrômico de Gomori modificado; C, ATP ase no pH 9,4; D, ATP ase no pH 4,6; E, NADH-TR; F, Oil-red-O. Fibra aparentemente normal no HE (A, seta pequena), mas alterada em outras reações (B,C,D,E). A fibra aparentemente normal (A e B, setas grandes) é do tipo I (C e D), apresenta alterações oxidativas (E) e acúmulo de lipídeos (F). Em E, agrupamento de fibras tipo I com alterações oxidativas (Caso VI).*

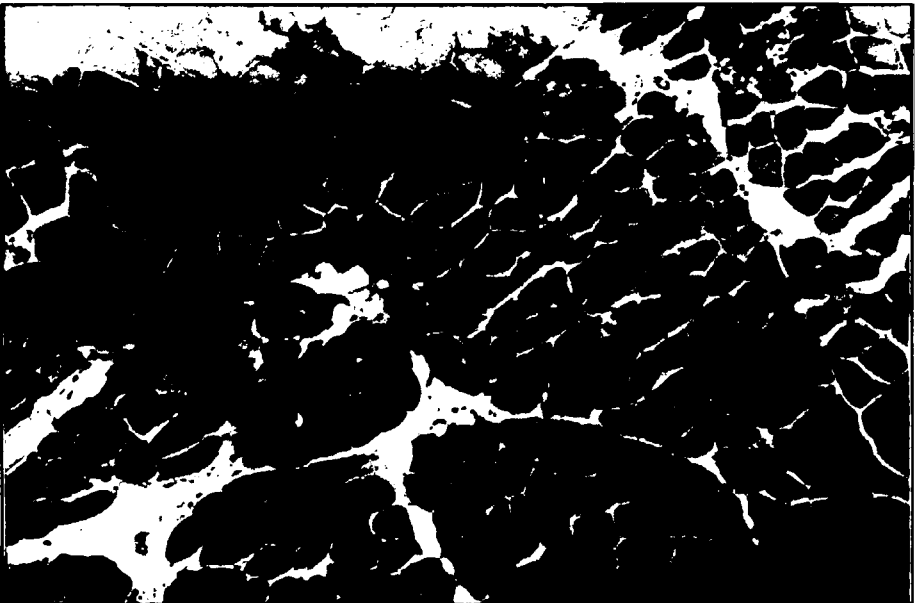
de lipídeos predominaram em fibras do tipo I (Fig. 2 C-F, seta grande). NADH-TR e SDH demonstraram granulações grosseiras e aumento da atividade oxidativa sub-sarcolemal em fibras do tipo I. O Paciente II, portador de polineuropatia periférica crônica, apresentou "type grouping". Isto possibilitou demonstrar, nitidamente, que todas alterações histológicas e histoquímicas predominaram nas fibras do tipo I (Figs 4 e 5).



Fig 3. Tricrômico de Gomori modificado. Presença de fibras granulares (ragged-red). A, Caso VI; B e C caso I; D, coelho.



*Fig 4. NADH-TR. "Type grouping" devido a polineuropatia prévia. Nítida prevalência das alterações oxidativas nos fascículos contendo fibras do tipo I (Caso II).*



*Fig 5. Esterase inespecífica. Mesmos fascículos da Fig 4. Fibras necróticas, do tipo I, positivas à esterase inespecífica.*

*Tabela 1. Achados clínicos e laboratoriais dos 6 pacientes e 2 cães.*

Casos	Idade	Sonolência	Acuidade visual	Midríase	Prose palpebral	Oftalmoparesia	Mialgia	Diminuição de força	Hiporreflexia	Induficiência respiratória	Urina escura	Valores máximos
												CPK DKL TGO (em mg %)
<b>Pacientes humanos</b>												
I	22	+	↓	-	+	+	+	+	+	-	+	16410 1424 389
II	70	+	↓	-	+	+	+	+	+	-	+	21860 2563 1060
III	40	+	↓	+	+	+	+	+	+	-	+	14240 1642 555
IV	15	+	↓	-	+	+	+	+	-	-	+	1444 488 76
V	4	+	↓	+	+	+	+	+	-	+	+	40560 3134 655
VI	55	+	↓	-	+	-	+	+	-	-	+	423 283 35
<b>Cães</b>												
I	1	+	*	+	+	+	*	+	+	-	+	* * *
II	4	+	*	+	+	+	*	+	+	-	+	* * *

+, presente; -, ausente; \*, dados não disponíveis; CPK, creatino-fosfoquinase; DHL, desidrogenase láctica; TGO, transaminase oxaloacética.

Pacientes	Local da Picada	ESTUDOS DAS CONDUÇÕES SENSITIVAS				ELETROMIOGRAFIAS			
		Nervo	Latência	Amplitude	Velocidade	Músculo	Ativ. Inserção	Ondas agudas positivas	Esforoço leve/máximo
I	face medial, metade superior, perna (d)	sural (d)	4,0	10,0	28,5	deltoídeus (d)	↑	+	interferencial
		fibular sup. (d)	4,3	8,0	30,0	tibialis anterior (d)			
		sural (e)	2,9	20,0	40,0				
II	dorso do pé (d)	fibular sup (d)	4,2	2,0	30,1	deltoídeus (d)	normal	+	padrão neurogênico*
		fibular sup (e)	3,8	10,0	39,1	tibialis anterior (d)			
III	face lateral, metade inferior, perna (d)	fibular sup (d)	3,4	1,3	39	deltoídeus (d)	normal	+	interferencial
		fibular sup (e)	3,1	15,0	49,1	tibialis anterior (d)			
		sural (d)	3,2	12,0	44,2				
		sural (e)	3,0	20,0	47,2				
IV	dorso do pé (e)	fibular sup (d)	3,0	18,0	43,4	deltoídeus (d)	normal	+	interferencial
		fibular sup (e)	3,6	2,0	39,4	tibialis anterior (e)			
V	cotovelo (d), região adjacente ao nervo radial	radial (d)	inexcitável			deltoídeus (d)	normal	+	interferencial
		radial (e)	1,3	17,0	51,5				
VI	polegar (d)	radial (d)	3,9	0,1	23,7	deltoídeus (d)	normal	-	padrão neurogênico**
		radial (e)	2,0	7,0	48,5	tibialis anterior (e)	normal	+	interferencial

(d), direito; (e), esquerdo; +, presente; \*, polineuropatia periférica alcoólica prévia. \*\* radiculopatia C<sub>3</sub> prévia. Observar a mononeuropatia sensitiva primariamente axonal nos nervos adjacentes às picadas.



## DISCUSSÃO

Nossos pacientes apresentaram quadros clínicos e laboratoriais típicos de envenenamento crotálico: sonolência, queda da acuidade visual, midríase, ptose palpebral, oftalmoparesia, mialgia, diminuição de força muscular, hiporreflexia profunda, insuficiência respiratória, urina escura e aumento dos valores séricos das enzimas musculares. Midríase e insuficiência respiratória ocorreram somente na criança (Caso V). Cupo e col.<sup>7</sup> descreveram midríase em 9 dentre 10 crianças picadas por Cdt, e insuficiência respiratória ocorreu uma vez numa casuística de 21 crianças<sup>9</sup>.

Os achados clínicos e laboratoriais observados nos cães também foram característicos de envenenamento crotálico.

Na apresentação dos resultados preferimos o termo "urina escura" porque a "hemoglobinúria" descrita por diferentes autores nesta condição clínica, corresponde, na realidade, a mioglobínúria<sup>2</sup>. Em nosso estudo, urina escura e aumento de CPK, DHL e TGO são indicativos da ação miotóxica do veneno crotálico.

É sabido que lavradores, vítimas da cascavel, comumente se queixam de anestesia na região da picada. A mononeuropatia sensitiva que documentamos ao exame ENMG, no nervo mais próximo ao local da inoculação do veneno, é o dado eletrofisiológico correspondente. Ekenbäck e col.<sup>12</sup>, em 1985, descreveram polineuropatia axonal sensitivo-motora num paciente gravemente intoxicado com veneno crotálico, que recebeu soroterapia inespecífica 8 horas após o acidente. Em nossos casos, observamos apenas mononeuropatia sensitiva, talvez porque o tratamento específico fora administrado precocemente. Que seja de nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se demonstra mononeuropatia sensitiva em vítimas de acidente crotálico. Giorgi e col.<sup>13</sup>, em 1993, demonstraram efeito analgésico deste veneno em camundongos, relacionado a sub-frações de baixo peso molecular.

A estimulação repetitiva, em todos os pacientes, a 15 e 20 Hz, demonstrou o fenômeno da pseudo-facilitação, ou seja, aumento da amplitude do potencial composto de unidades motoras (PCUM) sem aumento da área subjacente. Dos 6 pacientes, apenas 2 apresentaram discreto incremento, caracterizado por aumento da amplitude e da área do PCUM. O paciente de Ekenbäck e col.<sup>12</sup> tampouco apresentou alterações eletrofisiológicas à estimulação repetitiva. Este conjunto de dados sugere que, nos casos de intoxicação crotálica, o bloqueio pré-sináptico da transmissão neuro-muscular seja mínimo. Ao contrário do que vem sendo postulado por diferentes autores com bases experimentais<sup>6,17,23,27-29</sup>, acreditamos que a ação pré-sináptica da peçonha da cascavel sobre a transmissão neuro-muscular seja mínima e não contribua de maneira importante para o quadro clínico dos pacientes.

Em 1979, Gopalakrishnakone e col.<sup>14</sup> demonstraram em camundongos, através de microscopia eletrônica, ação da crotoxina sobre mitocôndrias dos terminais nervosos pré-sinápticos e fibras musculares. Mais tarde, também experimentalmente, demonstraram que as mitocôndrias musculares possuíam acúmulos de cálcio e sugeriram que a fosfolipase A<sub>2</sub> (componente da crotoxina), ao agir sobre a membrana da fibra muscular, abriria fendas, que permitiriam o influxo de cálcio para o sarcoplasma. A mitocôndria seria lesada na tentativa de tamponar o excesso de cálcio<sup>10,15</sup>. Shah e col.<sup>25</sup> demonstraram miopatia mitocondrial em ratos intoxicados com crotoxina. As alterações encontradas foram semelhantes às de pacientes com doenças mitocondriais. Observamos fibras granulares no tricrômico de Gomori modificado, predomínio de necrose em fibras do tipo I (especialmente demonstrado no Caso II que apresentou "type grouping"), presença de granulações grosseiras nas fibras do tipo I associadas a acúmulo de atividade oxidativa sub-sarcolemal às reações oxidativas (NADH-TR e SDH) e acúmulo de lipídeos em fibras tipo I (oil-red-O).

Tais achados indicam o comprometimento do metabolismo oxidativo mitocondrial em seres humanos e cães vítimas de acidente crotálico.



15. Gopalakrishnakone P, Dempster DW, Hawgood BJ, Elder HY. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon* 1984; 22:85-98.
16. Hadler WA, Vital-Brazil O. Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. *Mem Inst Butantan* 1966; 33:1001-1008.
17. Hawgood BJ, Smith JW. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotopotin complex isolated from venom of the south american rattlesnake. *Br J Pharmacol* 1977;61:597-606.
18. Jorge MT, Pereira Jr, Júnior WB, Ribeiro LA, Amato-Neto V, Rassi IE, Salem A. Comportamento de enzimas e alterações anátomo-patológicas do músculo esquelético em pacientes picados por serpente do gênero *Crotalus*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1986;19(Supl):29.
19. Kamiguti AS, Cardoso JLC. Haemostatic changes caused by the venoms of south american snakes. *Toxicon* 1989;27:995-963.
20. Kimura J. *Eletrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*. Philadelphia: F A Davis, 1983.
21. Kouyoumdjian JA, Harris JB, Johnson MA. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. *Toxicon* 1986;24:575-583.
22. Magalhães RA, Ribeiro MMF, Resende NA, Amaral CFS. Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*crotalus durissus terrificus*). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1986;28:228-233.
23. Radvanyi F, Saliou B, Lembezat MP, Bon C. Binding of crotoxin, a presynaptic phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin, to negatively charged phospholipid vesicles. *J Neurochem* 1989;53:1252-1260.
24. Rossi MA, Peres LC, Paola F, Cupo P, Hering SE, Azevedo-Marques MM. Electron-microscopic study of systemic myonecrosis due to poisoning by tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in humans. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:169-173.
25. Shah AJ, Sahgal V, Muschler G, Subramani V, Singh H. Morphogenesis of the mitochondrial alterations in muscle diseases. *J Neurol Sci* 1982;55:25-37.
26. Siqueira JE, Higuchi ML, Nabut N, Lose A, Souza JK, Nakashima M. Lesão miocárdica em acidente ofídico pela espécie *Crotalus durissus terrificus* (cascavel): relato de caso. *Arq Bras Card* 1990;54:323-325.
27. Su MJ, Chang CC. Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A<sub>2</sub> activity (beta-bungarotoxin, Taipoxin, crotoxin). *Toxicon* 1984; 22:631-640.
28. Vital Brazil O. Pharmacology of crystalline crotoxin: II. Neuromuscular blocking action. *Mem Inst Butantan* 1966; 33:981-992.
29. Vital Brasil O, Eugênio AGB, Laszlo GM. Origem da paralisia respiratória causada pela crotoxina. *Ciência e Cultura* 1973; 25:1165-1169.