

ALESSANDRA DE QUEIROZ GUIMARÃES

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**ESTUDO DOS EFEITOS LOCAIS INDUZIDOS PELO
VENENO DE *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) EM RATOS**

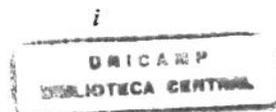
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Alessandra de Queiroz Guimarães.

Campinas, 22 de junho de 2001.

Albetiza Lobo de Araújo
Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo
- Orientadora -

CAMPINAS

2001



ALESSANDRA DE QUEIROZ GUIMARÃES

**ESTUDO DOS EFEITOS LOCAIS INDUZIDOS PELO
VENENO DE *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) EM RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

CAMPINAS

2001

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

G947e Guimarães, Alessandra de Queiroz
 Estudo dos efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) em ratos / Alessandra de Queiroz Guimarães. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

 Orientador : Albetiza Lobo de Araújo
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Edema. 2. Hemorragia. 3. Venenos de cobra. 4. Inflamação.
I. Albetiza Lobo de Araújo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Albetiza Lôbo de Araújo

Membros:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Profa. Dra. Yara Cury

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

Data: 22/06/01

DEDICATÓRIA

A Deus.

Aos meus queridos pais, pelo presente da vida.

A minha irmã Daniela e ao meu sobrinho Matheus.

Ao Heitor, pelo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Marlene, cuja meta principal foi proporcionar estudo às suas filhas, por acreditar ser a *EDUCAÇÃO* o único patrimônio que se pode legar;

À minha família, que tornou possível a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, pela orientação, convívio, entusiasmo e pela oportunidade do contato com a pesquisa científica;

Ao Dr. Cassian Bon, do Instituto Pasteur-França, pelo fornecimento do veneno de *Bothrops lanceolatus*;

À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling, pela colaboração no estudo morfológico, leitura do manuscrito da dissertação e sugestões;

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, pela co-orientação nos estudos imunológicos;

Aos amigos e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia e Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela atenção dispensada;

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela colaboração, sugestões, críticas e fornecimento das drogas e aparelhos necessários à realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pelas sugestões, críticas e auxílio;

À Profa. Dra. Iara Cury, pelos comentários e sugestões;

Ao amigo Luiz de Faria, pelo convívio e colaboração;

À técnica Alessandra Ponciano, pela assistência e amizade;

Ao Gustavo Henrique da Silva pelo auxílio técnico no estudo morfológico e trabalho fotográfico;

Aos amigos Chariston, Sara, Yoko, Francine e Vanessa pelo companheirismo e apoio;

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia que contribuíram para minha formação;

A todos alunos do curso de Pós Graduação e funcionários do Departamento de Farmacologia, pela convivência agradável e inesquecível que tivemos;

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xxiii</i>
1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Venenos ofídicos.....	29
1.2. Inflamação.....	33
1.3. Soroterapia.....	35
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Materiais.....	43
3.1.1. Animais.....	43
3.1.2. Veneno e soro anti- <i>Bothrops lanceolatus</i>	43
3.1.3. Fármacos e reagentes.....	43
3.2. Métodos.....	44
3.2.1. Determinação do aumento do volume de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	44
3.2.2. Diálise do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	44
3.2.3. Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	44

3.2.3.1. Pré-tratamentos.....	44
3.2.3.1.1. Metisergida.....	44
3.2.3.1.2. Mepiramina e Ciproheptadina.....	45
3.2.3.1.3. Dexametasona.....	45
3.2.3.1.4. Indometacina.....	45
3.2.3.1.5. HOE 140.....	45
3.2.3.1.6. HOE 140 e metisergida.....	46
3.2.4. Efeito do EDTA sobre as atividades hemorrágica e edematogênica do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	46
3.2.5. Determinação da Atividade Hemorrágica.....	46
3.2.6. Reagente de Drabkin.....	47
3.2.7. Curva Padrão de Hemoglobina.....	47
3.2.8. Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> tratado com EDTA.....	48
3.2.9. Análise morfológica das atividades hemorrágica e edematogênica do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	48
3.2.10. Ensaio Imunoquímico.....	49
3.2.10.1. Precipitação do soro anti VBL em meio líquido.....	49
3.2.10.2. Determinação quantitativa de proteínas.....	50

3.2.10.3. Testes imunoquímicos de imunodifusão.....	50
3.2.10.4. Curva de Precipitação.....	51
3.9.10.5. Ensaio <i>in vivo</i>	52
3.2.11. Análise Estatística.....	53
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Aumento do volume de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	57
4.2. Efeito da diálise sobre o edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	57
4.3. Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	57
4.4. Efeito do EDTA sobre as atividades hemorrágica e edematogênica do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	58
4.5. Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> tratado com EDTA.....	58
4.6. Análise morfológica das atividades hemorrágica e edematogênica do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	66
4.7. Ensaio Imunoquímico.....	75
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÕES.....	91
7. SUMMARY.....	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

VBL	veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>
Anti-VBL	soro anti- <i>Bothrops lanceolatus</i>
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
VBL+EDTA	veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> incubado com EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral (tumoral necrosis factor)
HOE 140	d-Arg-[Hyp ³ , Thi ⁵ ,d-Tic ⁷ ,Oic ⁸] - bradicinina
i.p.	intraperitonal
i.d.	intradérmica
i.m.	intramuscular
s.c.	subcutânea
i.v.	intravenosa
RPM	rotações por minuto
H.E.	hematoxilina-eosina
NaOH	hidróxido de sódio

LISTA DE TABELAS

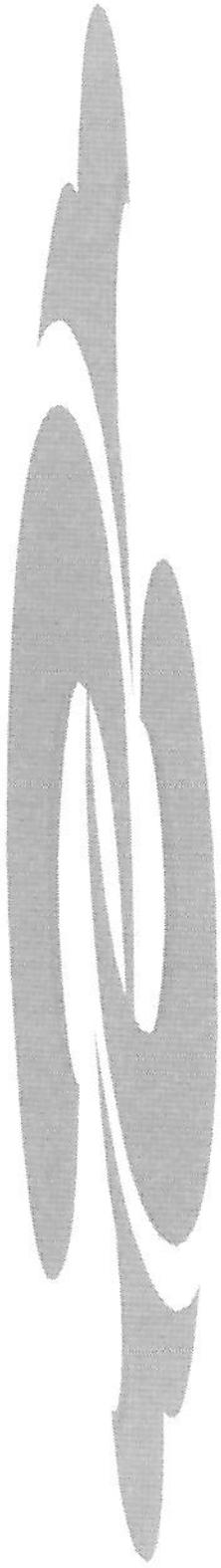
	<i>Pág</i>
Tabela 1: Determinação quantitativa de proteínas do soro anti- <i>Bothrops lanceolatus</i> antes e após precipitação em meio líquido.....	76
Tabela 2: Dados quantitativos da precipitação específica no sistema VBL e soro anti-VBL parcialmente purificado.....	77

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
Figura 1: serpente <i>Bothrops lanceolatus</i>	32
Figura 2: Aspecto do músculo gastrocnêmio 3 horas após injeção (i.m.) do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> incubado (A) ou não (B) com EDTA 5mM.....	63
Figura 3: Aspecto histológico da região subplantar de ratos 15 minutos (A) e 3 horas (B) após injeção de salina fisiológica (0,1 ml).....	69
Figura 4: Aspecto histológico da região subplantar de ratos 15 minutos (A, B) e 3 horas (C, D) após injeção subplantar do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> (50 µg).....	70
Figura 5: Aspecto histológico da região subplantar de ratos 15 min (A, B) e 3 horas (C, D) após injeção subplantar do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> (50 µg) previamente incubado com EDTA 5mM.....	71
Figura 6: Micrografias da região subplantar de ratos demonstrando o efeito da dexametasona sobre as atividades hemorrágica e edematogênica induzidas pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> aos 15 minutos (A, B) e 3 horas (C, D) após injeção subplantar do veneno.....	72
Figura 7: Aspecto histológico do rim 3 horas após injeção subplantar de salina fisiológica 0,1 ml (A, B) ou veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> 50 µg (C, D) em ratos.....	73
Figura 8: Análise histológica do rim 3 horas após injeção subplantar do VBL (50 µg) em animais pré-tratados com dexametasona (A, B) ou VBL previamente incubado com EDTA (C, D).....	74
Figura 9: Neutralização <i>in vitro</i> da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> pelo soro anti-VBL parcialmente purificado....	79

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág</i>
Gráfico 1: Aumento do volume de pata (edema) induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> em ratos.....	59
Gráfico 2: Curso temporal do edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> em ratos.....	60
Gráfico 3: Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> em ratos.....	61
Gráfico 4: Efeito do EDTA sobre a atividade hemorrágica induzida pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> em músculo gastrocnêmio de ratos.....	62
Gráfico 5: Efeito do EDTA sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> em ratos.....	64
Gráfico 6: Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> tratado com EDTA em ratos.....	65
Gráfico 7: Curva de precipitação específica no sistema VBL e soro anti-VBL parcialmente purificado.....	78
Gráfico 8: Neutralização <i>in vitro</i> da atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> pelo soro anti-VBL parcialmente purificado.....	80



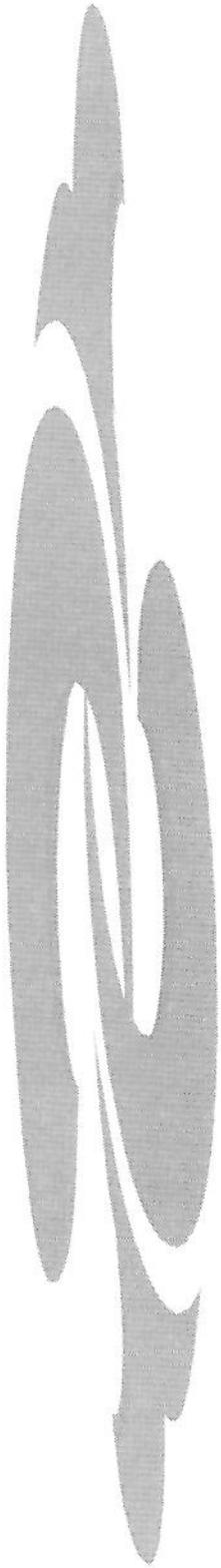
RESUMO

É bem conhecida a capacidade dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* induzirem intensos efeitos locais, tais como edema, hemorragia e necrose. Neste trabalho investigou-se os possíveis mediadores da resposta inflamatória local (edema) e hemorrágica induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) em ratos. O edema foi induzido por injeção subplantar de VBL (12,5 - 100 µg/pata) e quantificado com hidropletismógrafo. Em todas as doses testadas, a resposta edematogênica foi máxima aos 15 minutos, caindo, progressivamente, até desaparecer após 24 horas. As drogas metisergida, ciproheptadina, dexametasona, HOE 140 e associação HOE 140 - metisergida reduziram significativamente a atividade edematogênica induzida pelo VBL (50 µg), o que não ocorreu com a indometacina e mepiramina. O efeito edematogênico pareceu ser independente da presença de aminas biogênicas ou outras substâncias de baixo peso molecular no veneno, uma vez que a diálise não alterou significativamente este quadro. Investigando a atividade hemorrágica, tratamos o VBL com EDTA. O tratamento inibiu a atividade hemorrágica, bem como reduziu significativamente o edema. Nos animais injetados com VBL tratado com EDTA, o edema residual mostrou-se mediado pela serotonina, histamina, bradicinina e possivelmente, metabólitos do ácido araquidônico.

A análise histopatológica das patas injetadas com o VBL demonstrou aumento da região dérmica e dos espaços intercelulares, característicos do edema, além da presença de moderado infiltrado inflamatório e intensa hemorragia. O tratamento prévio dos animais com dexametasona reduziu o infiltrado celular e o edema, sem interferência na atividade hemorrágica. O estudo das patas injetadas com VBL tratado com EDTA demonstrou redução do número de hemáceas extravasculares e do edema, sem aparente alteração do infiltrado leucocitário.

Além dos efeitos locais, a injeção subplantar do VBL provocou alterações sistêmicas detectadas nos rins. Os túbulos distais apresentaram diâmetro aumentado; nos túbulos proximais, restos celulares provavelmente de natureza protéica, foram vistos ao lado de vasos sangüíneos congestionados. Nos corpúsculos renais houve aumento do espaço capsular de filtração, além de alterações na lobulação do tufo de capilares. O tratamento do veneno com EDTA reverteu alguns dos efeitos glomerulares e tubulares produzidos pelo envenenamento, o que não se observou em animais pré-tratados com dexametasona.

O soro anti-VBL parcialmente purificado previamente incubado com o VBL eliminou completamente a atividade hemorrágica e parcialmente a atividade edematogênica do veneno, não demonstrando eficácia superior quando os resultados foram comparados àqueles obtidos com o soro anti-VBL total. A inoculação intravenosa soro anti-VBL total ou parcialmente purificado, imediatamente após injeção do VBL, foi ineficaz na neutralização dos dois fenômenos.



1. INTRODUÇÃO

1.1. VENENOS OFÍDICOS

Ao longo da história das civilizações, poucos assuntos têm estimulado tanto a mente e a imaginação do homem quanto as serpentes. O temor por estes animais constituiu um sentimento misterioso e incontrolável, numa atitude que originou numerosas lendas e crenças nas antigas civilizações.

O mais velho relato sobre veneno de serpentes foi escrito em papiro, no Egito, cerca de 1600 a.C. Como posteriormente ilustrado por Sustrate e Nagarjuna 800 – 700 a.C., os venenos ofídicos eram utilizados com o objetivo de prolongar a vida e essa foi, talvez, a primeira ilustração de uso medicinal do veneno de serpentes. Francisco Redi, em 1664, demonstrou que os venenos necessitavam ser injetados na pele para produzirem seus efeitos, o que levou Felice Fontana, em 1766 a iniciar o estudo toxicológico e pesquisa científica sobre os venenos ofídicos. No final do século XIX, Silas Weir Mitchel (1866), um grande neurologista, publicou importantes observações sobre venenos de serpentes de várias espécies, enfatizando que em suas secreções havia substâncias com propriedades tóxicas para imobilizar, matar e digerir a presa. O início do estudo sistemático sobre os efeitos biológicos exercidos pelos venenos ofídicos, ficou a cargo de Flexner e Noguchi, que descreveram o efeito hemolítico de alguns venenos sobre o sangue (DEVI, 1968; CONDREA, 1979).

Os venenos ofídicos são os mais complexos de todos os venenos conhecidos. São produzidos por um par de glândulas especializadas, localizadas na boca da serpente e compostos por uma mistura complexa de proteínas, com ou sem atividade enzimática, bem como outras substâncias não protéicas, de natureza orgânica ou inorgânica. Embora a função biológica dos componentes inorgânicos não seja totalmente compreendida, acredita-se que alguns metais estejam relacionados com a estabilidade de certas proteínas, enquanto outros, como o Zn, Co, Fe e Cu sejam indispensáveis ao processo catalítico de componentes enzimáticos, como as metaloproteinases (BJARNASSON & FOX, 1994). Os venenos geralmente apresentam coloração branca, amarela ou laranja e a fração protéica, de maior importância do ponto de vista fisiopatológico, representa 90% do peso seco.

São conhecidas aproximadamente 2500-3000 espécies de serpentes. Deste total, aproximadamente 15% são consideradas venenosas, ou seja, apresentam a capacidade de inocular na presa o seu veneno (OHSAKA, 1979). Estas serpentes estão taxonomicamente agrupadas em três famílias: Elapidae, Viperidae e Colubridae (UNDERWOOD, 1979).

Os envenenamentos causados por serpentes venenosas representam um problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais, as quais geralmente correspondem a regiões subdesenvolvidas. No Brasil são notificados, anualmente, pelo Ministério da Saúde, cerca de 20.000 acidentes. Deste total, aproximadamente 90% são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (SAÚDE, 1998). No Estado de São Paulo, estas serpentes foram responsáveis por cerca de 85,6% dos casos (RIBEIRO *et al.* 1993) e envolveram principalmente *Bothrops jararaca*, *jararacussu*, *alternatus* e *neuwiedi* (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 1993).

Os efeitos causados pelo envenenamento botrópico podem ser classificados clinicamente, de acordo com a presença de alterações sistêmicas e locais. Estes venenos caracterizam-se por:

- Exercer intensa atividade proteolítica (MEBS, 1970; MANDELBAUN, REICHEL, ASSAKURA, 1982; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989);
- Coagular o plasma sanguíneo (ROSENFELD, HAMPE, KELEN, 1959; LÔBO DE ARAÚJO, KAMIGUTI, BON, 2000). A maioria dos venenos botrópicos ativa a coagulação sanguínea por atuarem sobre o fibrinogênio, a protrombina (Fator II), o Fator X (NAHAS *et al.*, 1964; 1979) e o Fator VIII (KIRBY *et al.*, 1979; NISHIDA *et al.*, 1994). As principais causas de óbitos no envenenamento botrópico estão relacionados a sangramentos em órgãos vitais e choque (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1991).
- Liberar substâncias farmacologicamente ativas, tais como histamina e bradicinina (ROTHSCHILD & ROTHSCCHILD, 1979);

- Produzir hemorragia (BJARNASON & TU, 1978; FABIANO & TU, 1981). Muitas toxinas hemorrágicas, hoje bioquimicamente caracterizadas como zinco metaloproteinases (BJARNASSON & FOX, 1988), foram isoladas de venenos de serpentes Crotalidae e Viperidae (FRANCESCHI *et al.* 2000; BORKOW, GUTIÉRREZ, OVADIA, 1993). Essas enzimas apresentam graus variáveis de atividade proteolítica, destruindo a membrana basal e a matriz extracelular de capilares e pequenos vasos (OHSAKA, 1979). Além disso, estas toxinas inibem a coagulação sanguínea e liberam cininas a partir do cininogênio (BJARNASSON & FOX, 1983), potencializando desta forma, o efeito hemorrágico;
- Causar pronunciado efeito local, como edema, hemorragia e necrose (ROSENFELD, 1971; BOLÑOS, 1982). O edema pode acometer vários segmentos do membro afetado e, dependendo das proporções que adquire, acarreta aumento da pressão sanguínea em compartimentos que contêm músculos, nervos e vasos, levando à síndrome compartimental. O quadro pode evoluir para necrose e, muitas vezes, pode levar à necessidade de amputação da extremidade afetada (JIMENEZ-PORRAS, 1973). Este complexo quadro fisiopatológico pode ser consequência da múltipla ação biológica de um único componente do veneno, ou do sinergismo de vários (OHSAKA, 1979);
- Causar falência renal aguda, secundária à necrose tubular e ocasionalmente glomerulonefrite (AMARAL *et al.*, 1985, 1986; REZENDE *et al.*, 1989; BOER-LIMA, GONTIJO, CRUZ-HÖFLING, 1999).

O gênero *Bothrops* conta com vários representantes no continente americano. Três espécies endêmicas são reconhecidas: *Bothrops insularis*, na Ilha da Queimada Grande, costa do Brasil; *Bothrops carabeus*, em Santa Lúcia, nas Antilhas e a *Bothrops lanceolatus*, na Ilha da Martinica, América Central (HOGE & ROMANO HOGE, 1978, 1979).

Descrita pela primeira vez por Lacépede em 1789, a *B. lanceolatus* é uma serpente grande, com tendências arborícolas, habitante de encostas rochosas das florestas tropicais e úmidas da Martinica (CAMPBELL & LAMAR, 1989), onde é responsável por aproximadamente 20 envenenamentos ao ano (THOMAS & TYBURN, 1996). Seu veneno é capaz de induzir intensos efeitos locais como edema e dor, além de alterações sistêmicas, como hemorragia e trombose, responsáveis pela letalidade (THOMAS *et al.*, 1995).

Poucos estudos experimentais foram realizados com este veneno que, apesar do isolamento geográfico da serpente, demonstrou apresentar atividades biológicas semelhantes as *Bothrops* brasileiras. Recentemente, uma fosfolipase A₂ ácida e uma enzima fibrino(geno)lítica foram isoladas deste veneno (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 1994; 1998). Em ensaios *in vivo*, utilizando camundongos, o veneno de *B. lanceolatus* demonstrou aumentar a permeabilidade vascular causando edema, mediado principalmente por produtos da lipo e ciclooxigenase; induziu migração leucocitária abundante e hemorragia quando doses elevadas de veneno foram empregadas (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000). Em ratos, o aquecimento do veneno aboliu completamente a atividade hemorrágica e produziu edema de forma reduzida, sugerindo o envolvimento do componente hemorrágico, ou outro(s) componente(s) termolábil(eis) na atividade edematogênica induzida pelo veneno de *B. lanceolatus* (FARIA *et al.*, 2001).

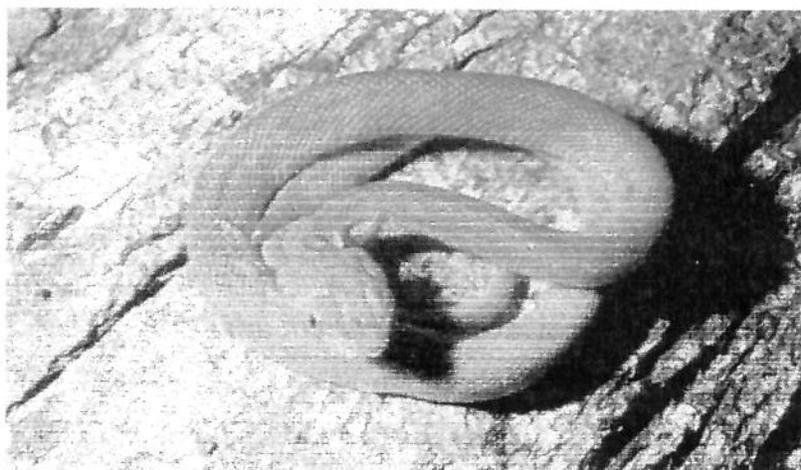


Figura 1: Serpente *Bothrops lanceolatus*.

1.2. INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma importante consequência do envenenamento botrópico (ROSENFELD, 1971). A reação inflamatória é uma resposta protetora do organismo, no sentido de destruir, diluir ou remover o agente causador da injúria (BELANTI, 1980). Após qualquer lesão tecidual, ocorre uma série de alterações celulares e sistêmicas, através das quais o organismo busca restaurar e manter a homeostasia e, apesar da complexidade que cerca o fenômeno, manifesta-se de maneira uniforme, independentemente do agente desencadeador da resposta. Entretanto, dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou órgãos afetados, da espécie animal e da coexistência de estados patológicos, algumas variações podem ocorrer (GARCIA LEME, 1989).

Celsius, escritor romano do 1º século antes de Cristo, descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, tumor e dor. O 5º sinal clínico, a perda de função (*functio laesa*), foi posteriormente incluído por Virchow.

JULIUS COHHEIN (1889) forneceu uma das primeiras descrições microscópicas da inflamação, observando no mesentério de rã, a hiperemia ativa com extravasamento de plasma, de leucócitos e de hemácias (RANG *et al.*, 1997).

Imediatamente após o início do processo inflamatório, ocorrem eventos de origem vascular, caracterizados pelo aumento do fluxo sanguíneo na área lesada (eritema e rubor), causando consequentemente elevação da temperatura local (calor). O aumento de permeabilidade das vênulas pré-capilares ocasiona o extravasamento de proteínas para o espaço intersticial, o qual leva a formação de edema (RANG *et al.*, 1997).

Ao lado dos eventos vasculares, os fenômenos celulares da resposta inflamatória são muito importantes, uma vez que representam os principais mecanismos pelos quais o organismo “neutraliza” os agentes lesivos e repara o tecido danificado. As células envolvidas nessa resposta são as chamadas células residentes (células endoteliais, mononucleares residentes e mastócitos) e células que chegam ao foco inflamatório, provenientes do sangue (neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monócito). No decorrer de uma resposta inflamatória, uma grande variedade de substâncias denominadas mediadores

inflamatórios, são formadas e liberadas concomitantemente ou seqüencialmente no local da lesão. Esses mediadores originam-se a partir do plasma ou de uma variedade de tipos celulares, como: células endoteliais, mastócitos, macrófagos e leucócitos. Os mediadores de origem plasmática incluem fatores do sistema complemento e as cininas, os quais são gerados por ativação enzimática. Os mediadores de origem celular incluem a histamina e a serotonina (oriunda de mastócitos e basófilos), prostaglandina, prostaciclina, tromboxano e leucotrienos (originados a partir da cascata do ácido araquidônico em diferentes tipos celulares), o fator de agregação plaquetária (células endoteliais, leucócitos), citocinas (TNF e diversas interleucinas oriundas principalmente de leucócitos mononucleares), substância P e CGRP (neuropeptídeos liberados de terminações nervosas não adrenérgicas e não colinérgicas, no sítio inflamatório), o óxido nítrico proveniente de diferentes fontes, incluindo o endotélio, leucócitos, terminações nervosas não adrenérgicas, não colinérgicas (DALE, 1994).

Estudos experimentais tem evidenciado que, a resposta inflamatória local induzida por venenos do gênero *Bothrops*, caracteriza-se pela exsudação de proteínas plasmáticas e decorre da síntese e/ou liberação de mediadores endógenos, como a histamina, serotonina, eicosanóides e fator ativador de plaquetas (TREBIEN & CALIXTO, 1989; CHAVES *et al.*, 1995; LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000; LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2001). A lesão local é caracterizada ainda, pela presença de células inflamatórias. LÔBO DE ARAÚJO *et al.* (2000) demonstrou que o veneno de *B. lanceolatus*, quando injetado em patas de camundongos, induz intenso influxo leucocitário. Resultados semelhantes foram obtidos por GUTIÉRREZ *et al.* (1986) e LOMONTE *et al.* (1993) em tecido muscular de camundongos injetados com o veneno de *B. asper*. A migração de neutrófilos para o foco da lesão foi também observada após a administração dos venenos de *B. jararaca*, *B. erythromelas* e *B. alternatus* (FLORES *et al.*, 1993; BURIGO *et al.*, 1996; FARSKY *et al.*, 1997).

1.3. SOROTERAPIA

No último quarto do século passado, a efervescência da imunologia permitiu um espantoso avanço no tratamento de doenças epidêmicas graves, como a febre tifóide, peste bubônica, raiva e outras. A metodologia básica utilizada no combate destas enfermidades consistia na produção de soros hiperimunes contra os agentes etiológicos das mesmas. Influenciado por essa linha de pensamento e tendo vivenciado inúmeros envenenamentos ofídicos na região de Saigon, CALMETTE (1892), um pesquisador francês, iniciou estudos no sentido de verificar a antigenicidade de venenos ofídicos, objetivando um possível agente terapêutico. Este pesquisador extraiu o veneno de alguns exemplares de *Naja tripudians* e injetou doses crescentes do mesmo em animais de experimentação. Constatou, pela primeira vez, que o soro de animais imunizados possuía propriedades antitóxicas e, portanto, com potencial valor curativo no envenenamento ofídico. De volta a Paris e utilizando o mesmo veneno como antígeno, Calmette iniciou a produção em maior escala deste soro e distribuiu amostras para vários outros países, que também enfrentavam problemas de ofidismo. Uma destas amostras chegou às mãos de Vital Brazil, Diretor do Instituto Serumtherápico, hoje Instituto Butantan, que vinha estudando possíveis métodos terapêuticos contra o envenenamento por serpentes brasileiras.

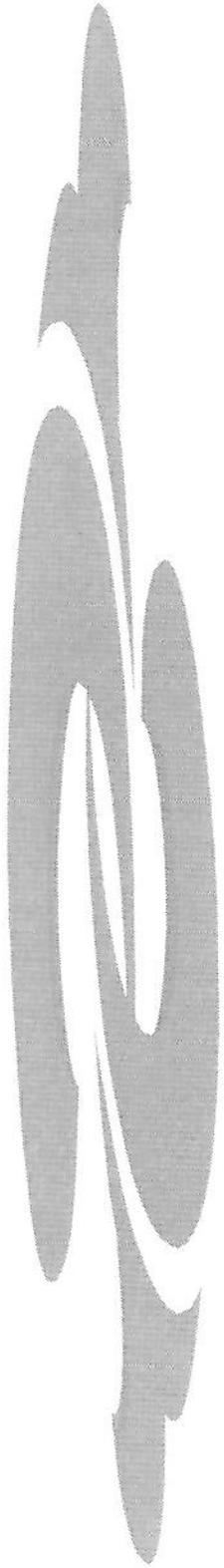
Este autor descreveu que o soro de animais imunizados contra o veneno de *Bothrops jararaca* era inativo contra o veneno de cascavel – serpente do gênero *Crotalus* - e que o soro de animais imunizados contra o veneno de cascavel era pouco efetivo contra o veneno de jararaca, porém, os dois soros eram altamente potentes contra os venenos homólogos (VITAL BRAZIL, 1901). Ficava assim demonstrada a especificidade dos soros antiofídicos e, em 1901, foram produzidos em grande escala, no Brasil, os primeiros lotes de soros anticrotálico, antibotrópico e misto, então chamado de antiofídico, contra o veneno das serpentes dos dois gêneros.

Atualmente, o único tratamento conhecido e eficiente nos casos de acidentes ofídicos é a soroterapia específica (WARREL, 1992). Antes da utilização da soroterapia, os

envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* apresentavam prognóstico de morte de 2 a 3%, estando hoje reduzido para 0,5 a 0,6%.

Embora o emprego da soroterapia seja eficaz no tratamento das alterações sistêmicas decorrentes do envenenamento ofídico, as lesões locais são dificilmente neutralizadas por antivenenos específicos, mesmo que administrados logo após o acidente (GUTIÉRREZ *et al.* 1981; LOMONTE, 1985; LOMONTE, TARKOWSKY, HANSON, 1993). Várias hipóteses são sugeridas para explicar esta ineficácia: 1) os efeitos locais, em geral, se instalam rapidamente, o que dificultaria sua neutralização pelos anticorpos, que chegariam ao local da picada depois que o efeito já se estabelecera (GUTIÉRREZ, ROJAS, CERDAS, 1987); 2) os componentes do veneno responsáveis pelos efeitos locais, são, em geral, proteínas de baixo peso molecular (TU, 1982), portanto pouco imunogênicas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1985), de modo que os antivenenos convencionais não apresentam anticorpos capazes de neutralizar os constituintes responsáveis pelos efeitos locais.

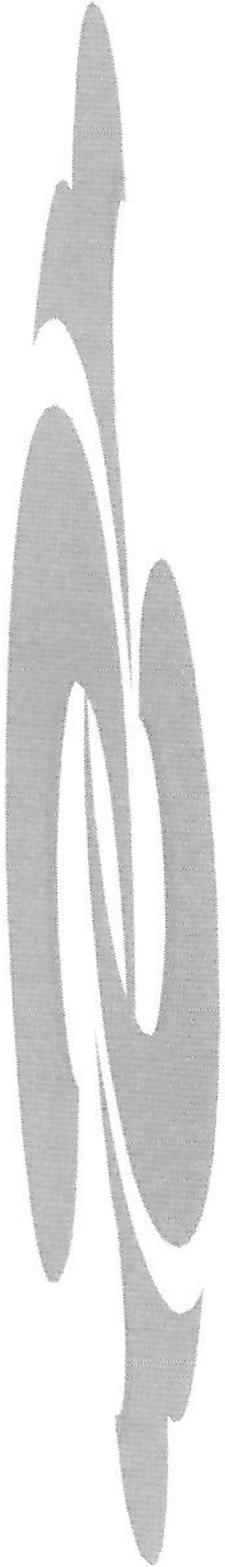
Os efeitos locais induzidos pelos venenos botrópicos têm sido amplamente investigados, possibilitando o entendimento dos mecanismos farmacológicos e fisiopatológicos envolvidos na gênese destes fenômenos. Entretanto, sendo o veneno de *Bothrops lanceolatus* pouco estudado e os efeitos locais dificilmente controlados pelas terapias convencionais, substâncias com propriedades farmacológicas definidas foram utilizadas na tentativa de identificar os mediadores envolvidos nestas respostas. Paralelamente, a avaliação das alterações teciduais produzidas pelo veneno e o estudo imunológico do soro monoespecífico, complementam este trabalho, visando contribuir para o melhor entendimento da complexidade do envenenamento ofídico.



2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo, contribuir no entendimento dos mecanismos envolvidos na ação do veneno de *Bothrops lanceolatus* em ratos, quanto:

- à resposta hemorrágica e inflamatória local (edema);
- à morfologia e patogênese das alterações teciduais;
- à neutralização dos efeitos locais com o soro monoespecífico, baseando-se em estudos imunoquímicos.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Animais

Foram utilizados ratos machos “Wistar” pesando entre 130 e 180 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, sob ciclo de luz, à temperatura ambiente, recebendo água e ração *ad libitum*, até a realização dos experimentos.

3.1.2. Veneno e soro anti-*B. lanceolatus*

O veneno de *B. lanceolatus* (VBL) e o soro anti-*B. lanceolatus* (anti-VBL, lote BD 278 obtido de soro de cavalo), foram gentilmente cedidos pela “Unité des Venins” do Instituto Pasteur (Paris, França). A solução mãe de VBL (10 mg/ml) foi preparada em salina 0,9%, aliquotada, mantida a -20°C e descongelada na hora do uso.

3.1.3. Fármacos e reagentes

Mepiramina, metisergida, ciproheptadina, serotonina, HOE 140, indometacina, dexametasona, carragenina, hemoglobina e azul brilhante de Coomassie (Sigma Chemical); EDTA sal dissódico (Fischer Scientific Company); Halotano (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.); cloreto de sódio e ácido acético glacial (Chemco); bicarbonato de sódio, carbonato de sódio (Reagen); tartarato de sódio potássio, sulfato de cobre II, hidróxido de sódio, hematoxilina, eosina, xilol, heptano, ferricianeto de potássio, cianeto de potássio, formaldeído e álcool etílico (Merck S.A.); álcool metílico (Nuclear); reagente Folin (Quell Ind. Quim. Ltda.).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Determinação do edema induzido pelo veneno de *B. lanceolatus* (VBL)

Grupos de 5 a 7 animais, superficialmente anestesiados com halotano, receberam na região subplantar esquerda 0,1 ml de solução contendo diferentes concentrações de VBL (12,5; 25; 50; 75 e 100 µg/pata). O grupo controle recebeu salina 0,9% nas mesmas condições experimentais. O deslocamento do volume de pata (edema) foi determinado por pletismografia (hidroplestimógrafo modelo 7150 Ugo Basile, Itália) em intervalos de 0,25; 0,5; 2; 4; 6 e 24 horas pela diferença dos resultados obtidos antes (basal) e após as injeções.

3.2.2. Efeito da diálise sobre o edema de pata induzido pelo veneno de *B. lanceolatus*

O veneno de *B. lanceolatus* (3 ml de uma solução 2 mg/ml em salina fisiológica) foi dialisado por 24 horas a 4°C em 2 litros de salina, visando eliminar substâncias com peso molecular inferior a 3000 D presentes no veneno. A solução usada para diálise foi trocada quatro vezes durante este período. Uma alíquota do veneno foi retirada antes da diálise, para subsequente comparação com os resultados obtidos com o veneno dialisado (controle).

3.2.3. Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de *B. lanceolatus*

3.2.3.1. Pré-tratamentos

3.2.3.1.1. Metisergida

Os animais foram tratados com metisergida (6 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.), 15 minutos antes da indução do edema com o VBL (50 µg/pata). Os animais controle receberam salina (i.p.) nas mesmas condições experimentais.

3.2.3.1.2. Mepiramina e ciproheptadina

Os animais foram tratados com mepiramina (6 mg/kg) ou ciproheptadina (6 mg/kg), 15 minutos antes da indução do edema com o VBL 50 µg/pata (FARIA *et al.*, 2001). Os animais controle receberam salina (i.p.) nas mesmas condições experimentais.

3.2.3.1.3. Dexametasona

Os animais foram tratados com dexametasona (1 mg/kg), por via subcutânea (s.c.), 2 horas antes (RAO *et al.*, 1993; FARIA *et al.*, 2001) de receberem a injeção de VBL (50 µg/pata). Os animais controle receberam salina 0,9% nas mesmas condições experimentais.

3.2.3.1.4. Indometacina

Os animais foram tratados com indometacina (10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes (TREBIEN & CALIXTO, 1989; RAO *et al.*, 1993) de receberem injeção de VBL (50 µg/pata). O grupo controle recebeu salina com 2,5% de bicarbonato de sódio. A efetividade da indometacina foi previamente confirmada em animais que receberam, na região subplantar, carragenina (100 µg).

3.2.3.1.5. HOE 140

Os animais foram tratados com HOE 140 (0,6 mg/kg), por via intravenosa (i.v.), 30 minutos antes da administração do VBL (50 µg/pata). Os animais controle receberam salina (i.v.) nas mesmas condições experimentais.

3.2.3.1.6. HOE 140 e metisergida

Grupos de animais foram tratados com a associação entre HOE 140 (0,6 mg/kg, i.v.) e metisergida (6 mg/kg, i.p.), que foram administrados 30 minutos e 15 minutos, respectivamente, antes da injeção subplantar do VBL (50 µg/pata). Os animais controle receberam salina nas mesmas condições experimentais.

3.2.4. Efeito do EDTA sobre as atividades hemorrágica e edematogênica do veneno de *B. lanceolatus* (VBL)

O VBL (50 µg) foi incubado com EDTA (5 Mm) por 30 minutos, em temperatura ambiente (CHAVES, BARBOZA, GUTIÉRREZ, 1995). A seguir, grupos de 5 a 7 animais receberam a mistura (0,1 ml) no músculo gastrocnêmio esquerdo, para a determinação do efeito hemorrágico, ou na região subplantar posterior esquerda, para avaliação da atividade edematogênica. O efeito hemorrágico foi determinado três horas após a inoculação do VBL tratado com EDTA e a atividade edematogênica determinada por pletismografia, em diferentes intervalos de tempo (0,25; 0,5; 2; 4; 6 e 24 horas).

3.2.5. Determinação da atividade hemorrágica

Dosagem de hemoglobina

Grupos de 5 a 7 animais foram anestesiados e receberam por via intramuscular (i.m.), na região posterior do músculo gastrocnêmio esquerdo (GETTY, 1981), 0,1 ml de VBL (50 µg) incubado com o EDTA 5 mM. Os animais controle receberam apenas o VBL (50 µg), salina ou EDTA (5 mM). Após 3 horas, onde se observa o pico da resposta hemorrágica (FARIA, 1996), os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical. Antes da parada cardíaca, os animais foram perfundidos com 100 ml de solução salina (0,9%), no ventrículo esquerdo, com drenagem pelo átrio direito. Os músculos foram dissecados com instrumental cirúrgico, pesados e acondicionados a -20°C durante a noite.

A seguir as amostras foram tratadas com reagente de Drabkin (6 ml/g), homogeneizadas em triturador e centrifugadas à 4000 rpm, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recentrifugados em centrífuga refrigerada à 18.500 rpm, durante 30 minutos. A cada 2 ml de sobrenadante, foi adicionado 0,5 ml de heptano, homogeneizado em agitador eletromecânico e novamente centrifugado à 4000 rpm, durante 15 minutos. A hemorragia foi determinada de acordo com o método de cianometemoglobina (OWNBY, COLBERG, ODELL, 1984; PELISSARI *et al.*, 1993), com algumas modificações, dosando-se a quantidade de hemoglobina em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de hemoglobina foi obtida multiplicando-se a absorbância encontrada pelo fator (X). Esse fator foi previamente determinado através da curva padrão de hemoglobina. Os resultados obtidos foram divididos pelos pesos dos respectivos músculos. A quantidade de hemoglobina foi expressa em mg/g de tecido.

3.2.6. Reagente de Drabkin

Reagente de Drabkin: bicarbonato de sódio (2 g), ferricianeto de potássio (0,394 g) e cianeto de potássio (0,108 g) foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada. O reagente foi mantido em temperatura ambiente na ausência da luz, durante, no máximo, 30 dias.

3.2.7. Curva padrão de Hemoglobina

Ao reagente de Drabkin (1,5; 3; 6; 9; 12 e 15 ml) foram adicionados 20 µl de hemoglobina padrão (14,8 g/dl). Os tubos foram agitados e a curva padrão determinada em espectrofotômetro a 540 nm. O fator (X) foi encontrado dividindo-se a somatória das concentrações de hemoglobina pela somatória das respectivas absorbâncias.

3.2.8. Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de *B. lanceolatus* tratado com EDTA

Para averiguarmos quais os mediadores envolvidos na resposta edematogênica induzida pelo veneno de *B. lanceolatus* tratado com EDTA, seguimos a mesma metodologia descrita anteriormente para o VBL.

3.2.9. Análise morfológica das atividades hemorrágica e edematogênica do veneno de *B. lanceolatus* (VBL)

Grupos de 3 animais, superficialmente anestesiados com halotano, receberam na região subplatar posterior esquerda o veneno de *B. lanceolatus* (50 µg) incubado com salina ou EDTA 5 mM (0,1 ml). O grupo de animais controle recebeu o mesmo volume de salina fisiológica estéril. Após 15 minutos (pico da resposta edematogênica) ou 3 horas (pico da resposta hemorrágica; FARIA, 1996) os animais foram sacrificados, suas patas seccionadas e imersas em solução fixadora de Bouin por, pelo menos, 24 horas. O fixador de Bouin foi removido através de lavagens em água corrente com algumas gotas de hidróxido de amônio. A seguir, as patas foram descalcificadas através de banhos sucessivos em uma solução contendo 10% de formaldeído e 5% de ácido acético glacial. Esse processo prolongou-se por 20 dias, sendo realizada uma troca diária da solução descalcificante. Teve então início a desidratação, onde as patas foram colocadas em álcool 70%, onde permaneceram no mínimo 30 minutos. A partir deste ponto, a cada 30 minutos, o material foi passado em soluções alcoólicas de diferentes concentrações 80%, 95%, 100% (I), 100% (II), 100% (III). Em seguida, procedeu-se à diafanização (banhos de xilol) e a embebição do tecido em parafina, à 60°C, durante 3 horas.

O material foi cortado em micrótomo de parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro albuminizadas e após secagem, os cortes foram desparafinizados com banhos de xilol e hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (álcool absoluto I e II, 95%, 80% e 70%, 5 minutos cada) e lavados em água destilada. A seguir, os cortes foram corados pelo método Hematoxilina-

Eosina: hematoxilina de Erlich – 3 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos e eosina 0,5% aquosa – 5 minutos; ou Tricrômico de Masson: hematoxilina de Erlich – 3 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos; Fucsina ácida 20 segundos, lavados rapidamente em água destilada; Ácido fosfomolibdico por 7 minutos, lavados rapidamente com água destilada; Azul de anilina 2 minutos, lavados rapidamente com água destilada.

A seguir, os cortes foram submetidos ao processo inverso, isto é, desidratação, diafanização e, finalmente, montados em Entelan para preparações histológicas permanentes.

As observações histológicas foram efetuadas por microscopia óptica (M.O.) e fotografadas por microscópio Zeiss-Jena (Alemanha), utilizando-se filme Panatomic X, Kodak, ASA 32, preto e branco.

Como parâmetro adicional de avaliação da atividade tóxica do VBL, após injeção subplantar do veneno, foram colhidos os rins dos animais e processados segundo o protocolo anteriormente descrito, sem a etapa de descalcificação. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos em animais injetados com salina estéril.

3.2.10. Ensaio imunológico

3.2.10.1. Precipitação do soro anti-VBL em meio líquido

Antes de iniciarmos o tratamento dos animais com o soro anti-VBL, realizamos a precipitação das imunoglobulinas com solução saturada de sulfato de amônio. O objetivo deste processo é eliminar o excesso de proteínas séricas desprovidas de atividade de anticorpo.

O método empregado foi o de HEIDELBERGER & KENDAL (1935). Inicialmente o conteúdo de 20 frascos de soro anti-VBL liofilizado (conteúdo médio do frasco \pm 730 mg) foram reconstituídos em 100 ml de água destilada e mantidos em repouso por algumas horas até completa dissolução. A seguir o soro foi centrifugado (5000 rpm, por

20 minutos, à 5°C) e o precipitado obtido, denominado Resíduo Insolúvel, armazenado para posterior determinação do conteúdo protéico. Ao sobrenadante obtido, adicionamos 100 ml de água destilada e a seguir, gota a gota sob agitação constante, 200 ml de solução saturada de sulfato de amônio (pH=7,0). A solução obtida foi centrifugada (3000 rpm por 15 minutos à 5°C) e o sobrenadante obtido, denominado 1^o Sobrenadante, armazenado. Ao precipitado obtido adicionamos 170 ml de salina fisiológica e a seguir 200 ml de solução de sulfato de amônio, gota a gota, sob agitação constante. A solução foi centrifugada (3000 rpm, por 15 minutos, à 5°C) e o sobrenadante obtido, denominado 2^o. Sobrenadante, armazenado. O precipitado foi lavado com salina fisiológica e recolhido em saco de diálise. A diálise foi realizada em câmara fria, inicialmente em água destilada (4 litros) e a seguir em salina fisiológica, até que o líquido de diálise apresentasse reação negativa para o reagente de Nessler.

O conteúdo protéico dos precipitados foi determinado pelo método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Biureto.

3.2.10.2. Determinação quantitativa de proteínas

A concentração protéica de diferentes preparações foi determinada pelo reativo de Biureto, segundo WEICHSELBAUM (1946) e pelo reagente Folin-Ciocalteau, segundo o método de LOWRY *et al.*, (1951), modificado por HARTREE (1972), utilizando se albumina bovina (BSA) como padrão. O coeficiente de extinção molar do BSA foi determinado a 280 nm em espectrofotômetro, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

3.2.10.3. Testes imunoquímicos de imunodifusão

A interação entre antígeno e anticorpo, em proporções adequadas, resulta na formação de um composto insolúvel (precipitado). Com base nessa característica da reação

antígeno-anticorpo, procedemos a análise dos componentes da mistura antigênica (VBL) e do anticorpo (anti VBL), antes e após a sua concentração.

No teste de imunodifusão, utilizamos gel de ágar a 1% preparado em salina fisiológica (OUCHTERLONY, 1967). As lâminas (7,5x2,5 cm) foram devidamente desengorduradas, recobertas com 3,5 ml de ágar e com auxílio de aparelho furágar foram feitos orifícios. Para a reação, foram colocadas em posições adequadas, soluções de veneno de *B. lanceolatus* (2000 e 3000 µg/ml), de soro anti-*B. lanceolatus* (anti-VBL) total ou parcialmente purificado (puro; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32). A seguir, as lâminas foram mantidas em meio umedecido por 24 horas. Para a remoção de proteínas não reagentes, as lâminas foram lavadas sucessivamente em salina fisiológica. A seguir, foram secas à temperatura ambiente, coradas com azul brilhante de Coomassie (solução 0,5% de metanol 45%, ácido acético 45%, água destilada 10%) e o excesso de corante retirado com a solução descolorante.

3.2.10.4. Curva de precipitação

Para a precipitação em meio líquido, tubos de vidro contendo 0,5 ml do soro anti-VBL parcialmente purificado, receberam 0,5 ml de soluções de antígeno (VBL) em concentrações crescentes (125, 250, 300, 360, 430, 520, 620, 750, 895, 1080 µg/ml). Os tubos foram mantidos em banho-maria, à 37°C, por 30 minutos e acondicionados em geladeira por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, por 15 minutos, à 4°C. Os sobrenadantes foram submetidos a ensaios de imunodifusão, visando identificar excesso de antígeno ou anticorpo, enquanto os precipitados foram lavados com salina fisiológica gelada (1,5 ml) e novamente centrifugados sob refrigeração (2000 rpm, por 15 minutos, à 4°C). Para a dissolução dos mesmos, foram adicionados 0,1 ml de NaOH 0,1N e o conteúdo protéico determinado pelo método de Lowry.

3.2.10.5. Ensaio *in vivo*

Neutralização das atividades edematogênica e hemorrágica através da incubação do veneno de *B. lanceolatus* e soro anti-VBL parcialmente purificado.

O VBL (25, 50 e 75 µg) foi incubado com o soro anti-VBL parcialmente purificado (75 µl), por 30 minutos a 37°C. A seguir, 100 µl de cada mistura foi administrada na região subplantar posterior esquerda ou na região dorsal, para a determinação das atividades edematogênica e hemorrágica, respectivamente. O edema foi determinado por pletismografia em diferentes intervalos de tempo (0,25, 0,5, 2, 4, 6 e 24 horas). Os grupos controle receberam somente o VBL, o soro anti-VBL ou salina, nas mesmas condições experimentais.

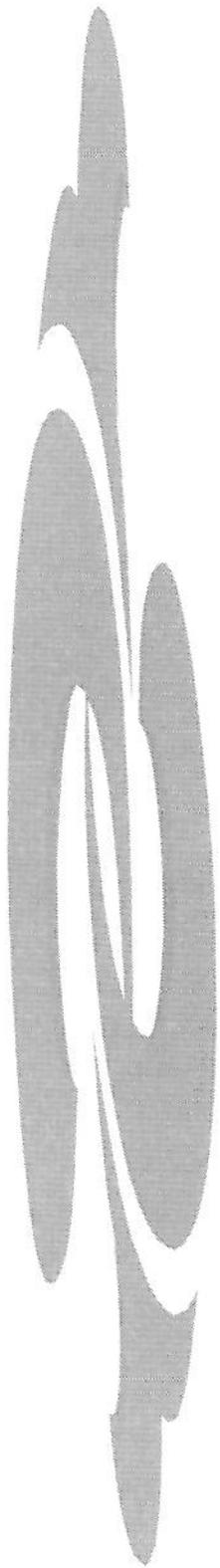
Os animais utilizados para o teste hemorrágico foram previamente depilados e injetados por via intradérmica (i.d.) com VBL, VBL+soro anti-VBL parcialmente purificado, soro ou salina em diferentes sítios, dois de cada lado da linha média dorsal. Após três horas, os animais foram sacrificados e a atividade hemorrágica determinada pelas lesões obtidas.

Neutralização das atividades edematogênica e hemorrágica do veneno de *B. lanceolatus* (VBL) através da inoculação do anti-VBL parcialmente purificado por via endovenosa.

Neste experimento, o veneno de *Bothrops lanceolatus* (25, 50 e 75 µg) foi injetado na região subplantar (edema) ou dorsal (hemorragia) de ratos e o soro anti-VBL, parcialmente purificado, inoculado a seguir, por via endovenosa. O edema e a hemorragia foram determinados como descrito anteriormente.

3.2.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm o erro padrão das médias (EPM) e analisados pelo teste *T* de Student não pareado ou pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Em todas as análises, os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1. EDEMA INDUZIDO PELO VENENO DE *B. LANCEOLATUS* EM RATOS

O edema induzido pelo VBL em diferentes doses (12,5; 25; 50; 75 e 100 µg) ocorreu de forma dose-dependente (gráfico 1). Em todas as doses o VBL produziu hemorragia, observada macroscopicamente. No curso temporal (50 µg), observou-se efeito máximo 15 minutos após o estímulo, com queda gradativa, desaparecendo após 24 horas (gráfico 2). Perfil semelhante foi obtido com todas as doses testadas.

4.2. EFEITO DA DIÁLISE SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO VENENO DE *B. LANCEOLATUS* EM RATOS

Conforme ilustrado no gráfico 2, o processo de diálise não alterou significativamente o edema induzido pelo veneno de *B. lanceolatus*.

4.3. PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO VENENO DE *B. LANCEOLATUS* EM RATOS

No sentido de identificar os possíveis mediadores envolvidos no edema induzido pelo VBL, os animais foram pré-tratados com metisergida, mepiramina, ciproheptadina, dexametasona, indometacina, HOE 140 e associação entre HOE 140 e metisergida, previamente à administração do VBL (50 µg).

Como podemos observar no gráfico 3, o edema induzido por 50 µg de VBL aos 15 minutos ($0,928 \pm 0,075$ ml), foi inibido pela metisergida ($0,508 \pm 0,028$ ml), ciproheptadina ($0,636 \pm 0,063$ ml), dexametasona ($0,602 \pm 0,051$ ml), HOE 140 ($0,698 \pm 0,0458$ ml) e HOE 140 associado a metisergida ($0,453 \pm 0,017$ ml). A mepiramina e a indometacina não inibiram significativamente o edema.

4.4. EFEITO DO EDTA SOBRE AS ATIVIDADES HEMORRÁGICA E EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE *B. LANCEOLATUS*

Verificando-se que o edema foi acompanhado de intensa hemorragia, tratou-se o veneno com o agente quelante EDTA, na tentativa de inativar quimicamente a atividade hemorrágica do veneno.

O gráfico 4 mostra que o EDTA reduziu significativamente a quantidade de hemoglobina presente no músculo gastrocnêmio ($2,37 \pm 0,18$ mg/g tecido), quando comparado ao grupo controle tratado somente com 50 µg de VBL ($6,16 \pm 0,0265$ mg/g tecido). Macroscopicamente, a atividade hemorrágica foi completamente eliminada pelo tratamento do VBL com o EDTA (Fig. 2).

Quanto ao edema, observamos queda significativa desta atividade em todos os intervalos de tempo avaliados. Conforme ilustrado no gráfico 5, o edema induzido pelo veneno de *B. lanceolatus*, agora incubado com EDTA, aos 15 minutos mostrou inibição de 54,8% ($0,42 \pm 0,017$ ml) quando comparado ao VBL não tratado ($0,928 \pm 0,075$ ml).

4.5. PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO VENENO DE *B. LANCEOLATUS* TRATADO COM EDTA

A exemplo do ocorrido com o VBL *in natura*, o edema induzido pelo VBL tratado com EDTA ($0,42 \pm 0,017$ ml) foi inibido pela metisergida ($0,275 \pm 0,010$ ml), ciproheptadina ($0,342 \pm 0,025$ ml), dexametasona ($0,294 \pm 0,02$ ml), HOE 140 ($0,223 \pm 0,021$ ml), HOE 140 associado a metisergida ($0,237 \pm 0,027$ ml) e não foi alterado pela indometacina (gráfico 6). Entretanto, este edema foi discretamente inibido pela mepiramina ($0,344 \pm 0,025$ ml), o que não ocorreu com o VBL *in natura*.

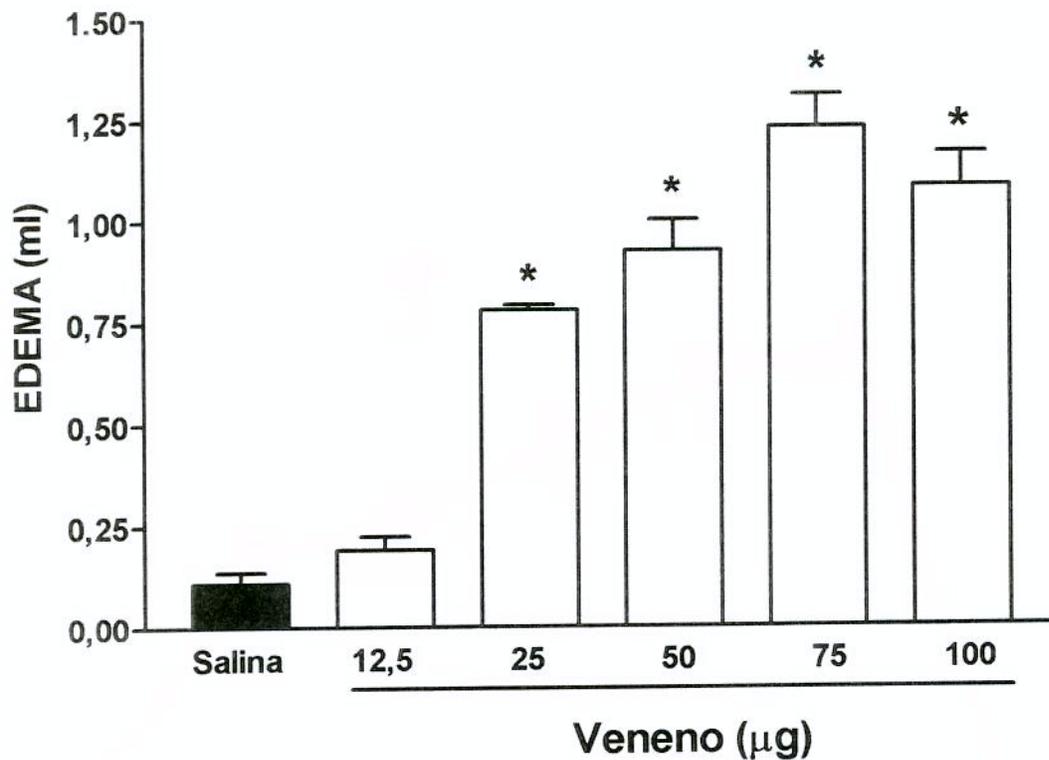


Gráfico 1: Edema induzido pelo veneno de *B. lanceolatus* em ratos. Os animais receberam diferentes doses de veneno na região subplatar posterior esquerda. O aumento no volume de pata (edema) foi determinado por pletismografia 15 minutos após a administração do veneno. O grupo controle recebeu salina nas mesmas condições experimentais. Cada barra representa a média \pm EPM de 7 animais. * $p < 0,01$ comparados com o controle.

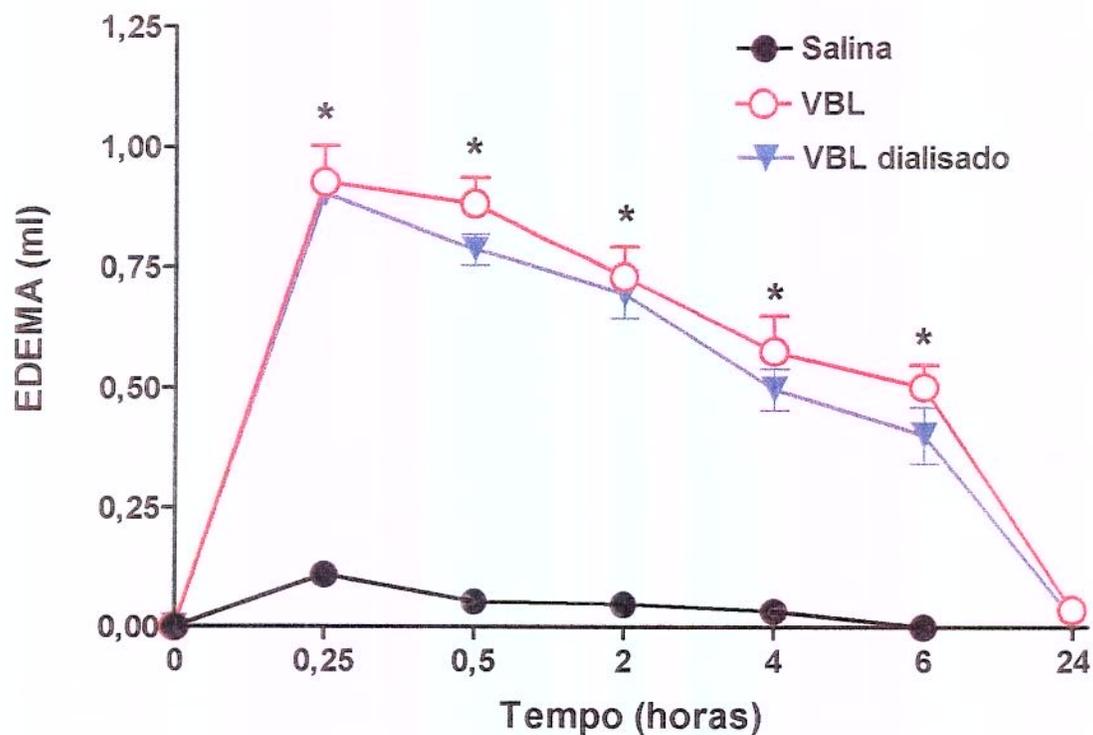


Gráfico 2: Curso temporal do edema de pata induzido pelo veneno de *B. lanceolatus* em ratos. Os animais receberam 50 µg de veneno dialisado ou não na região subplantar posterior esquerda. O aumento no volume de pata (edema) foi determinado por pletismografia após diferentes intervalos de tempo. O grupo controle recebeu salina nas mesmas condições experimentais. Cada ponto representa a média ± EPM de 7 animais, * $p < 0,01$ comparando o VBL e o VBL dialisado com os animais tratados com salina. Não houve diferença significativa entre o VBL e o VBL dialisado.

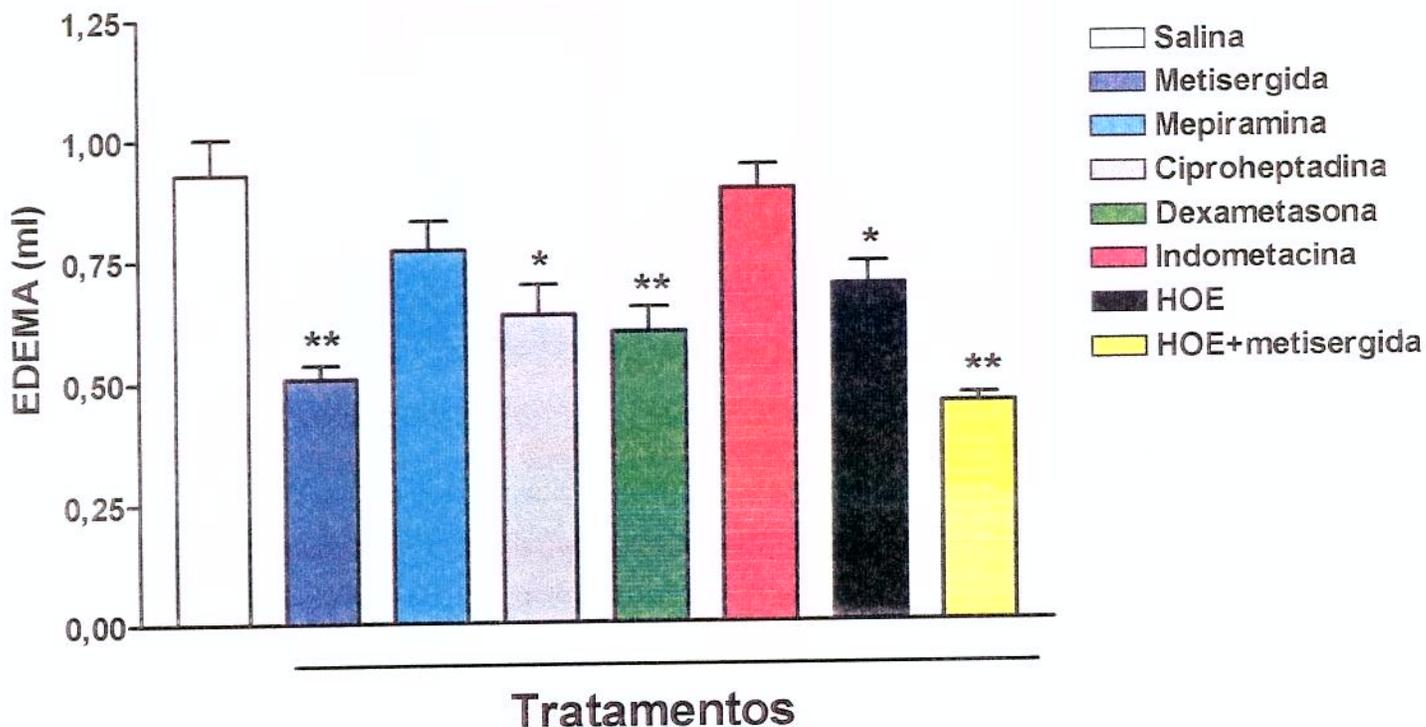


Gráfico 3: Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de *B. lanceolatus* em ratos. Os animais foram pré tratados com metisergida (6 mg/kg, i.p., 15 min antes), mepiramina (6 mg/kg, i.p., 15 min antes), ciproheptadina (6 mg/kg, i.p., 15 min antes), dexametasona (1mg/kg, s.c., 2 horas antes), indometacina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes), HOE 140 (0,6 mg/kg, i.v., 30 min antes), HOE 140 associado a metisergida (0,6 mg/kg, i.v. e 6 mg/kg, i.p., respectivamente). O edema foi induzido com o VBL (50 µg/pata) na região subplatar posterior esquerda. O grupo controle foi pré-tratado com salina nas mesmas condições experimentais. O edema foi determinado após 15 minutos. Cada barra representa a média ± EPM de 7 animais, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados com o grupo salina.

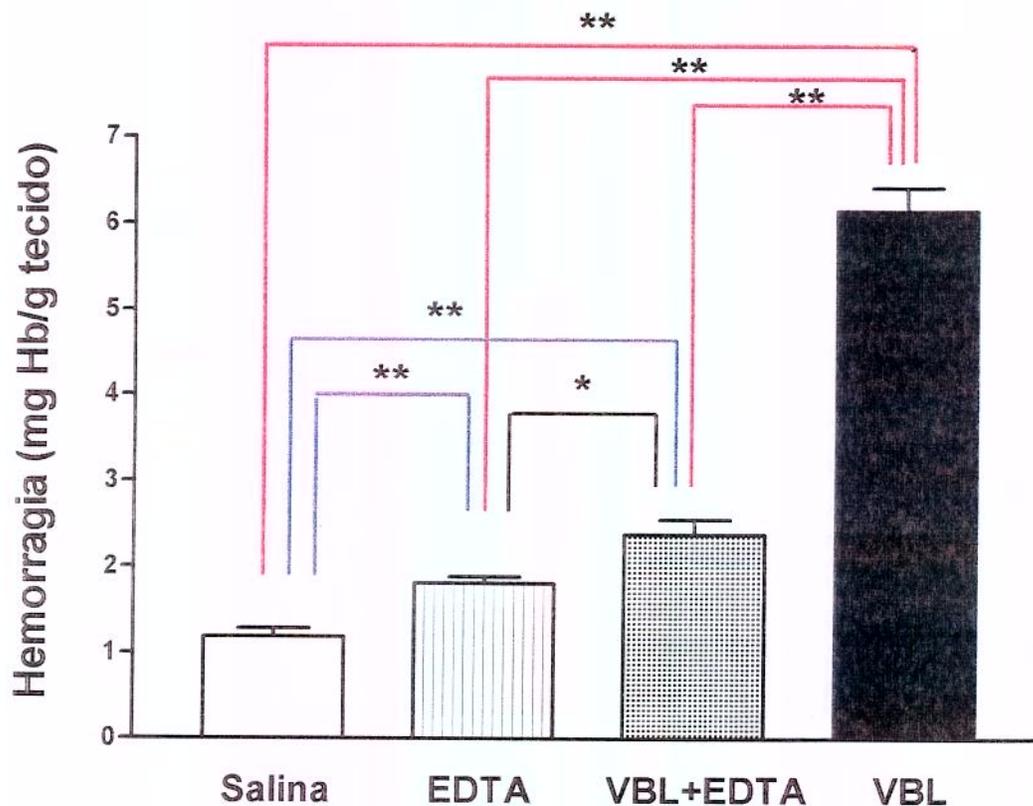


Gráfico 4: Efeito do EDTA sobre a atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *B. lanceolatus* em músculo gastrocnêmio de ratos. O veneno (50 µg) foi previamente incubado com EDTA 5 mM, por 30 minutos, à temperatura ambiente (Chaves *et al.*, 1995). A seguir a mistura, com volume final de 0,1 ml, foi administrada no músculo gastrocnêmio esquerdo. Os grupos controle receberam VBL, salina ou EDTA nas mesmas condições experimentais. Os animais foram sacrificados 3 horas após as injeções. Cada barra representa a média ± EPM de 7 animais, ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$.

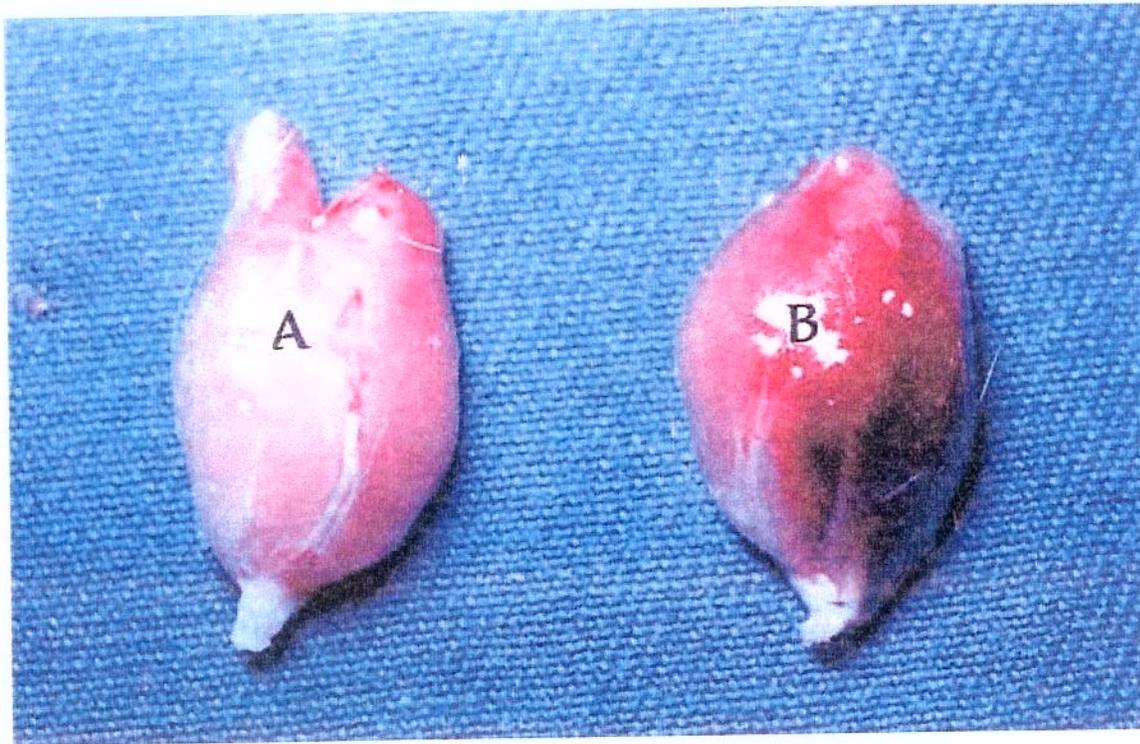


Figura 2: Aspecto do músculo gastrocnêmio 3 horas após injeção (i.m.) do veneno de *Bothrops lanceolatus* incubado (A) ou não (B) com EDTA 5mM.

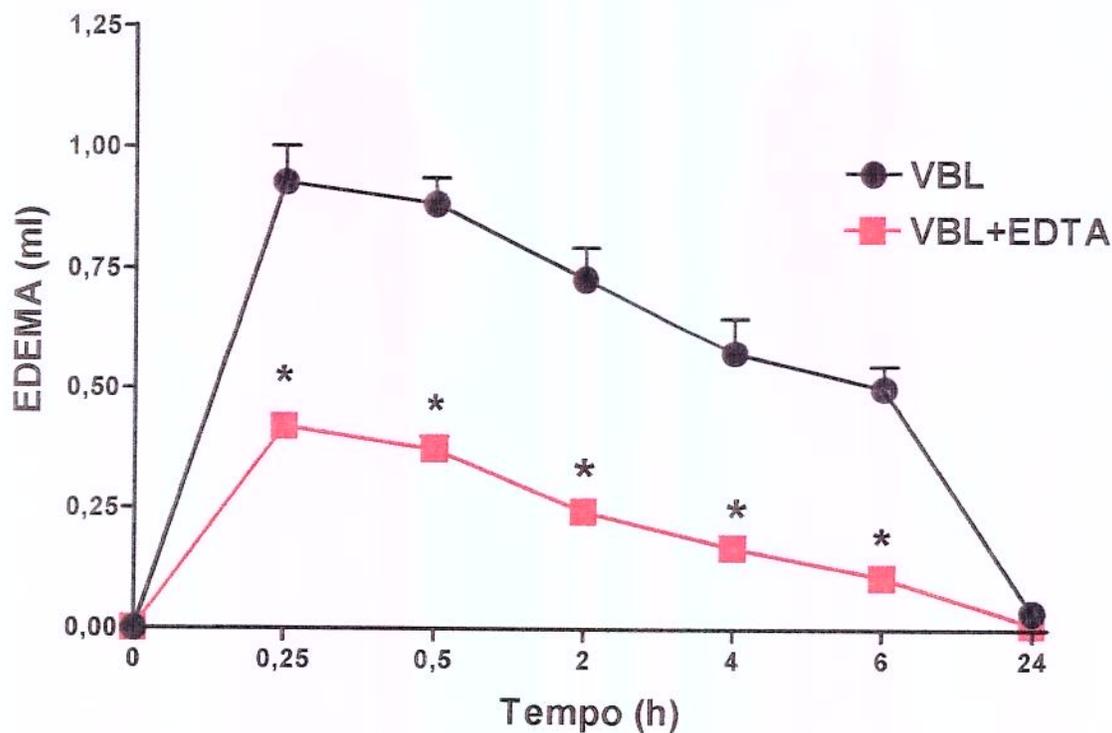


Gráfico 5: Efeito do EDTA sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *B. lanceolatus* em ratos. Antes da indução do edema, o VBL (50 µg) foi incubado com EDTA 5 mM, por 30 minutos, à temperatura ambiente (Chaves *et al.*, 1995). Os animais receberam a mistura na região subplantar da pata posterior esquerda e o edema foi determinado por pletismografia, após diferentes intervalos de tempo. Os animais controle receberam somente o VBL nas mesmas condições experimentais. Cada ponto representa a média ± EPM de 7 animais, * $p < 0,01$ comparado com o VBL não tratado.

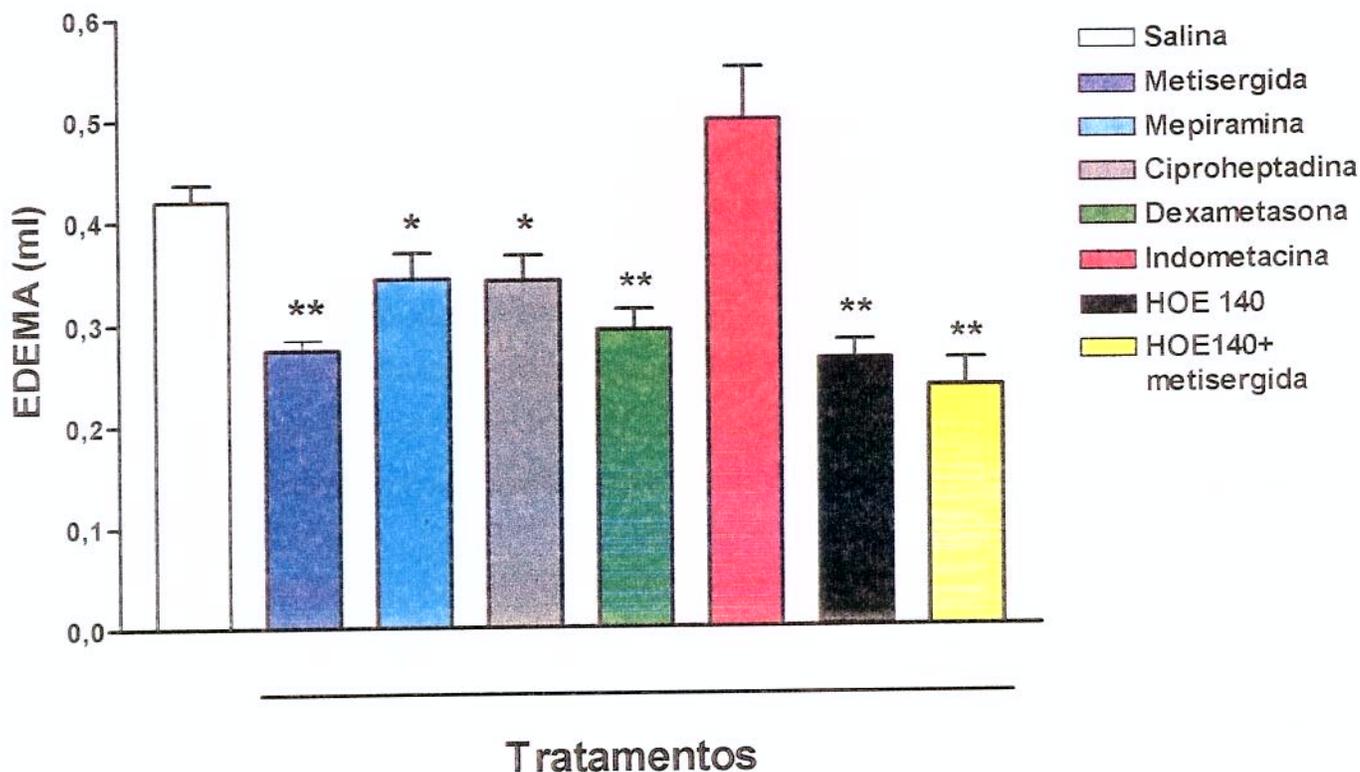


Gráfico 6: Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno de *B. lanceolatus* (VBL) tratado com EDTA em ratos. Os animais foram pré-tratados com metisergida (6 mg/kg, i.p., 15 min antes), mepiramina (6 mg/kg, i.p., 15 min antes), ciproheptadina (6 mg/kg, i.p., 15 min antes), dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2 horas antes), indometacina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes), HOE 140 (0,6 mg/kg, i.v., 30 min antes), HOE 140 associado a metisergida (0,6 mg/kg, i.v. e 6 mg/kg, i.p., respectivamente). O edema de pata foi induzido pelo VBL+EDTA. O grupo controle foi pré-tratado com salina nas mesmas condições experimentais. O edema de pata foi determinado após 15 minutos. Cada barra representa a média \pm EPM de 7 animais, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado com o grupo salina.

4.6. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA REGIÃO SUBPLANTAR DE RATOS INJETADOS COM O VENENO DE *B. LANCEOLATUS*

Controle: Quinze minutos após a administração de 0,1 ml de salina estéril 0,9% na região subplantar, a estrutura histológica do tecido subcutâneo apresentava-se normal (Fig.3 A). A derme subjacente à epiderme, denominada derme papilar, apresenta projeções para a epiderme, as papilas dérmicas, e estende-se em direção à hipoderme, recebendo o nome de derme reticular. A derme é constituída por feixes de fibras colágenas, formando tecido conjuntivo denso, entre os quais fibroblastos e outras células do tecido conjuntivo entremeiam-se. Junto à epiderme e mais profundamente, podem ser vistos feixes de fibras colágenas, ductos glandulares e adipócitos.

Observamos que, três horas após a administração de salina (Fig. 3 B), o tecido subcutâneo da região subplantar mantém estrutura histológica normal, feixes de fibras colágenas bem organizadas e justapostas, entremeadas principalmente por fibroblastos, mastócitos, além de vasos sanguíneos, ductos e túbulos de glândulas sudoríparas.

Veneno de *B. lanceolatus*: Quinze minutos após a administração do veneno de *Bothrops lanceolatus* na região subplantar (Fig. 4 A, B), há formação de edema importante e focos hemorrágicos. O edema estendeu-se pelo tecido conjuntivo, separando, uns dos outros, os feixes de fibras colágenas. Nesta fase, observa-se discreto infiltrado inflamatório decorrente da saída de leucócitos polimorfonucleares das vênulas, evento flagrado na Fig. 4 B.

Três horas após a injeção do VBL na região subplantar (Fig. 4 C, D), eram marcantes a hemorragia e a migração de leucócitos polimorfonucleares para o tecido conjuntivo. As paredes de vênulas e arteríolas freqüentemente apresentavam descontinuidades da parede (Fig. 4 C), permitindo a saída de células do sangue para o tecido conjuntivo circunjacente, o qual apresentava aspecto esgarçado (Fig. 4 D), características estas inerentes ao processo inflamatório em curso.

Veneno de *B. lanceolatus* tratado com EDTA: Quinze minutos após a indução do edema com o veneno de *B. lanceolatus* pré-incubado com EDTA (Fig. 5 A, B), houve redução importante do efeito hemorrágico. A presença de edema foi mantida, embora houvesse evidências de sua redução.

Três horas após a indução do edema com o veneno de *B. lanceolatus* pré-incubado com EDTA, a redução do quadro edematogênico-hemorrágico foi mantida (Fig. 5 C, D). O EDTA pareceu não reduzir de forma significativa a migração de leucócitos polimorfonucleares, que eram vistos atravessando a parede das vênulas em direção ao tecido conjuntivo (Fig. 5 D).

Pré-tratamento dos animais com dexametasona: A Fig. 6 A e B ilustra que, 15 minutos após a indução do edema com o veneno de *B. lanceolatus* em animais pré-tratados com dexametasona, observa-se que, em algumas regiões, os feixes de fibras colágenas apresentam-se organizados compactamente na derme. Nas regiões mais profundas, junto ao limite com a hipoderme, estes feixes apresentavam-se mais frouxamente organizados, evidenciando o edema (Fig. 6 B).

Três horas após injeção subplantar do veneno de *Bothrops lanceolatus*, em animais pré-tratados com dexametasona (Fig. 6 C, D), observou-se queda significativa da atividade edematogênica em relação aos animais injetados com o VBL (Fig. 4 C, D), porém levemente aumentado em relação aos 15 minutos pós-VBL (Fig. 4 A, B), mostrando que em algumas regiões, o tecido conjuntivo estava mais frouxamente organizado. A dexametasona não impediu o efeito hemorrágico (Fig. 6 D).

Rins: Três horas após a administração de salina 0,9% (0,1 ml) na região subplantar de ratos, os rins apresentavam organização normal do parênquima renal. A Fig. 7 A e B ilustra a região cortical onde podem ser vistos os túbulos constituintes do néfron cortical e os corpúsculos renais. Tanto os túbulos proximais quanto os distais apresentavam aspecto íntegro. Os corpúsculos renais apresentavam o tufo de capilares glomerulares envolvidos pela cápsula de Bowman. O espaço capsular apresentava dimensões normais, assim como era normal a disposição das alças capilares.

Na Fig. 7 C e D, constatou-se que três horas após a administração do veneno de *B. lanceolatus* na região subplantar, alterações sistêmicas foram detectadas nos rins. A figura 7 D ilustra que tanto os túbulos do néfron, quanto os glomérulos foram afetados. Os diâmetros dos túbulos distais estavam aumentados e nos túbulos proximais, restos celulares, provavelmente de natureza protéica, eram observados ao lado de vasos congestionados. Na foto (D), constatamos que VBL produziu alterações importantes nos corpúsculos renais, que se caracterizavam pelo aumento acentuado do espaço capsular de filtração e alterações na lobulação do tufo de capilares, com aumento concomitante do espaço de filtração.

A Fig. 8 (A, B) demonstrou que três horas após a injeção do veneno de *B. lanceolatus* em animais pré-tratados com dexametasona, as alterações tubulares e glomerulares provocadas pelo envenenamento, foram mantidas. Alterações nos epitélios dos túbulos e o lúmen tubular repleto de células, provavelmente descamadas, foram também verificadas. Foi observado também o aumento do interstício renal, lobulação do tufo de capilares com concomitante aumento do espaço de filtração (Fig 8 B).

Na Fig. 8 (C, D) constatou-se que a incubação do veneno de *B. lanceolatus* com o EDTA, reverteu alguns dos efeitos glomerulares e tubulares produzidos pelo envenenamento, como ausência de lobulação do tufo de capilares glomerulares, espaço de filtração normal, aparente retorno do diâmetro tubular. Entretanto, células descamadas presentes na luz dos túbulos proximais estavam presentes.

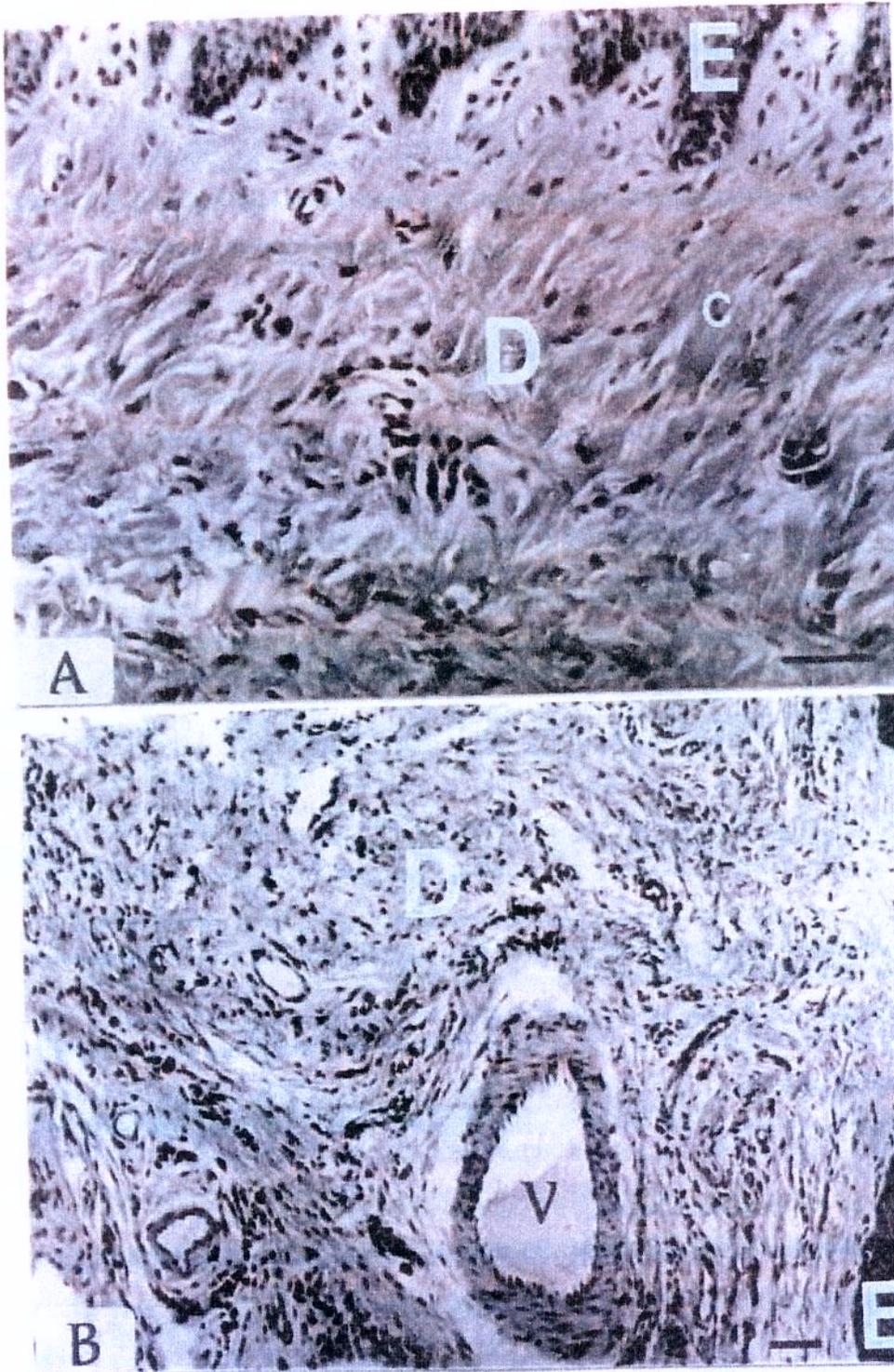


Figura 3: Aspecto histológico da região subplantar de ratos 15 minutos (A) e 3 horas (B) após injeção de salina fisiológica (0,1 ml). Observe a derme (D) abaixo da epiderme (E). Na derme vêem-se feixes de fibras colágenas (c), fibroblastos e vasos sanguíneos (V) com lúmen vazio. Aumentos: 252x e 226x respectivamente.

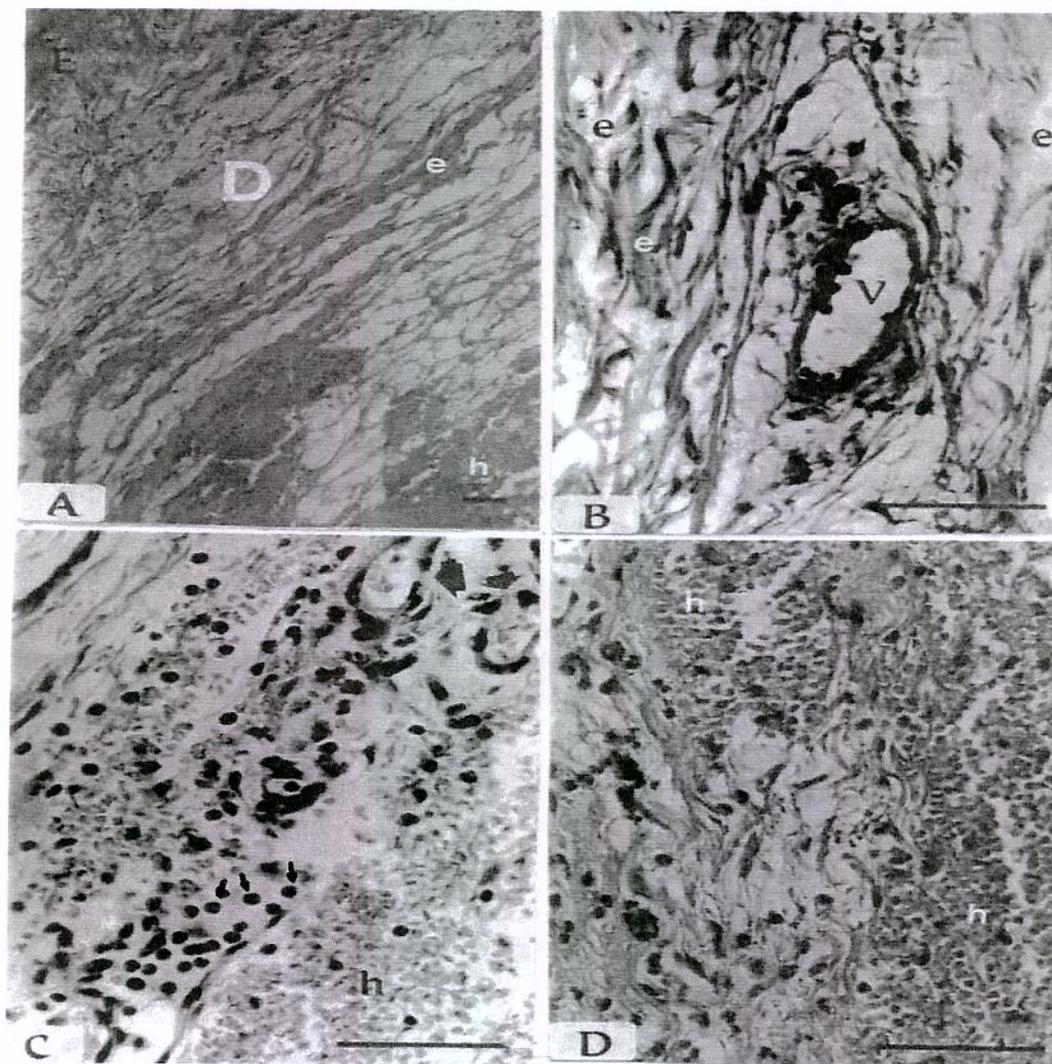


Figura 4: Aspecto histológico da região subplantar de ratos 15 minutos (A, B) e 3 horas (C, D) após injeção do veneno de *Bothrops lanceolatus* (50 µg). Em A e B fica claramente evidenciado o edema (e) causado pelo VBL já aos 15 minutos. Toda a região da derme (D) mostra aspecto frouxo com grande quantidade de espaços entre os feixes de fibras colágenas. Aumentos: 126x e 504x respectivamente.

Em C e D observa-se grande quantidade de hemáceas (h) extravasculares, infiltradas entre alguns feixes esgarçados de fibras colágenas. Note também a ocorrência de neutrófilos (setas pequenas) no infiltrado inflamatório. Observe também o rompimento de vasos sanguíneos (setas grandes). E=epiderme; V=vaso. Aumento: 504x.

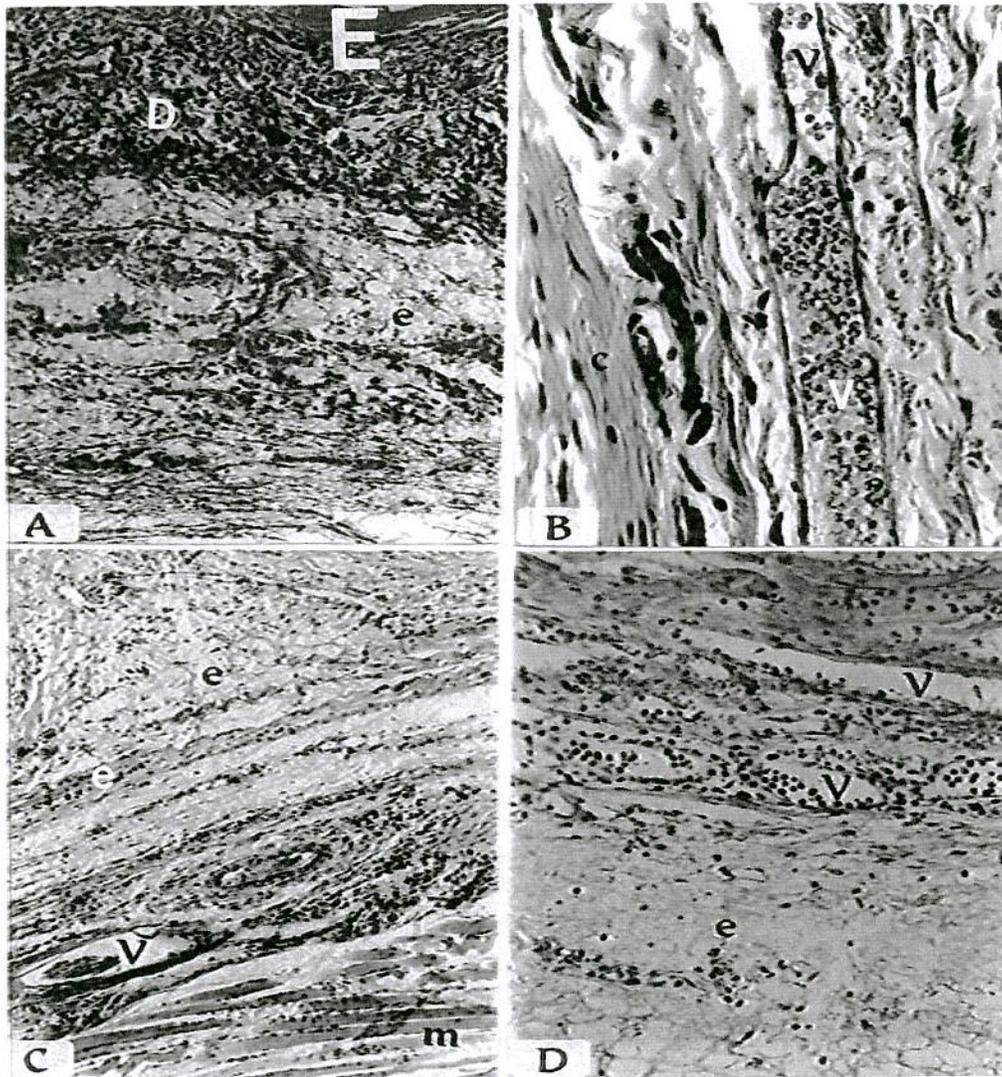


Figura 5: Aspecto histológico da região subplantar de ratos 15 min (A, B) e 3 horas (C, D) após injeção subplantar do veneno de *Bothrops lanceolatus* (50 µg) previamente incubado com EDTA 5mM. Note que aos 15 minutos (A, B) a atividade hemorrágica não foi totalmente inibida. Em algumas regiões, logo abaixo da epiderme (E) vêem-se hemáceas (h) extravasadas para o tecido dérmico. Em outras regiões (Fig. B), as hemáceas estão mais concentradas dentro dos vasos (V). Após três horas, não se observa hemorragia significativa, como mostram as figuras C e D. O edema (e) persiste, além do que é apreciável o infiltrado inflamatório observado em todas as figuras. m=células musculares abaixo da derme; c=feixes de fibras colágenas. Aumentos: 126x, 504x, 122,5x e 245x respectivamente.

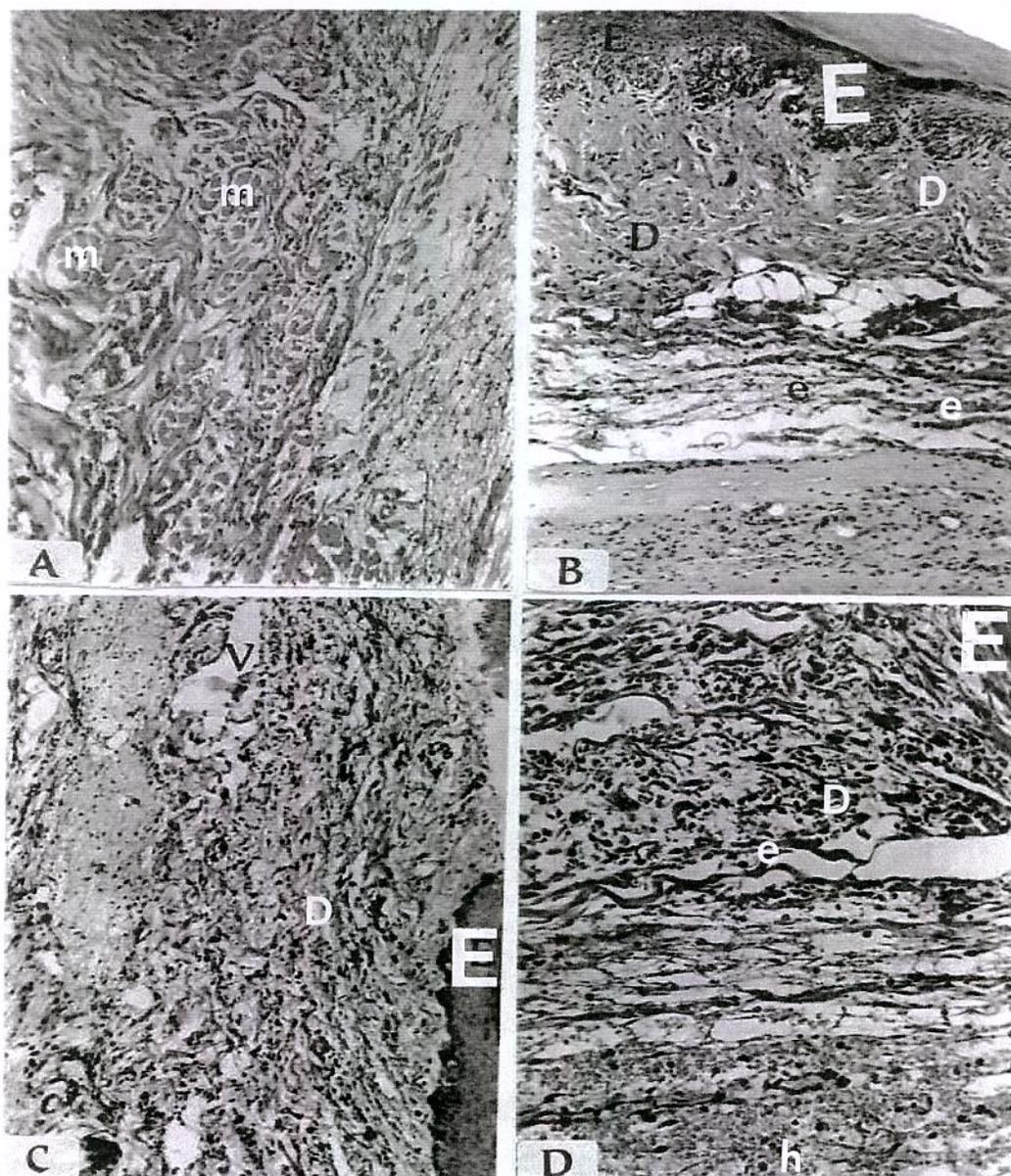


Figura 6: Micrografias da região subplantar de ratos demonstrando o efeito da dexametasona sobre as atividades hemorrágica e edematogênica induzidas pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* aos 15 minutos (A, B) e 3 horas (C, D) após injeção subplantar do veneno. Em ambos os períodos pós-venenamento, a dexametasona inibiu significativamente o edema (e), bem como o infiltrado inflamatório. Note-se também a presença de focos hemorrágicos (h) no tecido dérmico. E=epiderme, D=derme, V=vaso, m=músculo. Aumentos: 126x, 126x, 126x e 252x respectivamente.

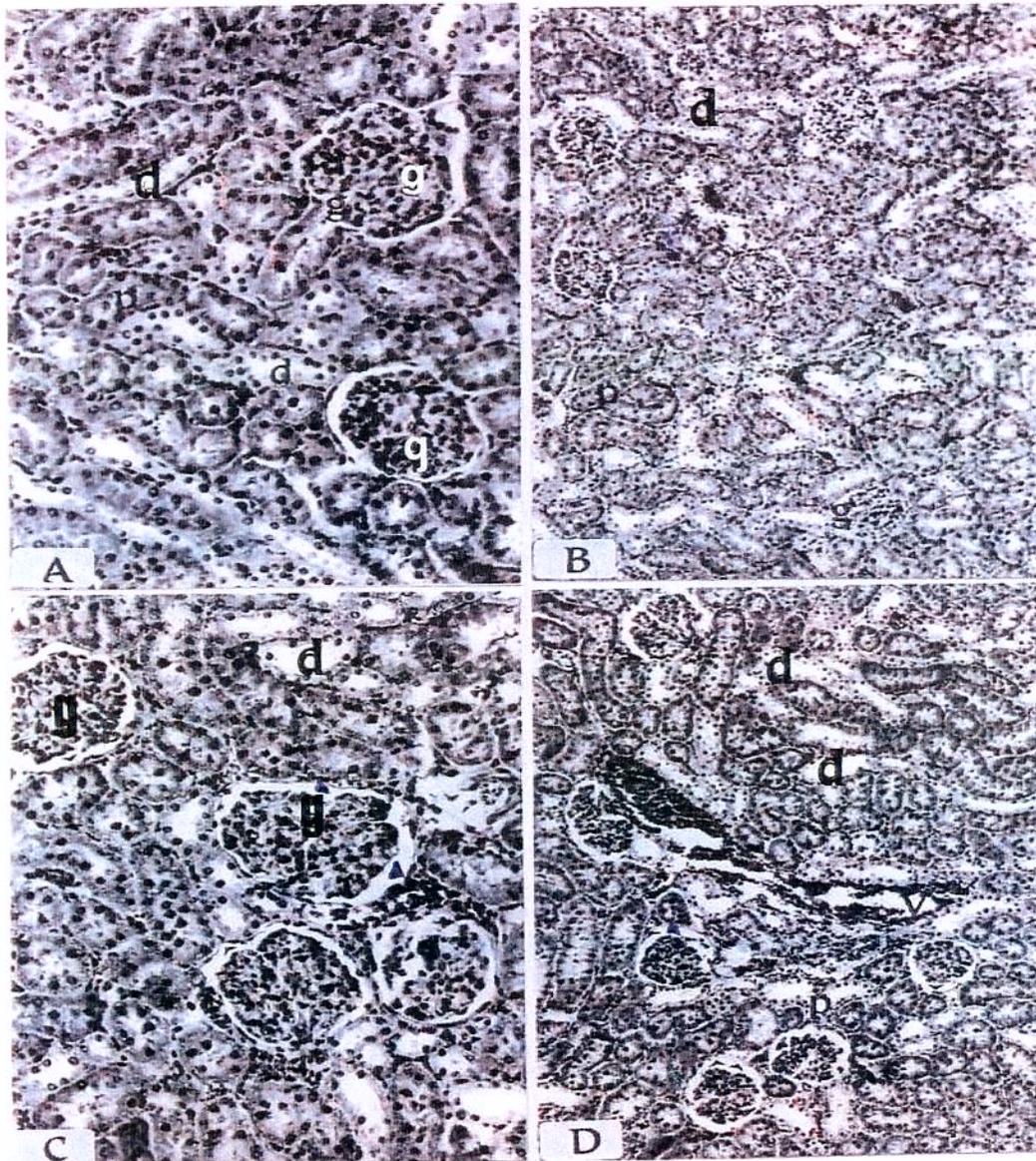


Figura 7: Aspecto histológico do rim 3 horas após injeção subplantar de salina fisiológica 0,1 ml (A, B) ou veneno de *Bothrops lanceolatus* 50 µg (C, D) em ratos. Os ratos injetados com o VBL na região subplantar apresentaram alterações glomerulares, envolvendo os capilares glomerulares (g) (lobulação e desorganização das alças glomerulares) e a cápsula glomerular (setas) (aumento do espaço de filtração), quando comparados aos controles. Também observou-se alterações nos componentes tubulares do néfron; os túbulos proximais (p) mostram restos celulares na luz, decorrentes de alterações no epitélio tubular e os túbulos distais (d) têm diâmetro aumentado em relação aos controles. V=vaso. Aumentos: 252x, 126x, 252x, e 126x respectivamente.

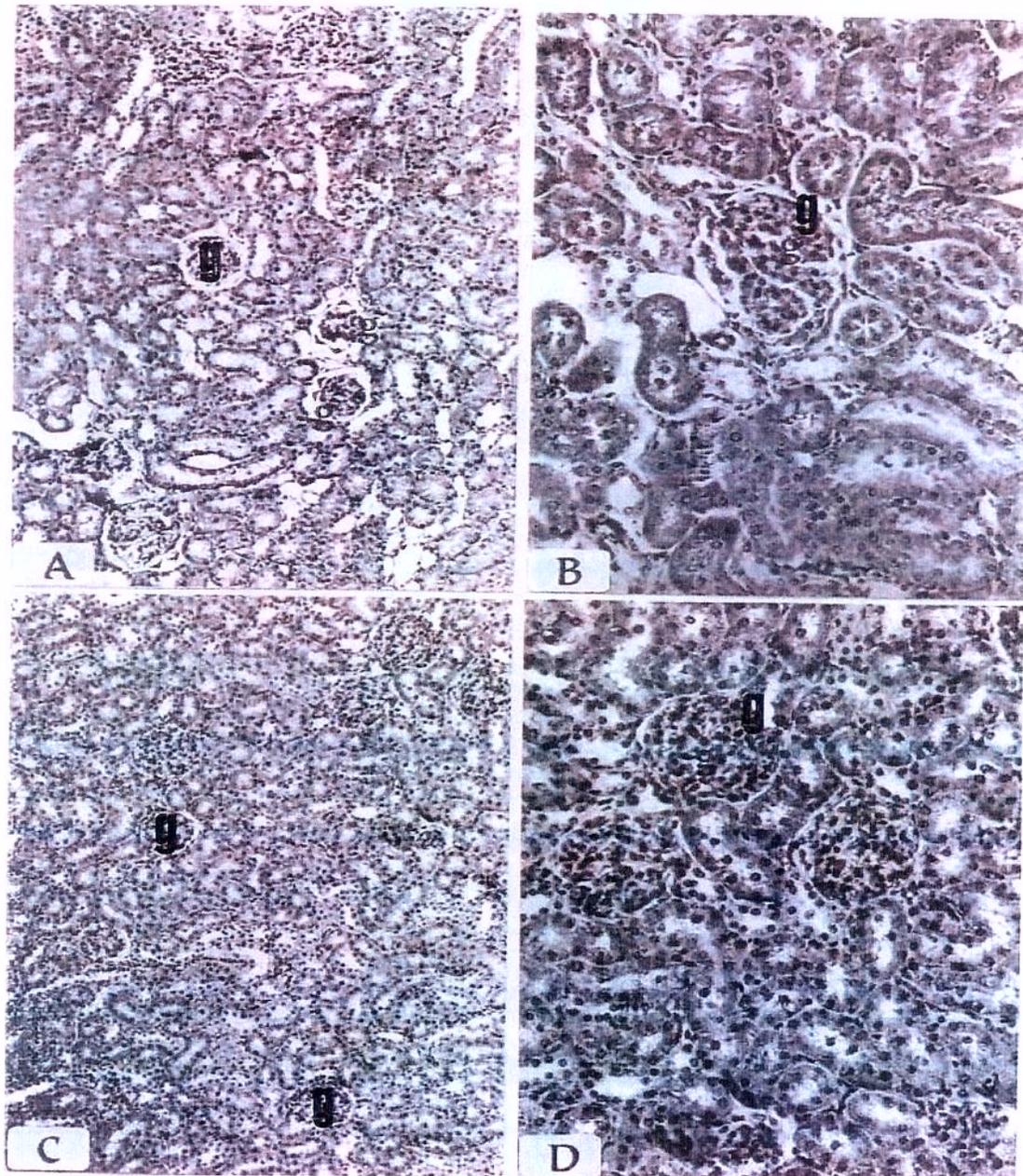


Figura 8: Análise histológica do rim 3 horas após injeção subplantar do veneno de VBL (50 µg) em animais pré-tratados com dexametasona (A, B) ou VBL previamente incubado com EDTA (C, D). O tratamento prévio dos animais com dexametasona não inibiu as alterações glomerulares e tubulares produzidas pelo envenenamento (A, B). Já o EDTA mostrou prevenir alguns dos efeitos produzidos pelo VBL (C, D), sendo o aspecto histológico apresentado por este grupo de animais semelhante ao dos animais controles, injetados com salina. Aumento: 126x, 252x, 126x e 252x respectivamente.

4.7. ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS

A tabela 2 e o gráfico 7 demonstram a imunoprecipitação quantitativa em meio líquido do veneno de *Bothrops lanceolatus* e do soro anti-*Bothrops lanceolatus* (anti-VBL) concentrado. Foram adicionadas doses crescentes de antígeno a uma quantidade constante de anti-VBL (500 µl). Verificou-se nessas condições, que a quantidade de precipitado obtido (µg proteína/ml) aumenta progressivamente com a dose de antígeno adicionada, até atingir o máximo (680 µg proteína/ml), a partir do qual passa a decrescer, possivelmente em virtude da formação de complexos solúveis por excesso de antígeno.

Considerando a zona de equivalência ag/ac na faixa de 520 a 750 µg/ml de antígeno, elegemos o pico de 680 µg/ml para a determinação do volume de soro empregada nos ensaios de neutralização *in vivo*. Nestas condições, estabelecendo-se a relação ag/ac obtivemos 340µg de VBL/500 µl de fração globulínica, logo, a dose utilizada para neutralização de 50 µg de antígeno, foi em torno de 75 µl de soro anti-VBL.

Utilizando diferentes doses de VBL (25, 50 e 75 µg), o soro anti-VBL (75 µl) concentrado, previamente incubado com o VBL, foi capaz de neutralizar completamente a atividade hemorrágica (Figura 9) e parcialmente a atividade edematogênica do veneno de *Bothrops lanceolatus* (gráfico 8). A inoculação do soro anti-VBL concentrado, por via endovenosa (75 µl), imediatamente após administração do VBL (25, 150 e 75 µg), não alterou significativamente as respostas edematogênica e hemorrágica produzidas pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (resultados não apresentados).

Em paralelo, foram realizados ensaios em meio gelificado (imunodifusão). Nossos resultados demonstraram além da antigenicidade do soro anti VBL, que o processo de precipitação em meio líquido, mantém as propriedades do anticorpo (anti-VBL), além de produzir linhas de precipitação mais definidas, características da concentração do soro.

Tabela 1: Determinação quantitativa de proteínas do soro anti *Bothrops lanceolatus* antes e após a precipitação em meio líquido.

Amostra	Dosagem de Proteínas mg/ml	Método
Soro Anti VBL Total	108,93	Biureto
Resíduo Insolúvel	24,92	Biureto
1° Sobrenadante	1,98	Biureto
2° Sobrenadante	0,0734	Biureto
Fração Gamaglobulínica	69,32	Biureto

Tabela 2: Dados quantitativos da precipitação específica no sistema VBL e soro anti-VBL parcialmente purificado. Adição de doses crescentes de antígeno (VBL) a 0,5 ml de soro anti-VBL.

[] Antígeno VBL µg/ml	Precipitado Ag+Ac µg prot/ml	Anticorpo Concentrado Ac (ml)	Teste dos	
			Sobrenadantes	
			Ag	Ac
125	84.10	0.5	-	+
250	111.1	0.5	-	-
300	125.7	0.5	-	-
360	133.1	0.5	-	-
430	143.15	0.5	-	-
520	151.3	0.5	-	-
680	167	0.5	-	-
750	143.75	0.5	-	-
895	150.65	0.5	-	-
1080	142.5	0.5	+	-

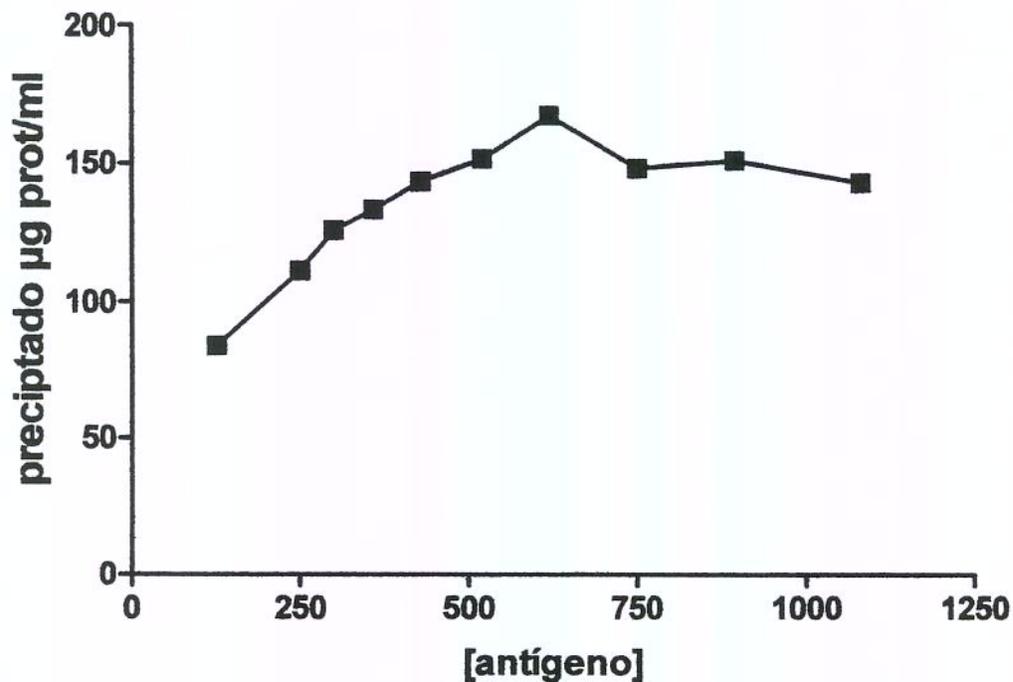


Gráfico 7: Curva de precipitação específica no sistema VBL e soro anti-VBL parcialmente purificado. Foram adicionadas doses crescentes de antígeno (VBL) a 0,5 ml do soro anti-VBL. Os tubos foram mantidos a 37°C por 30 minutos, sendo a seguir acondicionados em geladeira por 24 horas. As amostras foram centrifugadas e lavadas com salina gelada. Aos precipitados obtidos, foram adicionados NaOH 0,1N para dissolução dos mesmos. As amostras foram analisadas em seu conteúdo de proteína pelo método de Biureto.

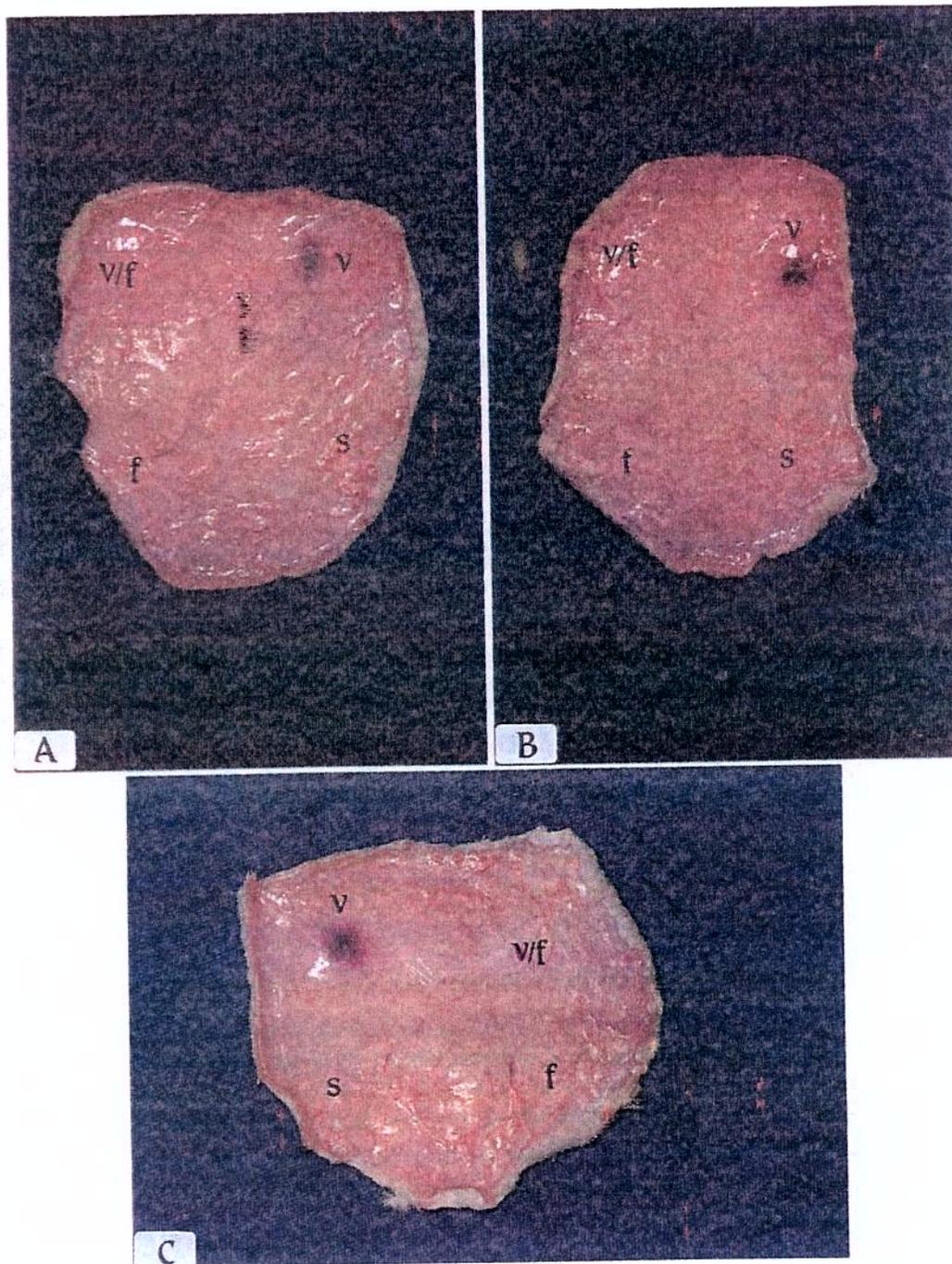


Figura 9: Neutralização *in vitro* da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops lanceolatus* pelo anti-VBL parcialmente purificado. O VBL 25 (A), 50 (B) ou 75 μ g (C) foi incubado com a fração globulínica do soro anti-VBL (75 μ l) por 30 minutos a 37°C. A seguir, a mistura (0,1 ml) foi injetada no dorso dos animais. Após 3 horas os animais foram sacrificados e a pele removida. v/f=VBL+fração; f=fração; v=VBL e s=salina

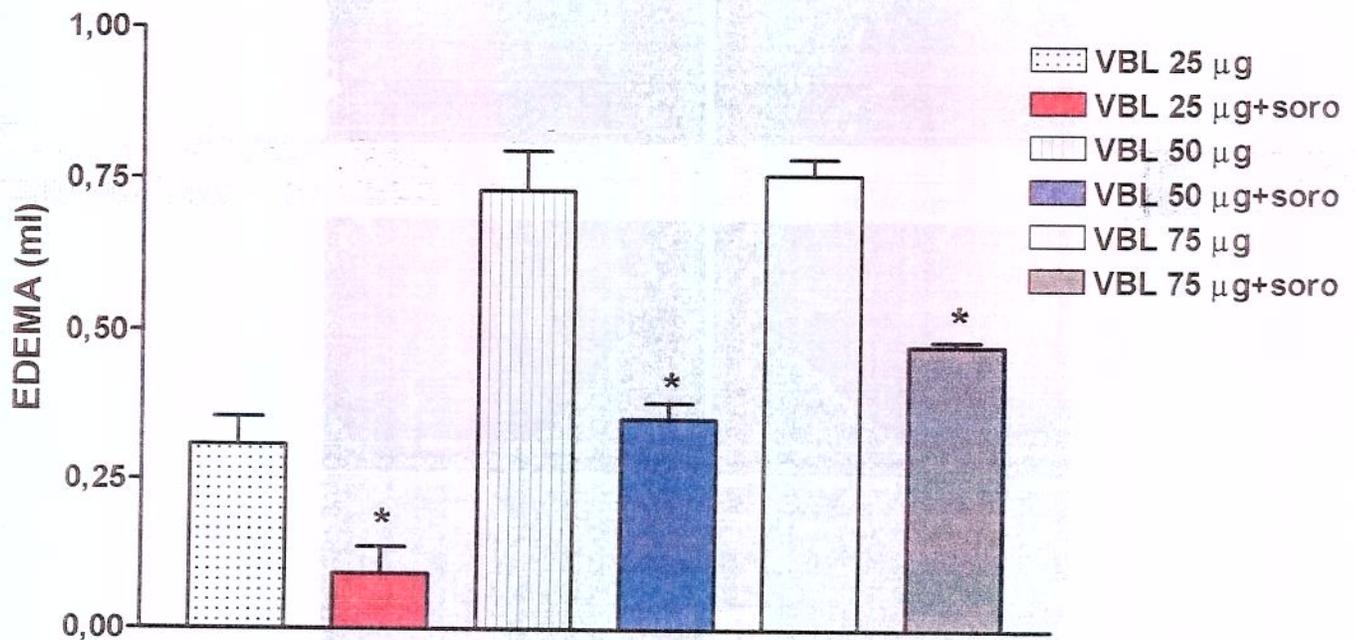
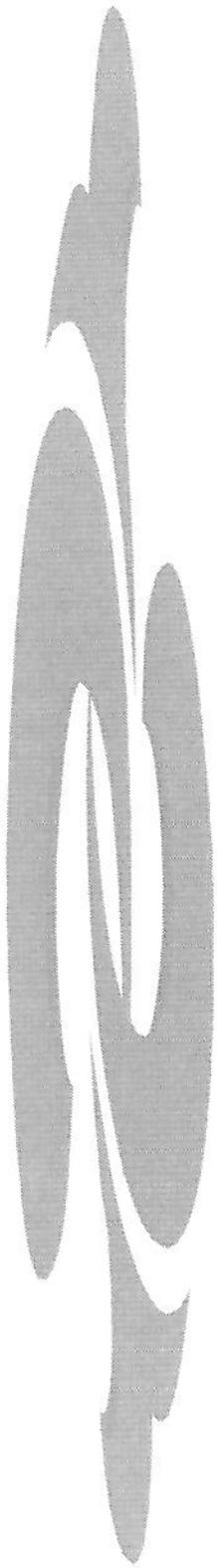


Gráfico 8: Neutralização *in vitro* da atividade edematogênica induzida pelo veneno de *B. lanceolatus* pelo soro anti-VBL parcialmente purificado. O VBL (25, 50 ou 75 µg) foi incubado com 75 µl da fração globulínica por, 30 minutos, a 37°C. A seguir, a mistura (0,1 ml) foi administrada na região subplantar posterior esquerda. O edema foi determinado por pletismografia 2 h após. Os animais controle receberam VBL ou a fração globulínica nas mesmas condições experimentais. Cada ponto representa a média ±EPM de 7 animais, * $p < 0,01$ comparado com o VBL.



5. DISCUSSÃO

A inflamação é uma importante característica do envenenamento por serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae (ROSENFELD, 1971). Os venenos botrópicos, além de alterações sistêmicas, algumas vezes letais, induzem intensos efeitos locais, entre eles hemorragia e edema (OHSAKA, 1979; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Tais efeitos foram observados quando injetamos o veneno de *B. lanceolatus* (VBL) em patas de ratos. O edema de pata induzido pelo VBL em ratos ocorreu de forma dose- e tempo- dependente, assim como anteriormente observado com o VBL aquecido (FARIA *et al.*, 2001). Em todas as doses testadas, o edema foi acompanhado de hemorragia, atingindo índices máximos 15 minutos após o estímulo e estatisticamente insignificantes após 24 horas. Tais fenômenos foram também observados com os venenos de *Bothrops jararaca* (PERALES *et al.*, 1992; TREBIEN & CALIXTO, 1989) e *Bothrops asper* (LOMONTE *et al.*, 1993).

Estudos utilizando diferentes venenos ofídicos demonstram que o início do edema e o tempo necessário para que este alcance índices máximos varia consideravelmente (CHAVES *et al.*, 1995; PERALES *et al.*, 1992; SELISTRE *et al.*, 1990). Este fato poderia ser explicado por variações na composição e origem dos venenos, bem como por diferenças nas espécies animais empregadas. LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, (2000) descreveu que, diferente do observado em ratos, o VBL quando inoculado na região subplantar de camundongos produz resposta edematogênica máxima somente 2 horas após estímulo, desaparecendo após 24 horas.

O edema induzido pelo VBL parece ser independente da presença de aminas biogênicas ou substâncias de baixo peso molecular, uma vez que a diálise não alterou significativamente este quadro. Nossos resultados estão de acordo com as observações realizadas por IWANAGA & SUZUKI (1979) que descrevem que os venenos Elapidae contêm polipeptídios de baixo peso molecular, enquanto que venenos Crotalidae e Viperidae contêm polipeptídios e toxinas biologicamente ativas de alto peso molecular, portanto não dialisáveis. Além disso, o edema induzido pelo VBL envolve em parte, uma fração termolábil, visto que o aquecimento do veneno reduziu em 30% esta atividade (FARIA *at al.*, 2001). Observações semelhantes foram relatadas com os venenos de *Lachesis muta rhombeata* (DE MOURA *et al.*, 1998) e *Bothrops jararaca* (PERALES *et al.*, 1992; TREBIEN & CALIXTO, 1989).

Os resultados obtidos na curva dose resposta nos levaram a selecionar a dose de 50 µg para a realização dos demais experimentos. Esta dose, além de produzir respostas de intensidade intermediária, reproduz o quadro patológico observado após o envenenamento (CHAVES *et al.*, 1995; LOMONTE *et al.*, 1993).

Como observado com outros venenos ofídicos (ROTHSCHILD & ROTHSCCHILD, 1979), o edema induzido pelo VBL em ratos ocorre em virtude da liberação de substâncias farmacologicamente ativas no local da picada. Na tentativa de identificar os possíveis mediadores envolvidos nesta resposta, substâncias com atividades farmacológicas conhecidas foram utilizadas. Nossos resultados demonstraram que a serotonina apresenta papel importante na atividade edematogênica desencadeada pelo VBL, uma vez que a metisergida reduziu significativamente este efeito. É importante citar que o edema induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca* em ratos (TREBIEN & CALIXTO, 1989) e em camundongos (PERALES *et al.*, 1992), não foi alterado pela metisergida.

A histamina é um importante autacóide no mecanismo de formação de edema induzido por muitos agentes inflamatórios, entre eles os venenos ofídicos (DE MOURA *et al.*, 1998). Resultados obtidos anteriormente demonstraram que o edema induzido pelo VBL aquecido, em ratos, envolve a histamina, uma vez que o tratamento dos animais com mepiramina, um antagonista de receptor H₁, reduziu significativamente este efeito (FARIA *et al.*, 2001). No entanto, o edema induzido pelo VBL *in natura* em ratos parece não envolver a histamina, uma vez que a mepiramina não alterou este quadro. Resultados semelhantes foram obtidos com o VBL (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000) e *Bothrops jararaca* em camundongos (PERALES *et al.*, 1992). O tratamento dos animais com ciproheptadina, um duplo antagonista de receptor H₁ e de serotonina, reduziu em menor grau quando comparado aos animais tratados com metisergida, o edema induzido pelo VBL em ratos, indicando que esta resposta envolve a desgranulação de mastócitos e a conseqüente liberação de substâncias vasoativas como a histamina e especialmente a serotonina, abundante em mastócitos de roedores.

Fosfolipases A₂ presentes em venenos ofídicos exercem grande variedade de efeitos farmacológicos, entre eles miotoxicidade (SOARES *et al.*, 2000), neurotoxicidade

(FAURE & BON, 1987), alterações na coagulação sanguínea (CONDREA, 1979; LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 1998), além de importante atividade edematogênica (CHAVES *et al.*, 1998; CHIU *et al.*, 1989; VISHWANATH *et al.*, 1987). Estas substâncias induziriam edema por dois mecanismos distintos: a) através da liberação do ácido araquidônico em consequência da degradação enzimática da membrana fosfolipídica, aumentando a biossíntese de eicosanóides e b) diretamente, afetando a microvasculatura, levando a exsudação do plasma. O fato de LÔBO DE ARAÚJO *et al.* (1994) ter detectado a presença de fosfolipase A₂ no VBL, nos incentivou a utilizar um glicocorticóide na tentativa de inibir o edema induzido por este veneno. A dexametasona reduziu significativamente o edema induzido pelo VBL. Estes resultados também foram obtidos com o VBL aquecido em ratos (FARIA *et al.*, 2001) e o VBL *in natura* em camundongos (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000). O corticosteróide atua indiretamente sobre a fosfolipase A₂, através da síntese de lipocortina, bloqueando a cascata do ácido araquidônico e os produtos de sua metabolização. Além disso, poderia estar agindo diretamente sobre células residentes, leucócitos ou células endoteliais, inibindo a liberação de mediadores participantes da resposta inflamatória (RANG *et al.*, 1997).

O envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase foi por nós investigada pré-tratando os animais com a indometacina. Nossos resultados diferem daqueles obtidos com o veneno de *B. jararaca* (TREBIEN & CALIXTO, 1989) e *B. asper* (CHAVES *et al.*, 1995), uma vez que a indometacina não alterou o quadro edematogênico induzido pelo VBL. Fato semelhante foi observado com o VBL aquecido em ratos (FARIA *et al.*, 2001) e em camundongos (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000).

A participação de cininas no edema de pata induzido pelo VBL nos foi indicada quando o captopril foi capaz de potencializar e o HOE 140 inibir o edema induzido pelo VBL aquecido (FARIA *et al.*, 2001). De fato, quando tratamos os animais com HOE 140, um antagonista de receptor B₂ (CAMPOS & CALIXTO, 1995), o edema induzido pelo VBL foi reduzido em cerca de 25%, indicando desta forma a participação da bradicinina no edema induzido pelo VBL. Sendo o HOE 140 e a metisergida as drogas que, isoladamente, foram as mais eficazes na redução deste efeito, optamos pela associação entre ambas.

Como pudemos observar no gráfico 3, este tratamento reduziu em cerca de 51% o edema induzido pelo VBL. Este resultado poderia ser explicado pela capacidade do veneno em promover a liberação da bradicinina, que indiretamente, estimularia a desgranulação de mastócitos com conseqüentemente liberação de serotonina (BHOOLA *et al.*, 1992).

Ao lado do edema, a hemorragia local ou sistêmica é outra importante manifestação resultante do envenenamento botrópico (BARAMOVA *et al.*, 1989; KAMIGUTI *et al.*, 1991). Os fatores hemorrágicos responsáveis por tais efeitos, hoje caracterizados como zinco metaloproteinases (BJARNASSON & FOX, 1994; KAMIGUTI *et al.*, 1996), vêm sendo isolados de venenos ofídicos (MOREIRA *et al.*, 1994; FRANCESCHI *et al.*, 2000) e amplamente investigados (ANAI *et al.*, 1998). Estes fatores apresentam graus variáveis de atividade proteolítica, exercendo seus efeitos através da destruição da membrana basal de vasos (BJARNASSON & TU, 1978; BJARNASSON & FOX, 1994) bem como degradando proteínas da matriz extracelular (BARAMOVA *et al.*, 1989; 1990).

Vale a pena ressaltar que, assim como observado com o veneno de *B. asper* (LOMONTE *et al.*, 1993), o VBL quando administrado em pequenas doses em camundongos, produz edema livre de hemorragia (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000). Em ratos, o VBL apesar de produzir hemorragia de forma dose-tempo dependente, somente o aquecimento foi capaz de abolir totalmente esta atividade (FARIA *et al.*, 2001), possivelmente em conseqüência da inativação do componente hemorrágico pelo agente físico.

Conhecendo-se a capacidade do ácido etileno diaminotetrácético (EDTA) em inibir a atividade hemorrágica dos venenos ofídicos, graças a sua capacidade quelante de zinco (FRIEDERICH & TU, 1971; OWNBY & TU, 1977), metal indispensável à ação das metaloproteinases (BJARNASSON & FOX, 1994), investigou-se o efeito deste agente sobre as atividades hemorrágica e edematogênica induzidas pelo VBL.

Para avaliar a atividade hemorrágica do VBL, utilizamos o método descrito por OWNBY *et al.*, (1984), através da quantificação da hemoglobina presente em músculo

gastrocnêmio após inoculação do VBL tratado ou não com EDTA. A exemplo do observado com o veneno aquecido (FARIA *et al.*, 2001), a hemorragia foi significativamente reduzida pelo tratamento do veneno com o agente quelante EDTA, indicando que o componente hemorrágico é afetado tanto pelo tratamento físico (aquecimento), quanto pelo tratamento químico (EDTA).

Como o EDTA foi capaz de inibir a atividade hemorrágica presente no VBL e supondo que as proteínas hemorrágicas estariam envolvidas na atividade edematogênica, injetou-se o VBL tratado com EDTA na pata dos animais. A atividade edematogênica do VBL foi reduzida em todos os intervalos de tempo avaliados. Fato semelhante foi observado com o veneno de *B. asper* em camundongos (CHAVES *et al.*, 1995). Nossos resultados sugerem que os fatores hemorrágicos estejam também envolvidos no edema induzido pelo VBL, potencializando direta ou indiretamente esta atividade, não descartando a hipótese de que o VBL quando tratado com EDTA promova a liberação de mediadores diversos daqueles liberados pela administração do VBL *in natura*.

Com o intuito de identificar os mediadores envolvidos no edema de pata induzido pelo VBL tratado com EDTA (VBL+EDTA), empregamos a mesma metodologia descrita para o VBL não tratado. A exemplo do ocorrido com o VBL aquecido (FARIA *et al.*, 2001), o edema de pata induzido pelo VBL+EDTA parece ser mediado pela serotonina, histamina, bradicinina e metabólitos do ácido araquidônico, possivelmente pela via da lipoxigenase – a indometacina não afetou o edema - uma vez que a metisergida, mepiramina, ciproheptadina, dexametasona, HOE 140 e associação entre HOE 140 e metisergida reduziram significativamente este edema.

Alguns experimentos foram acompanhados pela análise histopatológica das patas injetadas. Quinze minutos e três horas após a injeção do VBL, observou-se formação de edema e hemorragia, caracterizados pelo afastamento de estruturas colágenas, aparecimento de espaços entre as células do conjuntivo e presença de hemáceas extravasculares, quadro este, característico do envenenamento botrópico (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). A migração de células inflamatórias induzida pelo VBL em ratos foi evidente, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos. Resultados

semelhantes foram obtidos por PÉREZ *et al.*, (1998) com o veneno de *B. jararaca*, e por LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, (2000) com o VBL em camundongos, e, poderiam ser atribuídos à capacidade destes venenos em promover a secreção ou ativação de mediadores endógenos com propriedades quimiotáticas (FARSKY *et al.*, 1997).

O efeito hemorrágico observado microscopicamente após injeção subplantar do VBL foi caracterizado por descontinuidades nas paredes dos vasos (Fig. 4C), levando ao extravasamento de hemáceas para o meio extravascular. O tratamento do VBL com o agente quelante EDTA, pareceu reverter significativamente este quadro, e, em alguns pontos, os vasos sanguíneos apresentavam aspecto íntegro (Fig. 5B). Estes resultados confirmam os indícios do envolvimento das metaloproteinases na atividade hemorrágica induzida pelo VBL em ratos, uma vez que o EDTA reduziu significativamente este efeito, possivelmente em consequência da sua atividade quelante de zinco, levando à inibição das atividades enzimáticas e biológicas destes componentes hemorrágicos (BJARNASSON & FOX, 1994).

Dentre os efeitos sistêmicos observados após envenenamento por espécies *Bothrops*, a insuficiência renal aguda é uma das principais responsáveis pela letalidade (AMARAL *et al.*, 1985, 1986). Três horas após a administração do VBL na região subplantar, alterações sistêmicas foram detectadas nos rins. Os túbulos distais apresentavam diâmetro aumentado e nos túbulos proximais restos celulares, provavelmente de natureza protéica, foram observados. Além disto, o VBL produziu alterações importantes nos corpúsculos renais, caracterizados pelo aumento acentuado do espaço capsular de filtração e alterações na lobulação do tufo de capilares. Alterações morfológicas semelhantes, associadas a distúrbios da função renal, foram descritas por BÔER-LIMA *et al.* (1999) com o veneno de *Bothrops moojeni* em ratos. A atividade proteolítica presente no VBL (Donato, 1991), possivelmente do componente hemorrágico, parece estar envolvida neste processo, uma vez que o EDTA reverteu os efeitos tubulares e glomerulares provocados pelo envenenamento. Segundo GUTIÉRREZ & LOMONTE (1995), enzimas proteolíticas apresentam graus variáveis de citotoxicidade em diferentes tipos celulares, podendo contribuir direta ou indiretamente para a nefrotoxicidade observada neste estudo.

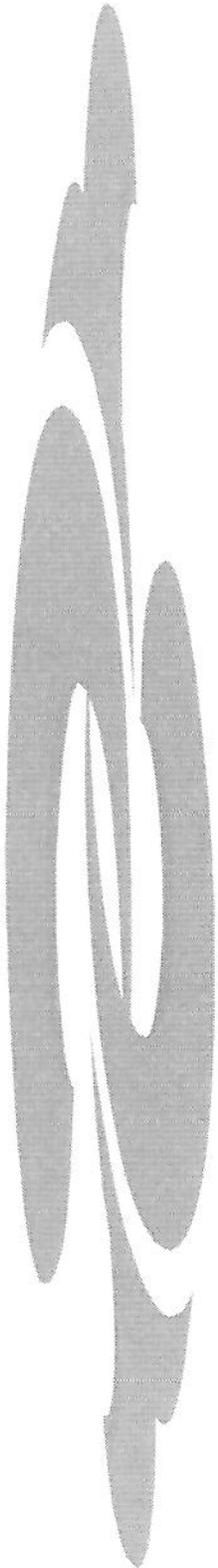
Além do tratamento com fármacos, verificamos a capacidade neutralizante do soro anti-VBL sobre o edema e a hemorragia induzidos pelo VBL. Para isso, o soro anti VBL foi concentrado através de precipitação com solução saturada de sulfato de amônio, visando à eliminação de proteínas como a albumina, desprovidas de atividade de anticorpo. Este processo reduziu em cerca de 40% o conteúdo protéico do soro anti-VBL (tabela 1), bem como os ensaios de imunodifusão demonstraram linhas de precipitação mais definidas quando comparadas àquelas obtidas com o soro total (resultados não apresentados).

Na curva de precipitação, ao adicionarmos doses crescentes de antígeno (VBL) à fração globulínica obtida do soro anti VBL, verificamos que precipitado aumenta progressivamente até alcançar um máximo, além do qual decresceu, possivelmente pela formação de complexos solúveis.

O padrão característico obtido na curva de precipitação está diretamente relacionado às classes de imunoglobulinas antitóxicas presentes no soro. Enquanto as IgE – predominantes no início do processo de imunização – exibem curva de precipitação do tipo coelho, constituída de uma porção inicial (ascendente), um *plateau* (equivalência) e uma porção descendente; as antitoxinas do tipo IgT – predominantes no fim da hiperimunização – dão floculação de Ramon e apresentam curva de precipitação tipicamente campanular, do tipo cavalo (BELANTI, 1980), como observado no sistema VBL e soro anti-VBL. Na realidade, a antitoxina de cavalo pode exibir os dois tipos de curva, conforme a natureza da imunoglobulina a que está associada, IgT (tipo precipitina) e IgG (tipo floculação).

Investigando a capacidade neutralizante *in vivo* da fração obtida do soro anti-VBL, realizamos testes de pré-incubação ou inoculação endovenosa. A fração globulínica previamente incubada com o VBL neutralizou completamente a hemorragia; o edema, nas mesmas condições experimentais foi neutralizado somente a partir da segunda hora. A discreta efetividade do soro anti-VBL em inibir o edema induzido pelo VBL pode estar relacionada ao fato de, assim como observado com o anti-VBL total (FARIA, 1996), produzir edema importante quando injetada em patas de ratos (resultados não apresentados).

A inoculação endovenosa da fração globulínica imediatamente após injeção do VBL não inibiu significativamente os dois fenômenos. Nossos resultados estão de acordo com aqueles obtidos por LOMONTE *et al.* (1993) e LÉON *et al.* (2000), que relatam que efeitos locais como edema e hemorragia, produzidos por alguns venenos ofídicos somente são neutralizados pelos antivenenos convencionais, quando previamente incubados ao veneno.

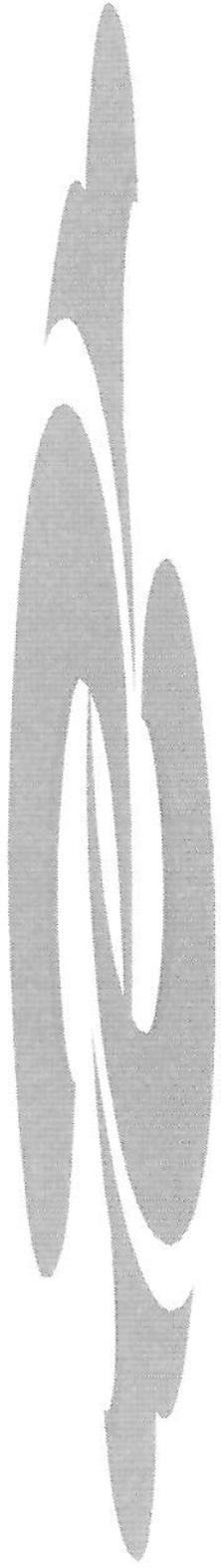


6. CONCLUSÕES

Utilizando o edema de pata como modelo de resposta inflamatória induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL), concluímos que:

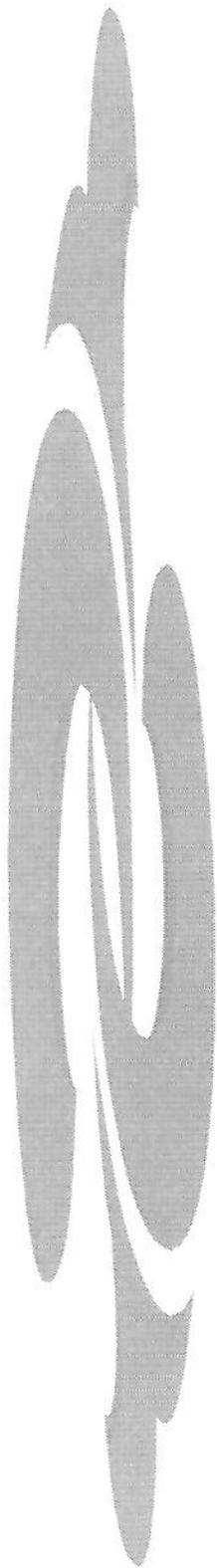
- a) O edema induzido pelo VBL em ratos ocorre de forma dose-tempo dependente e parece ser independente da presença de substâncias de baixo peso molecular no veneno. É mediado principalmente pela serotonina, bradicinina e metabólitos do ácido araquidônico, possivelmente pela via da lipoxigenase. Não descartamos a hipótese de que a dexametasona poderia estar agindo através da estabilização da membrana de mastócitos, impedindo desta forma, a liberação de aminas vasoativas.
- b) O VBL quando tratado com o agente quelante EDTA, perde a atividade hemorrágica e produz edema de forma reduzida, sugerindo o envolvimento do componente hemorrágico neste processo. O edema induzido pelo VBL incubado com EDTA pareceu envolver a liberação de mediadores como a histamina, serotonina, bradicinina e metabólitos do ácido araquidônico (possivelmente pela via da lipoxigenase);
- c) Análise histopatológica demonstrou que a injeção subplantar do VBL produz edema e hemorragia, acompanhada por infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos. A neutralização da atividade hemorrágica e redução da atividade edematogênica pelo EDTA foi comprovada a nível microscópico, entretanto este agente pareceu não interferir no infiltrado inflamatório. A dexametasona reduziu o edema e o infiltrado inflamatório, não afetando o quadro hemorrágico;
- d) A administração subplantar do VBL provocou alterações sistêmicas detectadas nos rins, caracterizadas pelo aumento capsular de filtração bem como alterações tubulares. O EDTA pareceu reverter este quadro, sugerindo o envolvimento do componente hemorrágico nesta atividade. A dexametasona não reverteu os efeitos glomerulares e tubulares produzidos pelo envenenamento;

- e) O soro anti-VBL concentrado foi eficaz na neutralização das atividades edematogênica e hemorrágica somente em testes de pré-incubação. A administração endovenosa foi ineficaz na neutralização dos dois fenômenos. Em todos os testes, o emprego do soro anti-VBL concentrado não apresentou capacidade neutralizante superior quando comparada àquela obtida com o soro anti-VBL total.



7. SUMMARY

Pharmacological modulation of the rat hind-paw edema induced by subplantar injections of *Bothrops lanceolatus* venom (BLV) was investigated. The edema induced by subplantar injections of 12.5; 25; 50; 75 and 100 µg of BLV was quantified by hydroplethysmography. With all of the venom doses tested, the edematogenic response were maximal within 15 min and disappeared over 24 h. Edema is not due to the presence of edematogenic amines or other small molecules, since dialysis did not change the edema. Part of edema induced by BLV is due to hemorrhagic components (metalloproteinases) since prior incubation of BLV 50 µg and 5 mM EDTA for 30 min at room temperature, caused a partial inhibition of its edematogenic activity. However, liberation of pharmacological active substance at the site of injection such as arachidonate metabolites, serotonin and bradykinin may play an important role in the BLV-induced edematogenic effect, since dexamethasone, methysergide and HOE 140 reduced significantly the edema formation. Histological examination showed that BLV (50 µg) caused a marked edema and hemorrhage, characterized by extensive intercellular spaces and presence of extra vascular red blood cells. In addition, there was infiltration of inflammatory cells, particularly neutrophils. The chelating agent EDTA reduced moderately the edema, reduced partially the hemorrhage, but did not affect the presence of inflammatory cells at the site of venom injection. The ability of antiserum to *Bothrops lanceolatus* venom and of a partially purified antibody fraction from this serum in neutralizing the local effects produced by BLV in rats was also investigated. Preincubation-type experiments showed that BLV-induced edema was neutralized by globulin-rich fraction 2 h, or more, after venom administration. Macroscopically, the hemorrhagic activity was completely neutralized. When BLV-antiserum and the globulin-rich fraction were administered i.v. after venom injection, no significant edema and hemorrhage neutralization was observed. BLV-antiserum and globulin rich fraction neutralized the venom-induced edema and hemorrhage to similar extents. This finding indicated that the globulin-rich fraction obtained by ammonium sulfate precipitation offers no significant advantages in neutralization compared to the unfractionated antiserum.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D.- Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, **23**: 877-85, 1985.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S.- Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **28**: 220-27, 1986.
- ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. – Inhibition of snake venom hemorrhagic metalloproteinase by human and rat α -macroglobulins. **Toxicon**, **36**:1127-39, 1998.
- BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W.– Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, **275**: 63-71, 1989.
- BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; GONIAS, S. L.; FOX, J. W.– Interaction of hemorrhagic metalloproteinase with human α_2 macroglobulin. **Biochemistry**, **29**: 1069-74, 1990.
- BELANTI, J. A.– **In: Imunologia**, 2^a. edição. Interamericana (Ed.). Rio de Janeiro, pp 3-23, 1980.
- BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K.- Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, **44**: 4-80, 1992.
- BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. – Characterization and substrate site mapping of two hemorrhagic zinc proteases from *Crotalus atrox* venom. **In: Pirkle, H. and Markland, F. S. (Eds.), Hematology. Hemostasis and Animal Venoms**, vol 7, Marcel Dekker Inc. N.Y., pp 457-77, 1988.

- BJARNASSON, J. B. & FOX, J.W.- Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, **62**: 325-72, 1994.
- BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. – Proteolytic specificity and cobalt exchange of hemorrhagic toxin a zinc protease isolated from the venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Biochemistry**, **22**: 3770-78, 1983.
- BJARNASSON, J. B. & TU, A. T. – Hemorrhagic toxins from diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. **Biochemistry**, **7**: 3395-404, 1978.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A. – Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. Jour. Trop. Med. Hyg.**, **61**: 698-706, 1999.
- BOLÃÑOS. R.- Las serpientes venenosas de Centroamerica y el problema del ofidismo. Primera Parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. **Rev. Cost. Cienc. Méd.**, **3**: 165-84, 1982.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. – Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, **31**: 1137-50, 1993.
- BRAZIL, V. – Contribuição ao estudo do veneno ophidico. **Rev. Méd. São Paulo** (1901).Collectanea dos Trabalhos do Instituto Butantan (1901-17), pp 1-30.
- BURIGO, A. C.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. - Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, **48**: 106-11, 1996.
- CAMPBELL, J. A., LAMAR, W. W. – *In*: The venomous reptiles of Latin America. Cornell University Press, Ithaka, 1989.
- CAMPOS, M. M. & CALIXTO, J. B.– Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, **114**:1005-13, 1995.

- CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.– Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, **33**: 31-9, 1995.
- CHAVES, F.; LÉON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. – 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**, **36**: 1861-69, 1998.
- CHIU, H. F.; CHEN, I. J.; TENG, C. M. – Edema formation and degranulation of mast cells by a basic phospholipase A₂ purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon**, **27**: 115-25, 1989.
- CONDREA, E. – Hemolytic effects of snake venoms. **In**: Lee, C. Y. (Ed.) Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 52, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1979, pp 448.
- DALE, M. M.; FOREMAN, L. C.; FAN, T. P. D.- Introduction to the immunology and pathology of host defense mechanisms. **In**: Dale, M. M. (Ed.), Textbook of Immunopharmacology, Oxford 1994, pp 1-17.
- DE MOURA, R. S.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE CARVALHO, C. R. M. – Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, **36**: 771-80, 1998.
- DEVI, A. – The protein and nonprotein constituents of snake venoms. **In**: Bücherl, W; Buckley E.; Deulofeu, V. (Eds.). Venomous Animals and Their Venoms. Vertebrates. vol. I. Academic Press – New York, 1968, pp 119-65.
- DONATO, J. L.- **Caracterização bioquímica e biológica de uma fração esterásica isolada da peçonha de *Bothrops lanceolatus***. Campinas, 1991.
- FABIANO, R. J. & TU, A. T.– Purification and biochemical study of viriditoxin, a tissue damaging toxin, from prairie rattlesnake venom. **Biochemistry**, **20**: 21, 1981.

- FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A.- Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**, **39**: 825-30, 2001.
- FARIA, L. – **Estudo das atividades edematogênica e hemorrágica do veneno de *Bothrops lanceolatus* em ratos.** Campinas, 1996. Tese de mestrado – Universidade Estadual de Campinas.
- FARSKY, S. H. P.; COSTA-CRUZ, J. W. M.; CURRY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. – Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, **35**: 185-93, 1997.
- FAURE, G. & BON, C. – Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, **27**: 730-38, 1987.
- FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCHESCHI, J.- Lipoygenase-derived mediators may be involved in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, **31**: 1551-59, 1993.
- FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M.– Purification and characterization of BaH₄, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, **38**: 63-77, 2000.
- FRIEDERICH, C. & TU, A. T. – Role of metals ions snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Bioch. Pharmacol.**, **20**: 1549-56, 1971.
- GETTY, D. V. M. R.– Anatomia dos animais domésticos. Interamericana (Ed.) Rio de Janeiro, 1981, 5^a. ed. pp 351-423.
- GUTIÉRREZ, J. M., CHAVES, F.; BOLANÓS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, G.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. – Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, **19**: 493-500, 1981.

- GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, J.; CERDAS, L.- Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, **23**: 887-93, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, E.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CERDAS, L.- Comparative study of the edema-formation activity of Costa Rica snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. **Comp. Biochem. Physiol.**, **85C**: 171-75, 1986.
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, **51**: 211-23, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B.- Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, **33**: 1405-24, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; CERDAS, L. - Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. **Toxicon**: **25**:713-20, 1987.
- HARTREE, E.F. - Determination of protein. A modification of the Lowry method that give a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, **48**: 422-27, 1972.
- HEIDELBERGER, M. & KENDAL, F.E. - The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and the homologous antibody II. Conditions for quantitative precipitation of antibody in horse sera. **Jour. Exp. Med.**, **61**: 559, 1935.
- HOGUE, A. R. & ROMANO HOGUE, S. A. R. W. L.- Poisonous snakes of the world. Part I - Checklist of the pit vipers *Viperoidea*, *Viperidae*, *Crotalinae*. **Mem. Inst. Butantan**: **42/43**: 179-310, 1978/79.
- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. - Enzymes in snake venoms. *In*: Lee, C. Y. (Ed.) Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1979, pp 61-158.

- JIMENEZ-PORRAS, J. M. – Reptile toxins. *In*: Biology Data Book, vol. II, 2nd. Ed. pp 697. Rochville Pibe: Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), 1973.
- KAMIGUTI, A.; THEAKSTON, R. G. D.; DESMOND, H. P.; HUTTON, R. A. – Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, **29**: 1097-105, 1991.
- KAMIGUTI, A.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. G. D.; ZUZEL, M.– Review article: Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, **34**: 627-42, 1996.
- KIRBI, E. P.; NIEWIAROWSKI, S.; STOCKER, K.; KETTNER, C.; SHAW, E.; BUDZINSKI, T.M.- Thrombocytin. A serine protease from *Bothrops atrox* venom. Purification and characterization of the enzyme. **Biochemistry**, **18**: 3564-70, 1979.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M.; GUIMARÃES, S. M.; - Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**: 552, 1991.
- LÉON, G.; VALVERDE, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.- Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, **38**: 233-44, 2000.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; KAMIGUTI, A.; BON, C.– Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom. **Toxicon**, *in press*, 2000.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; SOUZA, A. O.; CRUZ HÖFLING, M. A.; FLORES, C. A.; BON, C. - *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces edema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, **38**: 209-21, 2000.

- LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BON, C.- Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon** **32**:1069-81, 1994.
- LÔBO DE ARAÚJO, A; DONATO, J.L.; BON, C. – Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, **36**:745-58, 1998.
- LOMONTE, B.– Edema forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, **23**: 173-80, 1985.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKY, A.; HANSON, L. A.– Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of Edema formation, Inflammatory cells and Cytokine Release in a Mouse Model. **Inflammation**, **17**: 93-103, 1993.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. (1951) – Protein measurement with the Folin phenol Reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 265-75. 1951.
- MANDELBAUN, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T.– Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, **20**: 955-72, 1982.
- MEBS, D. – A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int. Jour. Biochem.**, **1**: 335, 1970.
- MOREIRA, L.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.- Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, **32**: 977-87, 1994.
- NAHAS, L.; DENSON, K. W. E.; MACFARLANE, R. G.- A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, **12**: 355-67, 1964.

- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R.- Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemostas.**, **41**: 314-28, 1979.
- NISHIDA, S.; FUGIMURA, Y.; MIURA, S.; OSAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H.- Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, **33**: 1843-49, 1994.
- OHSAKA, A. – Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. *In*: C. Y. Lee (Ed.). Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, Springer Verlag-Berlin, New York, 1979, pp 480-546.
- OUCHTERLONY, O. – Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis. *In*: Weir, B. M. (Ed.) Handbook of Experimental Immunology, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1967, pp 665-705.
- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; ODELL, G. V.– A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. **Toxicon**, **22**: 227-33, 1984.
- OWNBY, C. L. - Pathology of rattlesnake envenomation. *In*: Tu, A. T. (Ed.) *Rattlesnake Venoms, their actions and treatment*. Marcel Dekker, New York, 1982. pp 109-63.
- PELISSARI, C. B.; STINGHEN, S. T.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S.– Cianomethemoglobin method padronization for supernatant hemoglobin determination. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, **25**: 14-6, 1993.
- PERALES, J.; AMORIM, C. Z.; ROCHA, S. L. G.; DOMONT, G. B.; MOUSSATCHÉ, H.– Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antithrombotic fraction isolated from Opossum (*Didelphis Marsupialis*) serum. **Agents Actions**, **37**:250-59, 1992.

- PÉREZ, O. C. A.; KOSCINCZUKI, P.; TEIBLER, P.; NEGRETE, M. S.; RUIZ, R.; MARUÑAK, S.; BOGARIN, G.– Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* e *Crotalus* de Argentina. **Toxicon**, **36(8)**: 1165-72, 1998.
- RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M.– Sistema endócrino. Glicocorticóides. **In:** Guanabara Koogan (Ed.), *Farmacologia*, 3a. ed., Rio de Janeiro, 1997, pp. 332-61.
- RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKON, P. C.– Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, **17**: 723-41, 1993.
- RESENDE, C. C.; ARAÚJO, F. A. A.; SALLENAVE, R. N. U. R.– Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos. **In:** Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Brasília, 1989.
- REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S.; BAMBIRRA, E. A.; LACHAT, J. J.; COIMBRA, T. M.– Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. Jour. Méd. Biol. Res.**, **22**: 407-16, 1989.
- RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, V. A. F. P.; ALBUQUERQUE, M.; TAKAOKA, N. Y.– Acidente ofídico no Estado de São Paulo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, **39**: 4-7, 1993.
- ROSENFELD, G.; HAMPE, O. G.; KELEN, E. M. A.– Coagulation and fibrinolytic activity of animal venoms: determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Mem. Inst. Butantan.**, **29**: 143-48, 1959.
- ROSENFELD, G.– Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South América. **In:** Bucherl, W and Buckley, E. E. (Ed.) *Venomous Animals and their Venoms*. Academic press, New York, 1971. pp 345-403.

- ROTHSCHILD, A. M. AND ROTHSCCHILD, Z.- Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. *In:* C. Y. Lee (Ed.) Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 52, Springer Verlag-Berlin, New York, 1979, pp 591-628.
- SAÚDE, M. D.- Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, 1998.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (1993) – *Manual de Vigilância Epidemiológica*, pp 13-28.
- SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P.; GIGLIO, J. R.- Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, **28**: 261-73, 1990.
- SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.- Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, **378**: 201-9, 2000.
- THOMAS, L. & TYBURN, B.- *Bothrops lanceolatus* bites in Martinique: clinical aspects and treatment. *In:* Bon, C., Goyfon, M. (Eds.), Envenomings and their treatments. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, pp. 255-65, 1996.
- THOMAS, L., TYBURN, B., BUCHER, B., PECOUT, F., KETTERLE, D., RIEUX, D., SMADJA, D., GARNIER, D., PLUMELLE, Y.- Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique failure of anticoagulants and efficacy of a monoespecific antivenom. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **52**: 419-26, 1995.

- TREBIEN, H. A. & CALIXTO, J. B. (1989) – Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, **26**: 292-300, 1989.
- TU, A.T.- Chemistry of Rattlesnake Venoms. **In**: Rattlesnake Venoms, their Actions and Treatment. New York, Marcel Dekker, 1982, pp 247.
- UNDERWOOD, G.– Classification and distribution of venomous snakes in the world. **In**: C. Y. Lee (Ed.) Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 52, Springer Verlag-Berlin, New York, 1979, pp 15-40.
- VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. – Characterization of three edema inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, **25**: 501-15, 1987.
- WARREL, D. A. **The global problem of snake bite: its prevention and treatment.** Singapore, National University of Singapore, 1992.
- WEICHSELBAUM, T. E. – An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. **Am. Jour. Clin. Path. Tech. Suppl.**, **10**: 40-9, 1946.