

TATIANE FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS INFLAMATÓRIOS
INDUZIDOS PELO VENENO BRUTO E PELA LMTX-I DE
Lachesis muta muta (SURUCUCU) EM RATOS**

Campinas

2008

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS INFLAMATÓRIOS
INDUZIDOS PELO VENENO BRUTO E PELA LMTX-I DE
Lachesis muta muta (SURUCUCU) EM RATOS**

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci

Campinas

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F413c Ferreira, Tatiane
 Caracterização dos efeitos inflamatórios induzidos pelo veneno
 bruto e pela LmTX-I de *Lachesis muta muta* (Surucucu) em ratos /
 Tatiane Ferreira. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

 Orientadores : Gilberto de Nucci, Ellen Cristina Teizem Landucci
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Venenos de cobras. 2. Permeabilidade vascular. 3.
 Mastócitos. 4. *Lachesis muta muta*. I. Nucci, Gilberto de. II.
 Landucci, Ellen Cristina Teizem. III. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Characterization of inflammatory effects induced by *Lachesis muta muta* venom (Surucucu) and LmTX-I in rats

Keywords: • Snake venom
 • Vascular Permeability
 • Mast cells
 • *Lachesis muta muta*

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci
Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Profa. Dra. Alessandra Linardi

Data da defesa: 18 - 08 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci



Co-Orientadora:

Prof. Dr. Elen Cristina Teizem Landucci



Membros:

Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci



Profa. Dra. Alessandra Linardi



Profa. Dra. Stella Regina Zamuner



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/08/2008



DEDICATÓRIA



*A Deus, por ter me concedido vida e saúde
e por me prover da força necessária para o término de mais uma etapa da minha vida;*

*Ao meu Pai, José Antonio,
que primeiramente me incentivou a buscar o conhecimento e carinhosamente me
acompanhou durante todo esse tempo.*

*À minha querida Mãe, Eriete, que se doou para mim,
com todo seu imenso carinho, que combina a sensibilidade da delicadeza e da
força, elementos decisivos para o arremate destas páginas.
Obrigada por terem renunciado a seus sonhos em favor dos meus!*

*Ao meu irmão que sempre me apoiou em todos os momentos, sempre com muita
paciência;*

*A todos àqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as
grandes realizações.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci, através de quem vim a este departamento, pelo empenho no seu papel de orientadora, pelos ensinamentos, dedicação e amizade. Obrigada por ter me dado a oportunidade e de me colocar em contato com profissionais excepcionais.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pela oportunidade de trabalhar em seu grupo. Todo meu respeito e admiração.

Ao grande amigo e colaborador Emilton Ap. Camargo, pela ajuda, paciência e apoio na idealização e realização do trabalho. Meu eterno e sincero agradecimento. Sinto-me privilegiada por ter tido a oportunidade de lhe conhecer e trabalhar com você.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela colaboração, amizade e oportunidade de aprender e com isso crescer ao longo desses anos.

Aos colaboradores Daniela C. da Silva Damico e Prof. Dr. Sérgio Marangoni do Departamento de Bioquímica da UNICAMP pela ajuda e fornecimento do veneno e da PLA_2 utilizados neste trabalho.

À Profa. Maria Teresa Ribela (IPEN/CENEN – USP) pela colaboração com a marcação da albumina com I^{125} .

À Profa. Dr. Stella Regina Zamuner e à Profa. Dra. Alessandra Linardi pela participação como membros titulares na Banca de Defesa de Tese. Obrigada pela atenção, carinho e conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, à Profa. Dra. Alessandra Linardi, ao Prof. Dr. Fábio Bucharéti, pela participação no exame de qualificação, no qual puderam apresentar valiosas sugestões para revisão deste trabalho.

Aos docentes e pós-graduandos do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do depto de farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, Adilson e Toninho, pela agradável convivência e pelos serviços prestados. E especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva por dispensar tanto cuidado na criação dos ratos.

A todos os amigos do Departamento de Farmacologia, especialmente do laboratório do Prof. Dr. Edson Antunes e Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela convivência e troca de experiência durante todos esses anos.

As grandes amigas Gláucia Coelho de Mello, Nádia Mariano, Ivani de Souza e Adriana Rampazio pela força, ajuda, companheirismo e por terem me ensinado muitas coisas. O dia-a-dia de trabalho sem vocês não teria graça.

Aos grandes amigos que aqui conquistei, em especial, Camila Leite, Luís Gustavo Souza, Fábio Marangoni, Mônica Ruzon, Giovana Gomes, Letícia Lintomem, Lineu Baldissera, Priscila Monteiro, Marina Calixto, Maria Andréia Delbin, Fernando Bau, Mário Ângelo Claudino, Carla Penteado, Cristiane Freitas, Fabíola Mônica. Fernanda Priveiro, Fernanda Datti, Marcelo Datti, Haroldo Flores, Juliana Baracat, Rafael Annovazi, Rafael Prada, Sisi Marcondes, Ricardo Kalaf, Elionai, Cássia Saccon e Renata Scatamburlo. Obrigada pelo maravilhosa convivência.

A toda a minha família, em especial, meu pai José Antonio, minha mãe Eriete e meu irmão Gabriel.

Ao meu querido Júnior, pela paciência, compreensão, apoio e carinho dispensados durante toda a realização do meu trabalho.

Aos meus amigos de longa data, Claudia Melo, Geovana Capovilla, Luciana Casacio, Priscila Paulino, Marina Rodrigues, Carla Melo, Mariângela Zanivan, Ana Carolina Trevisan, Victor Chiari, Filippe Iasen, Jeferson “Chene”, Jeancarlo da Silva, Marcella Tomasi, Ana Fábria Duraes e em especial a Maria Luiza Melo, a saudosa Tia Iza, pelo apoio e alegria que amenizou vários momentos difíceis. Agradeço toda a força e amizade que me dá a certeza de poder contar sempre com vocês!

À UNICAMP, pela oportunidade de crescimento científico e profissional nesta conceituada instituição.

À FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo imprescindível apoio financeiro.

Aos animais, que solicitados pela Ciência, contribuíram involuntariamente com suas vidas em prol desta pesquisa. O meu respeito e a minha gratidão.

OBRIGADA.

*Pedras no caminho? Guardo todas. Um
dia vou construir um castelo!*

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	xv
Lista de materiais.....	xvii
Lista de figuras e tabelas.....	xix
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Lachesis muta muta: classificação, distribuição geográfica e características do envenenamento.....	24
1.2. Epidemiologia	25
1.3. Ações do veneno.....	26
1.4. Inflamação causada por venenos ofídicos	28
1.5. Fosfolipases A₂ (PLA_{2s})	30
1.6. PLA₂ secretórias e o processo inflamatório.....	34
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Animais.....	40
3.2. Obtenção do veneno de L. m. muta.....	40
3.2.1. Purificação da LmTX-I.....	40
3.3. Edema de pata induzido pelo veneno de L. m. muta e LmTX-I em ratos.....	41
3.4. Medida da permeabilidade vascular na pele dorsal de ratos após injeção do veneno de L. m. muta	42
3.4.1. Tratamentos farmacológicos	43
3.5. Desgranulação de mastócitos peritoneais de ratos “in vitro”	44
3.5.1. Purificação de mastócitos peritoneais.....	44
3.5.2. Liberação de histamina de mastócitos peritoneais.....	44
3.6. Análise estatística	45
4. RESULTADOS	47
4.1. Efeito da injeção intraplantar do veneno de L. m. muta	47
4.2. Efeito da injeção intraplantar da LmTX-I.....	49
4.3. Efeito da injeção do veneno de L. m. muta na pele dorsal de ratos	51
4.4. Efeito da injeção da LmTX-I na pele dorsal de ratos	52
4.5. Investigação dos mediadores inflamatórios: tratamentos farmacológicos.....	53
4.5.1. Envolvimento das aminas derivadas de mastócitos.....	53
4.5.2. Liberação de histamina de mastócitos	55
4.5.3. Participação de metabólitos da COX e de PAF	56
4.5.4. Papel do NO e receptores NK ₁	58
4.5.5. Papel dos receptores de bradicinina do tipo B ₂	60

5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXO	91

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT ₂	receptor de serotonina do subtipo 2
ASC	área sob a curva
C48/80	composto 48/80
COX	ciclooxigenase
cPLA ₂	fosfolipase A ₂ citosólica
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido ribonucléico
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
H ₁	receptor de histamina do subtipo 1
HSA-I ¹²⁵	albumina humana marcada com iodo radioativo
i.p.	injeção intra-peritoneal
i.v.	injeção endovenosa
iPLA ₂	fosfolipase A ₂ independente de cálcio
KRP	tampão fosfato Krebs-Ringer (pH 7,4)
<i>L. m. muta</i>	<i>Lachesis muta muta</i> .
LmTX-I	PLA ₂ isolada do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster
LTB ₄	leucotrieno B ₄
NK ₁	neurocinina-1
NO	óxido nítrico
PAF	fator de ativação plaquetária (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina)
PCA4248	ácido metil 2-(feniltio)etil ester 1,4-diidro-2,4,6-trimetil-3,5-piridinodicarboxílico
PGE ₁	prostaglandina E ₁
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PLA ₂	fosfolipase A ₂
sPLA ₂	fosfolipase A ₂ secretória

cPLA₂
SR140333

fosfolipase A₂ citosólica
cloreto de ((S)-1-{2-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(3-
isopropoxifenilacetil)

LISTA DE MATERIAIS

Susbtância

Procedência

Ácido acético glacial	J. T. Baker (México)
Azul de Evans	Sigma (EUA)
Azul de tripan	Sigma (EUA)
Bradicinina	Sigma (EUA)
C48/80	Sigma (EUA)
CaCl ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Ciproeptadina	Sigma (EUA)
Cristal violeta	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
DMSO	Sigma (EUA)
Glicose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
GR73632	Glaxo Group Research (Ware, UK)
Halotano	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)
HCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
HEPES	Sigma (EUA)
Histamina	Sigma (EUA)
HSA-I ¹²⁵	IPEN/CNEN/USP (São Paulo, Brasil)
Icatibant	Aventis Pharma (Alemanha)
Indometacina	Sigma (EUA)
K ₂ HPO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
L-NAME	Sigma (EUA)
Mepiramina	Sigma (EUA)
Metanol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MgCl ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MgSO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na ₂ CO ₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

NaHCO ₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHPO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaOH	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<i>o</i> -ftaldialdeído	Sigma (EUA)
PCA4248	Tocris (Reino Unido)
Percoll	Sigma (EUA)
SR140333	Sanofi Research (França)
Substância P	Sigma (EUA)
Tiopental sódico	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. <i>Lachesis muta muta</i>	24
Figura 2. Sítio de ação das PLA ₂ nos fosfolipídeos de membrana.....	31
Figura 3. Edema de pata induzido pelo veneno de <i>L. m. muta</i>	48
Figura 4. Edema de pata induzido pela LmTX-I.....	50
Figura 5. Extravasamento de proteínas plasmáticas na pele induzido pelo veneno de <i>L. m. muta</i>	51
Figura 6. Extravasamento de proteínas plasmáticas na pele induzido pela LmTX-I.....	52
Figura 7. Efeito inibitório da ciproheptadina ou mepiramina no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de <i>L. m. muta</i> ou LmTX-I.....	54
Figura 8. Liberação de histamina de mastócitos peritoneais induzida pelo veneno de <i>L. m. muta</i> e LmTX-I.....	55
Figura 9. Efeito da indometacina ou PCA4248 no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de <i>L. m. muta</i>	57
Figura 10. Inibição do extravasamento de proteínas plasmáticas induzida pelo veneno de <i>L. m. muta</i> , mas não pela LmTX-I mediante inibição da síntese não seletiva de NO ou de receptor NK ₁	59
Figura 11. Efeito inibitório do icatibant no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de <i>L. m. muta</i> , mas não pela LmTX-I.....	60

Tabela 1. Doses e vias de administração de antagonistas usados para estudar as mudanças na permeabilidade vascular causada pelo veneno bruto e pela LmTX-I de *L. m. muta*.....43

RESUMO

A habilidade do veneno bruto de *Lachesis muta muta* e da fosfolipase A₂ básica (LmTX-I) de induzir aumento da permeabilidade microvascular na pata e pele de ratos foi investigada nesse trabalho. O veneno bruto ou LmTX-I foi injetado subplantar ou intradermicamente e o edema foi medido após intervalos de tempo específicos. O volume da pata foi medido usando um hidropletismômetro, enquanto o extravasamento na pele foi medido através do acúmulo de albumina humana marcada com ¹²⁵I (injetada previamente i.v.) nos sítios de pele. A liberação de histamina dos mastócitos de ratos foi medida por espectrofluorometria. O veneno bruto (0,3-3 µg/pata) ou LmTX-I (0,1-1 µg/pata) induziu edema de pata de maneira dose-dependente. A injeção intradérmica do veneno bruto (0,003-10 µg/sítio) ou LmTX-I (0,003-0,3 µg/sítio) na pele dorsal também resultou em extravasamento de proteínas plasmáticas de maneira dose-dependente. O extravasamento plasmático induzido pelo veneno bruto foi significativamente diminuído pelo tratamento com mepiramina (antagonista de receptor H₁, 6 mg/kg), ciproeptadina (antagonista H₁ e 5-HT₂, 2 mg/kg), L-NAME (inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico, 100 nmol/sítio), SR140333 (antagonista de receptor NK₁, 1 nmol/sítio), icatibant (antagonista de receptor B2, 0,6 mg/kg) e indometacina (inibidor não seletivo das cicloxigenases, 5 mg/kg), mas não pelo tratamento com PCA4248 (antagonista de receptor de PAF, 5 mg/kg). O extravasamento na pele induzido pela LmTX-I foi significativamente inibido pela ciproeptadina, mepiramina, indometacina e PCA4248, enquanto que L-NAME, SR140333 e icatibant não tiveram efeito. Tanto o veneno bruto quanto a LmTX-I induziram a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos de maneira concentração-dependente. Em conclusão, o veneno de *L. m. muta* e a LmTX-I aumentam a permeabilidade microvascular por mecanismos envolvendo a ativação de mastócitos e a formação de metabólitos do ácido araquidônico. A resposta induzida pelo veneno bruto também envolve liberação de substância P, bradicinina e óxido nítrico enquanto a resposta induzida pela LmTX-I conta com a participação do PAF.

ABSTRACT

The ability of crude venom and a basic phospholipase A₂ (LmTX-I) from *Lachesis muta muta* venom to increase the microvascular permeability in the rat paw and skin has been investigated. Crude venom or LmTX-I were injected subplantarly or intradermally, after which oedema was measured at selected times thereafter. Paw volume was measured using a hydropletismometer, whereas skin extravasation at the skin sites was measured as accumulation of i.v. injected ¹²⁵I-human serum albumin. Histamine liberation from rat mast cell was measured spectrofluorometrically. Crude venom (0.3-3 µg/paw) or LmTX-I (0.1-1 µg/paw) induced a dose-dependent rat paw oedema. Intradermal injection of crude venom (0.03-10 µg/site) or LmTX-I (0.003–0.3 µg/site) in the dorsal skin also resulted in dose-dependent plasma extravasation. Crude venom-induced plasma extravasation was significantly inhibited by the histamine H₁ receptor antagonist mepyramine (6 mg/kg), the histamine/5-hydroxytryptamine antagonist cyproheptadine (2 mg/kg), the nitric oxide synthesis inhibitor N^o-L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME; 100 nmol/site), the tachykinin NK₁ receptor antagonist SR140333 (1 nmol/site), the bradykinin B2 receptor antagonist Icatibant (0.6 mg/kg) and the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (5 mg/kg). The platelet-activating factor receptor antagonist PCA4248 (5 mg/kg) had no significant effect. LmTX-I-induced skin extravasation was significantly inhibited by cyproheptadine, mepyramine, indomethacin and PCA4248, while L-NAME, SR140333 and Icatibant had no effect. Additionally, both *Lachesis muta muta* venom and LmTX-I concentration-dependently induced histamine release from rat peritoneal mast cells. In conclusion, *Lachesis muta muta* venom and LmTX-I increase microvascular permeability by mechanisms involving mast cell activation and both had arachidonic acid metabolites participation. Crude venom-induced responses also involves substance P, bradykinin and nitric oxide release, whether LmTX-I-induced response involves PAF.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Lachesis muta muta*: classificação, distribuição geográfica e características do envenenamento

No Brasil, a maioria das serpentes venenosas pertence à família Viperidae (subfamília Crotalinae) e Elapidae. No Brasil, a família Viperidae é representada por 3 gêneros principais:

Crotalus (cascavéis), *Bothrops* (jararacas) e *Lachesis* (surucucu). O envenenamento por cascavéis frequentemente causa insuficiência respiratória aguda, relacionada à paralisia



Figura 1. *Lachesis m. muta*

neuromuscular (Vital Brazil, 1972; Pellegrini Filho e Vital Brazil, 1976). O envenenamento por *Bothrops* causa principalmente efeitos locais representados por edema, dor, hemorragia, mionecrose e insuficiência renal (Boer-Lima e cols., 1999). Embora, distúrbios respiratórios sejam raros no envenenamento bothrópico, tal fenômeno foi reportado por Ribeiro e cols. (1988), levando a possibilidade do veneno bothrópico também exercer ação neurotóxica.

A subespécie *L. m. muta* é a maior do mundo dentre as espécies que compõem a subfamília *Crotalinae*. A filogeografia da serpente surucucu (gênero *Lachesis*) foi recentemente atualizada usando sequenciamento de DNA mitocondrial (Zamudio e Greene, 1997). Três espécies e duas subespécies foram classificadas: *Lachesis stenophrys* (encontrada na costa atlântica da Costa Rica, Panamá e noroeste da América do Sul), *Lachesis melanocephala* (encontrada na costa pacífica e do sudoeste da Costa Rica) e *Lachesis muta* (encontrada na floresta equatorial da Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Equador, Peru e Bolívia) (Rosenthal e cols., 2002). No Brasil são encontradas as duas

subespécies da *Lachesis muta*, a saber: *L. m. muta* (presente na bacia Amazônica) e *L. m. rhombeata* (Mata Atlântica do norte do Rio de Janeiro até Paraíba).

Uma revisão de 20 casos de acidentes em humanos, que ocorreram na Costa Rica, Guiana Francesa, Brasil, Colômbia e Venezuela, confiantemente atribuídos a este gênero de serpente, descreve sintomas locais de dor, edema, equimose, coagulopatia moderada, sintomas semelhantes aos observados no envenenamento bothrópico e em outros gêneros de viperídeos da América Latina. Entretanto náuseas, cólica abdominal, vômito constante, diarreia e sudorese foram sintomas exclusivos (Jorge e cols., 1997), não reportados em vítimas de outros crotalídeos.

Na Venezuela, um paciente desenvolveu intensa sudorese, vômito, diarreia aquosa, hipersalivação, hipotensão, bradicardia e insuficiência respiratória após 45 minutos de ser picado por uma espécime jovem de surucucu (Torres e cols., 1995). Este paciente também apresentou estrabismo, disartria (dificuldade de articular as palavras) e disfagia (dificuldade de deglutir). Estes sintomas, provocados pelo envenenamento por *Lachesis*, constituem um tipo de “síndrome de envenenamento”, não observado por vítimas de outros crotalídeos da América (Jorge e cols., 1997), e é possivelmente causada por substâncias endógenas (autacóides), que promovem a ativação do sistema nervoso autônomo parassimpático.

1.2. Epidemiologia

Acidentes humanos envolvendo serpentes do gênero *Lachesis* são raros e poucos têm sido documentados na literatura. A subespécie *L. m. muta* vive em florestas tropicais úmidas de difícil acesso, o que explica em parte, a baixa incidência de casos de envenenamento com esta serpente. Além disso, existe grande dificuldade de captura e manutenção em cativeiro

dessa espécie de serpente, o que torna difícil o estudo da fisiopatologia do envenenamento por *Lachesis* em modelo animal (Damico et al., 2005 a).

No Brasil os acidentes atribuídos ao gênero *Lachesis* constituem 1,1% do total de acidentes por serpentes peçonhentas, tendo sido notificados 939 acidentes provavelmente causados por esse gênero de serpente no período de 1990-1993, com 9 óbitos (0,9%) (Ministério da Saúde, 2001).

1.3. Ações do veneno

O veneno laquétrico apresenta atividades fisiopatológicas semelhantes às do veneno bothrópico, ou seja, atividade coagulante, proteolítica, hemorrágica e inflamatória aguda. É relatada ainda, uma atividade de cininogenase no veneno de *Lachesis muta*, que poderia explicar em parte, algumas alterações clínicas denominadas de “neurotóxicas” (Diniz e Oliveira, 1992). Observa-se um quadro neurotóxico no envenenamento por *L. muta*, fato não relatado no acidente bothrópico. Os sintomas apresentados entre os indivíduos envenenados por *L. muta* podem ser variáveis, caracterizando por instalação precoce de hipotensão arterial grave (nos primeiros minutos após o acidente), e concomitante sudorese, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e bradicardia. A intensificação dessas alterações pode levar ao choque, bradicardia grave e óbito (Jorge e cols., 1997).

Recentemente, foi descrito que o veneno bruto de *L. m. muta* possui um efeito citotóxico frente à célula tubular epitelial renal (MDCK). O veneno induziu uma diminuição da viabilidade celular e induziu alterações morfológicas e nucleares (Damico e cols., 2007).

Também foi descrito no veneno uma atividade “trombina-like” (ação coagulante). Esta protease foi isolada inicialmente por Silva e cols (1985), e foi posteriormente seqüenciada e confirmada sua homologia com a gioxina crotálica (Magalhães e cols., 1993; Aguiar e cols.,

1996). Além disso, foi identificada também uma fração ativadora de plasminogênio no veneno de *L. m. muta* (Sanchez e cols., 2000).

Foram isoladas ainda uma lectina (lactose-específica), capaz de causar hemaglutinação e agregação plaquetária (Ogilvie e cols., 1986) e uma fosfolipase A₂ ácida, com atividade inibidora da agregação plaquetária, bem como atividade miotóxica local *in vivo* e *in vitro* (Fuly e cols., 1997; Fuly e cols., 2000). Além disso, foram isoladas duas metaloproteinases (LHF-I e LHF-II) com atividade hemorrágica no veneno de *L. m. muta* e que, provavelmente desempenham um papel importante nos fenômenos hemorrágicos descritos nos acidentes laquéticos. Atribui-se a essas metaloproteinases atividade inflamatória local, formadora de edema e de degradação de componentes da matriz extracelular (Sanchez e cols., 1987; Sanchez e cols., 1995; Rucavado e cols., 1999).

Recentemente o veneno de *L. m. muta* foi estudado quanto aos efeitos neurotóxico e miotóxico. Esse trabalho demonstrou que em modelos experimentais *in vitro* o veneno de *L. m. muta* possui componentes farmacologicamente ativos que agem na junção neuromuscular e fibras musculares, cuja intensidade da ação depende da concentração do veneno e tipo de preparação neuromuscular isolada (camundongo ou biventer cervicis de pintainho) (Damico e cols., 2005a).

A partir do veneno total de *L. m. muta* foram purificadas duas novas toxinas (LmTX-I e LmTX-II). Essas novas toxinas foram caracterizadas como isoformas de PLA₂s básicas Asp49 (com resíduo de aspartato na posição 49), em função das características físico-químicas (Damico e cols., 2005b).

Foi realizada também a caracterização da PLA₂ básica D49 (LmTX-I) do veneno de *L. m. muta* que demonstrou uma potente atividade bloqueadora pré-sináptica neuromuscular *in vitro* em preparações neuromusculares de pintainho. A partir desses dados foi sugerido que a

LmTX-I é a principal toxina responsável pelo efeito observado com o veneno total dessa espécie, e que o efeito neurotóxico supera o efeito miotóxico isolado (Damico *e cols.*, 2006).

Embora vários trabalhos tenham caracterizado o veneno de *L. m. muta* quanto as suas atividades miotóxicas, neurotóxicas, agregantes para plaquetas, dentre outras, nenhum trabalho foi direcionado para a investigação da inflamação causada por esse veneno, bem como por seus componentes.

1.4. Inflamação causada por venenos ofídicos

A reação inflamatória é uma resposta de defesa do organismo contra a invasão por agentes infecciosos, por danos físicos, químicos ou traumáticos. É caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício e é um fenômeno essencialmente dinâmico, razão pela qual seu aspecto morfológico se modifica com o tempo. Essa resposta pode ser autolimitada e resolvida pelo organismo ou pode se cronificar levando a perda da função do tecido inflamado (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A inflamação é uma característica importante em quadros de envenenamento ofídico, dependendo da espécie de serpente envolvida. O envenenamento ocorrido por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado por induzir tanto alterações patológicas locais, como também sistêmicas, que são consequência do efeito aditivo ou sinérgico das diferentes toxinas e enzimas presentes nos venenos (Ownby *e cols.*, 1982; Trebien e Calixto, 1989), entretanto o quadro inflamatório causado pelo veneno das serpentes do gênero *Lachesis* ainda é pouco estudado.

No processo inflamatório, inclusive aquele subsequente ao envenenamento ofídico, vários eventos ocorrem para reconstituir o tecido lesado tais como (a) a vasodilatação local e aumento do fluxo sanguíneo; (b) aumento da permeabilidade dos capilares com extravasamento de líquido para os espaços intersticiais; (c) coagulação do líquido extravasado,

devido a quantidades excessivas de fibrinogênio e de outras proteínas que também extravasam através dos capilares e (d) edema inflamatório. Além do edema inflamatório, o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório é outro evento importante. Muitas células envolvidas na resposta inflamatória já estão presentes nos tecidos, tais como as células endoteliais, mastócitos e células mononucleares residentes, enquanto que outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue, como é o caso de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os mononucleares (monócitos e linfócitos) (Dale e Foreman, 1994). Muitos esforços vêm sendo realizado ao longo dos anos para se entender a fisiopatologia da resposta inflamatória causada por toxinas provenientes de venenos ofídicos. Em modelos inflamatórios, tais como edema de pata de rato ou camundongo, é descrito que os venenos bothrópicos causam inflamação caracterizada por infiltrado de leucócitos, edema, extravasamento de proteínas plasmáticas, os quais são efeitos decorrentes da ação de mediadores como aminas derivadas de mastócitos, mediadores derivados da ação das ciclooxigenases, bradicinina e mediadores quimiotáticos dentre outros (Trebien e Calixto, 1989; Chaves *e cols.*, 1995; Farsky *e cols.*, 1997; Zamuner *e cols.*, 2001).

O edema inflamatório é decorrente do aumento da permeabilidade vascular somado ao aumento da pressão de filtração, devido à vasodilatação. Isto se deve à ação de mediadores sobre as células endoteliais venulares, entre os quais se destacam histamina, bradicinina, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF), o componente do sistema complemento (C5a), taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Brain e Williams, 1985; Hua e Lundberg, 1986). O recrutamento e adesão de leucócitos é um processo complexo e multimediado cuja realização se dá na presença de agentes quimiotáticos, através de interações moleculares entre as moléculas de adesão presentes nos leucócitos, nas células endoteliais e ligantes da matriz extracelular (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Vestweber e Blanks,

1999). Além desses mediadores citados anteriormente, o óxido nítrico (NO) atua principalmente como vasodilatador, mas também, em condições basais regula a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e nos leucócitos (Furchgott e Vanhoutte, 1989; Moncada e Higgs, 2006), sendo assim um importante mediador da resposta inflamatória.

Outro tipo celular importante para o desencadeamento da inflamação causada por venenos ofídicos é o mastócito. Os mastócitos são células residentes que estão localizados principalmente ao redor dos vasos sanguíneos e são caracterizados pela presença de grandes grânulos que contém heparina, aminas (histamina e serotonina) e proteoglicanos. As aminas desempenham papel importante no aumento de permeabilidade vascular de natureza alérgica, mas também são alvo para a ação de componentes de venenos ofídicos, como as fosfolipases.

1.5. Fosfolipases A₂ (PLA_{2s})

As fosfolipases são enzimas que catalisam a hidrólise, em quatro posições, dos fosfoglicerídeos (lipídeos formados pela esterificação de dois ácidos graxos na primeira e segunda hidroxila do glicerol e de um grupamento fosfórico na terceira hidroxila).

Dependendo da posição da hidrólise, as fosfolipases recebem diferentes designações. As PLA_{2s} (fosfatidil-acil-hidrolases; EC 3.1.1.4) atuam na posição sn-2 da ligação acil-éster de fosfoglicerídeos (Figura 2), gerando como produtos desta hidrólise, quantidades equimolares de um ácido graxo e de um monoacilfosfatidil (lisofosfatidil), (Kini, 2005).

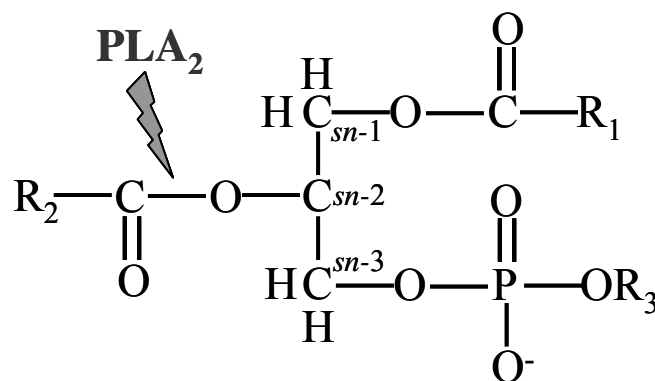


Figura 2. Sítio de ação das PLA₂ nos fosfolipídeos de membrana. Essas enzimas agem catalisando a clivagem do resíduo de ácido graxo na posição sn-2. Em R₁ são encontrados ácidos graxos saturados (freqüentemente C₁₆ e C₁₈), em R₂ são encontrados predominantemente ácidos graxos insaturados (principalmente C_{20,4}) e em R₃ é encontrado um grupo cabeça polar como colina, etanolamina ou inositol.

É interessante ressaltar que as PLA₂s são enzimas importantes na sinalização celular, pois ao catalisar a lise de fosfolipídeos de membrana, geram mediadores biologicamente ativos como as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos e o fator de ativação plaquetária (Flower e Blackwell, 1976, Snyder, 1989, Kini, 1997). A produção desses mediadores lipídicos pró-inflamatórios faz dessas enzimas um importante alvo terapêutico para o tratamento das doenças inflamatórias. Além disso, as PLA₂s provenientes de venenos apresentam grande homologia com a PLA₂ endógena, sendo capazes de reproduzir vários dos efeitos observados no processo inflamatório, podendo então ser utilizadas como ferramentas experimentais (Dennis 1994, Gutierrez e Lomonte, 1995).

As PLA₂s podem ser divididas em dois grupos: as extracelulares, de baixo peso molecular (14-18 kDa), também denominadas fosfolipases pancreáticas ou secretadas (sPLA₂s); e as intracelulares, de alto peso molecular (31-110 kDa), também denominadas

fosfolipases citosólicas (cPLA₂s), onde se inserem as PLA₂s endógenas independentes de cálcio (iPLA₂s)

As PLA₂s extracelulares ocorrem abundantemente na natureza e, geralmente, requerem Ca²⁺ para desempenharem sua atividade catalítica. O suco pancreático dos mamíferos e os venenos de serpentes estão entre as fontes mais ricas em PLA₂ extracelulares (Verheij e *cols.*, 1981). Ao contrário das PLA₂s pancreáticas, as PLA₂s provenientes de venenos podem produzir potentes efeitos farmacológicos, tais como: neurotoxicidade (pré e pós-sináptica), miotoxicidade (local e sistêmica), cardiotoxicidade, efeito anticoagulante, indutor de agregação plaquetária, inibidor de agregação plaquetária, atividade hemolítica, convulsionante, hipotensiva, anti-hemorrágica, edematogênica e lesão de órgãos e tecidos (Kini, 1997). Ao comparar as seqüências de aminoácidos desses dois tipos de PLA₂s, observa-se que são poucas as substituições de resíduos de aminoácidos que convergem PLA₂s pancreáticas em PLA₂s de venenos ofídicos que são altamente tóxicas, com especificidade para atuar em diferentes tecidos (Carredano e *cols.*, 1998).

Embora apresentem efeitos farmacológicos diferentes, as diversas PLA₂s de venenos ofídicos apresentam alta homologia (cerca de 40 a 99%) entre suas seqüências de aminoácidos. Por essa razão, não é fácil correlacionar às atividades farmacológicas de cada PLA₂ com suas diferenças estruturais. Assim, o estudo da relação entre estrutura e função desse grupo de proteínas é complexo e desafiante (Kini, 2005).

Inicialmente, as PLA₂s foram divididas em três grandes grupos com base na localização celular, seqüência de aminoácidos, massa molecular, presença de pontes dissulfídicas intramoleculares e necessidade de cálcio para a atividade enzimática (Heinrikson e *cols.*, 1977; Davidson e Dennis, 1990). À medida que foram sendo descobertas novas PLA₂s,

essa classificação ficou obsoleta. Six e Dennis (2000) propuseram uma reclassificação para as PLA₂s, dividindo-as em 11 grupos (I-XI), conforme detalhado a seguir.

O grupo I compreende as PLA₂s provenientes dos venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae* e de pâncreas de mamíferos. O grupo II compreende as PLA₂s dos venenos de *Crotalidae* e *Viperidae* e do fluido sinovial humano e plaquetas (Murakami e cols., 1995). O grupo III compreende as PLA₂s provenientes de veneno de abelhas e do lagarto do gênero *Heloperma*. As cPLA₂s foram isoladas inicialmente do citosol de plaquetas e monócitos e expressam sua atividade catalítica na presença de concentrações micromolares de cálcio ou na presença de fosfatidil inositol 4-5-bifosfato (Dennis, 1994; Mosior e cols., 1998), sendo classificadas como enzimas do grupo IV. O grupo V está representado pelas sPLA₂s encontradas em tecidos de mamíferos (14 kDa), especialmente em resposta à estímulos inflamatórios; o grupo VI é representado por PLA₂s independentes de cálcio (iPLA₂, 85 kDa); os grupos VII e VIII compreendem enzimas denominadas PAF acetil-hidrolases *a* e *b* respectivamente (45 kDa), sendo encontradas na circulação sanguínea da maioria dos animais e no cérebro de bovinos; o grupo IX é constituído de sPLA₂s isoladas de veneno de caramujo marinho também denominadas de conodipina M; o grupo X compreende sPLA₂s encontradas em leucócitos, fígado, timo e células endoteliais alveolares; e finalmente, o grupo XI é constituído pelas sPLA₂s de plantas (Six e Dennis, 2000). Posteriormente, também foram descritos os grupos XII, constituído por sPLA₂ distribuída em vários tecidos como coração, fígado e músculo esquelético (Gelb e cols., 2000), e XIII, presentes no capsídeo de parvovírus (Cannan e cols., 2004).

As PLA₂s isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* geralmente possuem um resíduo aspartato na posição 49 (Asp49), altamente envolvido com o sítio de ligação ao Ca²⁺. Porém, em algumas destas enzimas, o resíduo aspartato na posição 49 é substituído por lisina (Lys49),

o que impede uma ligação eficiente ao Ca^{2+} (Maraganore e cols., 1984; van den Bergh e cols., 1989). Dessa maneira, no grupo II podem ser encontradas PLA₂s Asp49 e Lys49, sendo que as últimas são desprovidas de atividade enzimática ou possuem atividade muito baixa, devido à substituição do aspartato por lisina. Além disso, pelo menos duas variantes com um resíduo de serina ocupando a posição 49 (PLA₂ Ser49) foram descritas (Krizaj e cols., 1991; Polgár e cols., 1996).

Existem evidências significativas de que a atividade catalítica das PLA₂s não é necessária para gerar uma desorganização de membrana (Díaz-Oreiro e Gutiérrez, 1997). Vários trabalhos demonstram que as PLA₂s miotóxicas são proteínas básicas e que apresentam um grande conteúdo de resíduos de lisina na região C-terminal. Segundo Gutiérrez e Lomonte (1995) as PLA₂s poderiam se ligar a determinados “sítios” com carga parcial negativa na membrana, que serviriam de ancoragem para as estas proteínas. Unidas assim à membrana celular, poderiam gerar uma desorganização conformacional da membrana, levando a uma alteração na permeabilidade e conseqüente destruição celular. Miotoxinas com estrutura molecular de PLA₂ são as principais responsáveis pela necrose do músculo esquelético descrito nas vítimas do envenenamento por serpentes (Mebs e Ownby, 1990). Estudos subseqüentes com a miotoxina II purificada de veneno de *Bothrops asper*, confirmaram que a região 115-129, rica em aminoácidos básicos e hidrofóbicos, estava envolvida não somente ao seu efeito miotóxico *in vivo*, mas também com a atividade citotóxica (Lomonte e cols., 2003).

1.6. PLA₂ secretórias e o processo inflamatório

As PLA₂s são enzimas importantes na sinalização celular, pois são capazes de lisar fosfolípidos de membrana, liberando o ácido araquidônico que, através da ação das ciclooxigenases (COXs), é metabolizado nos endoperóxidos cíclicos, que por sua vez levam à

formação das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. O ácido araquidônico também pode ser metabolizado pela via da 5-lipoxigenase, formando os leucotrienos (Flower e Blackwell, 1976). Através da ação das PLA₂s sobre fosfolipídeos de membrana contendo colina pode ser formado o PAF (1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), reação que ocorre em duas etapas tendo como intermediário o liso-PAF (1-*O*-alquil-2-lisoglicero-3-fosfocolina) (Snyder, 1989). A produção desses mediadores lipídicos pró-inflamatórios faz dessas enzimas um importante alvo terapêutico para o tratamento das doenças inflamatórias.

Para o estudo do papel das PLA₂s no processo inflamatório, PLA₂s exógenas provenientes de venenos (ofídicos e de abelhas), e de pâncreas de mamíferos são amplamente utilizadas, pois apresentam grande homologia com a PLA₂ endógena, sendo capazes de reproduzir vários dos efeitos observados no processo inflamatório (Dennis 1994, Gutierrez e Lomonte, 1995).

Essa capacidade foi primeiramente descrita quando se observou que sPLA₂s derivadas de venenos ofídicos provocavam edema de pata de rato (Brain e cols., 1977) e desgranulação de mastócitos *in vivo* (Damerou e cols., 1975). A partir daí desenvolveram-se vários trabalhos mostrando que a administração de diferentes sPLA₂s ofídicas em animais *in vivo* leva a efeitos inflamatórios locais caracterizados principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular e formação de edema. A partir daí, muitos outros trabalhos foram desenvolvidos e Wang e Teng (1990) sugeriram que as sPLA₂s poderiam induzir efeitos pró-inflamatórios por pelo menos três mecanismos diferentes: atividade enzimática, quantidade de sítios positivos e presença de um sítio farmacológico com participação de resíduos positivos. Posteriormente, também foram identificados e classificados dois tipos de receptores para PLA₂s: N (neuronal) e M (muscular) (Lambeau e Lazdunski, 1999).

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que PLA₂s homólogas isoladas dos venenos de *Bothrops jararacussu* (bothropstoxinas I e II) aumentam significativamente a permeabilidade vascular em ratos por mecanismo dependente de desgranulação de mastócitos (Landucci e cols., 1998). O mesmo foi observado para uma homóloga Lys-49 de PLA₂, a piratoxina I (proveniente do veneno de *Bothrops pirajai*; Landucci e cols., 2000). Também foi demonstrado que essas PLA₂s promovem infiltração de leucócitos para a cavidade pleural de ratos através de mecanismos não relacionados à ativação de mastócitos pleurais ou à atividade enzimática dessas enzimas (de Castro e cols., 2000). Além disso, Gambero e cols. (2002) examinaram a habilidade dessas PLA₂s e daquelas provenientes dos venenos de *Apis mellifera* e *Naja mocambique mocambique* em induzir quimiotaxia de neutrófilos. Esses autores verificaram que as mesmas são capazes de atrair neutrófilos humanos *in vitro* por um mecanismo independente da atividade fosfolipásica, envolvendo interações destas proteínas com os sítios de ligação para heparina/heparan na superfície celular, levando à liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e PAF. Recentemente, foi demonstrado que as PLA₂ secretórias são capazes de induzir pancreatite aguda em ratos (Camargo et al., 2005).

O isolamento de uma nova PLA₂ proveniente do veneno de *Lachesis muta muta* (Damico e cols., 2005b) permite que sejam realizados experimentos para o entendimento de suas ações edematogênicas, comparativamente ao veneno total, para melhor compreensão das características inflamatórias do envenenamento por essa espécie. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na inflamação induzida por esse veneno bruto ou por essa toxina isolada, apenas sugere-se que suas ações sejam semelhantes aos venenos bothrópicos.



2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto foram investigar a capacidade do veneno de *L. m. muta* e da PLA₂ isolada (LmTX-I) de induzir inflamação em modelos *in vivo* (edema de pata e de pele) e *in vitro* (desgranulação de mastócitos), bem como a participação de alguns mediadores inflamatórios.

Os objetivos específicos foram:

- i) Caracterizar o veneno bruto de *L. m. muta* e a LmTX-I quanto a capacidade de induzir edema de pata e de pele e desgranulação de mastócitos.
- ii) Investigar os mediadores farmacológicos envolvidos utilizando o modelo de edema de pele, avaliando a participação de aminas de mastócitos, derivados do ácido araquidônico, substância P, óxido nítrico (NO), bradicinina e fator de ativação plaquetária (PAF) pela utilização de tratamentos farmacológicos específicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos adultos, da espécie Wistar (150-250 g), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* e, dependendo do protocolo experimental, os mesmos foram mantidos conscientes ou anestesiados de forma apropriada com tiopental sódico ou halotano. Os protocolos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA - IB/UNICAMP) sob o protocolo número 1273-1.

3.2. Obtenção do veneno de *L. m. muta*

O veneno bruto foi obtido da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). A LmTX-I foi isolada a partir desse veneno através de colaboração com o Prof. Dr. Sérgio Marangoni e a Dra. Daniela C. S. Damico, ambos do Laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP.

3.2.1. Purificação da LmTX-I

A LmTX-I foi purificada conforme a metodologia descrita por Damico e *cols* (2005b). Resumidamente, uma alíquota do veneno (45 mg) foi dissolvida em tampão bicarbonato de amônio 0,2 mol/L, pH 8,0, e aplicado em uma coluna superdex 75 (1 cm x 60 cm), previamente equilibrada com a mesma solução tampão. As frações protéicas (1-5) foram eluídas no fluxo constante de 0,3 mL/min e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm, sendo posteriormente liofilizadas e conservadas a -20°C. A fração 3 (5 mg), com atividade

fosfolipásica, obtida na cromatografia anterior foi dissolvida em 200 µl de ácido trifluoroacético (TFA 0.1%, v/v). A solução resultante foi clarificada por centrifugação a 10.000 rpm por 3 min e o sobrenadante aplicado a uma coluna C18 µ-bondapack (0,78 cm x 30 cm; Waters 991 - PDA system). As novas frações obtidas nesta cromatografia foram eluídas através de um gradiente não linear (0-54%, v/v) de acetonitrila (solvente b), no fluxo constante de 1.0 mL/min durante 40 min. A fração resultante da coluna C18, que apresentou atividade fosfolipásica, foi submetida a mais um passo de purificação em HPLC de fase reversa usando uma coluna C8 (0.46 cm x 15 cm; Jones Chromatography Genesis), com um gradiente linear de 20-35% de acetonitrila por 90 min no fluxo constante de 1.0 mL/min. O perfil de eluição para ambas as análises foi monitorado a 220 e 280 nm, e as frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

3.3. Edema de pata induzido pelo veneno de *L. m. muta* e *LmTX-I* em ratos

Os animais (150-200 g) foram anestesiados superficialmente com halotano e submetidos à injeção subcutânea na região plantar da pata traseira esquerda de 100 µL de salina (0,9%), veneno bruto (0,3-3 µg/pata) ou LmTX-I (0,1-1 µg/pata) dissolvidos em solução fisiológica. O volume da pata foi medido através de um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália), imediatamente antes da injeção (basal) e em intervalos de tempo de 15, 30, 60 e 120 min após a injeção dos agentes edematogênicos.

Os resultados foram expressos como variação do volume da pata (mL) em relação ao valor basal. Também foram calculados os valores de área sob a curva (ASC) para cada dose injetada.

3.4. Medida da permeabilidade vascular na pele dorsal de ratos após injeção do veneno de *L. m. muta*

A técnica de edema de pele foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Brain e Williams (1985). Os ratos (200-250 g) foram anestesiados pela via intraperitoneal com tiopental sódico (50 mg/kg) e doses de manutenção foram administradas se necessárias. Após a depilação do dorso do animal, foi injetado albumina humana marcada com ^{125}I (2,5 $\mu\text{Ci/kg}$) juntamente com azul de Evans (utilizado apenas como marcador visual) por via intravenosa. Os agentes em teste foram preparados em solução Tyrode e injetados intradermicamente (em duplicata) em volume de 100 μL , utilizando-se uma distribuição randômica dos sítios na pele dorsal. Dessa maneira foram injetados solução Tyrode (veículo), veneno bruto (0,03-10 $\mu\text{g/sítio}$), LmTX-I (0,003-0,3 $\mu\text{g/sítio}$) ou o composto 48/80 que é um agente desgranulador de mastócitos (C48/80; 1 $\mu\text{g/sítio}$) usado como controle positivo. Após 30 minutos da injeção dos agentes, os animais dos grupos controle e tratado tiveram uma amostra de aproximadamente 3 mL de sangue coletada através de punção cardíaca. O animal foi então sacrificado injetando-se dose letal de tiopental sódico e realizando-se deslocamento cervical. A pele dorsal foi removida, os sítios injetados foram cortados com instrumento circular cortante (15 mm de diâmetro) e a radioatividade presente em cada sítio, bem como nas amostras de plasma (obtido após centrifugação do sangue por 10 min a 1000g), foi quantificada em contador gama. O edema formado em cada sítio foi calculado a partir da radioatividade presente no plasma e expresso como volume de plasma extravasado.

3.4.1. Tratamentos farmacológicos

Diversas drogas foram utilizadas para investigar os mediadores envolvidos no edema de pele de ratos induzido pelo veneno bruto de *L. m. muta* (1 µg/sítio) e pela LmTX-I (0,1 µg/sítio), conforme indicado na Tabela 1. Os veículos utilizados para as drogas não interferiram na indução de extravasamento plasmático na pele.

Tabela 1. Doses e vias de administração de antagonistas usados para estudar as mudanças na permeabilidade vascular causada pelo veneno bruto de *L. m. muta* e pela LmTX-I.

<i>Drogas</i>	<i>Ação</i>	<i>Dose</i>	<i>Via e tempo de administração</i>	<i>Referência</i>	<i>Veículo utilizado</i>
Ciproeptadina	Antagonista de receptores H ₁ e 5-HT ₂	2 mg/kg	i.p., 30 min antes	Câmara e cols., 2003	DMSO 50%
Indometacina	Inibidor não seletivo de ciclooxigenases	5 mg/kg	i.p., 1 h antes	Barbosa e cols., 2003	Carbonato de sódio 5%
Mepiramina	Antagonista de receptor H ₁	6 mg/kg	i.v., 15 min antes	Barbosa e cols., 2003	Salina
PCA4248	Antagonista do receptor de PAF	5 mg/kg	i.v., 1 h antes	Filliatre e cols., 2001	DMSO 50%
SR140333	Antagonista de receptor NK ₁	1 nmol/sítio	Co-injeção	Câmara e cols., 2003	Tyrode
L-NAME	Inibidor não seletivo da síntese de NO	100 nmol/sítio	Co-injeção	Ridger e cols., 1997	Tyrode
Icatibant	Antagonista de receptor B ₂	0,6 mg/kg	i.p., 15 min antes	Costa e cols., 2001	Salina

3.5. Desgranulação de mastócitos peritoneais de ratos “in vitro”

3.5.1. Purificação de mastócitos peritoneais

Mastócitos provenientes da cavidade peritoneal de 5-6 animais foram purificados em gradiente de percoll como descrito previamente por Enerback e Svensson (1980). Os ratos foram exsanguinados sob anestesia e 10 mL de solução de tampão fosfato Krebs-Ringer (KRP) de composição (em mmol/L) NaCl 150; KCl 6,1; Na₂HPO₄ 10; MgSO₄·7H₂O 1.5; CaCl₂·2H₂O 42,9 e glicose 5.6 com pH ajustado para 7,4 foi injetado na cavidade peritoneal. O abdômen foi massageado, o fluido coletado em tubo cônico de polipropileno e centrifugado (300 g, 5 min, 4°C). O precipitado resultante (no qual os mastócitos representam cerca de 10% das células) foi ressuspensionado em KRP e submetido a gradiente isotônico de percoll durante 10 min à temperatura ambiente, antes de ser centrifugado por 25 min (150 g, 4°C). A zona do gradiente (*pellet*) que contém os mastócitos foi separada e lavada duas vezes com KRP. Foi feita contagem total de células em câmara de Neubauer e contagem diferencial para certificação da pureza das células obtidas. A viabilidade dos mastócitos foi avaliada com o corante azul de Tripán. Obteve-se suspensões de mastócitos com pureza maior que 95% e viabilidade maior que 98%.

3.5.2. Liberação de histamina de mastócitos peritoneais

Alíquotas da suspensão de mastócitos (0,5 mL) foram incubadas à 37°C por 10 min (5% CO₂). Os estímulos tais como veneno bruto (0,3-10 µg/mL), LmTX-I (0,1-3 µg/mL) ou C48/80 (1 µg/mL, controle positivo) foram adicionados a suspensão (perfazendo um volume final de 1 mL e concentração final de 2 x10⁵ células/mL), incubados por 15 min (37°C; 5% CO₂) e a reação foi interrompida colocando-se os tubos teste em banho de gelo. As células

foram centrifugadas (450g, 10 min) e o sobrenadante removido e colocado em outro tubo teste. Ao sobrenadante e ao precipitado foram adicionados respectivamente 100 μ L de HCl 1mol/L e 1 mL de HCl 0,1 mol/L (ambos preparados em KRP) e os tubos foram colocados em banho fervente por 10 min para liberação da histamina residual. As concentrações de histamina foram determinadas por espectrofluorometria (Shore *e cols.*, 1959; Giraldele *e cols.*, 1994), através da reação da histamina com *o*-ftaldialdeído (80 μ L, solução 1% em metanol em meio básico). A liberação de histamina foi expressa como porcentagem de liberação no sobrenadante em relação ao conteúdo celular total.

3.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) para *n* experimentos ou animais. Os resultados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste modificado de Bonferroni. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.



4. RESULTADOS



4. RESULTADOS

*4.1. Efeito da injeção intraplantar do veneno de *L. m. muta**

A injeção do veneno de *L. m. muta* na pata de ratos induziu edema de maneira dose-dependente. Na menor dose utilizada (0,3 µg/pata; n=5) foi observado aumento significativo no volume das patas dos ratos nos tempos de 15, 30 e 120 min (mas não em 60 min) após a injeção quando comparado ao grupo injetado com salina. Nas doses maiores (1 e 3 µg/pata; n=5), foi verificado um edema significativo em todos os tempos, quando comparado com os respectivos valores do grupo salina, com pico em 15 min após a injeção e que após 2 h já foi diminuído em aproximadamente 40% (Figura 3A). Os valores de área sob a curva foram aumentados significativamente nas doses de 1 e 3 µg/pata quando comparados com o grupo salina (Figura 3B).

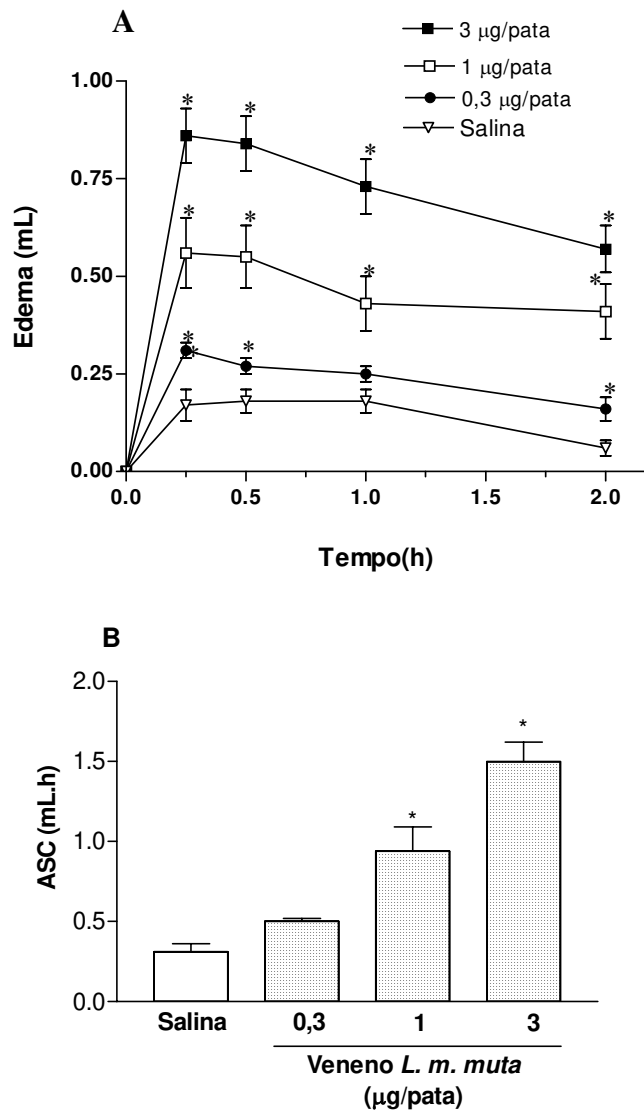


Figura 3. Edema de pata induzido pelo veneno de *L. m muta*. Salina ou veneno bruto (0,3-3 µg/pata, n=5) foram injetados na pata esquerda de ratos no volume de 100 µL e o edema foi medido de 15 min a 2 h. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. da variação do volume das patas em mL (painel A) ou valores de área sob a curva (ASC em mL.h; painel B) para n=5 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina.

4.2. Efeito da injeção intraplantar da LmTX-I

A injeção da LmTX-I na pata de ratos também induziu edema de maneira dose-dependente. Na menor dose utilizada (0,1 µg/pata; n=5) não foram observadas diferenças significativas em relação à injeção de salina (n=5), entretanto, nas doses de 0,3 e 1 µg/pata (n=5 cada) foi verificado um edema significativo na maioria dos tempos em comparação com os respectivos valores do grupo salina, com pico em 15 min após a injeção e que após 2 h foi diminuído em aproximadamente 50% (Figura 4 A). A análise dos dados na forma de área sob a curva confirmou o efeito edematogênico dose-dependente da LmTX-I (Figura 4 B).

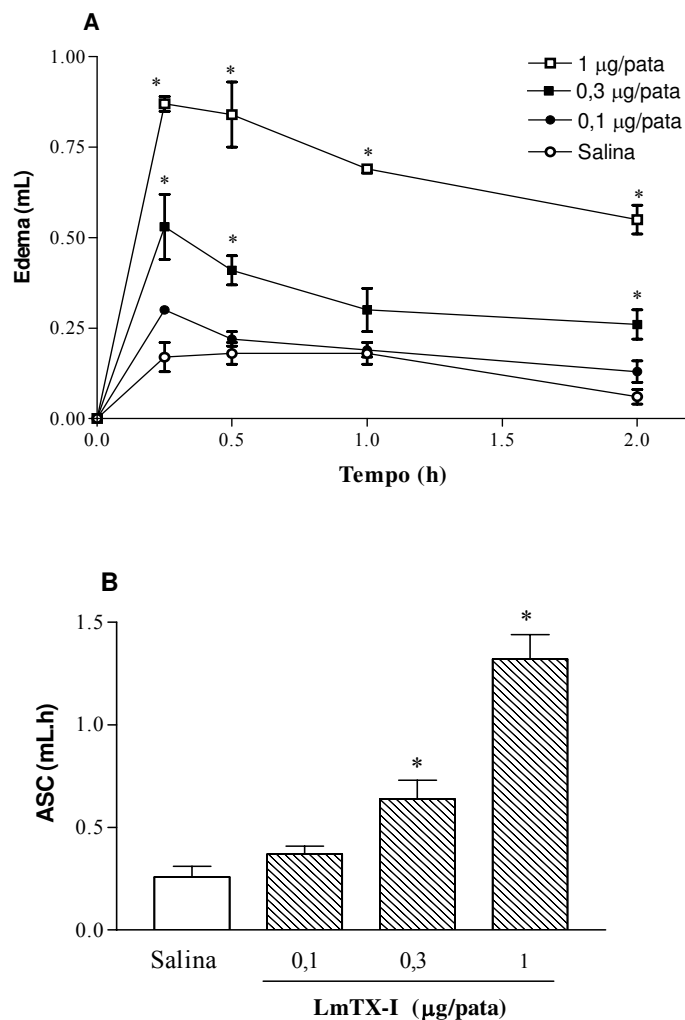


Figura 4. Edema de pata induzido pela LmTX-I. Salina ou LmTX-I (0,1-1 µg/pata) foram injetadas na pata esquerda de ratos no volume de 100 µL e o edema foi medido de 15 min a 2 h após a injeção. Os valores foram expressos como média ± SEM da variação do volume das patas em mL (painel A) ou valores de área sob a curva (ASC em mL.h; painel B) para n=5 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina.

4.3. Efeito da injeção do veneno de *L. m. muta* na pele dorsal de ratos

Quando injetado na pele dorsal de ratos, o veneno de *L. m. muta* (0,03-10 $\mu\text{g/sítio}$, n=5) causou aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas de maneira dose-dependente (Figura 5). A injeção do C48/80 (1 $\mu\text{g/sítio}$, n=5) aumentou significativamente ($P < 0,05$) o extravasamento plasmático na pele dorsal de ratos quando comparado aos sítios injetados com Tyrode (89,09 \pm 7,55 e 2,7 \pm 2,4 respectivamente para sítios injetados com C48/80 e Tyrode). A dose de 1 $\mu\text{g/sítio}$ foi escolhida para os experimentos subseqüentes.

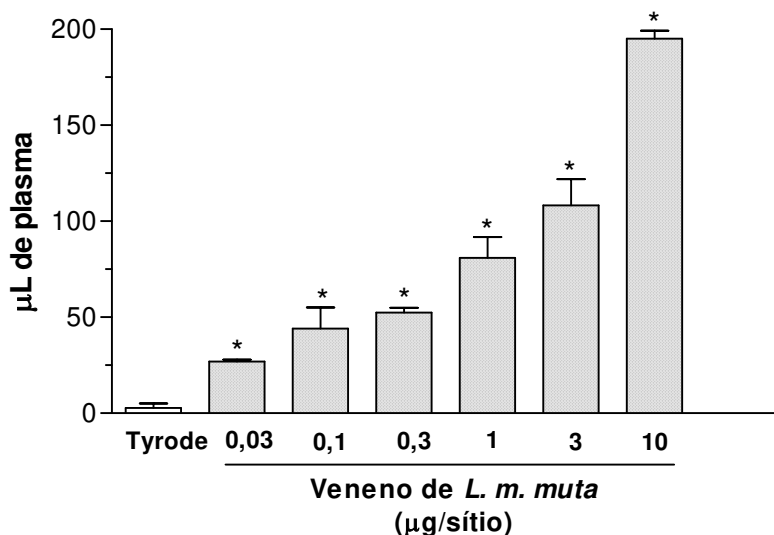


Figura 5. Extravasamento de proteínas plasmáticas na pele induzido pelo veneno de *L. m. muta*. Tyrode ou veneno *L. m. muta* (0,03-10 $\mu\text{g/sítio}$) foram injetados na pele de ratos no volume de 100 μL e o edema foi medido após 30 min. Os valores foram expressos como média \pm SEM de μL de plasma extravasado para n=5 animais. * $P < 0,05$ comparado com os sítios injetados com Tyrode.

4.4. Efeito da injeção da LmTX-I na pele dorsal de ratos

A injeção de LmTX-I (0,003-0,3 $\mu\text{g/sítio}$) na pele dorsal de ratos causou aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas de maneira dose-dependente, a partir da dose de 0,01 $\mu\text{g/sítio}$ (Figura 6). A dose de 0,1 $\mu\text{g/sítio}$ foi escolhida para os próximos experimentos.

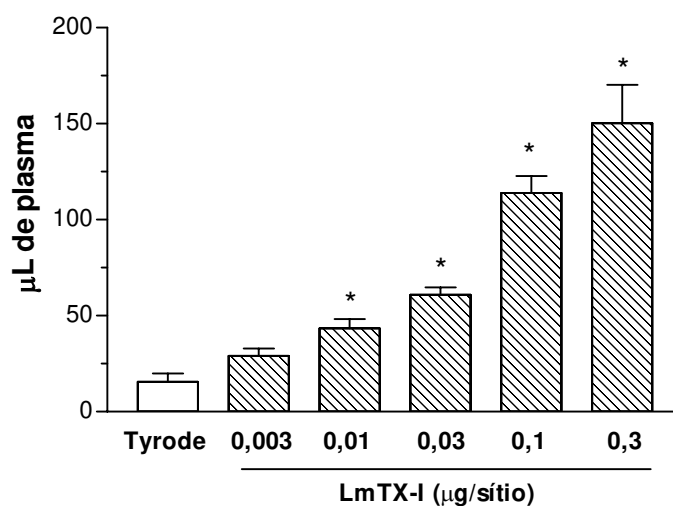


Figura 6. Extravasamento de proteínas plasmáticas na pele induzido pela LmTx-I. Tyrode ou LmTX-I (0,003-0,3 $\mu\text{g/sítio}$) foram injetados na pele de ratos no volume de 100 μL e o edema foi medido após 30 min. Os valores estão expressos como média \pm SEM de μL de plasma extravasado para $n=5$ animais. * $P < 0,05$ comparado com os sítios injetados com Tyrode.

4.5. Investigação dos mediadores inflamatórios: tratamentos farmacológicos

4.5.1. Envolvimento das aminas derivadas de mastócitos

Para investigar o papel das aminas derivadas de mastócitos, os ratos foram pré-tratados com ciproeptadina (2 mg/kg) ou mepiramina (6 mg/kg). Ambos os tratamentos reduziram significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas na pele de ratos induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio, n=5) ou LmTX-I (0,1 µg/sítio, n=5; Figura 7 A e B, respectivamente). Nos ratos tratados com ciproeptadina o extravasamento plasmático causado pelo composto 48/80 (1 µg/sítio) foi significativamente reduzido (150,5 ±17,6 e 11,4 ±4,8 µL, para ratos controles ou tratados respectivamente, n=5), bem como o pré-tratamento com mepiramina também aboliu o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por histamina (30 nmol/sítio; 52,3 ±8,6 e 7,2 ±3,0 µL, para ratos controles ou tratados respectivamente, n=5). Esses tratamentos não afetaram o valor basal observado nos sítios injetados com Tyrode (Figura 7).

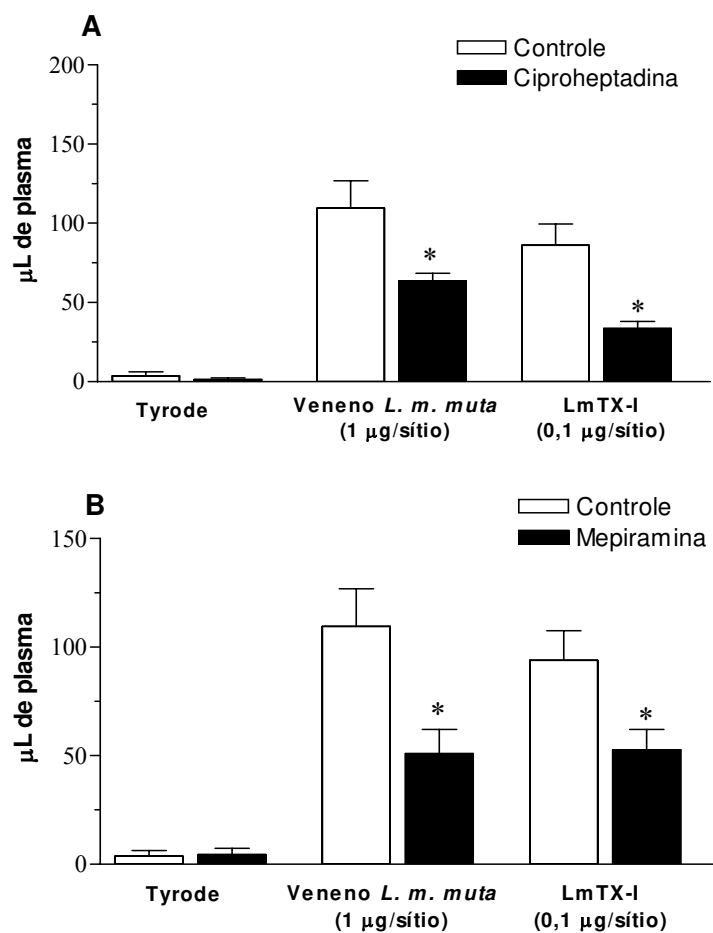


Figura 7. Efeito inibitório da ciproheptadina (2 mg/kg; Painel A) ou mepiramina (6 mg/kg; Painel B) no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio) ou LmTX-I (0,1 µg/sítio). Os valores estão expressos como média ± SEM de µL de plasma extravasado para n=5 animais. * $P < 0,05$ comparado com os respectivos sítios controles.

4.5.2. Liberação de histamina de mastócitos

O veneno de *L. m. muta* (0,3-10 $\mu\text{g/mL}$) induziu a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos. Isso também foi observado para a LmTX-I nas concentrações de 0,1 a 3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8).

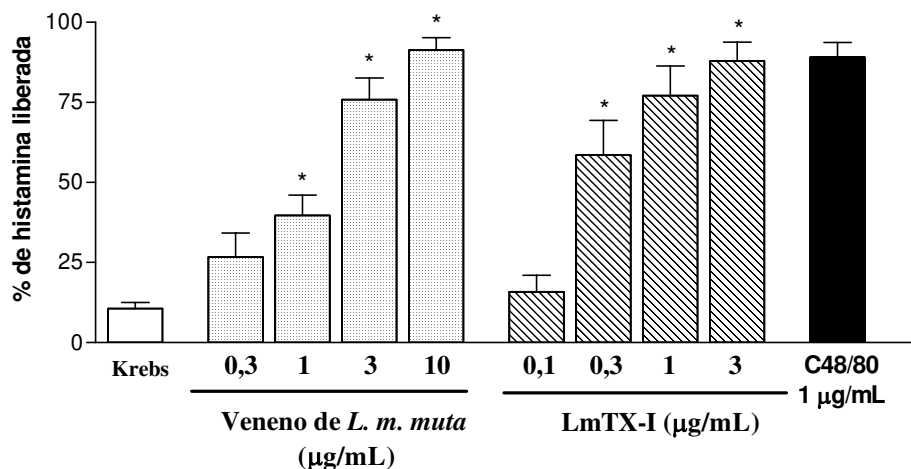


Figura 8. Liberação de histamina de mastócitos peritoneais induzida pelo veneno de *L. m. muta* (0,3-10 $\mu\text{g/mL}$) e LmTX-I (0,1-3 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados representam a média \pm S.E.M. de 3 experimentos realizados em duplicata. * $P < 0.05$ comparado com a liberação espontânea (Krebs).

4.5.3. Participação de metabólitos da COX e de PAF

O pré-tratamento dos ratos com indometacina (5 mg/kg), um inibidor não-seletivo de COX, diminuiu significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas na pele induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio, n=5) ou pela LmTX-I (0,1 µg/sítio, n=5) como mostrado na Figura 9 A. O pré-tratamento com o antagonista de PAF, PCA4248 (5 mg/kg), não afetou o extravasamento induzido pelo veneno bruto, entretanto, reduziu significativamente o extravasamento induzido pela LmTX-I (Figura 9 B). Ambos os tratamentos não alteraram significativamente os valores basais observados nos sítios injetados com Tyrode.

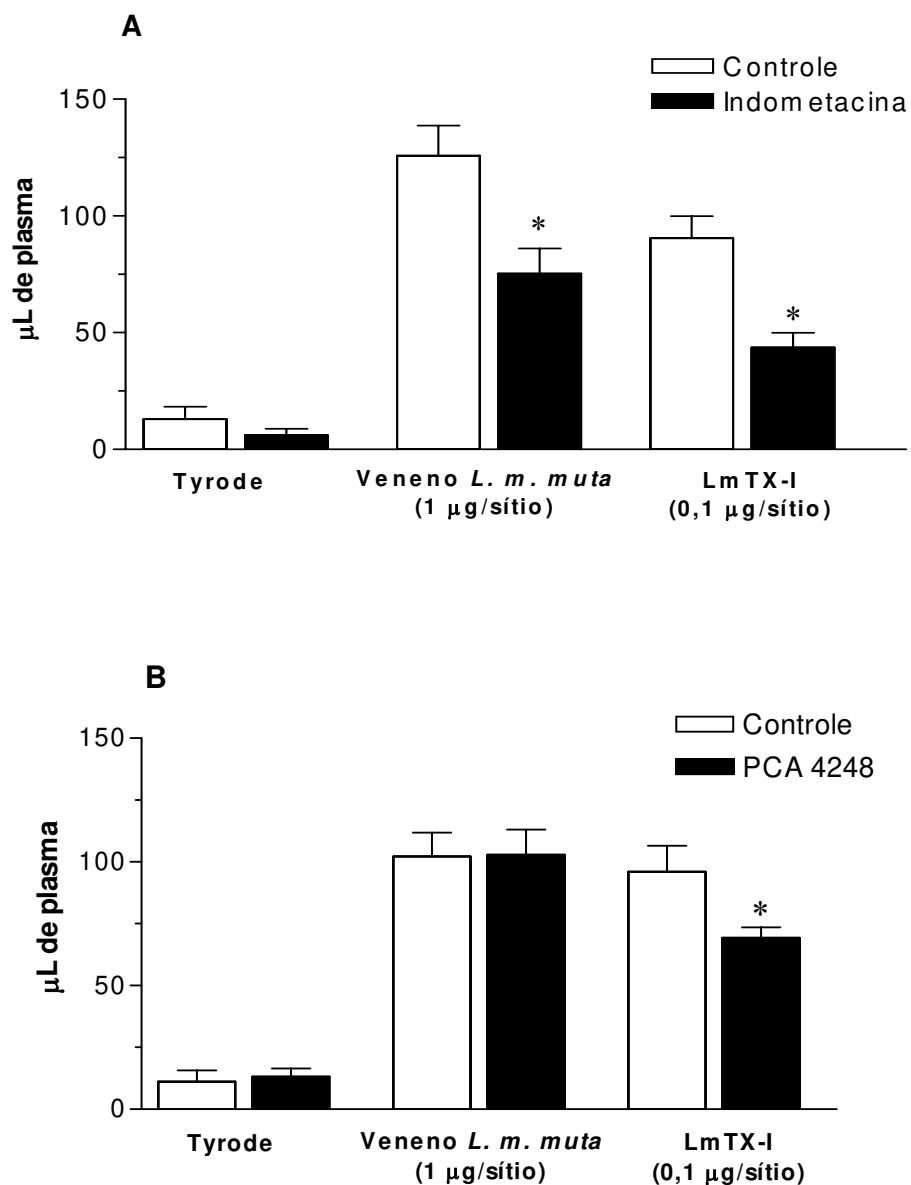


Figura 9. Efeito da indometacina (5 mg/kg; Painei A) ou PCA4248 (5 mg/kg; Painei B) no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio) ou LmTX-I (0,1 µg/sítio). Os valores estão expressos como média ± SEM de µL de plasma extravasado para n=5 animais. * $P < 0,05$ comparado com os respectivos sítios controles.

4.5.4. Papel do NO e receptores NK₁

A participação do NO no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de *L. m. muta* e LmTX-I foi investigado através da co-injeção de L-NAME (100 nmol/sítio). Esse inibidor não seletivo da síntese de NO reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio, n=5), mas não afetou o extravasamento basal induzido pela LmTX-I (0,1 µg/sítio, n=5; Figura 10 A). O tratamento não alterou significativamente os valores basais observados nos sítios injetados com Tyrode.

Investigamos também, a participação da substância P, um neuropeptídeo pró-inflamatório que age principalmente via receptor NK₁ na atividade inflamatória na pele dorsal de ratos utilizando o antagonista SR140333. A co-injeção do SR140333 (1 nmol/sítio, n=5), um antagonista de receptor NK₁, diminui significativamente o extravasamento plasmático na pele de ratos induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/ sítio). Entretanto, o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pela LmTX-I (0,1 µg/sítio, n=5) não foi alterado pela co-injeção do SR140333 (Figura 10 B). O agonista de receptor NK₁, GR73632 (100 pmol/sítio, n=5), causou aumento do acúmulo de plasma na pele de ratos que foi completamente abolido pelo SR140333 (35,9 ± 4,3 e 8,5 ± 3,5 µL, para sítios controles e co-injetados com SR140333 respectivamente, n=5).

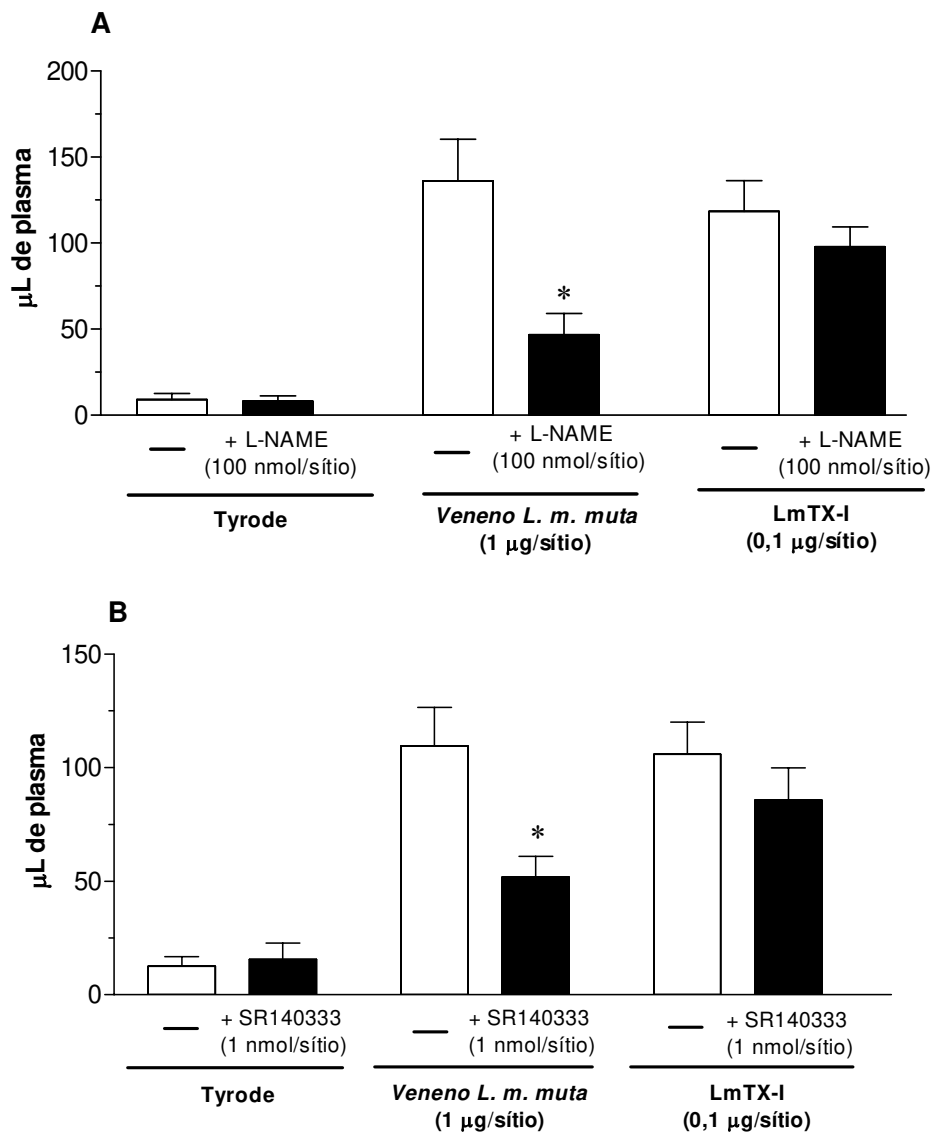


Figura 10. Inibição do extravasamento de proteínas plasmáticas induzida pelo veneno de *L. m. muta*, mas não pela LmTX-I mediante inibição da síntese não seletiva de NO (Painel A) ou de receptor NK₁ (Painel B). L-NAME (100 nmol/sítio) ou SR140333 (1 nmol/sítio) foi co-injetado com veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio), LmTX-I (0,1 µg/sítio) ou tyrode. Os valores estão expressos como média ± SEM de µL de plasma extravasado para n=5 animais. * $P < 0,05$ comparado com os respectivos sítios controles.

4.5.5. Papel dos receptores de bradicinina do tipo B₂

A participação dos receptores B₂, preferenciais para bradicinina, no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de *L. m. muta* e LmTX-I foi investigado através do pré-tratamento com icatibant (0,6 mg/kg), um antagonista do receptor B₂.

O pré-tratamento dos ratos com icatibant (0,6 mg/kg) não afetou o extravasamento plasmático na pele induzido pela LmTX-I (0,1 µg/sítio, n=5), entretanto, reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio, n=5) como mostrado na Figura 11. Nos ratos pré-tratados com icatibant o extravasamento de proteínas plasmáticas causado pela bradicinina (30 nmol/sítio, n=5) foi significativamente diminuído, validando o tratamento usado (160,3 ± 6,8 e 85,0 ± 3,7 µL de plasma, para os sítios de animais controles ou pré-tratados respectivamente, n=5).

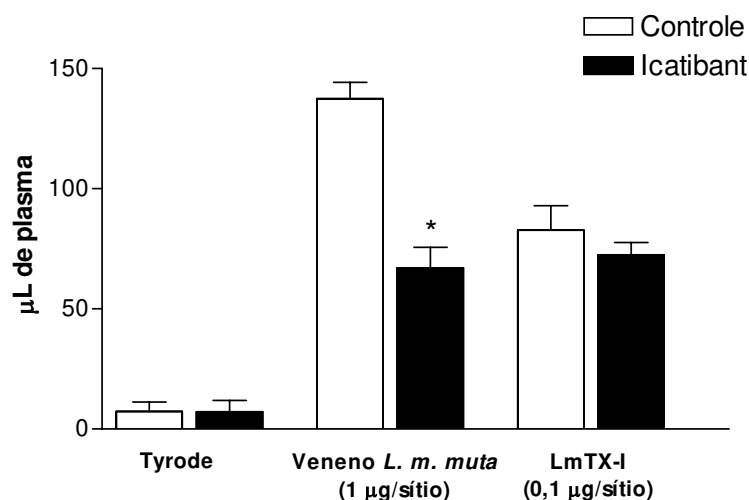


Figura 11. Efeito inibitório do Icatibant (0,6 mg/kg) no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de *L. m. muta* (1 µg/sítio), mas não pela LmTX-I (0,1 µg/sítio). Os valores estão expressos como média ± SEM de µL de plasma extravasado para n=5 animais. * $P < 0,05$ comparado com os respectivos sítios controles.



5. DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

É conhecido que o veneno laquétrico apresenta atividades fisiopatológicas semelhantes as do veneno bothrópico, ou seja, atividade coagulante, proteolítica, hemorrágica e inflamatória aguda. É relatada ainda, uma atividade cininogenase no veneno de *Lachesis muta*, que poderia explicar em parte, algumas alterações clínicas denominadas de “neurotóxicas” (Diniz e Oliveira, 1992). Observa-se um quadro neurotóxico no envenenamento por *L. muta*, fato não relatado no acidente bothrópico (Jorge e cols., 1997).

O envenenamento por *Bothrops* causa principalmente efeitos locais caracterizados por inflamação, dor, hemorragia e mionecrose (Gutierrez e cols., 1984; Trebien e Calixto, 1989, Chacur e cols., 2001; Carneiro e cols., 2002). Em modelos inflamatórios é descrito que os venenos bothrópicos causam inflamação caracterizada por infiltrado de leucócitos, edema, extravasamento de proteínas plasmáticas, os quais são efeitos decorrentes da ação de mediadores como aminas derivadas de mastócitos, mediadores derivados da ação das ciclooxigenases, bradicinina e mediadores quimiotáxicos dentre outros (Trebien e Calixto, 1989; Chaves e cols., 1995; Farsky e cols., 1997).

A resposta inflamatória local do veneno de *Lachesis muta muta* tem sido pouco estudada. O tratamento utilizado no envenenamento por *Lachesis* é um problema de saúde pública na região amazônica, onde o procedimento adotado é a utilização do antiveneno bothrópico cuja eficácia para neutralizar os efeitos letais do veneno laquétrico é considerada ainda incerta (Jorge e cols., 1997; Felicori e cols., 2005). Achados recentes aperfeiçoaram a produção do antiveneno específico para *Lachesis* por remoção de um dos componentes presentes no veneno, o qual possui atividade imunossupressora que impedia a produção de anticorpos anti-*Lachesis* (Stephano e cols., 2000).

No presente estudo, demonstramos que o veneno bruto de *L. m. muta* induz edema de pata e extravasamento de proteínas plasmáticas na pele dorsal de ratos de maneira dose-dependente. Estes dados foram similares aos observados por outra espécie de *Lachesis* (Soares de Moura *e cols.*, 1998) e também, por outros venenos bothrópicos incluindo *Bothrops asper* (Chaves *e cols.*, 1995; 2006), *Bothrops insularis* (Barbosa *e cols.*, 2003), *Bothrops jararaca* (Trebien e Calixto, 1989) e *Bothrops lanceolatus* (de Araújo *e cols.*, 2000; de Faria *e cols.*, 2001; Guimarães *e cols.*, 2004; Farsky *e cols.*, 2005).

Na pata de ratos verificamos indução de edema nas doses de 0,3-3 µg/pata. A LmTX-I também induziu aumento do volume da pata de ratos de maneira dose-dependente. Tanto o edema induzido pelo veneno, quanto pela LmTX-I, desenvolveram-se rapidamente com pico (atividade máxima) antes da primeira hora após a injeção, indicando que possivelmente haveria a participação de mastócitos (dada a semelhança com o efeito da injeção de composto 48/80 na pata de ratos).

Em modelo de edema de pele observamos que o veneno bruto também induziu extravasamento de proteínas plasmáticas de maneira dose-dependente em doses variando entre 0,03-10 µg/sítio. Vários trabalhos demonstraram que as aminas derivadas de mastócitos (histamina e serotonina) são importantes mediadores envolvidos na resposta edematogênica induzida por veneno bothrópico em ratos e camundongos, que podem ser liberadas principalmente pela ação das PLA₂s presentes nos venenos bothrópicos (Gutiérrez *e cols.*, 1986; Lloret e Moreno, 1993; Chaves *e cols.*, 1998; Landucci *e cols.*, 1998, 2000; Soares de Moura *e cols.*, 1998; Andrião-Escarso *e cols.*, 2000; Kanashiro *e cols.*, 2002). De fato, é conhecido que o veneno laquétrico apresenta atividades fisiopatológicas semelhantes às do veneno bothrópico e mostramos que há similaridades na atividade edematogênica.

Está bem estabelecido que as PLA₂s têm um importante papel no processo inflamatório, pois através da ativação delas são originados precursores lipídicos tais como mediadores derivados do ácido araquidônico e PAF (Teixeira *e cols.*, 2003). As PLA₂s obtidas de venenos de serpentes são muito utilizadas como ferramentas farmacológicas devido ao fato de possuírem uma grande homologia estrutural com as isoformas de PLA₂s endógenas humanas e, conseqüentemente, produzirem mediadores inflamatórios. Pouco é conhecido sobre a fisiopatologia da LmTX-I, uma PLA₂ Asp-49 básica isolada do veneno de *L. m. muta* (Damico *e cols.*, 2005b).

Nossos dados demonstram que a LmTX-I induz edema de pata e extravasamento de proteínas plasmáticas na pele dorsal de ratos de maneira dose-dependente e na mesma magnitude que o veneno bruto. A LmTX-I perfaz aproximadamente 2,5% do veneno bruto (Damico *e cols.*, 2005b), o que corresponde a aproximadamente 25 ng contidas em 1 µg de veneno bruto. A LmTX-I induziu extravasamento de plasma significativamente com doses maiores que 3 ng/sítio (ver fig. 6), assim sugerindo que boa parte das ações inflamatórias do veneno bruto se deve a ação da LmTX-I. Entretanto, outros componentes do veneno, como proteases, metaloproteinases ou lectinas devem também contribuir para as propriedades edematogênicas do veneno bruto.

Estudos anteriores confirmaram que PLA₂s de venenos de serpentes são capazes de ativar mastócitos *in vitro* levando a liberação de aminas (Moreno *e cols.*, 1992; Lau e Roche, 1997; Landucci *e cols.*, 1998; 2000) e quimiotaxia de neutrófilos (Gambero *e cols.*, 2002; 2004). Em estudos *in vivo*, as PLA₂s ofídicas causam edema de pata e extravasamento de proteínas plasmáticas na pele de rato (Cirino *e cols.*, 1989; Moreno *e cols.*, 1992; Landucci *e cols.*, 1998; 2000; Câmara *e cols.*, 2003), bem como induzem influxo de leucócito (Castro *e cols.*, 2000), em parte, em conseqüência da liberação de histamina e serotonina.

Em nossos estudos, o tratamento de ratos com mepiramina (antagonista de receptor de histamina do subtipo 1) ou ciproheptadina (antagonista de receptor de histamina/serotonina) reduziu significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno e pela LmTX-I. Além disso, ambos estimularam mastócitos *in vitro* levando a liberação de histamina, reforçando que a ativação de mastócitos locais tem papel importante nas propriedades edematogênicas de ambas as substâncias.

Os mediadores derivados da ciclooxigenase e PAF são importantes mediadores de diversos tipos de condições inflamatórias, incluindo aquelas induzidas por venenos e toxinas isoladas de venenos (Mitchell *e cols.*, 1995, Portanova *e cols.*, 1996).

Em nossos estudos, o tratamento dos animais com indometacina (inibidor não-seletivo das ciclooxigenases) reduziu significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas na pele induzido pelo veneno bruto e pela LmTX-I, indicando importante papel para os metabólitos do ácido araquidônico e estando de acordo com estudos anteriores que demonstraram redução da resposta edematogênica causada por diferentes venenos bothrópicos pela indometacina, a exemplo de *B. jararaca* (Trebien e Calixto, 1989), *B. asper* (Chaves *e cols.*, 1995), *B. lanceolatus* (de Araújo *e cols.*, 2000), *B. insularis* (Barbosa *e cols.*, 2003), e também pela *L. muta rhombeata* (Soares de Moura *e cols.*, 1998), bem como PLA₂s isoladas de venenos (Calhoun *e cols.*, 1989; Fuly *e cols.*, 2002).

Entre os metabólitos derivados da COX, a PGE₂ produzida por células residentes tem mostrado um papel crítico em diversos tipos de condições inflamatórias como consequência de sua habilidade de potencializar a vasodilatação local e, conseqüentemente, a formação de edema e extravasamento (Brock e Peters-Golden, 2007). Assim sendo, é provável que o aumento da permeabilidade microvascular em resposta ao veneno e a LmTX-I seja um efeito secundário à produção de PGE₂ na região das arteríolas pré-capilares, levando ao aumento do

fluxo sanguíneo microvascular e extravasamento de proteínas plasmáticas. Recentemente foi demonstrado que a injeção intraplantar de veneno de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* em camundongos leva a um aumento significativo da concentração de PGE₂ no tecido. Tal resultado sugere que a liberação de PGE₂ contribui para o aumento da permeabilidade microvascular levando a formação de edema (Olivo e cols., 2007). Brain e Williams (1985), utilizando modelo de edema de pele em coelhos, atribuíram à formação de edema à uma ação sinérgica de mediadores que aumentam a permeabilidade microvascular e a vasodilatação.

O tratamento dos animais com PCA4248 (antagonista de receptor de PAF) não afetou o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno bruto, estando de acordo com outro estudo que demonstrou que o BN5221, um outro antagonista de receptor de PAF, não inibe o edema induzido pelo veneno de *B. asper* (Chacur e cols., 2001). Entretanto, PCA4248 foi capaz de reduzir o extravasamento de proteínas plasmáticas na pele induzido pela LmTX-I, provavelmente, devido a atividade fosfolipásica da LmTX-I (Asp49). As razões para essa discrepância entre o veneno total e a LmTX-I em animais pré-tratados com PCA4248 não são claras, mas podem estar relacionadas à ação de outros componentes, além da LmTX-I, encontrados no veneno bruto.

Sabe-se que a substância P é liberada de fibras sensoriais aferentes e causa extravasamento de proteínas plasmáticas agindo principalmente, através de receptores de taquicinina do subtipo NK₁ nas vênulas pós-capilares (Holzer, 1998). Estudo anterior demonstrou que as PLA₂s isoladas de venenos de *Crotalus durissus* (*C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella*) causam extravasamento de proteínas plasmáticas na pele de ratos induzido em parte pelo mecanismo de ativação de fibras C (Câmara e cols., 2003). Nossos resultados indicam que a co-injeção do SR140333, um antagonista seletivo de receptor NK₁, diminuiu significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo

veneno de *L. m. muta*, mas não afetou a resposta induzida pela LmTX-I. Esses resultados sugerem que outros componentes no veneno bruto podem ativar as fibras sensoriais levando a liberação de substância P e formação de edema não relacionado com a LmTX-I.

O NO é um potente agente vasodilatador produzido pelo endotélio e é capaz de modular o tônus microvascular (Furchgott e Vanhoutte, 1989; Singh e Evans, 1997; Moncada e Higgs, 2006). Inibidores da síntese de NO, tal como o L-NAME, são capazes de afetar a interação das células inflamatórias com o endotélio e o extravasamento de proteínas vasculares (Kubes, 1993; Ialenti *e cols.*, 2000; Rumbaut e Huxley, 2002; Ahluwalia *e cols.*, 2004). A administração aguda de L-NAME reduz o extravasamento de proteínas plasmáticas na pele de diferentes espécies animais em resposta à diminuição no fluxo sanguíneo microvascular (Hughes *e cols.*, 1990; Ialenti *e cols.*, 1992; Teixeira *e cols.*, 1993; Medeiros *e cols.*, 1995; Mariani-Pedroso *e cols.*, 1995). Neste estudo, o envolvimento do NO na formação de edema de pele em ratos induzido pelo veneno bruto de *L. m. muta* ou LmTX-I foi investigado pela co-injeção de L-NAME. Estudos prévios demonstraram que o NO contribui para a formação de edema de pata em camundongos induzido pelo veneno de *Bothrops insularis* (Barbosa *e cols.*, 2003) ou *Bothrops asper* (Chaves *e cols.*, 2006) e também para edema de pata em ratos induzido pelo veneno de *Lachesis muta rhombeata* (Soares de Moura *e cols.*, 1998). A co-injeção de L-NAME significativamente reduziu o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de *L. m. muta*, mas não afetou o extravasamento de plasma induzido pela LmTX-I.

Sabe-se que diferentes vasodilatadores tais como PGE₁, PGE₂, PGI₂ (prostaciclina), taquicininas e CGRP potencializam o aumento da permeabilidade vascular induzida por vários agentes (Severini *e cols.*, 2002; Brain e Grant, 2004). Interessantemente, a vasodilatação arteriolar é mantida pelas prostaglandinas e/ou fator hiperpolarizante derivado do endotélio

(EDHF) em camundongos deficientes de eNOS (Sun *e cols.*, 1999; Huang *e cols.*, 2000; Bucci *e cols.*, 2005). Dessa forma poderíamos sugerir que a formação direta de prostaglandinas (especialmente PGI₂) proveniente da atividade fosfolipásica da LmTX-I possa superar a falta de NO local, mantendo assim o tônus vascular e conseqüentemente o extravasamento de proteínas plasmáticas na microcirculação da pele de ratos.

A bradicinina é liberada a partir do cininogênio de alto peso molecular, principalmente, pela ação enzimática de serinoproteases e calicreínas plasmáticas e exerce seus efeitos preferencialmente através da ativação de receptores B₂ (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola *e cols.*, 1992). O antagonista de receptor B₂, HOE 140 (icatibant), diminui o extravasamento plasmático, o acúmulo de leucócitos e os níveis de nitrito/nitrato no fluido sinovial de coelhos durante artrite induzida pelo veneno de *B. jararaca* (Guzzo *e cols.*, 2000).

Em nossos estudos, o pré-tratamento com icatibant reduziu significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno de *L. m. muta*, sugerindo que a formação local de cininas contribui para o edema induzido pelo veneno. Por outro lado, o extravasamento plasmático induzido pela LmTX-I não foi inibido pelo tratamento com icatibant, indicando que a bradicinina não seja um mediador central na resposta inflamatória induzida pela LmTX-I. De acordo com isto, outros estudos demonstraram que o icatibant não afetou o edema de pele em coelhos induzido por piratoxina-I, uma PLA₂ Lys-49 isolada de *B. pirajai* (Landucci *e cols.*, 2000).

Em resumo, a injeção do veneno bruto e da LmTX-I foram capazes de induzir edema de pata e extravasamento de proteínas plasmáticas na pele dorsal de ratos de maneira dose-dependente. O extravasamento plasmático induzido pelo veneno bruto foi significativamente inibido pelo tratamento com mepiramina, ciproptadina, L-NAME, SR140333, icatibant e indometacina, mas não pelo tratamento com PCA4248. O extravasamento na pele induzido

pela LmTX-I foi significativamente inibido pelos tratamentos com ciproheptadina, mepiramina, indometacina e PCA4248, enquanto que os tratamentos com L-NAME, SR140333 e icatibant não causaram efeito. Tanto o veneno bruto quanto a LmTX-I induziram a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos de maneira concentração-dependente.

Embora os dados deste estudo não sejam suficientes para indicar o mecanismo exato da ação do veneno e da LmTX-I, podemos sugerir que a desgranulação dos mastócitos *in vivo* seja um dos mecanismos iniciais da ação do veneno bruto. A LmTX-I contribuiria para a ação inflamatória do veneno na medida em que induz a desgranulação de mastócitos e a produção de mediadores derivados do ácido araquidônico. A partir daí, não só a liberação de aminas de mastócitos e a produção de mediadores lipídicos, mas também a ação de outros componentes do veneno bruto atuariam causando um aumento da produção de NO, o qual colaboraria para o extravasamento de líquidos, proteínas plasmáticas e, conseqüentemente, para a liberação de mediadores derivados do plasma (como a bradicinina). As fibras sensoriais poderiam ser ativadas inicialmente por constituintes do veneno (mas não pela LmTX-I) ou durante a liberação de outros mediadores inflamatórios, como as aminas, contribuindo para a liberação de neuropeptídeos (como a substância P).

Vale a pena ressaltar que o entendimento do quadro inflamatório que é observado clinicamente durante o envenenamento por essa espécie de serpente, pode servir de base para futuras estratégias direcionadas para minimizar os efeitos inflamatórios do veneno e de suas toxinas.



6. CONCLUSÕES



6. CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- i. O veneno de *Lachesis muta muta* e a LmTX-I aumentam a permeabilidade microvascular na pata e pele de ratos por mecanismos parcialmente envolvendo ativação de mastócitos *in vivo*.
- ii. A resposta inflamatória induzida pelo veneno bruto deve contar com a ação de outros componentes além da LmTX-I.
- iii. Os metabólitos do ácido araquidônico participam para o efeito inflamatório de ambos.
- iv. Substância P, bradicinina e NO medeiam o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo veneno bruto, mas não pela LmTX-I.
- v. PAF medeia a resposta induzida pela LmTX-I, mas não pelo veneno bruto.

De modo geral, pode-se afirmar que esse estudo poderá servir de base para futuros estudos envolvendo estratégias para neutralizar o veneno e os efeitos de suas toxinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar AS, Alves CR, Melgarejo A, Giovanni-de-Simone S. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. *Toxicon* 1996; 34:555-565.
- Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean, PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S, Hobbs AJ. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101:1386-91.
- Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Ângulo Y, Diaz C, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modification on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 2000; 82:735–763.
- Bahl AK, Dale MM, Foreman JC. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the accumulation and release of interleukin-1-like activity by peritoneal macrophages from the mouse. *Br J Pharmacol*. 1994;113 (3):809-14.
- Barbosa AM, do Amaral RO, Teixeira CF, Hyslop S, Cogo JC. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 2003; 42 (5):515-23.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*. 1992; 44 (1):1-80.

- Boer-Lima PA, Gontijo JA, da Cruz-Höfling MA. Histologic and functional renal alterations caused by Bothrops moojeni snake venom in rats. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61 (5):698-706.
- Brain S, Lewis GP, Whittle BJ. Actions of phospholipase-A₂ on mast-cell histamine release and paw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 1977; 59 (3):440P-1P.
- Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol* 1985; 86:855-860.
- Brain, SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004; 84 (3):903-34.
- Brock TG, Peters-Golden M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *ScientificWorldJournal.* 2007; 7:1273-84.
- Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa WC, Ignarro LJ, Cirino G. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102 (3): 904-908.
- Calhoun W, Yu J, Sung A, Chau TT, Marshall LA, Weichman BM, Carlson RP. Pharmacologic modulation of D-49 phospholipase A₂-induced paw edema in the mouse. *Agents Actions.* 1989; 27 (3-4):418-21.
- Câmara PRS, Esquisatto LCM, Camargo EA, Ribela MTCP, Toyama MH, Marangoni S, de Nucci G, Antunes E. Inflammatory oedema induced by phospholipases A₂ isolated from

- Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon* 2003; 41:823-829.
- Camargo EA, Esquisatto LC, Esquisatto MA, Ribela MT, Cintra AC, Giglio JR, Antunes E, Landucci ECT. Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A₂ in rats. *Toxicon* 2005; 46 (8):921-926.
- Canaan S, Zadori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, Sadilek M, Moreau ME, Tijssen P, Gelb MH. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A₂. *J Biol Chem* 2004; 279:14502-8.
- Carneiro AS, Ribeiro OD, De Franco M, Cabreira WH, Vorraro F, Siqueira M, Ibanez OM, Starobinas N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* 2002; 40:1571-1579.
- Carredano E, Westerlund B, Persson B, Saarinen M, Ramaswamy S, Eaker D, Eklund H. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. *Toxicon*.1998; 36:75-92.
- Castro RC, Landucci ECT, Toyama MH, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon* 2000; 38:1773-85.
- Chacur M, Picolo G, Gutierrez JM, Teixeira CF, Cury Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 2001; 39:1173-1181.
- Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 1995; 33:31-39.

- Chaves F, León G, Alvarado VH, Gutiérrez JM. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1998; 36:1861–1869.
- Chaves F, Teixeira CFP, Gutiérrez J M. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice *Inflam. Res.* 2006; 55:245–253.
- Cirino G, Peers SH, Wallace JL, Flower RJ. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 166:505-510.
- Costa SKP, Esquisatto LCM, Camargo E, Gambero A, Brain SD, De Nucci G, Antunes E. Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. *Life Science* 2001; 69:1573-85.
- Damerau B, Lege L, Oldigs HD, Vogt W. Histamine release, formation of prostaglandinlike activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmac* 1975; 287:141-56.
- Damico DC, Bueno LG, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, da Cruz-Hofling MA, Novello JC. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon* 2005a; 46 (2):222-9.
- Damico DC, Bueno LG, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S, da Cruz-Hofling MA, Novello JC. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A₂ (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). *Toxicon* 2006;1:759-65.

- Damico DC, Lilla S, de Nucci G, Ponce-Soto LA, Winck FV, Novello JC, Marangoni S. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A₂ isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim Biophys Acta* 2005b; 1726 (1):75-86.
- Damico DC, Nascimento JM, Lomonte B, Ponce-Soto LA, Joazeiro PP, Novello JC, Marangoni S, Collares-Buzato CB. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A(2) (LmTX-I) in cultured cells. *Toxicon* 2007; 49 (5):678-92.
- Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol* 1990; 31:228-238.
- de Araújo AL, Souza AO, Cruz-Höfling MA, Flores CA, Bon C. *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon* 2000; 38:209-221.
- de Castro RC, Landucci ECT, Toyama MH, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon* 2000; 38:1773-85.
- de Faria L, Antunes E, Bon C, de Araújo AL. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon*. 2001; 39:825-30.
- Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269:13057-60.

- Díaz-Oreiro C, Gutiérrez JM. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon*. 1997; 35:241-52.
- Diniz MR Oliveira EB. Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (bushmaster). *Toxicon* 1992; 30:247-258.
- Enerback I, Svenson I. Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of Percoll. *J. Immunol. Methods*. 1980; 39:135-142.
- Farsky SH, Antunes E, Mello SB. Pro and antiinflammatory properties of toxins from animal venoms. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4:401-11.
- Farsky SHP, Costa-Cruz JWM, Cury Y, Teixeira CFP. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. In vivo and in vitro studies. *Toxicon* 1997; 35:85-93.
- Felicori LF, Chávez-Olórtegui C, Sánchez EF. Specific identification of *Lachesis muta muta* snake venom using antibodies against the plasminogen activator enzyme, LV-PA. *Toxicon* 2005; 45:803-806.
- Filliatre LG, Sayah S, Latournerie V, Renaud JF, Finet M, Hanf R. Cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *Br. J. Pharmacol*. 2001; 132:1581-1589.
- Flower RJ, Blackwell GJ. The importance of phospholipase A₂ in prostaglandin biosynthesis. *Biochem Pharmacol* 1976; 25 (3):285-91.

- Fuly AL, Calil-Elias S, Zingali RB, Guimarães JA, Melo PA. Myotoxic activity of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (bushmaster) snake venom. *Toxicon* 2000; 38:961-971.
- Fuly AL, de Miranda AL, Zingali RB, Guimarães JA. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63 (9), 1589-97.
- Fuly AL, Machado OLT, Alves EW, Carlini CR. Mechanism of the inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (bushmaster) snake venom. *Thromb Haemost* 1997; 78:1372-1380.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989; 3:2007-18.
- Gambero A, Landucci ECT, Cintra ACO, De Nucci G, Antunes E. Signalling pathways regulating human neutrophil chemotaxis induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 2004; 44:473-8.
- Gambero A, Landucci ECT, Toyama MH, Marangoni S, Giglio JR, Nader HB, Dietrich CP, De Nucci G, Antunes E. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:65-72.
- Gelb MH, Valentini E, Ghomashchi F, Lazdunskii M, Lambeau G. Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A₂. *J Biol Chem* 2000; 275:39823-6.

- Giraldelo CM, Zappellini A, Muscará MN, De Luca IM, Hyslop S, Cirino G, Zatz R, De Nucci G, Antunes E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 257:87-93.
- Guimarães AQ, Cruz-Höfling MA, Ferreira de Araújo PM, Bon C, de Araújo A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflamm Res.* 2004; 53 (7):284-91.
- Gutiérrez JM, Lomonte B, Chaves F, Moreno E, Cerdas L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol* 1986; 84C:159–164.
- Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venom. *Toxicon* 1995; 33 (11):1405-1424.
- Gutierrez JM, Ownby CL, Odell GV. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol* 1984; 40:367-379.
- Guzzo ML, Farsky SH, De Nucci G, Antunes E, Silva MA, Mello SB. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 2000; 38 (11):1535-46.
- Heinrikson RL, Krueger ET, Keim PS. Amino acid sequence of phospholipase A₂ from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipase A based upon structural determinants. *J Biol Chem* 1977; 252: 913-21.
- Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *General Pharmacology* 1998; 30 (1):5–11.

- Hua XY, Lundberg JM. Dual capsaicin effects on ureteric motility: low dose inhibition mediated by calcitonin gene-related peptide and high dose stimulation by tachykinins? *Acta Physiol Scand.* 1986; 128 (3):453-65.
- Huang A, Sun D, Smith CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A, Kaley G. In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000; 278 (3):H762-H768.
- Hughes SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur J Pharmacol.* 1990; 191: 481-4.
- Ialenti A, Ianaro A, Maffia P, Sautebin L, Di Rosa M. Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carrageenin-induced rat pleurisy. *Inflamm Res.* 2000; 49, 411-7.
- Ialenti A, Ianaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1992; 211 (2):177-82.
- Jorge MT, Sano-Martins IS, Tomy SC, Castro SCB, Ferrari RA, Ribeiro LA, Warrell DA. Snakebite by the Bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. *Toxicon* 1997; 35:545-554.
- Kanashiro MM, Escocard RCM, Petretski JH, Prates MV, Alves EW, Machado OLT, Dias da Silva W, Kipnis TL. Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1179–1186.
- Kini RM. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? *Toxicon.* 1997; 34:1287-94.

- Kini RM. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2005; 34:200-4.
- Krizaj I, Bieber AL, Ritonja A, Gubensek F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur J Biochem.* 1991; 202:1165-8.
- Kubes P. Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP. *Am J Physiol.* 1993; 265:H1909-15.
- Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *TiPS* 1999; 20:162-70.
- Landucci ECT, Castro RC, Pereira MF, Cintra ACO, Giglio JR, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, de Nucci G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Euro J Pharmacol* 1998, 343:257-263.
- Landucci ECT, Castro RC, Toyama M, Giglio JR, Marangoni S, de Nucci G, Antunes E. Inflammatory oedema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. *Biochem Pharmacol* 2000; 59:1289–1294.
- Lau HY, Roche CM, 1997. Effects of secretory phospholipase A₂ enzymes on mast cells of rat, guinea pig and human. *Inflamm Res* 1997; 46, Suppl 1:S19-20.
- Lloret S, Moreno JJ. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* 1993; 31: 949–956.

- Lomonte B, Angulo Y, Santamaría C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. *Toxicon*. 2003; 42:307-12.
- Magalhães A, Da Fonseca BC, Diniz CR, Gilroy J, Richardson M. The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Lett* 1993; 329:116-120.
- Maraganore JM, Merutka G, Cho W, Welches W, Kézdy FJ, Heinrikson RL. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem*. 1984; 259: 13839-43.
- Mariani-Pedroso SR, Bizeto L, Antunes E, Zatz R, de Nucci G. Dissimilarity between prostaglandin E1 and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995; 52 (6):399-402.
- Mebis D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol Ther*. 1990; 48:223-36.
- Medeiros MV, Binhara IM, Moreno Júnior H, Zatz R, De Nucci G, Antunes E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. *Eur J Pharmacol*. 1995; 285:109-14.
- Ministério da saúde do Brasil – Fundação Nacional da Saúde – Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por animais peçonhentos. 2º Ed. - Brasília, D.F., 2001, p.120.
- Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol*. 1995; 50 (10):1535-42.

- Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 176 (1):213-54.
- Moreno JJ, Ferrer X, Ortega E, Carganico G. PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. *Agents Actions* 1992; 36:258-263.
- Mosior M, Six DA, Dennis EA. Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem*. 1998; 273:2184-91.
- Murakami M, Nakatani Y, Hara N, Kudo I, Inoue K. Role of phospholipase A₂ in mast cell activation and function. In: Glaser K.B, Vadas P. Phospholipase A₂. In: *Clinical Inflammation: Molecular Approches to Pathophysiology, New York, CRC Press, 1995*; vol. 5: 93-124.
- Ogilvie ML, Dockter ME, Wenz L, Gartner TK. Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. *J Biochem (Tokyo)*. 1986; 100:1425-1431.
- Olivo Rdo A, Teixeira CF, Wallace JL, Gutierrez JM, Zamuner SR. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon* 2007; 49 (5):670-7.
- Ownby CL, Gutiérrez JM, Colberg TR, Odell GV. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 1982; 20 (5):877-85.

- Pellegrini Filho A, Vital Brazil O. Origem da paralisia respiratória causada pela peçonha de *Micrurus frontalis*. *Ciênc Cult* 1976; 28:199.
- Polgár J, Magnenat EM, Peitsch MC, Wells TN, Clemetson KJ. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). *Biochem J*. 1996; 319:961-8.
- Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med*. 1996; 184:883-91.
- Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*. 1980; 32 (1):1-46.
- Ribeiro LA, Albuquerque MJ, De Campos VA. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: Avaliação de 43 casos, 1988/1998. *Ver Ass Méd Brás* 1988; 44:312-318.
- Ridger VC, Pettipher ER, Bryant CE, Brain SD. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. *J Immunol*. 1997; 159:383-390.
- Rosenthal R, Méier J, Koelz A, Müller C, Wegmann W, Vogelbach P. Intestinal ischemia after bushmaster (*Lachesis muta*) snakebite – a case report. *Toxicon* 2002; 40:217-220.

- Rucavado A, Flores-Sanchez E, Franceschi A, Magalhães A, Gutiérrez JM. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* 1999; 37:1297-1312.
- Rumbaut RE, Huxley VH. Similar permeability responses to nitric oxide synthase inhibitors of venules from three animal species. *Microvasc Res.* 2002; 64:21-31.
- Sanchez EF, Costa MIE, Chaves-Olorteghi C, Assakura MT, Mandelbaum FR, Diniz CR. Characterization of a hemorrhagic factor (LHF-I), isolated from the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. *Toxicon* 1995; 33:1653-1667.
- Sanchez EF, Magalhães A, Diniz CR. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon* 1987; 25:611-619.
- Sanchez EF, Santos CI, Magalhães A, Diniz CR, Figueiredo S, Gilroy J, Richardson M. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 2000; 378:131-141.
- Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev.* 2002; 54 (2):285-322.
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004;18 (3):385-405.
- Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH Jr, 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959; 127:182-6.

- Silva LM, Diniz CR, Magalhães A. Purification and partial characterization of an arginine ester hydrolase from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta noctívaga*. *Toxicon* 1985; 23:707-718.
- Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J*. 1997; 10 (3):699-707.
- Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: Classification and characterization. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1488:1-19.
- Snyder F. Biochemistry of platelet-activating factor: a unique class of biologically active phospholipids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 190 (2):125-35.
- Soares de Moura R, Aguiar AS, Melgarejo AR, Carvalho LCRM., 1998. Pharmacological profile of mouse hind-paw edema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. *Toxicon* 36 (5):771-780.
- Stephano MA, Guidolin R, Higashi HG, Tambourgi DV, Sant'Anna OA. The improvement of the therapeutic anti-*Lachesis muta* serum production in horses. *Toxicon* 2005; 45 (4):467-73.
- Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A, Kaley G. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ. Res.* 1999; 85 (3):288-293.
- Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 2003; 42 (8):947-962.

- Teixeira MM, Williams TJ, Hellewell PG. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol*. 1993; 110:1515-21.
- Torres Jr R, Torres AMA, Arroyo-Parajo MA. Coagulation disorders in bushmaster envenomation (Letter). *Lancet* 1995; 346:449-450.
- Trebien HA, Calixto JB. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions* 1989, 26:292–300.
- Van den Bergh CJ, Slotboom AJ, Verheij HM, de Haas GH, 1989. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A₂ and their importance for enzymatic activity. *J Cell Biochem* 1989; 39:379-90.
- Verheij HM, Egmond MR, de Haas GH. Chemical modification of the alpha-amino group in snake venom phospholipases A₂. A comparison of the interaction of pancreatic and venom phospholipases with lipid--water interfaces. *Biochemistry*. 1981; 20:94-9.
- Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*. 1999; 79 (1):181-213.
- Vital Brazil O. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. *J Formosan Med Assoc* 1972; 71:394-400.
- Wang JP, Teng CM. Comparison of the enzymatic and edema-producing activities of two venom phospholipase A₂ enzymes. *Eur J Pharmacol* 1990; 190:347-54.

Zamudio KR, Greene HW. Phyleography of the Bushmaster (*Lachesis muta*, Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics and conservation. *Biol J Linnean Soc* 1997; 62:421-442.

Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CF. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon* 2001; 39 (10):1505-13.



8. Anexo



8. ANEXO



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

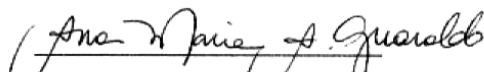
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1273-1, sobre "Estudo das frações e da PLA2 do veneno de Lachesis muta muta em modelos inflamatórios", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto De Nucci / Tatiane Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de maio de 2007.

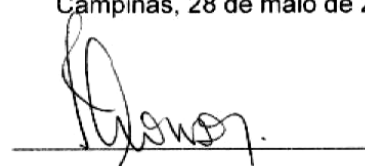
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1273-1, entitled "Study of venom fraction and PLA2 isolated from Lachesis muta muta in inflammatory models", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 28, 2007.

Campinas, 28 de maio de 2007.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>