

**ANA OLÍVIA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE  
*Bothrops lanceolatus* EM PATA DE CAMUNDONGOS**

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Ana Olívia de Souza.

Campinas, 30 de junho de 1995

*Albetiza Lobo de Araújo*  
Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

- Orientadora -

So89a

25784/BC

ANA OLÍVIA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE  
*Bothrops lanceolatus* EM PATA DE CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Departamento de  
Farmacologia da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. ALBETIZA LÔBO DE ARAÚJO

CAMPINAS - 30/06/1995

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

**Orientador:**

Prof. Dr. Albertina Lobo de Araújo

**Membros:**

1. Prof. Dr. Albertina Lobo de Araújo
  2. Prof. Dr. Carlos Alberto Flores
  3. Prof. Dr. Edson Arantes
- Handwritten signatures and initials are present next to the names of the members.

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data:** 30/06/95

**A**

**meus pais: Waltuir e Sebastiana**

**meus irmãos: Roberto, Wanderlei, e Donizete e**

**minha sobrinha: Nathália,**

**que fazem parte de minha história, e tornam a  
busca por novos horizontes cada vez mais cheia  
de coragem.**

**A DEUS pela força espiritual que Ele emana em  
minha vida a todo instante, das formas as mais  
variadas.**

**“Em todas as coisas somos mais que  
vencedores pela virtude daquele que nos  
amou.”**

**RM 8:37**

## AGRADECIMENTOS

---

- À Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo pela amizade, incentivo e oportunidade de estar em contato com a pesquisa científica.
- Ao Dr. Cassian Bon, do Instituto Pasteur, pelo fornecimento do veneno de *Bothrops lanceolatus*.
- À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Hofling, do Centro de Microscopia Eletrônica do IB - UNICAMP, pela valiosa colaboração e orientação no estudo morfológico que faz parte deste trabalho.
- À funcionária Marta Beatriz Leonardo, do Centro de Microscopia Eletrônica do IB - UNICAMP, pela realização das técnicas de análise histopatológica.
- Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Magna e Prof. Dr. Aquiles Piedra Buena pelo auxílio na realização das análises estatísticas.
- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Flores pela visão crítica, colaboração e sugestões sempre pertinentes.
- Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela colaboração, sugestões e fornecimento de várias drogas utilizadas neste trabalho.
- À Profa. Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo pelos comentários e sugestões.
- Ao Professor Dr. Stephen Hyslop pelas sugestões, críticas e auxílio.
- À minha amiga Profa. Cibeles Oliveira pela revisão gramatical deste trabalho.

- Ao colega de laboratório, Luiz de Faria, pela confiança e colaboração partilhadas no dia-a-dia.
- Aos colegas do Departamento de Farmacologia pelos bons momentos vividos.
- A meus amigos que sempre estiveram presentes, em especial à Claudinha pela convivência diária.
- Aos funcionários e docentes do Departamento de Farmacologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

**"Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. Se assim não for, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar preciso em relação a seus próximos e à comunidade."**

**Albert Einstein**



## SUMÁRIO

---

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumo.....</b>                                                        | <b>4</b>  |
| <b>1 - Introdução.....</b>                                                | <b>5</b>  |
| 1.1 - Venenos de serpentes.....                                           | 5         |
| 1.2 - Resposta inflamatória.....                                          | 11        |
| <b>2 - Objetivo.....</b>                                                  | <b>20</b> |
| <b>3 - Materiais e Métodos.....</b>                                       | <b>21</b> |
| 3.1 - Animais.....                                                        | 21        |
| 3.2 - Veneno.....                                                         | 21        |
| 3.3 - Drogas e reagentes utilizados.....                                  | 21        |
| 3.3.1 - Uso do Iloprost, análogo à prostaciclina (PGI <sub>2</sub> )..... | 22        |
| 3.3.2 - Uso do composto 48/80.....                                        | 22        |
| 3.3.3 - Uso do fator ativador de plaquetas.....                           | 22        |
| 3.3.4 - tratamento com drogas.....                                        | 22        |
| a - Anti-histamínico e anti-serotonínico.....                             | 22        |
| b - Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico.....                  | 23        |
| - Dexametasona.....                                                       | 23        |
| - Indometacina.....                                                       | 23        |
| - BW A4C.....                                                             | 23        |
| - Ácido nordihidroguaiarético (NDGA).....                                 | 23        |
| - WEB 2086.....                                                           | 24        |
| 3.4 - Medida do edema de pata e aumento de permeabilidade vascular....    | 24        |
| 3.5 - Determinação da dose mínima hemorrágica (DMH).....                  | 25        |
| 3.6 - Análise histopatológica.....                                        | 25        |
| 3.7 - Análise estatística.....                                            | 26        |

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4 - Resultados.....</b>                                                                                                 | <b>28</b> |
| 4.1 - Edema de pata e aumento de permeabilidade vascular.....                                                              | 28        |
| 4.2 - Dose mínima hemorrágica (DMH).....                                                                                   | 28        |
| 4.3 - Análise histopatológica.....                                                                                         | 29        |
| 4.4 - Potencialização do edema de pata e do aumento de<br>permeabilidade vascular com o uso do vasodilatador iloprost..... | 30        |
| 4.5 - Inibição do edema de pata e do aumento de permeabilidade<br>vascular pelo tratamento com drogas.....                 | 30        |
| <b>5 - Discussão.....</b>                                                                                                  | <b>43</b> |
| <b>6 - Conclusão.....</b>                                                                                                  | <b>49</b> |
| <b>7 - Abstract.....</b>                                                                                                   | <b>50</b> |
| <b>8 - Referências bibliográficas.....</b>                                                                                 | <b>51</b> |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Variação temporal do edema e do aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno.....                                          | 32 |
| <b>Figura 2.</b> Resposta do edema e do aumento de permeabilidade vascular à várias doses do veneno.....                                                | 33 |
| <b>Figura 3.</b> Atividade hemorrágica do veneno em pele de camundongos.....                                                                            | 34 |
| <b>Figura 4.</b> Demonstração histopatológica do edema de pata induzido pelo veneno.....                                                                | 35 |
| <b>Figura 5.</b> Demonstração histopatológica de hemorragia e infiltrado leucocitário induzidos pelo veneno.....                                        | 37 |
| <b>Figura 6.</b> Efeito potencializador do análogo à $PGI_2$ (iloprost) sobre o edema e o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno..... | 39 |
| <b>Figura 7.</b> Não envolvimento de histamina, serotonina e PAF no edema e aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno.....               | 40 |
| <b>Figura 8.</b> Efetividade dos inibidores de histamina, serotonina e PAF.....                                                                         | 41 |
| <b>Figura 9.</b> Envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico no edema e aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno.....             | 42 |

## RESUMO

---

A capacidade que os venenos de serpentes possuem de aumentarem a permeabilidade vascular e induzirem edema, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, é bem conhecida. Investigamos a resposta inflamatória (edema e permeabilidade vascular) induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) em camundongos Swiss machos. O edema de pata foi induzido pela injeção subplantar do VBL (125 a 1000 ng/pata) e quantificado pelo aumento do peso da pata. A permeabilidade vascular foi determinada pela quantidade de azul de Evans extravasado. O edema e o aumento de permeabilidade foram máximos dentro de duas horas e estatisticamente insignificantes a partir de 24 horas. A administração de iloprost (20 ng/pata) após a do VBL potencializou o edema e o aumento de permeabilidade vascular aproximadamente em 400%. O tratamento dos camundongos com indometacina (5 mg/kg), dexametasona (1 mg/kg), NDGA (100 mg/kg) ou BW A4C (50 mg/kg) inibiu o edema induzido pelo VBL (43%, 59%, 28% e 43%, respectivamente) e o aumento da permeabilidade vascular (0%, 66%, 48% e 44%, respectivamente). Ao contrário, os antagonistas de histamina, serotonina, e PAF [mepiramina (6 mg/kg), ciproheptadina (5 mg/kg), e WEB 2086 (50 mg/kg), respectivamente] não foram efetivos. Estes resultados indicam que os dois fenômenos anteriormente citados são mediados principalmente por produtos da ação de ciclooxigenase e lipoxigenase. A nível histológico, as patas que sofreram injeção de 250 e 500 ng do VBL apresentaram um aumento na região dérmica com espaços intercelulares que são indícios de edema. Houve a presença de infiltrado celular, principalmente neutrófilos, entre as fibras musculares, as quais, morfológicamente não foram afetadas, pelo menos durante as três primeiras horas de observação. Com a dose de 500 ng ocorreu intensa hemorragia registrando grande número de hemácias extravasculares.

## 1 - INTRODUÇÃO

---

### 1.1 - Venenos de serpentes

Desde os tempos mais remotos da humanidade, as serpentes, que suscitavam medo e eram objeto de superstição, despertam o interesse dos estudiosos. As serpentes são animais predadores que utilizam seu aparelho venenoso para capturar, matar as presas e delas se nutrirem. O aparelho venenífero é constituído pelas glândulas ou células secretoras e por todo um aparato necessário para inocular o veneno na presa escolhida.

Entre as muitas espécies de serpentes, pouco se sabe sobre as não venenosas, enquanto é sabido que as venenosas, graças à evolução de suas presas, se caracterizam pela habilidade de inocular o veneno em suas vítimas e são agrupadas em cinco famílias: Colubridae, Elapidae, Hydrophidae, Viperidae e Crotalidae (Tu, 1977). Na Colubridae, somente alguns gêneros são venenosos; nas outras quatro famílias, todos os gêneros o são. Destas, as Viperidae, Crotalidae e Elapidae são de maior importância médica (Warrell e Fenner, 1993).

No séc. XVI, após Jacques Grevin apresentar um relatório sobre os venenos de serpentes, estes passaram a ser considerados de importância científica. Em 1664, Francesco Redi, um biólogo italiano, os descreveu de forma metódica, e Felice Fontana, em 1766, iniciou os estudos toxicológicos e a pesquisa científica (Devi, 1968).

No final do séc. XIX, em 1886, Silas Weir Mitchell publicou observações importantes sobre venenos de serpentes (Devi, 1968), os quais evoluíram para secreções especializadas de alta eficiência em imobilização, morte e digestão da presa (Condrea, 1979). A função desses venenos em relação a grandes animais é secundária e defensiva (Underwood, 1979). Em geral, os venenos são de cor

branca, amarela ou laranja (Rosenfeld, 1971), produzidos e estocados em glândulas salivares especializadas e classificados de acordo com seus modos de ação e princípios tóxicos (Ohsaka, 1979).

No Brasil, os estudos sobre venenos tiveram grande participação de João Batista Lacerda, que, no século passado, realizou, no Museu Nacional, algumas pesquisas sobre a farmacologia dos venenos de serpentes brasileiras (Vital Brazil, 1982a).

Em 1963, iniciou-se a implantação dos centros de controles de intoxicação, os CCI. Os trabalhos realizados por estes centros demonstraram que os acidentes causados por animais peçonhentos representavam a segunda causa de atendimento nos hospitais de grandes centros do estado de São Paulo, superados somente por intoxicação medicamentosa. Nos centros localizados em regiões de grande atividade agrícola, como no interior de São Paulo, a situação se inverte (CCI - UNICAMP).

O mapeamento dos acidentes ofídicos no Brasil só foi possível a partir do momento em que critérios de diagnósticos clínicos foram definidos, baseados na sintomatologia e consequentemente sua terapêutica e avaliação prognóstica, mesmo sem a identificação da serpente (Rosenfeld, 1971). Existem aproximadamente 250 espécies de serpentes que estão distribuídas em nove famílias, das quais apenas duas (Elapidae e Crotalidae) englobam os quatro gêneros peçonhentos (*Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus*) existentes no país. A maioria dos acidentes ofídicos ocorre por ação de espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* - família Crotalidae - (Ministério da Saúde, 1986) destacando-se no estado de São Paulo como responsáveis por quase a totalidade dos envenenamentos ocorridos (Rosenfeld, 1971; Cardoso, 1985). No estado de São Paulo, entre 1986-1990, 86% dos casos notificados com especificação do gênero da serpente eram causados por espécies botrópicas, dentre elas, principalmente, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, e *B. neuwiedi* (Manual

de Vigilância Epidemiológica, 1993). No gênero *Bothrops*, três espécies endêmicas insulares também são reconhecidas: *B. insularis*, na ilha da Queimada Grande, na costa do Brasil; *B. carabaeus*, em St. Lúcia - nas Antilhas; e *B. lanceolatus*, na ilha da Martinica.

Descrita pela primeira vez por Lacépède, em 1789, a *B. lanceolatus* é uma serpente grande, habitante das florestas tropicais úmidas e chuvosas e de encostas rochosas, tendendo a ser arbóricola (Campbell e Lamar, 1989). Estudos realizados por Cheymol e col., (1968) mostraram que o veneno desta serpente, quando injetado em camundongos, tem atividade coagulante, não bloqueia a transmissão neuromuscular, aumenta a permeabilidade capilar e produz hipotensão por vasodilatação periférica, levando à morte, quando em grandes doses. Este veneno possui a maioria das atividades biológicas apresentadas pelas *Bothrops* brasileiras (Lôbo de Araújo e col., 1990) e contém uma fosfolipase A<sub>2</sub> ácida não tóxica para camundongos ou pintainhos, além de não bloquear eficientemente a transmissão neuromuscular nesses últimos (Lôbo de Araújo e col., 1994). Devido ao isolamento geográfico da *B. lanceolatus*, muitas características peculiares podem ter se desenvolvido a nível fisiológico e morfológico, a exemplo do que ocorreu no Brasil com a *B. insularis* (Amaral, 1921; Campos e Mello Filho, 1966).

De todos os venenos conhecidos, os de serpentes são os mais complexos (Ohsaka, 1979) e que contêm grande número de enzimas conferindo grande heterogeneidade a este produto natural (Iwanaga e Suzuki, 1979). As enzimas mais comumente encontradas são: acetilcolinesterase, fosfolipases, ribonucleases, proteinases, esterases, dipeptidases, L-amino ácido oxidases, desoxirribonucleases, enzimas tipo trombina, e outras.

Além de proteínas que em geral correspondem à 90% do peso seco, e são os componentes mais importantes do ponto de vista fisiológico, também se fazem presentes componentes de baixo peso molecular. Aqueles em menor proporção

são organofosforados, íons metálicos e não metálicos e materiais orgânicos não protéicos (Devi, 1968). Esses últimos incluem carboidratos, lipídeos, componentes de ácido nucleico, aminoácidos, peptídeos e algumas aminas biologicamente importantes, e apenas alguns têm potente atividade fisiológica (Bieber, 1979). Alguns dos íons metálicos são firmemente ligados a proteínas (metaloproteínas) e podem servir como cofatores para suas funções. Este parece ser o caso de certas enzimas proteolíticas e algumas proteínas hemorrágicas (Bieber, 1979), como a toxina hemorrágica "e" do veneno de *Crotalus atrox*, que possui cálcio, magnésio e zinco em sua composição (Bjarnason e Tu, 1978). As proteínas hemorrágicas presentes nos venenos de serpentes são denominadas hemorraginas (Grotto e col., 1967), princípios hemorrágicos (Ohsaka, 1979), ou fatores hemorrágicos (Mandelbaum e col., 1976) e são exemplos de metaloproteínas (Bjarnason e Tu, 1978; Civello e col., 1983; Miyata e col., 1989; Tan e Saifuddin, 1990; Takeya e col., 1990, 1993; Yonaha e col., 1991). Muitas toxinas hemorrágicas são enzimas proteolíticas (Civello e col., 1983; Mandelbaum e col., 1984; Nikai e col., 1984, 1986) capazes de romperem capilares, provocando o extravasamento de elementos sangüíneos (Ohsaka, 1979) para o compartimento extravascular (Queiroz e col., 1985).

Ohsaka (1979) considerou que as hemorraginas atuam sobre a membrana basal causando ruptura e perda da integridade vascular, o que leva à liberação simultânea de eritrócitos e albumina, por alteração na permeabilidade vascular; ou atuam sobre as paredes dos vasos sangüíneos, resultando em danos às junções entre as células endoteliais.

Como as enzimas podem sofrer grandes variações dependendo das condições da serpente (idade, nutrição, sexo, habitat), da manipulação e da estocagem do veneno, torna-se difícil explicar as diferenças observadas no conteúdo enzimático (Iwanaga e Suzuki, 1979).



Dentro de um mesmo gênero de serpente há diferenças significativas na composição do veneno em relação à toxicidade, letalidade, atividade enzimática, efeitos locais e aspectos imunológicos (Chippaux e col., 1991). Existem variações quantitativas e qualitativas na composição proteica (Fiero e col., 1972; Lomonte e col., 1983). Com o avanço da idade do réptil, os componentes de maior peso molecular tendem a desaparecer (Meier, 1986), a quantidade do veneno aumenta e a letalidade diminui, o que parece não estar associado à concentração proteica (Bonilla e col., 1973; Meier e Freyvogel, 1980). Há diferenças bem definidas entre os venenos de filhotes e suas respectivas mães no tocante às atividades enzimáticas (Furtado e col., 1991). O veneno da *B. asper* jovem difere notavelmente daquele da *B. asper* adulta, em muitos parâmetros bioquímicos e farmacológicos, como por exemplo em relação ao efeito hemorrágico, edematogênico e atividade proteolítica (Gutiérrez e col., 1980). Nos envenenamentos causados por *B. jararaca* (Rosenfeld e col., 1959; Kamiguti e col., 1986; Ribeiro e Jorge, 1989) e *B. moojeni* (Kouyoumdjian e Polizelli, 1989) jovens, há uma frequência muito maior de coagulabilidade sanguínea, quando comparados aos causados por serpentes adultas. A quantidade de soro antiofídico comercial necessária para neutralizar venenos de serpentes recém-nascidas é maior que aquela necessária para neutralizar os de espécies adultas de *Crotalus durissus durissus*, provavelmente devido à diferença na letalidade (Lomonte e col., 1983).

A variabilidade geográfica também é responsável por diferenças na composição dos venenos (Aragon e Gubensek, 1981; Meier, 1986; Soto e col., 1988). O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, existente na Bolívia, não tem atividade significativa sobre o fibrinogênio, enquanto o dessa mesma espécie em outras regiões, como o Brasil e a Argentina, apresenta alta atividade tipo trombina (Sanchez e col., 1992). Estas alterações também são conhecidas dentro do gênero *Bothrops*. As atividades hemorrágica, coagulante e proteolítica apresentadas pelos venenos de *B. asper* da Costa Rica, ocorrem de forma

diferente na região atlântica e na pacífica do país (Gutiérrez e Chaves, 1980; Aragon e Gubensek, 1981).

Embora os venenos sejam heterogêneos na composição e produzam efeitos múltiplos simultâneos, os inoculados por serpentes pertencentes à família Elapidae são predominantemente neurotóxicos, enquanto os viperídeos e crotalícos:

- causam efeitos prejudiciais sobre o sistema cardiovascular e coagulação sangüínea, (Condrea, 1979);
- exercem um forte efeito necrosante e se acumulam em maior concentração no pulmão, rins, coração, timo, linfonodo, fígado, e glândula tireóide (Gennaro e Ramsey, 1959);
- produzem, além de efeito sistêmico ou letal, notável efeito local consistindo de hemorragia, necrose e edema (Ohsaka, 1979; Ownby, 1982; Gutiérrez e Lomonte, 1989);
- formam uma lesão patofisiológica complexa, o que pode ser explicado pela ocorrência de múltiplas ações biológicas simultâneas de um único componente, ou pela interação sinérgica de vários componentes com diferentes atividades biológicas (Ohsaka, 1979).

Os envenenamentos botrópicos, em particular, são caracterizados por :

- induzirem estado de choque circulatório, que segundo Vital Brazil é a causa mais freqüente de morte (1982a);
- causarem pronunciado efeito local na forma de hemorragia e necrose tissular, ocasionando seqüelas, como perda de tecido que pode levar à necessidade de amputação da extremidade afetada (Brazil, 1911; Cheymol e col., 1968);
- exercerem intensa atividade proteolítica (Brazil e Rangel Pestana, 1909; Houssay e Negrete, 1918; Mebs, 1970);

- coagularem o plasma sangüíneo (Brazil e Vellard, 1928; Rosenfeld e col., 1959; Klobusitzky, 1961);
- liberarem substâncias farmacologicamente ativas, tais como histamina e bradicinina (Rothschild e Rothschild, 1979), levando à formação de edema e inflamação que se desenvolvem rapidamente após a inoculação do veneno (Rosenfeld, 1971; Amaral e col., 1987).

## **1.2 - Resposta inflamatória**

A inflamação é uma resposta protetora que pode diluir, remover ou destruir o agente incitante em animais (Gallin e col., 1988) e pode ocorrer de forma aguda ou crônica (Garcia Leme, 1979). Inicia-se com a detecção de injúria ao tecido (Williams, 1994) e caracteriza-se por eritema, calor, edema e dor. O eritema e o calor devem-se à vasodilatação e ao aumento do fluxo sangüíneo. O edema ocorre devido ao aumento de permeabilidade vascular, com extravasamento de fluidos para o tecido e ao acúmulo de células inflamatórias. A dor se deve ao estímulo de nervos aferentes por mediadores químicos e também à pressão aumentada do tecido (Dale e col., 1994).

Os componentes da resposta inflamatória compreendem reações inatas (imunologicamente não específicas) e adaptativas (imunologicamente específicas).

A reação inata se manifesta por eventos vasculares e celulares que podem ser modificados por mediadores químicos derivados do plasma ou de células (Rang e Dale, 1993).

As alterações vasculares se iniciam imediatamente após a injúria ao tecido e se desenvolvem durante as primeiras horas, compreendendo vasodilatação com aumento do fluxo sangüíneo; a isto segue-se lentificação e depois estase do

sangue, aumento de permeabilidade vascular e exsudação de plasma (Rang e Dale, 1993).

A vasodilatação e a fase inicial de aumento de permeabilidade vascular ocorrem por ação de vários mediadores celulares (histamina, prostaglandina E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub>, fator ativador de plaquetas, etc.) e alguns derivados do plasma (bradicinina), que atuam sobre pequenas arteríolas e esfíncteres pré-capilares. A associação de neutrófilos às paredes das vênulas pós-capilares contribui para a fase posterior, mais prolongada, de aumento da permeabilidade vascular. O plasma ainda contém numerosas substâncias que, com o aumento de permeabilidade vascular, fluem para a área inflamada. Estas substâncias incluem os componentes de quatro cascatas enzimáticas: os sistemas da coagulação, fibrinolítico, do complemento e o das cininas (Dale e col., 1994).

O sistema do complemento consiste de nove componentes principais, designados C1 a C9. Pode estimular os mastócitos a secretar mediadores químicos e ativar leucócitos. No sistema fibrinolítico, o fator XII é ativado em XIIa e o produto final é a fibrina que pode limitar a extensão da infecção. A trombina, principal enzima do sistema da coagulação, pode ativar o sistema do complemento, e participar da ativação dos sistemas das cininas e fibrinolítico. E, finalmente, o sistema das cininas participa da produção de potenciais mediadores da inflamação, em particular, da bradicinina (Rang e Dale, 1993; Dale e col., 1994).

Algumas das células envolvidas nos eventos celulares já estão presentes nos tecidos (células endoteliais vasculares, mastócitos e fagócitos mononucleares teciduais), enquanto outras têm acesso pelo sangue (plaquetas e leucócitos) (Dale e col., 1994).

As plaquetas são elementos cruciais na homeostase, também participam das respostas inflamatórias e podem ter um importante papel na asma (Rang e Dale, 1993).

Os leucócitos são células móveis e podem ser polimorfonucleares - granulócitos - (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) ou mononucleares (monócitos e linfócitos). Os polimorfonucleares são as primeiras células a chegarem no sítio inflamatório. Não se multiplicam, têm pouca capacidade de sintetizar proteína e uma vida curta. Aderem ao lado das vênulas pós-capilares na área e então migram, através das paredes dos vasos, para o sítio do patógeno invasor, atraídos por quimiotaxinas (Dale e col., 1994). Na vigência de certas reações inflamatórias ocorre ativação do sistema complemento, com liberação do fragmento C5a, que é quimiotático para neutrófilos (Macmillan e Foster, 1988). Os neutrófilos, em particular, são capazes de fagocitar, matar e digerir microorganismos. Neutrófilos e eosinófilos têm receptores em suas superfícies para o produto do complemento, C3b, que forma um elo entre o polimorfo e o organismo invasor. Os monócitos chegam ao sítio inflamatório muitas horas após os polimorfos e nos tecidos se transformam em macrófagos (literalmente "grandes comedores"). Fagocitam microorganismos, fragmentos de tecidos e polimorfonucleares mortos. Também apresentam material antigênico aos linfócitos, no início de uma resposta imune. Podem secretar enzimas lisossomais, componentes do complemento, prostaglandinas, um 'fator tecidual' que pode iniciar a cascata da coagulação, interferon, fator estimulante de fibroblasto, e fatores como interleucina-1, que modificam as atividades dos linfócitos. Secretam fatores que estimulam o desenvolvimento dos vasos sanguíneos e são importantes no processo de reparo. Quando estimulados por glicocorticóides, os monócitos secretam lipocortina, um polipeptídeo que modula a resposta inflamatória (Dale e Foreman, 1994).

As células endoteliais vasculares das pequenas arteríolas estão envolvidas na vasodilatação e no fornecimento de plasma e células sanguíneas para a área

inflamada, através da secreção do fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE). Já as células das vênulas pós-capilares regulam o fluxo de exsudato e consequentemente o fornecimento de mediadores derivados do plasma (Dale e col., 1994).

Os mastócitos estão localizados próximos à superfície da pele, no íntimo das membranas mucosas, forrando as cavidades do corpo e nas imediações dos vasos sangüíneos. Têm como constituintes de sua membrana, receptores para anticorpo e para componentes do complemento. Podem ser ativados a secretar mediadores, através destes receptores ou através de fatores produzidos por neutrófilos. Após um dano físico direto podem liberar mediadores como a histamina, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, e outras substâncias (Rang e Dale, 1993; Dale e col., 1994).

A reação adaptativa ou imune pode se sobrepor à reação inata. Reações imunes dependem de linfócitos. Estas células foram originalmente descritas por Rich como “espectadores fleumáticos assistindo à turbulenta atividade dos fagócitos”, mas elas são consideradas atualmente as células-chave na resposta imunológica específica, a qual a torna inata (ou reação imunologicamente não específica) vastamente mais eficiente (Dale e col., 1994).

### *Mediadores derivados de células*

#### *Eicosanóides*

Quando as células inflamatórias são estimuladas ou danificadas, ocorre a liberação do ácido araquidônico presente nas membranas das células, por ação de fosfolipase A<sub>2</sub> ou outras lipases. Por ação da enzima ciclooxigenase, o ácido araquidônico é metabolizado dando origem ao tromboxano (vasoconstritor e agregante de plaquetas) e a várias prostaglandinas. Algumas prostaglandinas têm ação vasodilatadora e também potencializam a ação de agentes que causam

aumento de permeabilidade vascular e dor. Esta é a principal via do metabolismo do ácido araquidônico, em macrófagos.

Outra via se inicia com a ação de lipoxigenase originando os ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETES) e deles então os ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETES) e leucotrienos. Um destes últimos, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), é um potente agente quimiotático para neutrófilos, eosinófilo e macrófagos. Outros leucotrienos, LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub>, têm poderosa ação broncoconstritora. Os leucócitos polimorfonucleares metabolizam o ácido araquidônico, principalmente a HETES e LTB<sub>4</sub>, enquanto os macrófagos fagocitantes, eosinófilos e mastócitos produzem LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub>, assim como prostaglandinas (Salmon e Higgs, 1994).

#### *Fator ativador de plaquetas*

O fator ativador de plaquetas é um potente mediador derivado de células por atividade de fosfolipase A<sub>2</sub>. É liberado de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e plaquetas estimuladas. Embora chamado fator ativador de plaquetas, também é quimiotático para neutrófilo; espasmogênico sobre músculo liso; vasodilatador e influente no aumento de permeabilidade vascular (Page, 1994).

#### *Citocinas*

Este termo se refere a peptídeos reguladores da reação inflamatória e imune que atuam por mecanismos parácrinos e autócrinos. As citocinas incluem as interleucinas de 1 a 12 (IL-1 a IL-12), os interferons, os fatores estimulantes de colônia, o fator de necrose tumoral, etc. Eles atuam sinergicamente para regular a proliferação, diferenciação e atividade de leucócitos e outras células inflamatórias (Hamblin, 1994).

#### *Histamina*

A histamina é estocada e liberada por mastócitos e basófilos. Através da interação com receptores denominados H<sub>1</sub>, pode dilatar os vasos sanguíneos,

aumentar a permeabilidade vascular e contrair músculos lisos, a exemplo daqueles dos bronquíolos e intestino. Além disso, a histamina pode modular a resposta de outras células, como linfócitos, através de receptores  $H_2$  (Dale e Foreman, 1994).

#### *Interações entre mediadores*

Os mediadores inflamatórios são especializados em suas ações, mas há notável interação entre eles. As mais proeminentes são as interações sinérgicas entre mediadores vasodilatadores e aqueles que aumentam permeabilidade microvascular. Assim, prostaglandinas vasodilatadoras ( $PGE_2$  ou  $PGI_2$ ) ou neuropeptídeos (como CGRP) induzem pouca formação de edema sozinhos, mas são capazes de potencializar edema induzido por mediadores como histamina ou bradicinina. Mediadores vasodilatadores também potencializam edema induzido por neutrófilos quimioatraentes (Williams, 1994).

O leito vascular tem a função de distribuir sangue para os tecidos, mantê-los com oxigênio e nutrientes, e remover resíduos de produtos metabólicos. Há um equilíbrio dinâmico entre o tecido e o fornecimento de sangue, com uma diferença de pressão hidrostática tendendo a mover o fluido para fora dos vasos e uma pressão osmótica (causada pela alta concentração de proteína no plasma relativo do fluido intersticial) atuando na direção oposta. O clearance linfático compensa qualquer excesso de movimento do fluido para fora. Este estado de equilíbrio depende de uma baixa permeabilidade da parede dos vasos em relação a proteínas plasmáticas, e esta é mantida pela junção entre as células endoteliais que asseguram uma passagem homogênea de sangue (Williams, 1994).

Em resposta a um estímulo injurioso, esses sistemas de equilíbrio alteram-se dramaticamente e, somados a outros sistemas de proteção que dão origem à sensação de dor, constituem a base da resposta inflamatória. A vasodilatação, o acúmulo de leucócitos e a formação de edema, que são três dos principais fatores da inflamação, atuam em conjunto para levar a uma resposta controlada. A



permeabilidade aumenta dramaticamente e fluidos ricos em proteínas movem-se do sangue para o espaço extravascular. O fluido extravasado sobrecarrega o clearance linfático, resultando em edema no tecido (Williams, 1994), o que determina o afastamento de estruturas colágenas (Garcia Leme, 1979). A formação do edema frequentemente é considerada uma consequência de injúria em células endoteliais por ação sinérgica de toxinas que afetam diretamente a vasculatura, com outras que liberam autacóides, como prostaglandinas, histamina e bradicinina (Ohsaka, 1979; Hawgood, 1982).

Quando o edema é induzido pelos venenos botrópicos, provavelmente uma variedade de proteínas farmacologicamente ativas estão envolvidas (Gutiérrez e Lomonte, 1989), tais como:

- Toxinas hemorrágicas que rompem a musculatura induzindo extravasamento (Ohsaka, 1979; Ownby, 1982);
- Toxinas atuando diretamente sobre células endoteliais dos capilares e vênulas, aumentando sua permeabilidade (Ohsaka, 1979; Ownby, 1982);
- Fosfolipases A<sub>2</sub> que, por ação direta ou por meio de lisofosfatídeos citolíticos, agiram sobre a membrana de mastócitos levando à liberação do conteúdo de seus grânulos (Rothschild, 1966; Damerau e col., 1975; Mietto, 1984). Ou ainda atuam sobre fosfolípídeo de membrana, liberando ácidos graxos. Entre estes, está o ácido araquidônico, que, sob a ação de ciclooxigenases e lipoxigenases, origina compostos ativos, como prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (Damerau e col., 1975; Huang, 1984; Robbins e col., 1987);
- proteases que atuam diretamente sobre cininogênio do plasma, liberando cininas (bradicinina) (Rocha e Silva e col., 1949); ou indiretamente, através da indução de danos à vasculatura, ativando o fator XII (Fator Hageman) da cascata da coagulação, o qual, por sua vez, ativa a calicreína e consequentemente o sistema das cininas (Gutiérrez e Lomonte, 1989);
- Componentes da cascata do complemento, particularmente C3a e C5a, que participam da reação inflamatória, também podem ser ativados pela presença do veneno ou outros mediadores liberados (Robbins e col., 1987).

O envenenamento por serpentes, causando morte ou incapacidade da vítima, ainda é um dos maiores problemas de Saúde Pública em muitos países (Heneine e Catty, 1993). Quando a soroterapia é iniciada imediatamente, a taxa de mortalidade é baixa e o óbito somente ocorre em pacientes que receberam o soro 6 a 10 horas após a picada (Kaiser e Michl, 1971). A introdução da soroterapia no tratamento de acidentes ofídicos é obra de dois cientistas, Albert Calmette e Vital Brazil. O primeiro demonstrou que o soro de animais imunizados com a peçonha ofídica era capaz de neutralizá-la, podendo ser empregado preventiva e curativamente para impedir seus efeitos no organismo. Deve-se, no entanto, a Vital Brazil, mineiro da cidade de Campanha (1865-1950), a introdução da especificidade dos soros antiofídicos, hoje mundialmente adotada (Vital Brazil, 1986). A administração de antivenenos não é totalmente efetiva porque geralmente abole os efeitos sistêmicos, enquanto os efeitos locais são difíceis de serem neutralizados (Russell e col., 1973; Gutiérrez e col., 1981, 1985; 1987; Ownby e col., 1984). Isso parece estar relacionado ao rápido desenvolvimento de efeitos locais após a picada, enquanto os sistêmicos que resultam em letalidade, se desenvolvem mais lentamente (Gutiérrez e col., 1987). Assim, os anticorpos capazes de neutralizar as toxinas responsáveis pelos efeitos locais somente chegariam ao local depois que o efeito já se estabeleceria (Gutiérrez e col., 1981, 1985, 1987; Ferreira e col., 1992), ou chegariam em quantidades insuficientes para neutralizarem as toxinas responsáveis pelos efeitos locais (Ferreira e col., 1992). Ainda há a possibilidade de o antiveneno não ter acesso ao local da picada ou não possuir anticorpos contra os componentes responsáveis pelos efeitos locais (Ferreira e col., 1992).

Como o edema faz parte do processo inflamatório e sendo a soroterapia parcialmente ineficaz nos efeitos locais, utilizamos substâncias antiinflamatórias no tratamento da atividade edematogênica e do aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus*. Isso foi feito na tentativa de discriminar o mecanismo de ação do edema inflamatório produzido por esse

veneno e de contribuir, de alguma forma, para melhor entendermos a complexidade do envenenamento ofídico.

## 2 - OBJETIVO

---

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade edematogênica do veneno de *Bothrops lanceolatus* em camundongos, e através do uso de substâncias anti-inflamatórias, determinar os possíveis mediadores envolvidos no processo inflamatório.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos (18-30 g), provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP.

#### 3.2 - Veneno

O veneno de *Bothrops lanceolatus* foi cedido pela "UNITÉ DES VENINS" do Instituto Pasteur (Paris-França). Para os experimentos foi utilizado veneno de um mesmo lote, dissolvido em salina. Uma solução mãe (1 mg/ml) foi preparada e aliqotada, mantida em freezer e descongelada imediatamente antes do uso.

#### 3.3 -Drogas e reagentes utilizados

Ácido acético (Merck), álcool etílico(Merck), azul de Evans (Reagen), bicarbonato de sódio (Reagen), BW A4C (Wellcome Research Laboratories), carragenina (Sigma Chemical CO.), ciproheptadina (Sigma Chemical CO.), cloreto de sódio (Chemco), composto 48/80 (Sigma Chemical CO.), dexametasona (INAF), DMSO (Fisher Scientific CO.), éter etílico (Chemco), fator ativador de plaquetas (Sigma Chemical CO.), formaldeído (Merck), formamida (Merck, Reagen, Vetec), hematoxilina-eosina (Merck), iloprost (Shering), indometacina (Sigma Chemical CO.), mepiramina (Sigma Chemical CO.), NDGA (Sigma Chemical CO.), WEB 2086 (Boering), xilol (Merck).

### **3.3.1 - Uso do Iloprost, análogo à prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)**

O iloprost, análogo à PGI<sub>2</sub> (20 ng), foi injetado 30 minutos antes dos animais serem sacrificados nas patas que já haviam recebido 250 ng do veneno ou salina. Em experimentos preliminares, utilizamos as doses de 5, 10 e 20 ng/pata de iloprost e verificamos que 20 ng/pata foi a dose mais eficiente na potencialização do edema.

### **3.3.2 - Uso do Composto 48/80**

Os animais estimulados com o composto 48/80 (1 µg/pata) foram previamente tratados com mepiramina (6 mg/kg por via intra-peritoneal) ou ciproheptadina (5 mg/kg por via subcutânea) 15 minutos antes do estímulo, em ambos os casos. O grupo controle recebeu salina.

### **3.3.3 - Uso do fator ativador de plaquetas**

Os animais foram tratados com WEB 2086 (50 mg/kg) por via subcutânea; 1 hora após, foram estimulados com o fator ativador de plaquetas (PAF, 1 µg/pata). Os animais controles receberam apenas salina.

### **3.3.4 - Tratamento com drogas**

#### **a - Anti-histamínico e anti-serotoninico**

A mepiramina (M, 6 mg/kg) e a ciproheptadina (C, 5 mg/kg) (Ho e Hwang, 1991) foram dissolvidas em salina no dia do experimento. A mepiramina foi injetada por via intra-peritoneal e a ciproheptadina por via subcutânea, 15 minutos e 1 hora antes do estímulo, respectivamente.

## **b - Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico**

### **Dexametasona**

A dexametasona (DEXA), que também inibe a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), foi usada nas doses de 0.5 mg/kg (Trebien e Calixto, 1989; Barja-Fidalgo e col., 1992) e 1.0 mg/kg (Rao e col., 1993), preparadas no dia do experimento por diluições em salina e administradas por via subcutânea, 1 hora antes do estímulo.

### **Indometacina**

A indometacina (INDO), que inibe a enzima ciclooxigenase (CO), foi usada na dose de 5 mg/kg (Trebien e Calixto, 1989; Barja-Fidalgo e col., 1992; Rao e col., 1993), preparada por dissolução em bicarbonato de sódio à 5%; o volume foi final completado com salina. A administração foi por via subcutânea, 1 hora antes do estímulo. O grupo controle recebeu uma solução de bicarbonato de sódio à 5% e salina.

### **BW A4C**

O BW A4C, que inibe a lipoxigenase (LO), foi usado nas doses de 10 e 50 mg/kg (Tateson e col., 1988). Este composto foi dissolvido em 50% de dimetil sulfóxido (DMSO), imediatamente antes do uso, e o volume completado com salina. A administração foi feita por via subcutânea, 1 hora antes do estímulo. O grupo controle recebeu uma solução de DMSO e salina nas mesmas proporções.

### **Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)**

O ácido nordihidroguaiarético (NDGA) inibe tanto a lipoxigenase (LO) como a ciclooxigenase (CO) simultaneamente e foi usado nas doses de 30 e 100 mg/kg. Essa substância foi dissolvida em álcool etílico antes do uso, e o volume final completado com salina e a administração foi feita por via subcutânea, 1 hora antes do estímulo. O grupo controle recebeu uma solução de álcool etílico e salina.

## **WEB 2086**

O WEB 2086, antagonista do fator ativador de plaquetas (PAF), foi usado na dose de 50 mg/kg, dissolvido em salina e administrado por via subcutânea, 1 hora antes do estímulo. Os animais controles receberam solução salina.

### **3.4 - Medida do edema de pata e aumento de permeabilidade vascular**

O edema de pata foi medido segundo Yamakawa e col., (1976). Em cada experimento foram utilizados de 5 a 12 animais, que eram usados tanto para medir o edema como a permeabilidade vascular. Após serem anestesiados com éter etílico, os animais receberam, por via subcutânea, 0.05 ml de uma solução de veneno de *B. lanceolatus* (125 a 1000 ng/pata) em uma das patas posteriores; na outra pata, 0.05 ml de solução salina (controle). A determinação do edema foi efetuada 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após o estímulo, como também a permeabilidade vascular.

Trinta minutos antes de serem sacrificados, os animais receberam intravenosamente 0.3 ml de uma solução 0.25% de azul de Evans (AE). Eles foram sacrificados com éter etílico, suas patas seccionadas com instrumental cirúrgico na articulação tibio-tarsal e pesadas em balança semi-analítica. O edema foi quantificado pela diferença, medida em mg, entre o peso da pata estimulada com o veneno e a pata estimulada com salina. Para a determinação da permeabilidade vascular, o azul de Evans extravasado foi quantificado segundo Griswold e col. (1986). As patas foram trituradas, colocadas em tubos de ensaio contendo 3.0 ml de formamida, que foram mantidos em banho-maria à 57°C, por 24 horas. Decorrido esse tempo, a concentração de azul de Evans extraído dos tecidos foi determinada por leitura das absorbâncias à 619 nm em espectrofotômetro Uvikon® 810 (Kontron Spectrophotometer, Suíça), utilizando-se cubetas de vidro. O resultado foi expresso em µg AE/g tecido e obtido por



comparação com uma curva padrão, determinada segundo padrões estabelecidos por Bertrand e col., (1993).

### **3.5 - Determinação da dose mínima hemorrágica (DMH)**

A dose mínima hemorrágica foi determinada de acordo com o método de Kondo e col., (1960). Camundongos Swiss machos pesando entre 18-22 gramas (n=6) foram anestesiados com éter etílico e tiveram injetados intradermicamente no dorso 0.05 ml de diferentes quantidades (250, 500, 750 e 1000 ng) do veneno de *Bothrops lanceolatus*. Os animais controles receberam um volume equivalente de salina. Seis horas após o estímulo, os animais foram sacrificados e a pele removida para a medida do halo hemorrágico. A dose mínima hemorrágica foi definida como a menor quantidade do veneno capaz de induzir uma mancha hemorrágica com 0.5 cm de diâmetro (Nikai e col., 1986). Essa medida é expressa pela média de dois diâmetros perpendiculares de cada mancha.

### **3.6 - Análise histopatológica**

Camundongos Swiss machos pesando 20-30 gramas foram anestesiados com éter etílico e tiveram injetados, por via subcutânea em uma das patas posteriores, 0.05 ml de uma solução do veneno de *Bothrops lanceolatus*, nas doses de 250 e 500 ng. As patas controle receberam salina. Após os tempos de 0.5, 1, 1.5, 2 e 3 horas, os animais foram sacrificados, suas patas seccionadas, e imediatamente imersas em solução fixadora de Bouin, recém preparada, onde permaneceram no mínimo 24 horas. A seguir foram descalcificadas através de banhos sucessivos em solução de formaldeído 10%, contendo 5% de ácido acético, durante cinco dias, sendo realizadas duas trocas diárias do mesmo. O fixador foi removido por lavagens em água corrente durante oito horas.

Iniciou-se a desidratação das patas, que foram colocadas em álcool 70%, onde permaneceram por uma noite. A partir deste ponto, a troca de álcool foi feita a cada uma hora, passando o material pelos álcoois 80%, 95%, 100% (I), 100% (II), 100% (III). Em seguida, procedeu-se à diafanização, que consiste em banhos de xilol para propiciar a embebição do tecido pela parafina, que é incompatível com o álcool. A embebição em parafina (Histosec.) ocorreu à 60°C, durante 12 horas.

Os blocos foram cortados em micrótomo de parafina. Os cortes foram semi-seriados, sendo a coleta realizada de 50 em 50 µm, e, em seguida, montados em lâminas de vidro albuminizadas. Após secagem, os cortes foram desparafinizados e hidratados utilizando-se respectivamente banhos de xilol e álcool em concentrações decrescentes (álcool absoluto, 95%, 80%, e 70%, 5 min. cada) e levados à água destilada. A seguir, foram corados pelo método de hematoxilina-eosina: hematoxilina de Erlich - 15 min.; lavados em água corrente por 10 min. e eosina 0.5% aquosa - 5 min.

Em seguida, os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e submetidos ao processo inverso, isto é, desidratação e diafanização em xilol. Finalmente, foram montados em Entelan.

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

### **3.7 - Análise estatística**

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  o erro padrão da média (SEM). Foi realizado o teste "t" não pareado de Student (Siegel, 1979) para análise entre dois grupos.

O nível de significância crítico admitido para rejeição de nulidade foi de uma probabilidade máxima de erro de até 5% ( $P < 0.05$ ) em todas as análises realizadas.

## 4 - RESULTADOS

---

### 4.1 - Edema de pata e aumento de permeabilidade vascular

A figura 1 mostra o curso temporal do edema de pata (A) e do aumento de permeabilidade vascular (B) induzidos por 250 ng do veneno de *B. lanceolatus*. O efeito máximo ocorreu duas horas após o estímulo, tanto para o edema ( $10 \pm 1.6$  mg, n=5-12) como para o aumento de permeabilidade vascular ( $3 \pm 1.1$   $\mu$ g AE/g tecido, n=5-12), mostrando que há um paralelismo entre estas atividades até duas horas após a injeção do veneno. Estes efeitos decaíram progressivamente sendo estatisticamente insignificantes às 24 horas.

O desenvolvimento do edema de pata e o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* ocorreram de forma tempo dependente com a dose de 250 ng/pata (figura 1). Trabalhamos com outras doses (125, 250, 500 e 1000 ng/pata) e verificamos o mesmo resultado para todas elas (resultado não mostrado). Doses acima de 250 ng/pata induziram hemorragia na pata dos animais, já com doses de 500 ng/pata, o edema e o aumento de permeabilidade vascular atingiram um efeito máximo, uma vez que as respostas apresentadas por esta dose não foram estatisticamente diferentes daquelas apresentadas por 1000 ng/pata (figura 2). Doses abaixo de 125 ng/pata foram inefetivas.

### 4.2 - Dose mínima hemorrágica (DMH)

A dose mínima hemorrágica foi determinada entre as doses de 250, 500, 750 e 1000 ng. Com a dose de 250 ng, não detectamos a formação de mancha hemorrágica na pele dos animais, que se comportaram como os do grupo controle (figura 3a). Como mostra a figura 3b, a dose mínima hemorrágica foi obtida com a

dose de 750 ng, que provocou uma mancha hemorrágica de 0.5 cm de diâmetro. Nas demais doses, os diâmetros das manchas hemorrágicas detectadas foram 0.42 e 0.7 cm, respectivamente para 500 e 1000 ng.

#### 4.3 - Análise histopatológica

As patas injetadas com salina, 250 e 500 ng do veneno de *B. lanceolatus* foram analisadas histopatologicamente.

A figura 4a mostra um corte histológico da pata de um animal injetado apenas com salina, onde a região subcutânea se apresenta normal e a dérmica com feixes de fibras colágenas homogeneamente organizadas. Abaixo da região dérmica, os feixes de músculos estriados esqueléticos também apresentaram aspecto normal, desprovidos de hemácias, a não ser aquelas contidas nos vasos sanguíneos.

As figuras 4a-d e 5a-d referem-se aos animais injetados com o veneno de *B. lanceolatus*. As doses de 250 e 500 ng apresentaram infiltrado inflamatório e extravasamento de células (principalmente neutrófilos que atravessam a parede endotelial e se dispersam no tecido conjuntivo adjacente). A região dérmica se mostrou aumentada e os feixes de fibras colágenas haviam desaparecido, dando lugar a fibras esgarçadas com espaços intercelulares aumentados, provavelmente preenchidos com exsudatos que são indícios de edema. As fibras musculares não foram afetadas e mostraram-se morfológicamente íntegras. A dose de 500 ng ainda apresentou intensa hemorragia com grande número de hemácias extravasculares (figura 5a).

Esses resultados confirmam os achados anteriores onde o edema ocorre na ausência de hemorragia para a dose de 250 ng. Então a partir deste momento

passamos a eleger esta dose para a continuidade do estudo do edema e do aumento de permeabilidade vascular.

#### **4.4 - Potencialização do edema de pata e do aumento de permeabilidade vascular com o uso do vasodilatador iloprost**

O edema de pata e o aumento de permeabilidade vascular desencadeados pelo veneno de *B. lanceolatus* aumentaram em torno de quatro vezes quando injetamos o veneno seguido do vasodilatador (figura 6). Nossos resultados mostram que o vasodilatador promoveu um sinergismo por potencialização, tanto em relação ao edema como em relação à permeabilidade vascular.

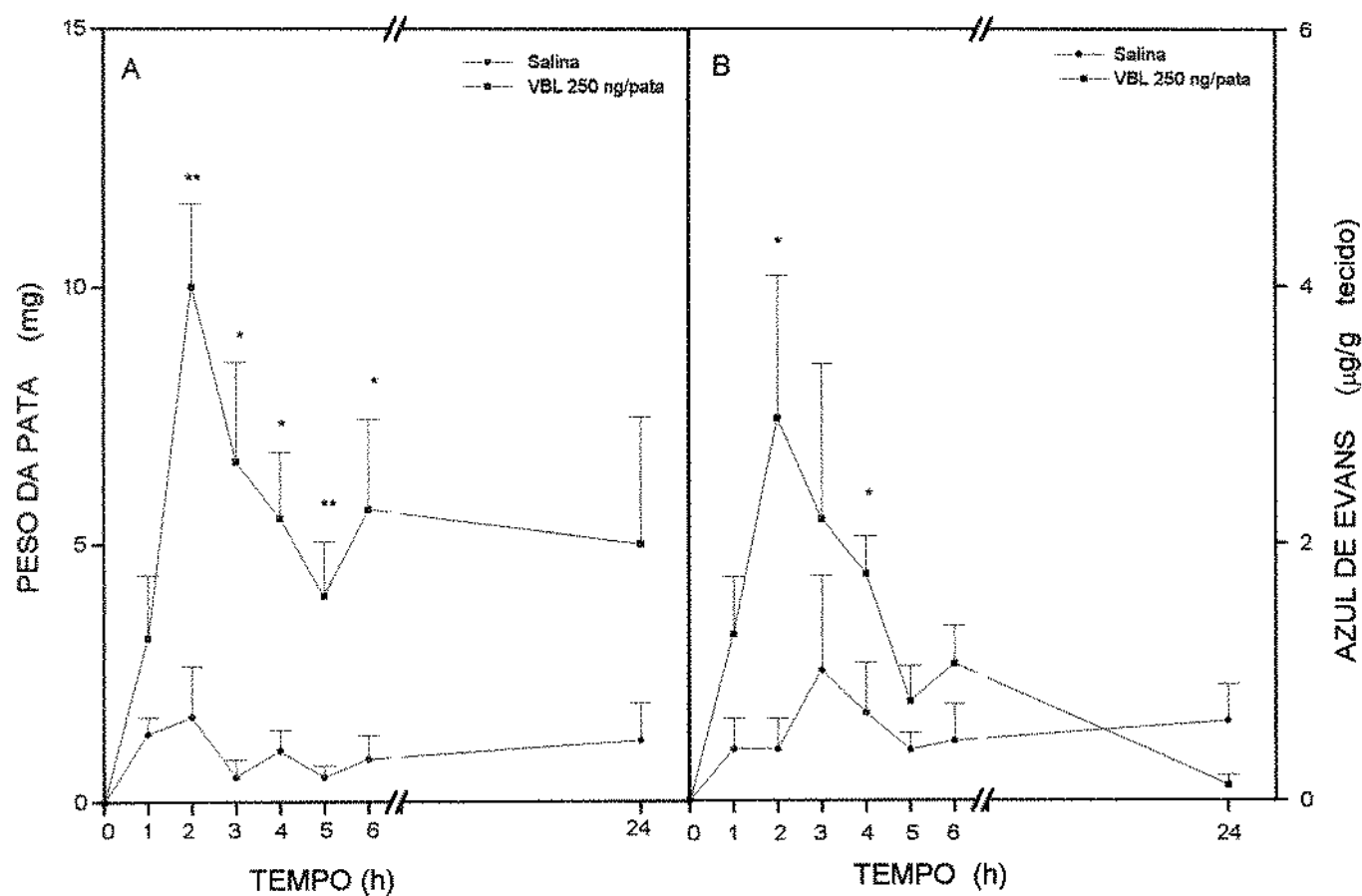
#### **4.5 - Inibição do edema de pata e do aumento de permeabilidade vascular pelo tratamento com drogas**

Quando os animais foram previamente tratados com o inibidor de histamina, mepiramina, ou o inibidor de serotonina e histamina, ciproheptadina, a resposta edematogênica e o aumento da permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* não foram alterados (figura 7), enquanto aquelas desencadeadas pelo composto 48/80 (1 ug/pata) foram inibidas (figura 8). A inibição do edema e do aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo composto 48/80 resultantes do uso da mepiramina e ciproheptadina comprovam a efetividade dessas drogas e o provável não envolvimento de histamina e serotonina na resposta edematogênica desenvolvida pelo veneno de *B. lanceolatus* nessa espécie animal. O antagonista de PAF, WEB 2086, na dose de 50 mg/kg também foi inefetivo em inibir ambas as atividades (figura 7). O oposto ocorreu quando injetamos o fator ativador de plaquetas (PAF) em animais tratados com o WEB 2086 (figura 8).

Observou-se que o edema e o aumento de permeabilidade vascular desenvolvidos pelo veneno de *B. lanceolatus* poderiam envolver fosfolipases e/ou os metabólitos do ácido araquidônico. Para tanto os animais foram tratados com dexametasona, um inibidor indireto da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), à 1.0 mg/kg e observamos uma inibição de ambas as atividades (respectivamente, 59% para edema e 66% para permeabilidade vascular) (figura 9). Também utilizamos a dose de 0.5 mg/kg e neste caso houve uma menor inibição das atividades, mostrando uma ação antiinflamatória, dose dependente (não mostrado).

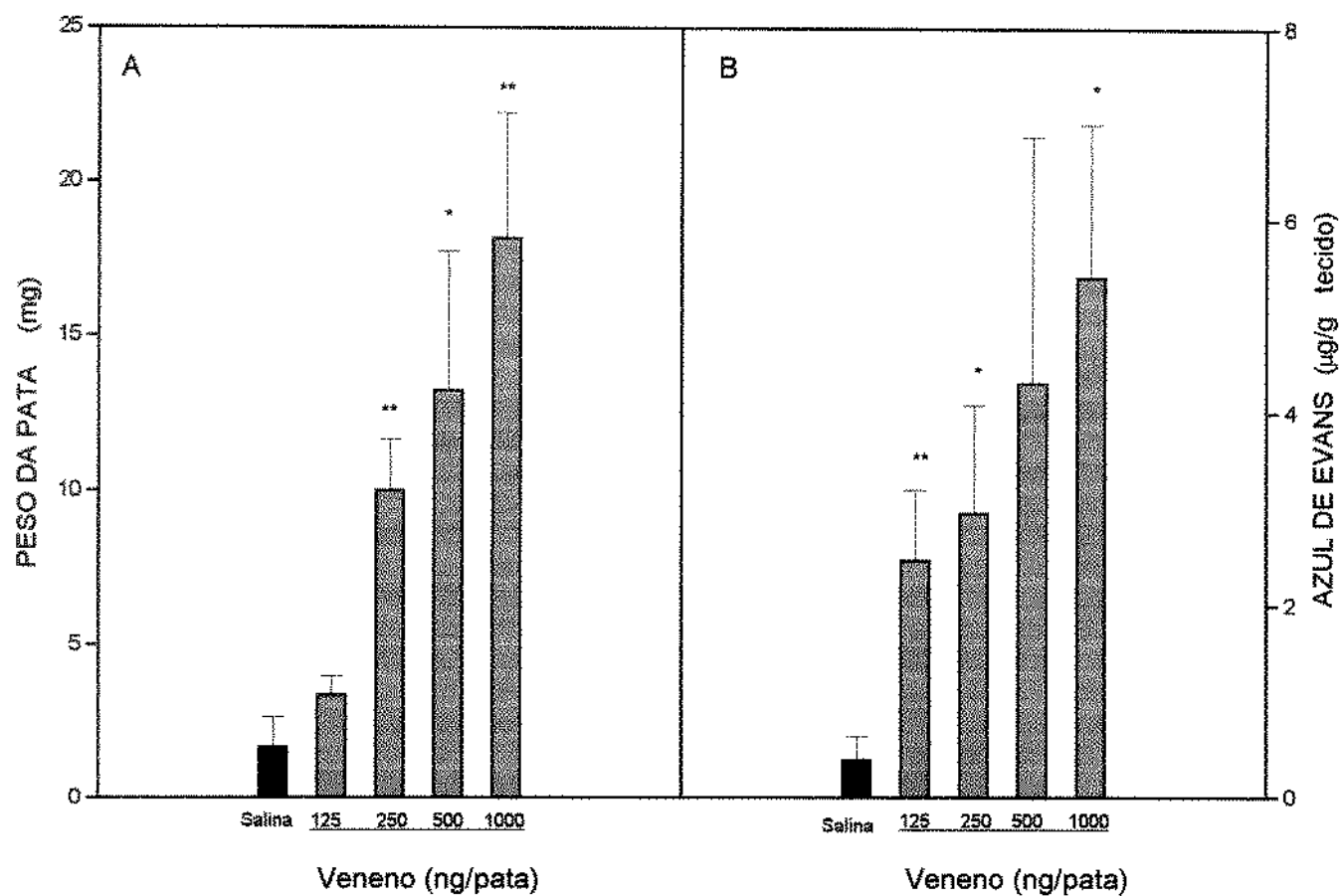
Os animais também foram tratados com um inibidor específico da ciclooxigenase, a indometacina, e da lipoxigenase, o BW A4C. Nossos resultados demonstraram que a indometacina inibiu o edema (43%), mas não inibiu a permeabilidade vascular; já o BW A4C na dose de 10 mg/kg, foi ineficaz para ambas as atividades (resultado não mostrado), enquanto a de 50 mg/kg inibiu o aumento de permeabilidade vascular (44%) e não inibiu o edema (43%) de forma significativa (figura 9).

O tratamento dos animais com o NDGA, um inibidor simultâneo de lipoxigenase e ciclooxigenase, na dose de 100 mg/kg, resultou em uma inibição tanto do edema (28%) como do aumento de permeabilidade vascular (48%) induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* (figura 9).

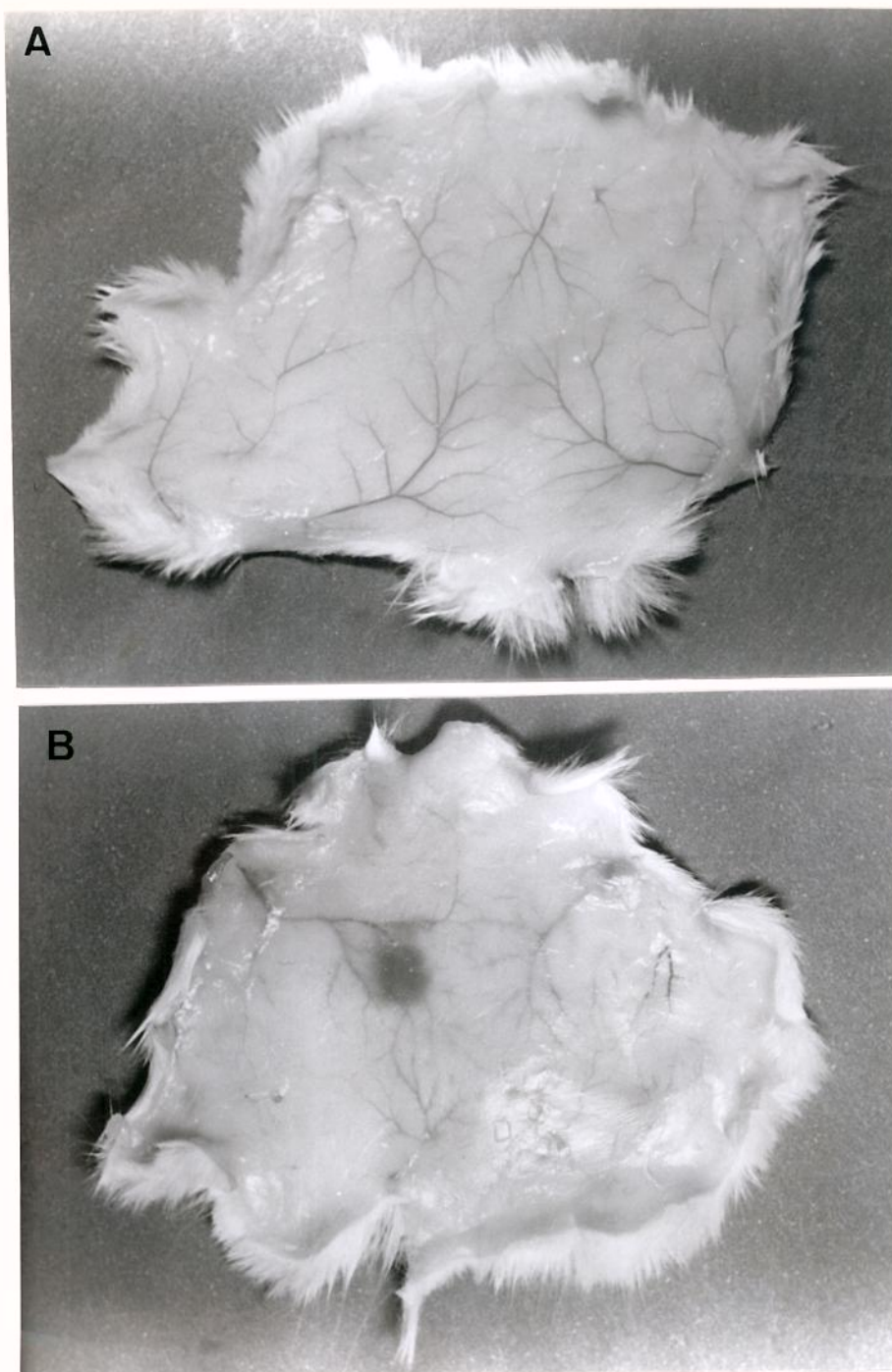


**Figura 1. Variação temporal do edema e do aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno.** Edema (A) e aumento de permeabilidade vascular (B) após injeção subplantar de salina e de 250 ng do veneno de *Bothrops lanceolatus* na pata de camundongos. Cada ponto representa a média  $\pm$  SEM de 5-12 camundongos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\* comparados com salina.





**Figura 2. Resposta do edema e do aumento de permeabilidade vascular à várias doses do veneno.** Edema (A) e aumento de permeabilidade vascular (B) medidos duas horas após injeção subplantar do veneno de *Bothrops lanceolatus*. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM de 5-12 camundongos.



**Figura 3. Atividade hemorrágica do veneno em pele de camundongos.** Mancha hemorrágica induzida por injeção subcutânea do veneno de *Bothrops lanceolatus* (750 ng) no dorso de camundongos. (A) Controle - salina, (B) dose mínima hemorrágica (DMH=750 ng). A dose de 250 ng se comportou de forma semelhante ao grupo controle.

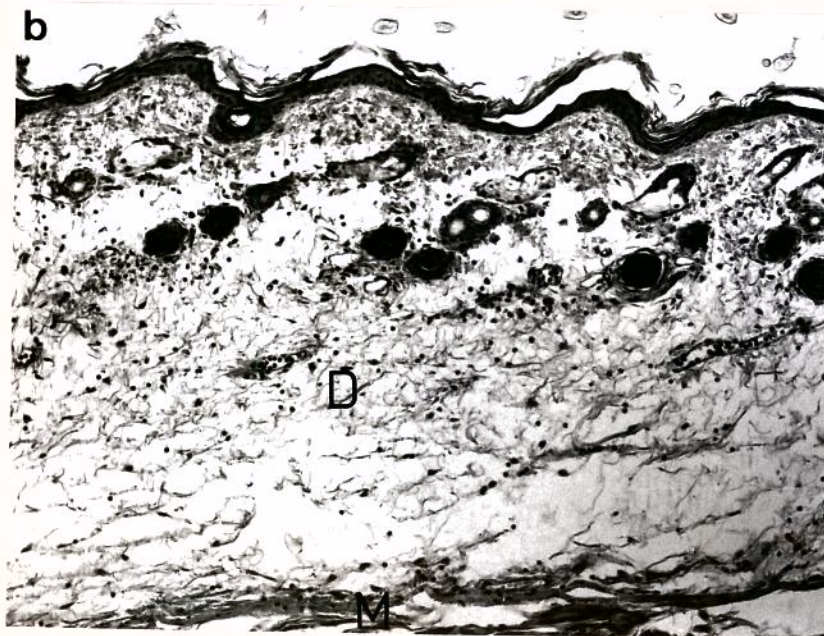
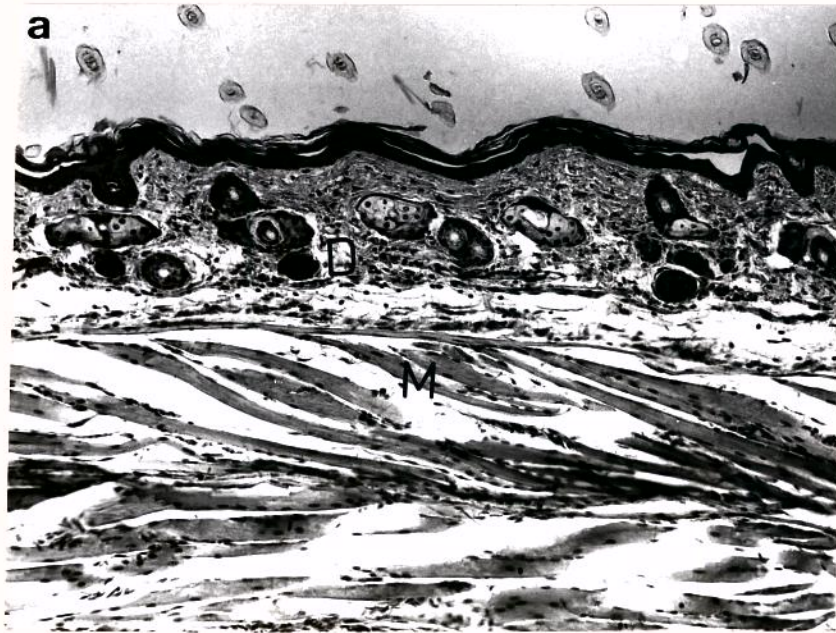
**Figura 4. Demonstração histopatológica do edema de pata induzido pelo veneno.**

Aparência histológica de região subplantar de camundongos, três horas após injetados com salina 0.9% (controle; a, 50  $\mu$ l) ou 500 ng de veneno de *B. lanceolatus* (b-d).

a- Observar a região dérmica (D) com aspecto normal, apresentando tecido conjuntivo, folículos pilosos e glândulas. Abaixo, deve-se notar fibras musculares com seus núcleos posicionados periféricamente. H. E. 115x.

b- Observar extensa região de edema no derme mais profundo. O edema atinge até a camada muscular (M) com rarefação do tecido conjuntivo, que se caracteriza por dispersão dos feixes de fibras colágenas e aumento do espaço extracelular (em torno de duas a três vezes) provavelmente preenchido com exsudatos. H. E. 122x.





**Figura 5. Demonstração histopatológica de hemorragia e infiltrado leucocitário induzidos pelo veneno.**

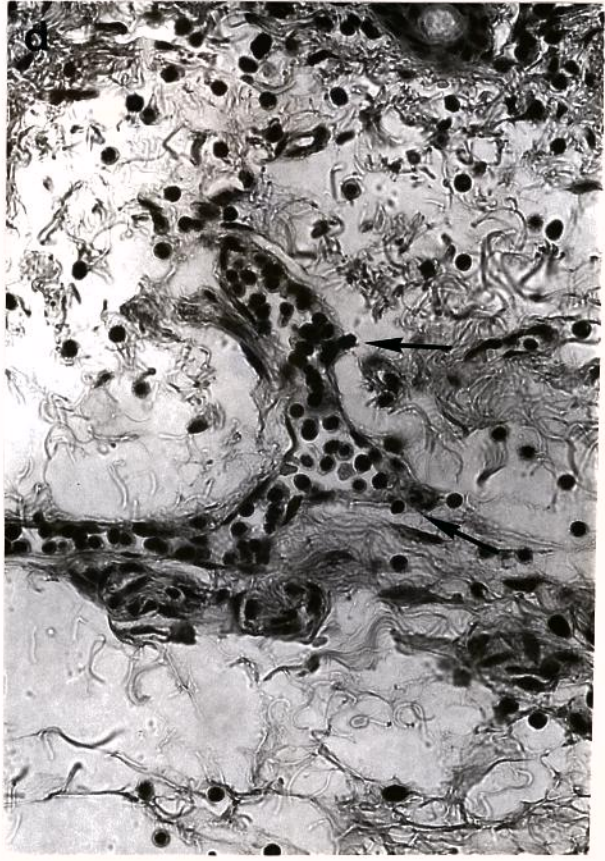
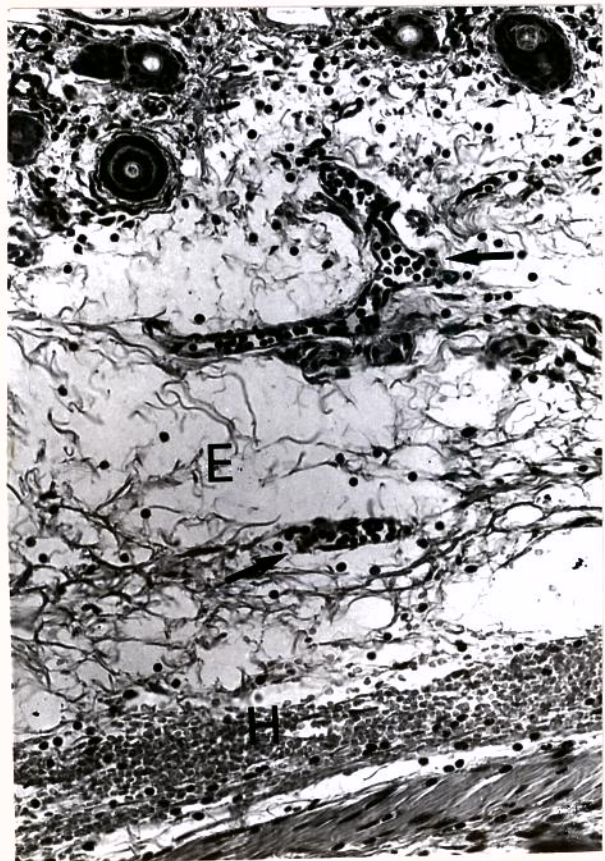
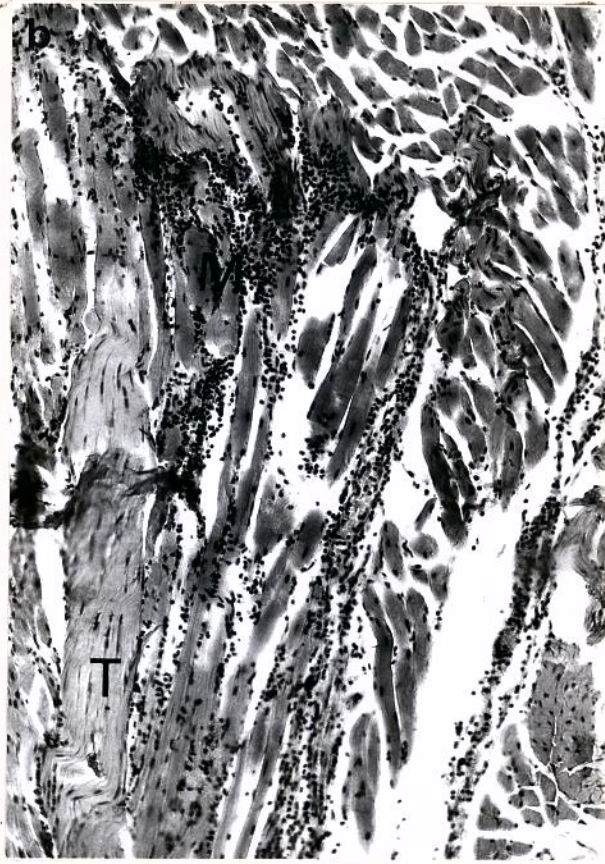
a- Observar região hemorrágica (H) com grande número de hemácias extravasculares junto aos feixes musculares (M). Note-se a presença de infiltrado leucocitário (L), principalmente neutrófilos, e espaços entercelulares. H. E. 243x.

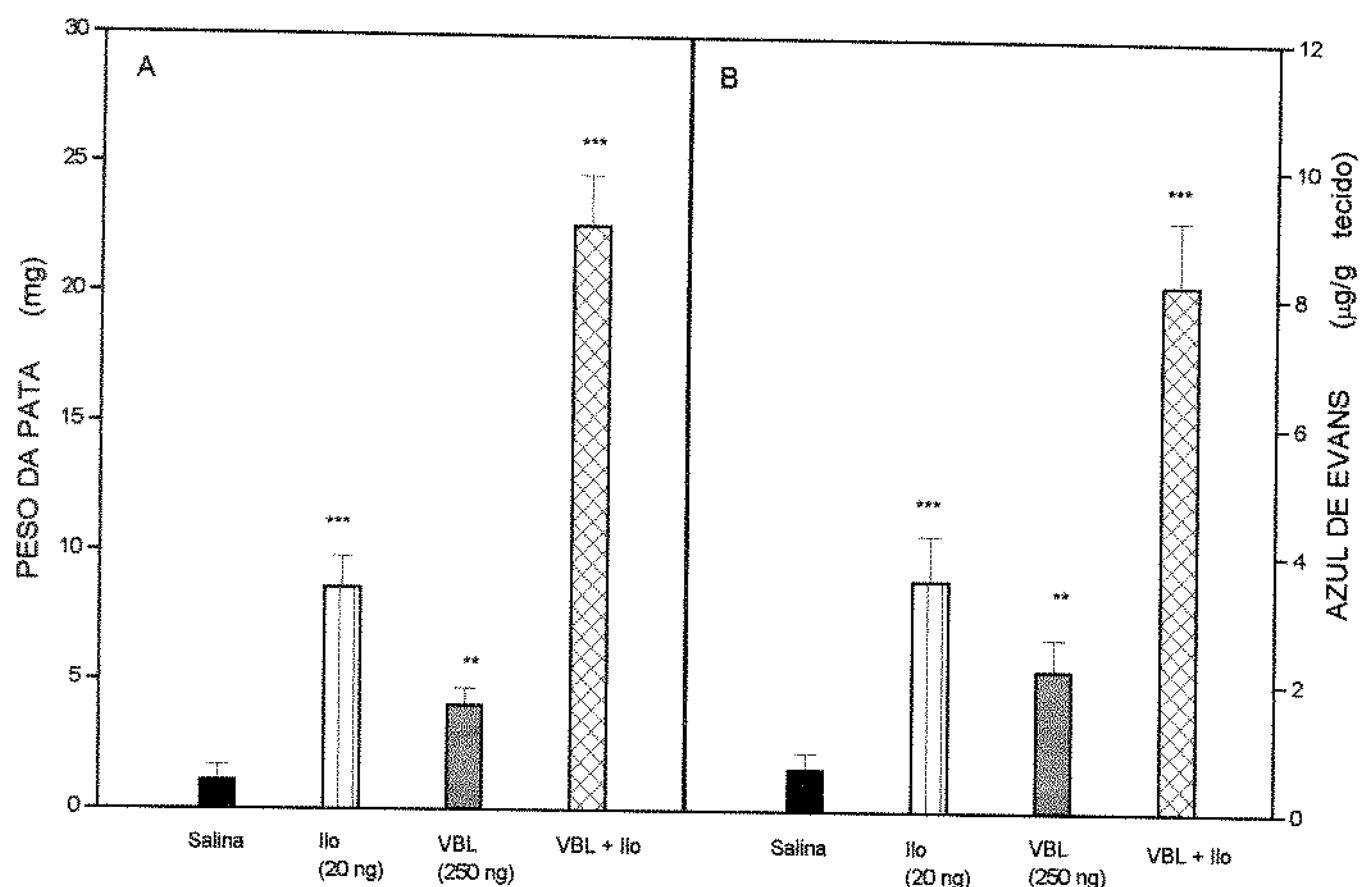
b- Observar a região de extenso infiltrado leucocitário proveniente de vênulas situadas no derme entre os feixes musculares (M); T=tendão. H. E. 115x.

c- Observar a presença de hemorragia (H) e edema (E) e a migração de leucócitos por diapedese (→). H. E. 230x.

d- Detalhe da figura anterior onde se observa a saída dos leucócitos através da parede endotelial da vênula (→). H. E. 461x.

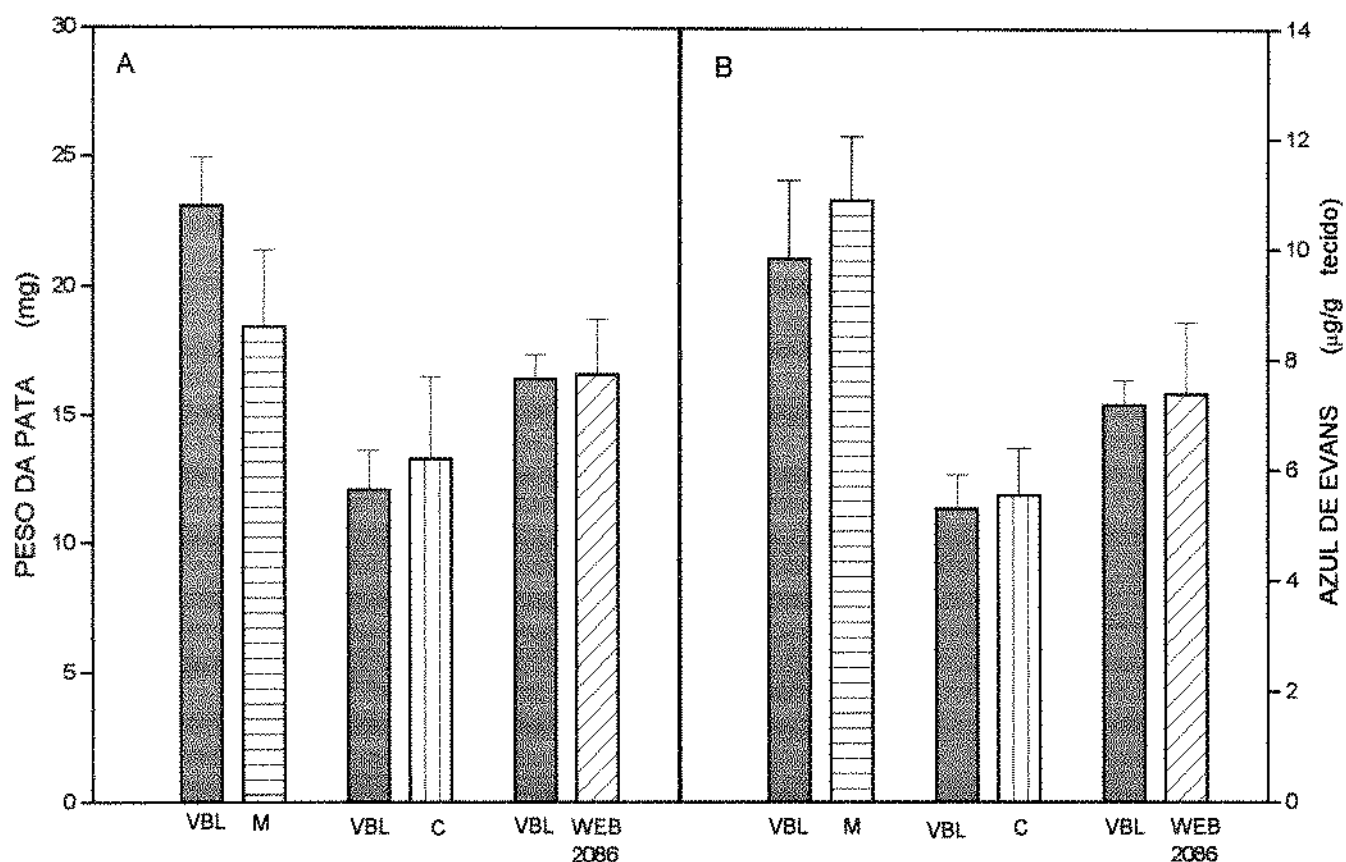






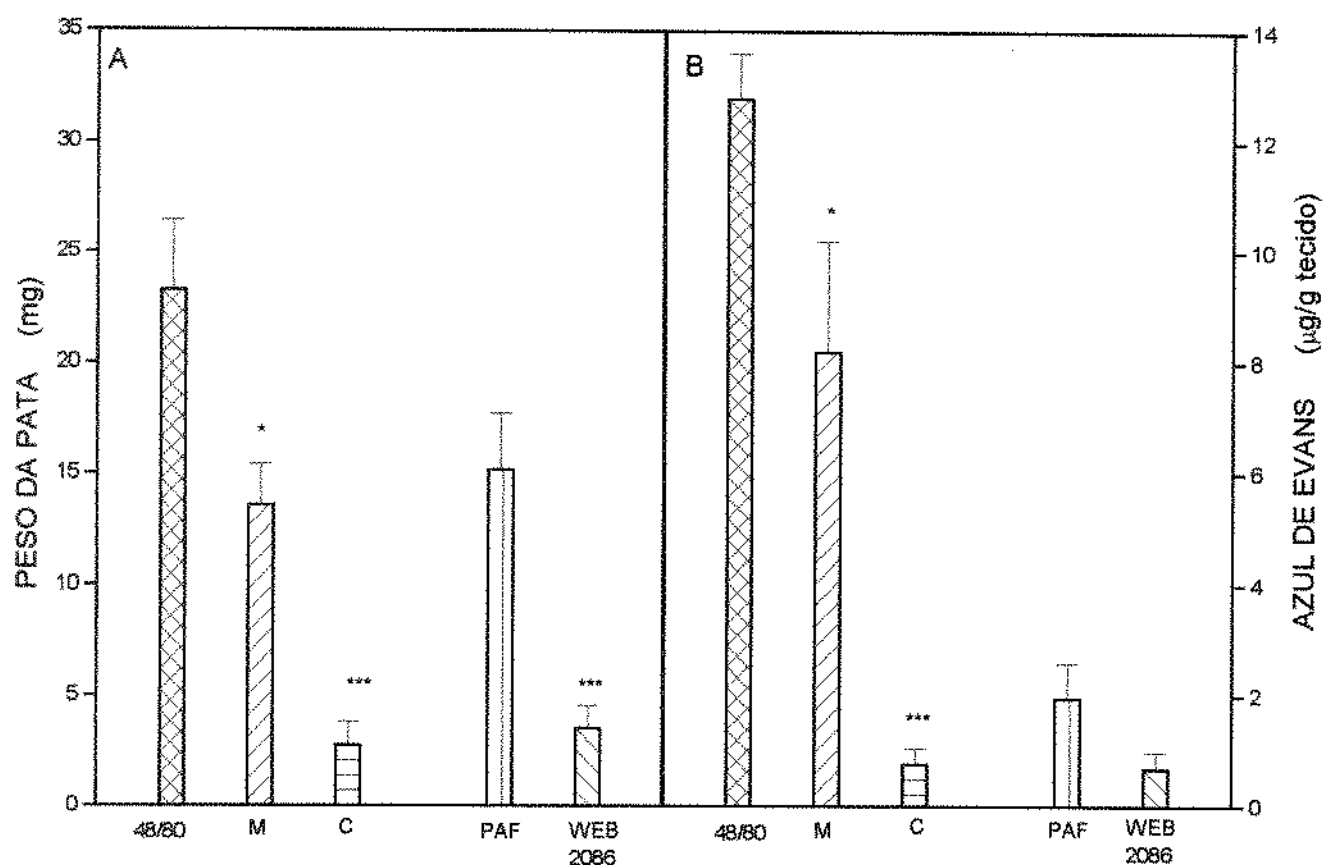
**Figura 6. Efeito potencializador do análogo à  $PGI_2$  (iloprost) sobre o edema e o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno.** Potencialização do edema (A) e do aumento de permeabilidade vascular (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* duas horas após a administração do veneno. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM de 27 camundongos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  comparados com salina.





**Figura 7. Não envolvimento de histamina, serotonina e PAF no edema e aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno.** Tratamento com mepiramina (M, 6 mg/kg); ciproheptadina (C, 5 mg/kg) e WEB 2086 (WEB, 50 mg/kg) não inibiu o edema de pata (A) e o aumento de permeabilidade vascular (B) induzidos por 250 ng do veneno de *B. lanceolatus*. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM de 8-12 camundongos. As medidas foram feitas duas horas após o estímulo.

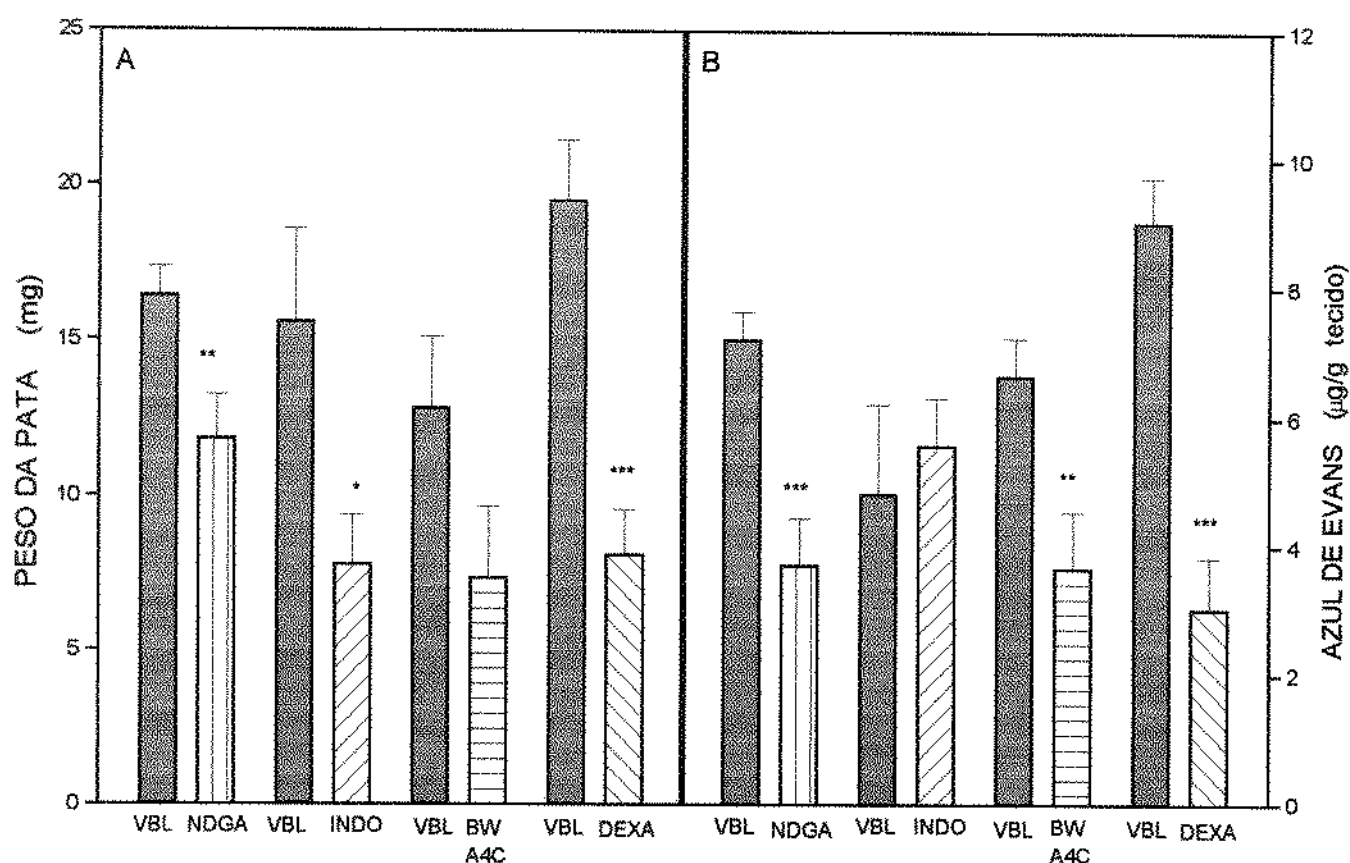




**Figura 8. Efetividade dos inibidores de histamina, serotonina e PAF.**

Tratamento com mepiramina (M, 6 mg/kg), ou ciproheptadina (C, 5 mg/kg) inibe o edema de pata e o aumento de permeabilidade vascular (B) induzidos pelo composto 48/80 (1 µg/pata). E o tratamento com WEB 2086 (50 mg/kg), inibe as citadas atividades induzidas pelo PAF (1 µg/pata). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM de 9-12 camundongos. As medidas foram feitas duas horas após o estímulo.

\*P < 0.05, \*\*\* P < 0.001, comparados com o efeito do composto 48/80 sozinho.



**Figura 9. Envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico no edema e aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno.** Ácido nordihidroguaiarético (NDGA, 100 mg/kg), indometacina (INDO, 5 mg/kg), BW A4C (50 mg/kg) e dexametasona (DEXA, 1 mg/kg) inibem o edema de pata (A) e o aumento de permeabilidade vascular (B) induzidos por 250 ng do veneno de *B. lanceolatus*. Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM de 7-12 camundongos. As medidas foram feitas duas horas após o estímulo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , comparados com os respectivos controles (VBL).

## 5 - DISCUSSÃO

---

A inflamação também é uma importante característica de envenenamento por picadas de serpentes pertencentes às famílias Viperidae e Crotalidae (Rosenfeld, 1971; Sawai, 1980). Os venenos botrópicos (família Crotalidae) induzem edema local no homem e em animais de laboratório (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez e Lomonte, 1989), o que, de acordo com Bonta e col., (1979), indica aumento de permeabilidade vascular. Estes efeitos foram verificados quando injetamos o veneno de *B. lanceolatus* em pata de camundongos. Como mostra a figura 1, o edema e o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* ocorreram de forma tempo dependente, alcançando índices máximos duas horas após o estímulo e índices estatisticamente insignificantes 24 horas depois. Esses resultados se assemelham àqueles observados em relação ao veneno de *Bothrops jararaca* (Trebien e Calixto, 1989; Perales e col., 1992) e às frações isoladas do veneno de *B. insularis* (Selistre e col., 1990).

Nossos experimentos foram acompanhados por análise histopatológica da pata dos camundongos. Como mostra a figura 4b, o edema inflamatório promovido pelo veneno de *B. lanceolatus* está de acordo com as afirmações de Garcia Leme (1979), segundo o qual o edema produzido pelo líquido extravasado determina o afastamento de estruturas colágenas e o aparecimento de espaços entre as células do tecido conjuntivo. O edema inflamatório descrito acima também apresenta infiltrado celular entre os feixes de fibras musculares (figura 5b), o que é característico de envenenamento botrópico (Gutiérrez e col., 1989). O mesmo também foi observado em edema provocado pelo veneno de *B. asper* (Gutiérrez e col., 1986; Lomonte e col., 1993) e pelas frações isoladas dos venenos de *B. moojeni* e *B. pradoi* (Moura da Silva e col., 1991).

Os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* causam manifestações locais e sistêmicas que evoluem simultaneamente. O edema pode indiretamente

contribuir para outros efeitos causados pelo veneno, como compressão de tecido e isquemia (Chapman, 1968). Entre as manifestações sistêmicas, a mais frequente é a alteração da coagulação sanguínea, seguida de hemorragia.

Essas informações e a observação macroscópica que sugeria a presença de hemorragia local nas patas nos levaram a estudar mais detalhadamente o fenômeno, através de técnicas mais específicas, como a determinação da dose mínima hemorrágica e estudos histopatológicos. De fato, a hemorragia foi comprovada (figura 3), e como se sabe, é uma das características do envenenamento botrópico (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez e col., 1981). A presença de grande número de hemácias extravasculares (figura 5a) e o rompimento de pequenas vênulas (figuras 5c e d) que identificam hemorragia foi por nós verificada com o uso do veneno de *B. lanceolatus*, e também por outros pesquisadores em relação aos venenos de *B. jararacussu* (Moura da Silva e col., 1991), *B. insularis* (Selistre e col., 1990; Cogo e col., 1993), *B. jararaca* (Kamiguti e col., 1991), e a alguns venenos de serpentes da Costa Rica, pertencentes ao gênero *Bothrops* (Gutiérrez e Chaves, 1980). Nossos resultados também estão de acordo com Garcia Leme (1979), o qual afirma que hemorragias sempre ocorrem após uma lesão vascular intensa. Isso, segundo Ohsaka (1979) e Ownby (1982), ocorre por ação de hemorraginas que afetam drasticamente a integridade dos vasos capilares. As hemorraginas presentes nos venenos de serpentes são responsáveis pela hemorragia local em pacientes envenenados (Warrell e col., 1977; Ohsaka, 1979) e já foram detectadas em algumas espécies do gênero *Bothrops* como *B. jararaca* (Mandelbaum e col., 1976), *B. neuwiedi* (Mandelbaum e col., 1984), e *B. moojeni* (Assakura e col., 1985).

A atividade edematogênica e o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus*, quando comparados com aqueles induzidos pela carragenina (100 µg/pata, 2 horas após o estímulo: edema=30 mg e permeabilidade vascular= 3µg/g tecido) em nosso laboratório, nos alertaram para a ocorrência de discreta atividade edematogênica apresentada por este veneno.

Esse fato nos levou a verificar se o uso de um vasodilatador seria capaz de potencializá-la, já que é conhecida a capacidade dos vasodilatadores em promoverem sinergismo no edema inflamatório (Williams e Peck, 1977; Williams, 1979). De fato, quando injetamos o veneno de *B. lanceolatus* seguido do vasodilatador, iloprost, houve uma potencialização de ambas as respostas (figura 6), mostrando que estas parecem depender da ação de vasodilatadores, o que foi demonstrado em relação ao neuropeptídeo "calcitonin-gene-related-peptide" - CGRP - (Brain e Williams, 1985; Antunes e col., 1992) e à prostaglandinas (Williams e Morley, 1973; Williams e Peck, 1977; Teixeira e col., 1993).

A potencialização do edema e do aumento de permeabilidade vascular provocados pela presença do vasodilatador nos permitiram averiguar se essas atividades seriam ou não inibidas com o uso de substâncias anti-inflamatórias. Como mostra a figura 7, os citados processos, induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* não foram inibidos nem por ciproheptadina, nem por mepiramina, sugerindo a não participação de serotonina e histamina no desenvolvimento do edema inflamatório, o que também foi visto com o veneno de *B. jararaca* (Trebien e Calixto, 1989; Perales e col., 1992). Ao contrário, Lomonte e col., (1990) verificaram que uma lectina isolada do veneno de *B. godmani* induz edema por ação destas aminas biogênicas, as quais ainda são apontadas por Rothschild e Rothschild (1979) como responsáveis pelo edema e aumento de permeabilidade vascular induzidos por alguns venenos de serpentes, e que, segundo Garcia Leme e Wilhelm (1975), quando testadas em ratos induzem aumento de permeabilidade vascular.

Tendo Lôbo de Araújo e col., (1994) isolado a fosfolipase A<sub>2</sub> presente no veneno de *B. lanceolatus*, utilizamos a dexametasona na tentativa de inibirmos o edema e o aumento de permeabilidade vascular induzidos por este veneno, já que fosfolipases são importantes no desenvolvimento da inflamação (Pruzansky e Vadas, 1991). Como mostra a figura 9, a dexametasona inibiu efetivamente estas

atividades, o que também foi verificado por Perales e col., (1992) para o veneno de *B. jararaca*. Tal inibição poderia ser explicada pela formação de lipocortina (Blackwell e col., 1980; Hirata, e col., 1980), que inibiria a fosfolipase (Di Rosa e col., 1985) e consequentemente a biossíntese de eicosanóides (Carnuccio e col., 1980; Hirata, 1981; Blackwell e col., 1982) e o fator ativador de plaquetas - PAF - (Rang e Dale, 1993). Não podemos esquecer que a dexametasona também pode ter inibido a migração de leucócitos (Flower e Dale, 1994), já que células polimorfonucleares (PMN) contribuem para o desenvolvimento de edema (Rang e Dalle, 1989) e estão presentes naquele induzido pelo veneno de *B. lanceolatus*.

A participação de diferentes metabólitos do ácido araquidônico no desenvolvimento de edema por alguns venenos de serpentes já é conhecida (Vishwanath e col., 1987; Haworth e col., 1988; Trebien e Calixto, 1989). Para tanto, utilizamos a indometacina, no sentido de verificar se havia participação da ciclooxigenase. Como mostra a figura 9, a indometacina inibiu o edema produzido pelo veneno de *B. lanceolatus* e não alterou o aumento de permeabilidade vascular. O edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* (Trebien e Calixto, 1989; Perales e col., 1992) e pela PLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* (Haworth e col., 1988) também foi inibido pela indometacina. A ineficácia da indometacina em inibir o aumento de permeabilidade vascular pode estar relacionada ao fato de que apenas os vasodilatadores (prostaglandinas) seriam inibidos, ficando livres aqueles mediadores responsáveis pelo aumento de permeabilidade vascular (LTB<sub>4</sub>, e C5a) (Williams e Morley, 1973; Williams e peck, 1977; Williams 1979) ou talvez porque esta substância não exerce efeito significativo sobre o acúmulo celular (Rang e Dale, 1993). Compostos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) inibem a ciclooxigenase e, portanto, a síntese de prostaglandinas (Foster e col., 1985). Isso nos dá suporte para concluirmos que o edema e o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* dependem da ação de vasodilatadores, lembrando que o iloprost, como anteriormente descrito, também potencializou essas atividades.

Como mostra a figura 9, o BW A4C inibiu apenas o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *B. lanceolatus* e não foi totalmente eficaz com relação ao edema. Acreditamos que a inibição de 44% da permeabilidade vascular seja insuficiente para impedir o extravasamento de fluidos responsáveis pela formação do edema. Embora nossos resultados não estejam de acordo com aqueles obtidos para os venenos de *Phoneutria nigriventer* (Marangoni e col., 1993) e *B. jararaca* (Perales e col., 1992) quanto ao aumento de permeabilidade vascular, onde os inibidores de lipoxigenase não foram efetivos, nos apoiamos nas evidências de que os leucotrienos possuem propriedades inflamatórias (Ford-Hutchinson e col., 1980) e são quimiotáticos para neutrófilos. Os leucotrienos ainda poderiam atuar conjuntamente com prostaglandinas na fase celular da resposta inflamatória (Vedmore e Williams, 1981; Bray e col., 1983; Williams, 1983; Kuehl e col., 1984) no homem e em animais (Higgs e col., 1988) e são apontados como os principais responsáveis pela resposta inflamatória desenvolvida em camundongos (Young e col., 1984) que são altamente sensíveis a estas substâncias (Gríswold e col., 1986).

Os inibidores tanto de ciclooxigenase como de lipoxigenase apresentam efeito anti-inflamatório qualitativamente diferente de inibidores seletivos de ciclooxigenase (Higgs e col., 1979); por isso, utilizamos o ácido nordihidroguaiarético (NDGA), responsável pela inibição simultânea de ambas as vias. Como mostra a figura 9, o NDGA inibiu o edema e o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* em camundongos, comprovando o envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico nessas atividades. Resultado semelhante foi obtido por Perales e col. (1992), que obtiveram inibição do edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* com o BW 755C, também em camundongos.

Sendo o PAF reconhecido como um mediador importante da resposta inflamatória (Williams, 1979, 1983; Samuelsson, 1983; Davies e col., 1984; Humes e col., 1989), averiguamos sua possível participação no processo

inflamatório induzido pelo veneno em estudo. Como mostra a figura 7, o WEB 2086, antagonista de PAF (Casals-Stenzel e col., 1987), não inibiu o edema, nem o aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus*, indicando que provavelmente o PAF não está envolvido na etiologia do edema induzido por este veneno. O mesmo também foi verificado com os venenos de *Phoneutria nigriventer* (Marangoni e col., 1993) e *B. jararaca* (Perales e col., 1992).

O estudo da participação de vários mediadores inflamatórios no edema de pata e aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus* em camundongos mostrou que a mepiramina, a ciproheptadina e o WEB 2086 não inibiram o edema e o aumento de permeabilidade vascular induzidos por este veneno, sugerindo a não participação de histamina, serotonina e PAF na origem destas respostas. Por outro lado, quando drogas que interferem no metabolismo do ácido araquidônico, como dexametasona, inibidor de ciclooxigenase - a indometacina -, o inibidor de lipoxigenase - BW A4C -, o inibidor de ambas ciclooxigenase e lipoxigenase - NDGA -, foram usados, todos causaram significativa inibição da atividade edematogênica e/ou do aumento de permeabilidade vascular induzidos pelo veneno de *B. lanceolatus*, demonstrando o envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico na origem dessas atividades.



## 6 - CONCLUSÃO

---

Utilizando o edema de pata como modelo da resposta inflamatória induzida pelo veneno de *B. lanceolatus*, concluímos que a atividade edematogênica ocorre de forma tempo dependente, com efeito máximo duas horas após o estímulo e é acompanhada pela formação de infiltrado leucocitário, principalmente neutrófilos, entre os feixes de fibras musculares. Diante da dose de 250 ng/pata, ocorreu de forma moderada e com ausência de hemorragia. Essa atividade edematogênica ainda é potencializada com o uso do vasodilatador iloprost e depende de uma interação sinérgica entre mediadores responsáveis pela vasodilatação e pelo aumento de permeabilidade vascular. A citada atividade parece envolver metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos. Aminas biogênicas (histamina e serotonina) e fator ativador de plaquetas (PAF) parecem não desempenharem papel relevante.

## 7 - ABSTRACT

---

The ability of snake venoms to increase vascular permeability and to induce oedema through the release of pharmacologically active substances is well known. This thesis investigates the inflammatory response (oedema and vascular permeability) induced by the venom of *Bothrops lanceolatus* (BLV) in male Swiss white mice (20-30g). Paw oedema was induced by the subplantar injection of BLV (125-1000 ng/paw) and was quantified as the increase in paw weight. Changes in vascular permeability were assessed by measuring the amount of Evans blue dye extravasation. Oedema and the increase in vascular permeability were maximal within two hours and had resolved after 24h. The administration of iloprost (20 ng/paw) immediately after BLV potentiated the oedema and increased the vascular permeability by approximately 400%. Pre-treating the mice with indomethacin (5 mg/kg), dexamethasone (1 mg/kg), NDGA (100 mg/kg), or BW A4C (50 mg/kg) inhibited the BLV-induced oedema (by 43%, 59%, 28% and 43%, respectively) and the increase in vascular permeability (by 0%, 66%, 48%, and 44%, respectively). In contrast, histamine, serotonin, and PAF-acether antagonists [mepyramine (6 mg/kg), cyproheptadine (5 mg/kg), and WEB 2086 (50 mg/kg), respectively] were not effective. In histological sections, the venom (250 and 500 ng) was observed to cause thickening of the inner dermal layers which was accompanied by the presence of large intercellular spaces indicative of oedema. In addition, there was a marked infiltration of inflammatory cells, particularly neutrophils, into the underlying muscle layer. The latter, however, remained morphologically unaffected during the three hours of observation. Venom doses of 500 ng or more produced intense hemorrhage in the paw. These results indicate that BLV-induces oedema and increases vascular permeability in the mouse paw as confirmed by histological examination of the injected paws. The principal mediators of this inflammation response are cyclooxygenase and lipoxygenase products.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AMARAL, C. F. S.; DOURADO, H. V.; KOUYOUMDJIAN, J. A.; CARDOSO, J. L.; CAMPOS, J. A.; AZEVEDO-MARQUES, M. e LOPES, P. F. A. (1987). *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, pp. 1-53.
- AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ofídios do Brasil. (1921). *An. Mem. do Instituto Butantan* 1: 40-44.
- ANTUNES, E.; MARANGONI, R. A.; BRAIN, S. D. e DE NUCCI, G. (1992). *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat an rabbit skin *in vivo*. *Toxicon* 30: 1011-1016.
- ARAGON, F. e GUBENSEK, F. (1981). *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon* 19: 797-805.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. A. e MANDELBAUM, F. R. (1985). Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon* 23: 691-706.
- BARJA-FIDALGO, C.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q. e FERREIRA, S. H. (1992). Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. *Inflammation* 16: 1-12.
- BERTRAND, C.; GEPPETTI, P.; BAKER, J.; YAMAWAKI, I. e WADEL, A. (1993). J. Role of neurogenic inflammation in antigen-induced vascular extravasation in guinea pig trachea. *J. Immunol.* 150: 1479-1485.
- BIEBER, A. L. (1979). Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52. Ed. Lee, C. Y., Springer-Verlag Berlin New York, p. 295.
- BJARNASON, J. B. e TU, A. T. (1978). Hemorrhagic toxins from western diamond rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry* 17: 3395-3404.
- BLACKWELL, G. J.; CARNUCCIO, R.; DI ROSA, M.; FLOWER, R. J.; LANGHAM, C. S. J.; PARENTE, L. O.; PERSICO, P.; RUSSELL-SMITH, N. C. e STONE, D. (1982). Glucocorticoids induce the formation and release of anti-inflammatory and anti-phospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 76: 185-194.
- BLACKWELL, G. J.; CARNUCCIO, R.; DI ROSA, M.; FLOWER, R. J.; PARENTE, L. e PERSICO, P. (1980). Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. *Nature* 287: 147-149.

- BONILLA, C. A.; FAITH, M. R. e MINTON, JR., S. A. (1973). L-Amino acid oxidase, phosphodiesterase, total protein and other properties of juvenile timber rattlesnake (*C. h. horridus*) venom at different stages of growth. *Toxicon* 11: 301-303.
- BONTA, I. L.; VARGAFTIG, B. B. e BOHM, G. M. (1979). Snake venoms as an experimental tool to induce and models of microvessel damage. In: *Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52.. Ed. Lee, C. Y., Springer-Verlag Berlin New York, p. 629 - 683.
- BRAIN, S. D. e WILLIAMS, T. J. (1985). Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 86: 855-860.
- BRAY, M. A.; CUNNINGHAM, F. M.; FORD-HUTCHINSON, A. W. e SMITH, M. J. H. (1983). Leukotriene B<sub>4</sub>: A mediator of vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 72: 483-486.
- BRAZIL, V. (1911). La défense contre l'ophidisme. 2 ed. São Paulo, Pocai e Weiis.
- BRAZIL, V. e RANGEL PESTANA, B. (1909). Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. VII. Ação proteolytica. *Revista médica de São Paulo* 12: 442.
- BRAZIL, V. e VELLARD, J. (1928). Action coagulante et anticoagulante des venins. *Ann. Institut Pasteur* 42: 403.
- CAMPBELL, J. A. e LAMAR, W. W. (1989). Lanceheads, Genus *Bothrops* Wagler, 1824. In: *The Venomous Reptiles of Latin America*,. Eds. CAMPBELL, J. A. e LAMAR, W. W. Ithaca: Comstock Publishing Associates. p. 180-226
- CAMPOS, J. S. e MELLO-FILHO, L. E. (1966). Observações biológicas sobre a ilha da Queimada Grande. *A folha médica* 52: 343-366.
- CARDOSO, J. L. (1985). Snakebites at hospital Vital Brazil. A study of 2908 cases. *Toxicon* 23: 558.
- CARNUCCIO, R.; DI ROSA, M. e PERSICO, P. (1980). Hydrocortisone-induced inhibition of prostaglandin biosynthesis in rat leucocytes. *Br. J. Pharmacol.* 68: 14-16.
- CASALS-STENZEL, J.; MUACEVIC, G. e WEBER, K. H. (1987). Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 974-981.

- CHAPMAN, D. (1968). The symptomatology, pathology and treatment of the bites of venomous snakes of central and southern Africa. In: *Venomous Animals and Their Venoms*, Vol. I, Venomous Vertebrates. (Eds. Bucherl, W., Buckley, E. and Deulofeu, V.). New York: Academic Press. p. 463-527.
- CHEYMOL, J.; MILLE, R.; BOURILLET, F.; SUGA, T. e LABOURDETTE, E. (1968). Sur quelques propriétés pharmacodynamiques et biologiques de venins de serpents du genre *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. atrox*, *B. lanceolatus* et *B. caribaeus*). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 61: 673-689.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V. e WHITE, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29: 1279-1303.
- CIVELLO, D. J.; DUONG, H. L. e GEREN, C. R. (1983). Isolation and characterization of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. *Biochemistry* 22: 749-755.
- COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P. e RODRIGUES-SIMIONI, L. (1993). Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 31: 1237-1247.
- CONDREA, E. (1979). Hemolytic effects of snake venoms. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. Lee, C. Y. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. p. 448.
- DALE, M. M. e FOREMAN, J. C. (1994). Histamine as a mediator of allergic and inflammatory reactions. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Ed. Dale, M. M.; Foreman, J. C. e Fan, T-D. D. Oxford, London, Edinburg, Boston, Melbourne, Paris, Berlin e Vienna. p. 123-130.
- DALE, M. M.; FOREMAN, J. C. e FAN, T-P. D. (1994). Introduction to the immunology and pathology of host defence mechanisms. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Ed. Dale, M. M.; Foreman, J. C. e Fan, T-D. D. Oxford, p. 1-17.
- DAMERAU, B.; LEGE, L.; OLDIGS, H.D. e VOGT, W. (1975). Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 287: 141-156.
- DAVIES, P.; BAILEY, P. J. e GOLDENBERG, M. M. (1984). The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 335 ou 337-357.
- DEVI, A. (1968). The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: *Venomous Animals And Their Venoms. Venomous Vertebrates*. Vol. I. Bucherl, Buckley, Deulofeu. Academic Press - New York - London. p 119-165

- DI ROSA, M.; CALIGNANO, R.; CARNUCCIO, A.; IALENTI, A. e SAUTEBIN, L. (1985). Multiple control of inflammation by glucocorticoids. *Agents Actions* 17: 284-289.
- FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. e MOTA, I. (1992). Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon* 30: 1591-1602.
- FIERO, M. K.; SEIFERT, M. W.; WEAVER, T. J. e BONILLA, C. A. (1972). Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus v. viridis*) venoms. *Toxicon* 10: 81-82.
- FLOWER, R. J. e DALE, M. M. (1994). The anti-inflammatory effects of corticosteroids. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Eds. Dale, M. M.; Foreman, J. C. e Tai-Ping D. Fan. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 299-308.
- FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHIPLEY, M. E. e SMITH, M. J. H. (1980). Leukotriene B: A potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286: 264-265.
- FOSTER, S. J.; McCORMICK, M. E. e HOWARTH, A. (1985). The contribution of cyclooxygenase and lipooxygenase products to acute inflammation in the rat. *Agents Actions* 17: 358-359.
- FURTADO, M. F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S. e ANTONIO, L. C. (1991). Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon* 29: 219-226.
- GALLIN, J. I.; DOLDSTEIN, I. M. e SNYDERMAN, R. S. (1988). Overview. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. (Gallin, J. L.; Goldstein, I. M.; Snyderman, R. S. Eds) New York: Raven Press. p.1-3
- GARCIA LEME, J. (1979). Métodos experimentais no estudo da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumat.* 19: 146-150.
- GARCIA LEME, J. e WILHELM, D. L. (1975). The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. *Br. J. Exp. Path.* 56: 402-407.
- GENNARO, J., JR. e RAMSEY, H. W. (1959). Distribution in the mouse of lethal doses of cotton-mouth moccasin venom labelled with iodine-131. *Nature (Lond.)* 184: 1244.
- GRISWOLD, D. E.; WEBB, E. F.; CLARK, M. A. e MONG, S. (1986). Phlogistic activity of leukotriene D<sub>4</sub> in the mouse. *Inflammation* 10: 1-7.

- GROTTO, L.; MOROZ, C.; DE VRIES, A.; GOLBLUM, N. (1967). Isolation of *Vipera palestinae* hemorrhagin and distinction between its hemorrhagic and proteolytic activities. *Biochim. Biophys Acta* 133: 356-362.
- GUTIÉRREZ, J. M. e CHAVES, F. (1980). Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*. *Toxicon* 18: 315-321.
- GUTIÉRREZ, J. M. e LOMONTE, B. (1989). Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan.*, 51: 211-223.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F. e BOLÁÑOS, R. (1980). Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28: 341-351.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F. e CERDAS, L. (1986). Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev. Biol. Trop.* 34: 209-219.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLÁÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O. e PORTILLAR, E. (1981). Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENE, J. A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z. e SCHOSINSKY, K. (1989). Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* 27: 735-745.
- GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G. e CERDAS, L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23: 887-893.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G. e CERDAS, L. (1987). Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon* 25: 713-720.
- HAMBLIN, A. S. (1994). Cytokines. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Ed. Dale, M. M.; Foreman, J. C. e Fan, T-D. D. Oxford, London, Edinburg, Boston, Melbourne, Paris, Berlin e Vienna. p. 179-192.
- HAWGOOD, B. J. (1982). Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: *Rattlesnake venoms. Their actions and treatment*. Ed. A. T. Tu. Marcel Dekker. New York. p. 121-162.
- HAWORTH, D.; HERON, J. R. M. e CAREY, F. (1988). Rat paw hyperalgesia and oedema in response to NMDA *Naja naja* phospholipase A<sub>2</sub>. *Br. J. Pharmacol.* 93: 145p.

- HENEINE, L. G. D. e CATTY, D. (1993). Species-specific detection of venom antigens from snakes of the *Bothrops* and *Lachesis* genera. *Toxicon* 31: 591-603.
- HIGGS, G. A.; FLOWER, R. J. e VANE, J. R. (1979). A new approach to anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1959-1961.
- HIGGS, G. A.; FOLLENFANT, R. L. e GARLAND, L. G. (1988). Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: effects on acute inflammatory responses. *Br. J. Pharmacol.* 94: 547-551.
- HIRATA, F. J. (1981). The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein, in rabbit neutrophils by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 256: 7730-7733.
- HIRATA, F.; SCHIFFMAN, E.; SUBRAMANIAN, V.; SALOMON, D. e AXELROD, J. (1980). A phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 2533 - 2536.
- HO, C. L. e HWANG, L. L. (1991). Local edema induced by the black-bellied hornet venom and its components. *Toxicon* 29: 1033 - 1042.
- HOUSSAY, B. A. e NEGRETE, J. (1918). Estudios sobre venenos de serpientes. III. Action de los venenos de serpientes sobre las substâncias proteicas. *Rev.Inst. Bacteriol. (Dep. Nac. Higiene)* 1: 341.
- HUANG, H. (1984). Release of slow reating substance from the guinea-pig lung by phospholipases A<sub>2</sub> of *Vipera russelli* snake venom. *Toxicon* 22: 359.
- HUMES, J. L.; OPAS, E. E. e Bonney, R. J. (1989). Arachidonic acid metabolites in mouse ear edema. In: *Advances in Inflammation Research*. Vol.11. Eds. Otterness, A. I. Lewis, e R. Capetola. Raven Press, New York. p. 57-65.
- IWANAGA, S. e SUZUKI, T. (1979). Enzymes in snake venom. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. Lee, C. Y. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. p. 61-158.
- KAISER, E. e MICHL, H. (1971). Chemistry and pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: *Venomous Animals and Their Venoms. Venomous Vertebrates*. Vol. II. Eds. Bucherl, Buckley. New York, London. Academic press. p. 307-318.
- KAMIGUTI, A. S.; SILVA, M. V. e CARDOSO, J. L. C. (1986). Desfibrinação do sangue no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 19 (suppl.): 28.
- KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; DESMOND, H. e HULTON, R. A. (1991). Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 29: 1097-1105.



- KLOBUSITZKY, D. (1961). Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms. *Am. J. Sci.* 242: 107.
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. e OHSAKA, A. (1960). Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Japan. J. med. Sci. Biol.* 13: 43-51.
- KOUYOUMDJIAN, J. A. e POLIZELLI, C. (1989). Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: Correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. *Rev. Med. Trop. São Paulo* 31: 84-90.
- KUEHL, F. A.; DOUGHERTY, H. W. e HAM, E. A. (1984). Interactions between prostaglandins and leukotrienes. *Biochem. Pharmacol.* 33: 1-5.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; MORENO, R. A. e PRADO-FRANCESCHI, J. (1990). Comparison of the phospholipase A<sub>2</sub>, blood-clotting, caseinolytic, esterolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. In: *Third Pan-American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins*. Oaxtepec, 1990. *Toxicon* 28: 601.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F. e BON, C. (1994). Purification of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. *Toxicon* 32: 1069-1081.
- LOMONTE, B.; GENE, J. A.; GUTIÉRREZ, J. M. e CERDAS, L. (1983). Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon* 21: 379-384.
- LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. e RAMIREZ, G. (1990). Isolation of a galctose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). *Toxicon* 28: 75-81.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A. e HANSON, L.A. (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17: 93-105.
- MacMILLAN, R. M. e FOSTER, S. J. (1988). Leukotriene B<sub>4</sub> and inflammatory disease. *Agent Actions* 24: 114-119.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. e REICHL, A. P. (1984). Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* 22: 193-206.
- MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P. e ASSAKURA, M. T. (1976). Some physical and biochemical characteristics of HF<sub>2</sub> one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins* 1: 111-121.

- MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. (1993). Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo. p. 13-28.
- MARANGONI, R. A.; ANTUNES, E.; BRAIN, S. D. e DE NUCCI, G. (1993). Activation by *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom of tissue kallikrein-kininogen-kinin system in rabbit skin in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 109: 539-543.
- MEBS, D. (1970). A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.* 1: 335.
- MEIER, J. (1986). Individual and aged-dependent variation in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon* 24: 41-46.
- MEIER, J. e FREYVOGEL, T. A. (1980). Comparative studies on venoms of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*), carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricoles*) snakes at different ages. *Toxicon* 18: 661-662.
- MIETTO, L.; BATTISTELLA, A.; TOFFANO, G. e BRUNI, A. (1984). Modulation of lysophosphatidylserine-dependent histamine release. *Agents Actions* 14: 376-378.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. (1986). "II Reunião técnica sobre ofidismo: distribuição geográfica das serpentes do Brasil". Brasília.
- MIYATA, T.; TAKEYA, H.; OSEKI, Y.; ARAKAWA, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S. e OMORI-SATOH, T. (1989). Primary structure of hemorrhagic protein, HR2a, isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* 105: 847-853.
- MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G. e THEAKSTON, R. G. D. (1991). Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*: 29: 713-723.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H. e TU, A. T. (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Archs. Biochem. Biophys.* 231: 309-319.
- NIKAI, T.; OGURI, E.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; MORI, N. e TU, A. T. (1986). Reevaluation of hemorrhagic toxin HR-1 from *Agkistrodon halys blomhofii* venom: proof of proteolytic enzyme. *Int. J. Biology* 18: 103-108.
- OHSAKA, A. (1979). Hemorrhagic, necrotizing and edema forming effects of snake venoms. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52. Ed. Lee, C. Y., Springer - verlag, Berlin, Heidelberg New York, p. 480-546.
- OWNBY, C. L. Pathology of rattlesnake envenomation. (1982). In: *Rattlesnake venoms, their actions and treatment*. Ed. TU, A. T. Marcel Dekker, New York. p. 163-209.

- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; CLAYPOOL, L. e ODELL, G. V. (1984). *In vivo* test of the ability of antiserum to myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myonecrosis induced by myotoxin a and homologous crude venom. *Toxicon* 22: 99-105.
- PAGE, C. P. (1994). Platelet activating factor. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Ed. Dale, M. M.; Foreman, J. C. e Fan, T-D. D. Oxford, London, Edinburg, Boston, Melbourne, Paris, Berlin e Vienna. p. 200-205.
- PERALES, J. AMORIM, C. Z.; ROCHA, S. L. G.; DOMONT, G. B.; MOUSSATCHÉ. (1992). Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antibothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Agent Actions* 37: 250-259.
- PRUZANSKI, W. e VADAS, P. (1991). Phospholipase A<sub>2</sub> - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol. Today* 12: 143-146.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. e MANDELBAUM, F. R. (1985). Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 23: 341-345.
- RANG e DALE, M. M. (1993). Hormônios locais, inflamação e alergia. In: *Farmacologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan SA (ed). p. 152-174.
- RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F. e ISAKON, P. C. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* 17: 723-741.
- RIBEIRO, L. A. e JORGE, M. T. (1989). Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulta e filhote. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo* 44: 143-145.
- ROBBINS, S. L. ; COTRAN, R. S. e KUMAR, V. (1987). Inflamação e reparo. In: *Patologia estrutural e funcional*. México, Nueva Editorial Interamericana. p. 33-72.
- ROCHA E SILVA, M. ; BERALDO , W. T. e ROSENFELD, G. (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Phys.* 156:261-173.
- ROSENFELD, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and their Venoms*. Vol. II Ed. Bucherl, W. and Buckley, E. E. Academic Press, New York. p. 345-403.

- ROSENFELD, G.; HAMPE, O. G. e KELEN, E. M. A. (1959). Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mems. Inst. Butantan* 29: 143-163.
- ROTHSCHILD, A. M. (1966). Mechanism of histamine release by animal venoms. *Mem. Inst. Butantan* 33: 467-476.
- ROTHSCHILD, A. M. e ROTHSCCHILD, D. Z. (1979). Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: *Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52. Ed. Lee, C. Y., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg Ney York, p. 591.
- RUSSEL, F. E.; RUZIC, N. e GONZALES, H. (1973). Effectiveness of antivenim (Crotalidae) polyvalent following injection of *Crotalus* venom. *Toxicon* 11: 461-464.
- SALMON, J. A. e HIGGS, G. A. (1994). The eicosanoids: generation and actions. In: *Texbook of Immunopharmacology*. Ed. Dale, M. M.; Foreman, J. C. e Fan, T-D. D. Oxford, London, Edinburg, Boston, Melbourne, Paris, Berlin e Vienna. p. 131-142.
- SAMUELSON, B. (1983). Leukotriene: mediators of immediate hipersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220: 568-575.
- SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G. e DINIZ, C. R. (1992). Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 30: 95-103.
- SAWAI, Y. (1980). Studies on snakebites in the Asian areas. In: *Natural Toxins*. Eds. D. Eaker and T. Wadstrom. Pergamon Press. Oxford. p. 25-32.
- SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P. e GIGLIO, J. R. (1990). Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 28: 261-273.
- SIEGEL, S. (1979). In: *Estatística não paramétrica*. Rio de Janeiro. McGraw-Hill do Brasil-Ltda (ed). p. 302-305.
- SOTO, J. G.; PEREZ, J. C. e MINTON, S. A. (1988). Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. *Toxicon* 26: 875-882.
- TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; NISHINO, N.; MAKINOSE, Y.; OMORI-SATOH, T.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. e IWANAGA, S. (1993). Primary structures of platelet aggregation inhibitors (desintegrins) autoproteolytically released from snake venom hemorrhagic metalloproteinases and new fluorogenic peptide substrates for these enzymes. *J. Biochem.* 113: 473-483.

- TAKEYA, H.; ONIKURA, A.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. e IWANAGA, S. (1990). Primary structure of a hemorrhagic metalloproteinase, HT-2, isolated from the venom of *Crotalus ruber ruber*. *J. Biochem.* 108: 711-719.
- TAN, N. H. e SAIFUDDIN, M. N. (1990). Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Toxicon* 28: 385-392.
- TATESON, J. E.; RANDALL, R. W.; REYNOLDS, C. H.; JACKSON, W. P.; BHATTACHERJEE, P.; SALMON, J. A. e GARLAND, L. G. (1988). Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assesment *in vitro* and *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 94: 528-539.
- TEIXEIRA, M. M.; WILLIAMS, T. J. e HELLWELL, P. G. (1993). E-Type prostaglandins enhance local oedema formation and neutrophil accumulation but suppress eosinophil accumulation in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.* 110: 416-422.
- TREBIEN, H. A. e CALIXTO, J. B. (1989). Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents actions* 26: 292-300.
- TU, A. T. (1977). Venoms: biochemistry and molecular biology. John Wiley - Sons. p. 23-63.
- UNDERWOOD, G. (1979). Classification and distribution of venomous snakes in the world. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52. Ed. Lee, C. Y. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. p.15-40.
- VEDMORE, C. V. e WILLIAMS, T. J. (1981). Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 289: 646-650.
- VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M. e GOWDA, T. V. (1987). Characterization of three edema-inducing phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon* 25: 501-515.
- VITAL BRAZIL, O. (1982a). Peçonhas In: *Farmacodinâmica*. Ed. Corbett C. E.. Rio de Janeiro, Guanabara, Koogan. p. 1044-1074.
- VITAL BRAZIL, O. (20/05/1986). Sobre os primórdios da soroterapia antiofídica. O Estado de São Paulo. p. 43.
- WARRELL, D. A.; DAVIDSON, N. McD.; GREENWOOD, B. M.; ORMEROD, L. D.; POPE, H. M.; WATKINS, B. J. e PRENTICE, C. R. M. (1977). Poisoning by bites of the saw-scaled or carpet viper (*Echis carinatus*) in Nigeria. *Quart. J. Med.* 46: 33-62.

- WARRELL, D. A. e FENNER, P. J. (1993). Venomous bites and stings. *Br. Med. Bull.* 49: 423-439.
- WILLIAMS, T. J. (1979). Prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub> and the vascular changes in inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 65: 517-524.
- WILLIAMS, T. J. (1983). Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. *Br. Med. Bull.* 39: 239-242.
- WILLIAMS, T. J. e MORLEY, J. (1973). Prostaglandin as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature* 246: 215-217.
- WILLIAMS, T. J. e PECK, M. J. (1977). Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* 270: 530-532.
- WILLIAMS, T. J. e YARGOOD, H. (1990). Effect of glucocorticosteroids on microvascular permeability. *Am. Rev. Respir. Disc.* 141: 39-43.
- WILLIAMS, T. J. (1994). Vascular changes in inflammation and mechanisms of oedema formation. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Ed. Dale, M. M.; Foreman, J. C. e Fan, T-D. D. Oxford, p. 211-217.
- YAMAKAWA, M., NOZAKI, M. e HOKAMA, Z. (1976). Fractionation of Sakishima habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic, and edema-forming activities of the fractions. In: *Animal, Plant, and Microbial Toxins* 1: 97-109. (Ohsaka, A., Hayashi, K. and Sawai, Y., Eds). New York: Plenum Press.
- YONAHARA, K.; IHA, M.; TOMIHARA, Y.; NOZAKI, M. e YAMAKAWA, M. (1991). Characterization of three hemorrhagic factors from the venom of Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon* 29: 703-711.
- YOUNG, J. M.; SPIRES, J. A.; BEDFORD, C. D.; WAGNER, B. BALLRON, S. J. e DE YOUNG, L. M. (1984). The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.* 82: 367-371.