

ALDETE ZAPPELLINI

**ESTUDOS BIOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DA
PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas***

Orientadora: Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi

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

Campinas

1991

T/UNICAMP
Z49e

15303/FCM/972

Esta exemplar corresponde a
versão final da dissertação
de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas
de Unicamp, para obtenção do
título de mestre em Farmacologia.
Campinas, 17 de novembro, 1991

Márcio C. P. G. / FCM
Márcio C. P. G. / FCM
Juliana Prado Franceschi
Orientadora

Esta tese foi preparada no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, durante o curso de pós-graduação em Farmacologia e apresentada à Faculdade de Ciências Médicas desta Universidade, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

UNICAMP - Campinas - São Paulo

1991

"Há mais mistérios entre o céu e a
terra do que imagina a nossa vã
filosofia"

William Shakespeare

Dedico esta Tese a meus pais.

Princípios éticos na experimentação animal

Artigo I Todas as pessoas que pratiquem a experimentação biológica devem tomar consciência de que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar à dor.

Artigo II O experimentador é, normalmente, responsável por suas escolhas e por seus atos na experimentação animal.

Artigo III Procedimentos que envolvam animais devem prever e se desenvolver considerando-se sua relevância para a saúde humana ou animal, a aquisição de conhecimento ou o bem da sociedade.

Artigo IV Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidades apropriadas e apresentar boas condições de saúde, utilizando-se o número mínimo necessário para se obter resultados válidos. Ter em mente a utilização de métodos alternativos tais como modelos matemáticos, simulação por computador e sistemas biológicos "in vitro".

Artigo V É imperativo que se utilizem os animais de maneira adequada, incluindo aí evitar o desconforto, angústia e dor. Os investigadores devem considerar que os processos determinantes de dor ou angústia em seres humanos causam o mesmo em outras espécies, a não ser que o contrário tenha se demonstrado.

Artigo VI Todos os procedimentos com animais, que possam causar dor ou angústia, precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequadas. Atos cirúrgicos ou outros atos dolorosos não podem se implementar em animais não anestesiados e que estejam apenas paralisados por agentes químicos e/ou físicos.

Artigo VII Os animais que sofram dor ou angústia intensa ou crônica, que não possam se aliviar e que não serão utilizados devem ser sacrificados por método indolor e que não cause estresse.

Artigo VIII O uso de animais em procedimentos didáticos e experimentais pressupõe a disponibilidade de alojamento que proporcione condições de vida adequadas às espécies, contribuindo para sua saúde e conforto. O transporte, a acomodação, a alimentação e os cuidados com os animais criados ou usados para fins biomédicos devem ser dispensados por técnico qualificado.

Artigo IX Os investigadores e funcionários devem ter qualificação e experiência adequadas para exercer procedimentos em animais vivos. Deve-se criar condições para seu treinamento no trabalho, incluindo aspectos de trato e uso humanitário dos animais de laboratório.

Comitê de Ética e Legislação do Colégio Brasileiro de Experimentação

ÍNDICE

Agradecimentos	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de Materiais	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivo	9
3. Materiais e Métodos	10
3.1 Peçonha	10
3.2 Animais de Experimentação	10
3.3 Toxicidade	10
3.4 Gel Filtração	10
3.5 Atividades Enzimáticas	11
3.6 Pressão arterial sistêmica de cães anestesiados	13
3.7 Análise Estatística	14
4. Resultados	15
5. Discussão	41
6. Conclusões	48
7. Referências Bibliográficas	49

AGRADECIMENTOS

A Roberto Coppo Rohwedder pelo incentivo e carinho constantes.

À Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi pela orientação segura e amizade verdadeira.

Ao Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado pelo entusiasmo científico.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pela indispensável colaboração que proporcionou muitos dos resultados desta Tese.

Aos amigos Profs. Drs. Edson Antunes e Carlos Alberto Flores pelas críticas e sugestões sempre pertinentes.

A José Luiz Donato e Stephen Hyslop pela colaboração nas metodologias bioquímicas.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite pela assessoria precisa ao longo desta Tese.

Aos amigos Dora Maria Grassi Kassisse, Élen Cristina Teizem Landucci e Moacir Serralvo Faria pelos bons momentos.

Aos Docentes do Departamento de Farmacologia pelo crescimento proporcionado, e aos funcionários pelo auxílio sempre simpático.

Ao Instituto Butantan pelo fornecimento dos venenos utilizados nesta Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido.

RESUMO

A *B. erythromelas* é uma serpente que habita exclusivamente as regiões quentes do Nordeste brasileiro (Bahia ao Ceará). Nesta Tese avaliaram-se características bioquímicas e farmacológicas de sua peçonha.

Verificou-se que o veneno apresenta atividades coagulante, proteolítica (caseinolítica), fosfolipásica e hemorrágica, bem como discreta atividade TAME-esterásica. Os fracionamentos realizados revelaram a presença de três (Sephadex G-75) e quatro (Sephadex G-100) picos distintos. No primeiro pico detectaram-se as atividades proteolítica e coagulante, no segundo, TAME-esterásica (ausente em Sephadex G-75), no terceiro, fosfolipásica e coagulante. Nenhuma atividade foi detectada no último pico.

Através do estudo farmacológico, verificou-se que a peçonha de *B. erythromelas* é menos tóxica do que a de *B. jararaca* para camundongos (via intraperitoneal); no entanto, esta relação se inverteu para pintainhos (via intramuscular).

Estudamos também os efeitos deste veneno sobre a pressão arterial sistêmica e a respiração, bem como sobre o tempo de coagulação, de cães anestesiados. Observou-se que após administração de 25 µg/kg da peçonha (via endovenosa, "bolus"), os animais apresentaram uma queda da pressão arterial que revelou a presença de dois componentes distintos: o primeiro manifestou-se por uma queda de rápida instalação e de moderada intensidade e o segundo, por uma queda mais acentuada e persistente. Verificou-se também que o veneno determinou a morte de 58,8% dos animais, por parada respiratória precedida por hiperpnéia. Incoagulabilidade sanguínea, após uma breve fase de hipercoagulabilidade (coagulopatia de consumo) foi também observada.

O pré-tratamento dos animais, de forma independente, com heparina, sulfato de celulose, N^w-nitro-L arginina metil éster (L-NAME), indometacina, soro antibotrópico (SAB), e sulfato de celulose e indometacina associados, determinou a sobrevida de 100% dos animais experimentados. O primeiro componente hipotensor foi inibido significativamente pelo sulfato de celulose, bem como pela heparina, enquanto que o segundo componente hipotensor foi abolido em 50% dos animais tratados com indometacina. A associação de sulfato de celulose e indometacina inibiu completamente as alterações pressóricas induzidas pelo veneno, bem como as anomalias respiratórias.

Estes resultados sugerem que bradicinina seja responsável pela queda inicial da pressão arterial e que eicosanóides com ação vasodilatadora, tais como prostaciclina e/ou prostaglandina E₂ sejam os mediadores da segunda queda pressórica. O estado de choque, por sua vez, seria mantido pela liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais, uma vez que o pré-tratamento com L-NAME determinou uma recuperação acelerada dos níveis pressóricos, ainda que não tenha interferido com nenhuma das respostas hipotensoras.

As alterações na coagulação somente foram revertidas com o uso do SAB, no entanto em proporção 30 vezes superior àquela recomendada pelo Instituto Butantan.

ABSTRACT

B. erythromelas is a snake found exclusively in the Northeast of Brazil (from Bahia to Ceará). In this Thesis, some of the biochemical and pharmacological characteristics of this venom were examined.

B. erythromelas venom possesses coagulant activity as well as proteolytic (caseinolytic), phospholipase and TAME-esterase activities. Fractionation of the venom yielded either three (Sephadex G-75) or four (Sephadex G-100) distinct peaks. The first peak contained primarily proteolytic and clotting activities; in the second one, TAME-esterase activity was detected (this peak was absent in the G-75 fractionation). The third peak contained phospholipase activity and in the last, no activity could be detected.

B. erythromelas venom, compared with *B. jararaca* venom, is less toxic in mice, when given i.p.. However, this potency is inverted when the venoms are given i.m. in chicks.

The effects of *B. erythromelas* venom on arterial blood pressure and respiration, as well as clotting time "in vivo" (anaesthetized dogs), were also examined. A bolus injection of *B. erythromelas* venom (25 µg/kg, i.v.) induced a biphasic hypotensive response consisting of a rapid initial decrease followed by a partial recovery (early phase) which was then succeeded by a more sustained hypotension (late phase). The dose of venom used caused a 58.8% mortality. The animals died following a period of profound respiratory alterations.

Independent pre-treatment of the animals with heparin, cellulose sulphate, N^w-Nitro-L arginine methyl ester (L-NAME), indomethacin, antithrombotic serum, or a combination of cellulose sulphate and indomethacin, abolished the lethality. The early phase of hypotension was inhibited by cellulose sulphate as well as by

heparin, while the late phase was partially inhibited (50%) by indomethacin. Pre-treatment with cellulose sulphate and indomethacin abolished the venom-induced alterations in blood pressure and respiration.

These results suggest that bradykinin may be responsible for the initial hypotensive response and that vasodilatory eicosanoids, such as prostacyclin and/or prostaglandin E₂ may mediate the late phase. Pre-treatment with L-NAME led to a more rapid recovery from the sustained late phase of hypotension although there was no effect on the immediate hypotensive response. This observation suggests that nitric oxide release, from endothelial cells, may contribute to the maintenance of the venom-induced shock. On the other hand, the hemostatic alterations were prevented only by pre-treatment with antithrombotic serum, however in a dose 30 fold above that recommended by the Butantan Institute.

LISTA DE MATERIAIS

1- MERCK

Ácido tricloroacético

Bicarbonato de sódio

Caseína

Cloreto de cálcio dihidratado

Cloreto de potássio

Cloreto de sódio

Colato de sódio

Dihidrogenofosfato de potássio

Fosfato monossódico monohidratado

Glicose anidra

Hidróxido de sódio

Lecitina de ovo

Vermelho de fenol

2- SIGMA

Indometacina

N^W-Nitro-L arginina metil éster

TAME (p-tolueno sulfonil L-arginina metil éster)

TRIS-hidrocloridrato de Tris (hidróximetil aminometano)

Trombina

3- Outras Procedências

Azul de dextran (Serva)

Citrato de sódio (Usina Colombiana S.A.)

EDTA-ácido etilenodiamino tetraacético (Reagen)

Heparina (Organon)

Iloprost (Boehringer Ingelhem)

Oxalato de amônio (Ecibra)

Pentobarbital sódico (Abbott)

Sephadex G-75 e Sephadex G-100 (Pharmacia)

Soro antibotrópico (Instituto Butantan)

Sulfato de celulose (Aldrich)

INTRODUÇÃO

Peçonhas ofídicas constituem uma mistura complexa de diversos componentes que se originam a partir de uma síntese proteica altamente especializada, e que parecem atuar em perfeita sintonia, tanto na digestão da presa, como na proteção da serpente contra seus predadores naturais.

A diversidade de atividades biológicas das peçonhas ocasiona o aparecimento de efeitos tóxicos e muitas vezes letais, o que faz com que envenenamentos ofídicos constituam um problema de considerável magnitude desde os tempos mais remotos. Segundo Swaroop & Grab (1954), cerca de 30 a 40 mil mortes ocorrem anualmente em decorrência de acidentes com serpentes venenosas em diferentes áreas do mundo. No Brasil, verifica-se que 88,1% dos acidentes ofídicos (junho de 1986 a dezembro de 1987) são ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops* seguidos por *Crotalus* (8,2%), *Lachesis* (2,9%) e *Micrurus* (0,7%; Alves et al., 1990).

As serpentes venenosas que se caracterizam pela habilidade de inocular a peçonha em suas vítimas, graças à evolução de suas presas, dividem-se em quatro famílias: *Hydrophiidae*, *Elapidae*, *Viperidae* e *Crotalidae*; nesta última, se incluem as serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, as mais comumente encontradas no Brasil.

Na região Nordeste, particularmente entre os estados da Bahia e Ceará, encontra-se a *Bothrops erythromelas*, serpente descrita por Amaral em 1926 (Fig. 1). Tal espécie, também conhecida como jararaca da seca, jararaca rosada ou jararaca avermelhada, é uma serpente de pequeno porte (82,5 a 125 cm)



Figura 1: Distribuição geográfica da *B. erythromelas* e da *B. jararaca*.

que fornece de 20 a 30 miligramas de peçonha por extração, segundo Vellard (1938), e de 15 a 20 miligramas, de acordo com dados do Instituto Butantan.

A investigação da atividade farmacológica da peçonha de *B. erythromelas* baseia-se no fato de as peçonhas botrópicas apresentarem um perfil de efeitos mais ou menos constante. Dentre estes efeitos, destaca-se inicialmente o choque, que segundo Vital Brazil (1982) é a causa mais frequente de morte nos acidentes causados por estas serpentes. Clinicamente o choque é do tipo hipovolêmico e este efeito parece ser devido ao extravasamento de sangue para os tecidos e órgãos internos. A hipotensão inicial parece não ter origem cardíaca, mas sim ser devida à vasodilatação que determina um profundo decréscimo na resistência periférica vascular. Este efeito é confirmado pelo fato de animais descerebrados, desmedulados ou desprovidos da circulação sanguínea cerebral também desenvolverem o choque (Lee & Lee, 1979). Autacóides como bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandinas, os quais são liberados por ação de enzimas contidas nas peçonhas (proteases, fosfolipase A₂ e fosfolipase C), podem também contribuir para as alterações circulatórias observadas no choque (Rothschild & Rothschild, 1979).

A relevância da bradicinina no envenenamento botrópico foi primeiramente demonstrada por Rocha e Silva & Beraldo (1949) que verificaram a liberação desta cinina a partir de uma fração globulínica do plasma por ação da peçonha de *B. jararaca* e da tripsina. A seguir, Deutsch & Diniz (1955) demonstraram que as enzimas formadoras das cininas, as cininogenases, distribuem-se amplamente nos venenos crotalídeos e viperídeos. Posteriormente, Ferreira (1965), em estudos com a peçonha de *B. jararaca*, verificou a presença de uma substância que amplificava a ação da bradicinina liberada. Tal substância, foi denominada BPF (bradykinin-potentiating factor). Estudos subsequentes demonstraram que os BPF_s constituem uma família de peptídeos (5 a 13 resíduos de

aminoácidos) que inibem a enzima peptidil dipeptidase, a qual não só participa da síntese de angiotensina II, como também promove a degradação da bradicinina, substâncias estas que se encontram estreitamente envolvidas na regulação da pressão arterial. De fato, a importância desta descoberta reflete-se no desenvolvimento do captopril (Cushman et al., 1977) e demais inibidores da enzima conversora, medicamentos largamente utilizados não somente nos casos de hipertensão renina-dependentes mas também na hipertensão arterial essencial (Garrison & Peach, 1990).

Mais ainda, Sung et al. (1988), estudando a interação da bradicinina com células endoteliais de artéria pulmonar bovina verificaram que o efeito final a nível de receptores do tipo B₂ consiste na elevação dos níveis intracelulares de cálcio e liberação de EDRF - endothelium derived- relaxing factor . Este composto, descoberto por Furchgott & Zawadski em 1980, enquanto estudavam a hipotensão produzida pela acetilcolina, é um importante agente vasodilatador, que atua através do aumento dos níveis intracelulares de GMP_c via ativação da guanilato ciclase (Ignarro & Kadowitz, 1985; Angus & Cocks, 1989). Desta forma, esta substância poderia contribuir para o estado de choque, fato que não foi ainda relatado para peçonhas ofídicas. Por outro lado, a estimulação do receptor B₂ em células endoteliais íntegras parece iniciar uma série de eventos biológicos, tais como: ativação das fosfolipases A₂ e C de membrana, liberação de prostaglandinas e acúmulo de AMP_c e GMP_c, fatores estes que desempenham importante papel no fenômeno da vasodilatação.

Outra característica das peçonhas botrópicas é a capacidade que têm de coagular o plasma e produzir hemorragias. A atividade coagulante de venenos ofídicos foi primeiramente descrita por Fontana em 1787 (cf. Boquet, 1979), que após administrar endovenosamente pequena dose do veneno de víbora em coelho, observou a morte do animal. A análise macroscópica dos vasos do animal revelou o

estado coagulado do sangue. Com o desenvolvimento de técnicas mais apropriadas ao estudo da cascata da coagulação, os venenos foram agrupados por Denson (1969) em quatro grupos básicos: 1) ativadores do fator X, 2) ativadores incompletos de protrombina (necessitam do fator V), 3) ativadores completos de protrombina (não necessitam do fator V) e 4) ativadores do fibrinogênio, convertendo-o em fibrina (ação semelhante à trombina). Rosing et al. (1988) relataram que com relação ao veneno de *B. erythromelas*, as evidências, até o momento disponíveis, não permitem classificá-lo corretamente como um ativador de protrombina completo ou incompleto. Com relação à hemorragia, o termo hemorragina ou princípio hemorrágico designa componentes ofídicos que determinam sangramento por uma alteração na composição da parede do vaso, ou ação na cascata da coagulação; entretanto, o desenvolvimento de hemorragia parece não ser agravado pela incoagulabilidade sanguínea determinada pelas peçonhas (Ohsaka, 1979). A atividade hemorrágica foi, por longo tempo, atribuída à presença de proteases nos venenos ofídicos. No entanto, após isolamento de proteases das peçonhas de *Agkistrodon halys blomhoffii* e *Trimeresurus flavoviridis* verificou-se que estas frações eram completamente isentas de atividade hemorrágica (cf. Ohsaka, 1979). Comparando a peçonha de *B. erythromelas* com a de *B. jararaca*, Tomy et al., (1988) descreveram que a atividade coagulante da peçonha de *B. erythromelas* é dez vezes mais potente que a da *B. jararaca*. Por outro lado, estas peçonhas não diferem significativamente na produção de hemorragia. O uso do soro antibotrópico (Instituto Butantan) foi eficaz em neutralizar por completo a atividade hemorrágica de ambas as peçonhas, bem como a atividade coagulante do veneno de *B. jararaca*, falhando no entanto, em inibir o efeito coagulante da peçonha de *B. erythromelas*, fenômeno este que foi parcialmente inibido pela heparina. Considerando-se que esta peçonha não é incluída na produção do soro antibotrópico do Instituto Butantan, talvez seja esta uma possível explicação para a ausência de neutralização do efeito supramencionado. Tal verificação fala a favor de uma regionalização da produção dos anti-soros, fato que vem sendo extensivamente discutido em congressos e

simpósios especializados no assunto. A elevada atividade coagulante da peçonha de *B. erythromelas* poderia assim potencializar o estado de choque, através do desenvolvimento de um quadro de coagulação intravascular disseminada que se caracteriza por trombocitopenia e consumo de fatores de coagulação do plasma, presença de produtos da ativação da coagulação, tais como monômeros de fibrina, fibrinopeptídeos e fragmentos de protrombina e produtos de degradação da fibrina, como uma consequência do depósito de fibrina na microcirculação (Rapaport, 1990). Rothschild & Almeida (1972) , estudando 'a participação das cininas no choque fatal produzido pela peçonha de *B. jararaca*, verificaram que mesmo uma liberação maciça de bradicinina pode ser tolerada por ratos previamente tratados com substâncias que previnem o aparecimento de um quadro de coagulação intravascular disseminada (heparina ou sulfato de celulose). De fato, Nahas et al., (1979) demonstraram que após administração intravenosa da peçonha de *B. erythromelas* (50 µg/kg) em cães anestesiados, ocorre um consumo dos fatores V e X da coagulação, bem como de protrombina e fibrinogênio (coagulopatia de consumo), alterações estas que foram completamente abolidas com o uso de heparina em alta dose (50 mil unidades).

Por outro lado, peçonhas ofídicas podem alterar a função plaquetária de diversas formas, quer induzindo a agregação e a reação de liberação, quer inibindo tal fenômeno. A ativação plaquetária, compreendendo as fases de adesão, agregação e degranulação, é uma cadeia de eventos na qual um grande número de enzimas, substratos e componentes bioquímicos da membrana, citoplasma e proteínas do glicocálice, estão envolvidos. Dada à complexidade de tal sistema, não é surpreendente o fato de peçonhas ofídicas alterarem o funcionamento normal destes componentes sanguíneos. Com relação à inibição plaquetária, Boffa & Boffa (1974), estudando a peçonha de *Vipera aspis*, detectaram três componentes distintos com atividades ADPase/5 nucleotidásica, fibrinolítica e fosfolipásica. Compostos de peçonhas ofídicas com atividade fosfolipásica vêm sendo relatados

como potentes inibidores da agregação plaquetária como o que se observa para as peçonhas de *Trimeresurus gramineus* (Ouyang & Huang, 1983) e de *Agkistrodon halys* (Ouyang et al., 1983). Tal enzima parece promover a inibição atuando como uma hemolisina de ação indireta, a qual agindo sobre fosfolipídeos de membrana, formaria lisolecitina, que lisaria inespecificamente a membrana das plaquetas e a de eritrócitos, devido a semelhança entre as cargas negativas das membranas destes componentes sanguíneos (Condrea, 1979). Com relação à peçonha de *B. jararaca*, Zingali et al. (1988) descreveram a atividade agregante da peçonha total. No entanto, após fracionamento desta peçonha em Sephacryl S-200, a fração com atividade fosfolipásica determinou uma marcante inibição da agregação induzida pelo colágeno.

Além da fosfolipase A₂, outras enzimas são frequentemente encontradas em peçonhas ofídicas tais como acetilcolinesterase, proteases e esterases entre outras (Zeller, 1951). Determinadas enzimas são características de espécies, gêneros e até famílias como por exemplo, as proteases, normalmente presentes na família *Viperidae*.

Segundo Rocha e Silva (cf. Diniz et al., 1966), as proteases são também capazes de produzir aguda hipotensão a qual é seguida por sinais característicos do choque cardiovascular. Este efeito estaria relacionado à capacidade destas enzimas em liberar cininas vasodilatadoras através da ativação do cininogênio plasmático. De fato, esta hipótese foi confirmada por Corrado et al. (1966), que demonstraram, em cães, que a tripsina (dose superior a 12 mg/kg) depleta os estoques de bradicininogênio plasmático e libera bradicinina ou substâncias semelhantes às cininas na circulação. Por outro lado, a histamina parece desempenhar um importante papel na gênese da hipotensão desencadeada por esta enzima, visto que 3 mg/kg de tripsina, determinaram o aparecimento deste autacóide no sangue circulante.

Finalmente, estas peçonhas caracterizam-se por induzir, a nível local, volumoso edema; frequentemente produzem necrose do tecido atingido (Rosenfeld, 1971). A produção de edema induzido pela peçonha de *B. jararaca* em pata de rato foi recentemente descrita por Trebien & Calixto (1989). A utilização de inibidores da via da ciclooxygenase e lipoxigenase, bem como antagonistas de receptores alfa-1 e alfa-2 adrenérgicos e inibidores da fosfolipase A₂ revelou marcante inibição do edema induzido por 10 µg deste veneno por pata de animal. Entretanto, a participação dos autacóides clássicos como histamina, serotonina, bradicinina e PAF-acetér parece pouco contribuir para o efeito observado.

OBJETIVOS

- 1- Estudo comparativo da toxicidade das peçonhas de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararaca* em camundongos e pintainhos.
- 2- Detecção das atividades enzimáticas (fosfolipásica, TAME-esterásica, proteolítica, coagulante e hemorrágica) dos venenos totais de *B. erythromelas* e *B. jararaca*.
- 3- Fracionamento do veneno de *B. erythromelas* e detecção das atividades enzimáticas (exceto hemorrágica) nos picos obtidos.
- 4- Estudo do efeito do veneno de *B. erythromelas* sobre a pressão arterial sistêmica, respiração e tempo de coagulação de cães anestesiados, bem como intervenção farmacológica sobre este fenômeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- PEÇONHA

Utilizaram-se as peçonhas de *B. erythromelas* e *B. jararaca*, gentilmente cedidas pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP)

2- ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos Swiss provenientes do Biotério Central da UNICAMP e pintainhos que foram gentilmente cedidos pela granja Ito (Campinas, SP). Os cães foram obtidos junto ao canil da UNICAMP.

3- TOXICIDADE

O estudo da toxicidade da peçonha de *B. erythromelas* foi realizado comparativamente ao da peçonha de *B. jararaca*. Utilizaram-se 24 animais por experimento, empregando-se 6 animais por dose. Camundongos Swiss (18-22 g) foram injetados pela via intraperitoneal e pintainhos (40-50 g), pela via intramuscular (músculo peitoral esquerdo). Os animais foram observados por um período de 24 horas após a administração da peçonha. Esta foi dissolvida em salina 0,85% para obtenção de uma solução mãe, a partir da qual prepararam-se 4 soluções em diferentes concentrações. As razões 1,5 e 2,0 foram empregadas, respectivamente para camundongos e pintainhos. Os valores de dose letal 50% (DL₅₀) foram obtidos utilizando-se o método de Weil (1952).

4- GEL FILTRAÇÃO

Sephadex G-75 ou G-100 foi previamente equilibrado à temperatura ambiente com Tris-HCl (100 mM; pH 7,4). Tanto o empacotamento como a eluição das frações foram realizados a 5°C. A qualidade do empacotamento foi confirmada

por meio de uma solução de azul de dextran (2 mg/ml), cujo peso molecular é superior a 2×10^6 . A peçonha de *B. erythromelas* (100 mg) foi então dissolvida em 6 ml de salina 0,85% e centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante límpido foi adicionado à coluna (90 x 2 cm). Frações de 2,0 e 2,5 ml, respectivamente para Sephadex G-75 e G-100, foram coletadas a um fluxo constante de 30 ml/hora. A concentração proteica das frações foi determinada medindo-se a absorbância a 280 nm.

5- ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A determinação das atividades enzimáticas do veneno total de *B. erythromelas* e de suas frações foi realizada.

5.1- ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A atividade fosfolipásica foi avaliada segundo o método descrito por Lôbo de Araújo & Radvany (1987). A 1,0 ml de meio de reação acrescentaram-se 10 μ l da peçonha em diferentes concentrações ou 10 μ l das frações. Após 15 minutos fez-se a leitura da absorbância a 558 nm contra o branco ao qual se adicionou tampão Tris-HCl (100 mM; pH 7,4). O meio de reação continha lecitina de ovo (3,5 mM) solubilizada em colato de sódio (4,0 mM), NaCl (100 mM) e vermelho de fenol (0,055 mM). Este meio foi ajustado em 1,0 de absorbância através da adição de NaOH (100 mM).

5.2- ATIVIDADE TAME-ESTERÁSICA

Determinou-se a atividade TAME-esterásica segundo o método de Hummel (1959). A 2,9 ml de meio de reação acrescentaram-se 100 μ l da peçonha em diferentes concentrações, ou 50 μ l das frações. Efetuou-se a leitura a 247 nm. O meio de reação continha o substrato TAME (500 mM), Tris-HCl (5,0 mM) e CaCl_2 (10 mM).

5.3- ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Foi determinada como descrito por Mandelbaum et al. (1982), que preconizam a caseína como substrato. A 1,0 ml de meio de caseína 2% contendo 100 μ l de CaCl_2 (80 mM) e 100 μ l de NaCl (150 mM) adicionaram-se o veneno ou as diferentes frações. Após 30 minutos de reação (37°C), acrescentaram-se 3,0 ml de ácido tricloroacético 5%. A solução permaneceu em banho de gelo por 60 minutos, filtrando-se em seguida. A concentração proteica foi determinada através da técnica descrita por Hartree (1972).

5.4- ATIVIDADE COAGULANTE

Foi determinada através do método descrito por Nahas et al. (1979). A 250 μ l de plasma humano citratado (1,0 ml de citrato de sódio 3,8% para 9,0 ml de sangue) adicionaram-se 50 μ l da peçonha em diferentes concentrações ou igual volume das frações. Cronometrou-se então o tempo de coagulação (formação da rede de fibrina) de cada amostra.

5.5- ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Determinou-se a atividade hemorrágica segundo o método de Kondo et al. (1960). Camundongos Swiss (18-22 g) foram injetados intradermicamente com concentrações crescentes da peçonha contida em um volume constante de 100 μ l. Seis horas após a injeção, os animais foram sacrificados e o halo hemorrágico foi medido. A dose hemorrágica mínima foi definida como sendo a menor quantidade de peçonha capaz de causar uma reação de 5 mm de diâmetro, 6 horas após a administração intradérmica.

6- PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA, RESPIRAÇÃO E TEMPO DE COAGULAÇÃO DE CÃES ANESTESIADOS

Para o estudo da atividade da peçonha de *B. erythromelas* sobre o sistema cardiovascular foram utilizados cães de ambos os sexos (4,8 a 16,0 kg), anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg, e.v.). A traquéia foi exposta e canulada. Foi usada uma cânula traqueal provida de duas saídas laterais. Uma das saídas foi conectada a um tambor de Marey a fim de se registrar os movimentos respiratórios de cada animal; a outra, permitiu a instalação de respiração artificial quando esta se fez necessária. Uma cânula de François Frank foi então inserida em uma das carótidas para registro da pressão arterial média através de um manômetro de Ludwig. Uma cânula de polietileno foi inserida na veia femoral para administração de drogas e outra, na artéria femoral para coleta de sangue. As amostras de sangue foram utilizadas para a determinação do tempo de coagulação, colocando-se 0,5 ml de sangue total em um tubo de vidro, de espessura e diâmetro constantes, e cronometrando-se, a 37°C, o tempo para a ocorrência da coagulação.

Neste estudo, subdividimos os animais em dois grupos: aqueles que receberam exclusivamente o veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg, e.v.) e aqueles previamente tratados com diferentes substâncias para avaliarmos a participação de diferentes mediadores nas alterações evocadas pela peçonha. Os animais submetidos aos diferentes pré-tratamentos foram comparados aos animais que receberam exclusivamente o veneno (animais controle). Os pré-tratamentos utilizados foram:

Heparina (200 e 1000 UI/kg),

Sulfato de Celulose (2 administrações de 20 mg/kg),

N^W-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 100 mg/kg),

Indometacina (10 mg/kg) e

Sulfato de Celulose e Indometacina (doses supramencionadas).

Os seguintes mecanismos de ação são propostos para as drogas supramencionadas:

Heparina: Acelerador da inibição da trombina pela antitrombina III;

Sulfato de celulose: Depletor parcial do cininogênio plasmático de alto peso molecular;

L-NAME: Inibidor da óxido nítrico sintetase;

Indometacina: Inibidor da enzima ciclooxigenase.

Avaliamos ainda o antagonismo químico pelo soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan. Foram utilizadas doses de 1, 3, 10 e 30 ml de soro para 5 mg de peçonha, injetadas cerca de 15 minutos antes da administração do veneno.

7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aplicaram-se testes estatísticos para determinação das médias e dos erros padrão das médias (EPM). A significância foi considerada a nível de 5% ($p < 0,05$) para o teste de t-Student (Snedecor, 1963) e análise de variância (ANOVA; Denenberg, 1976). Em alguns casos, à análise de variância seguiu-se o teste de Duncan para comparações múltiplas (Duncan, 1955; Kramer, 1956).

RESULTADOS

1- TOXICIDADE

Nossos resultados demonstraram que os pintainhos são mais sensíveis à peçonha de *B. erythromelas* do que os camundongos. Em relação à peçonha de *B. jararaca*, verificamos que esta relação se inverteu e os camundongos foram mais sensíveis do que os pintainhos (Tabela I).

	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. jararaca</i>
	(mg/kg)	
Pintainhos	1,49 (1,15-2,04)	6,06 (5,16-7,12)
Camundongos	3,05 (2,51-3,73)	0,85 (0,62-1,13)

TABELA I: DL50 e limites fiduciais das peçonhas de *B. erythromelas* e de *B. jararaca* em pintainhos (via intramuscular) e camundongos (via intraperitoneal).

2- FRACIONAMENTO

Nesta etapa, verificamos que o perfil cromatográfico obtido no fracionamento da peçonha de *B. erythromelas* em Sephadex G-100 (Fig. 2B) revelou uma melhor resolução que aquele realizado em Sephadex G-75 (Fig. 2A). No fracionamento realizado em Sephadex G-75 observamos o aparecimento de 3 picos distintos (picos I, II e III), enquanto o fracionamento em Sephadex G-100, determinou o aparecimento de um quarto pico (picos I, II, III e IV).

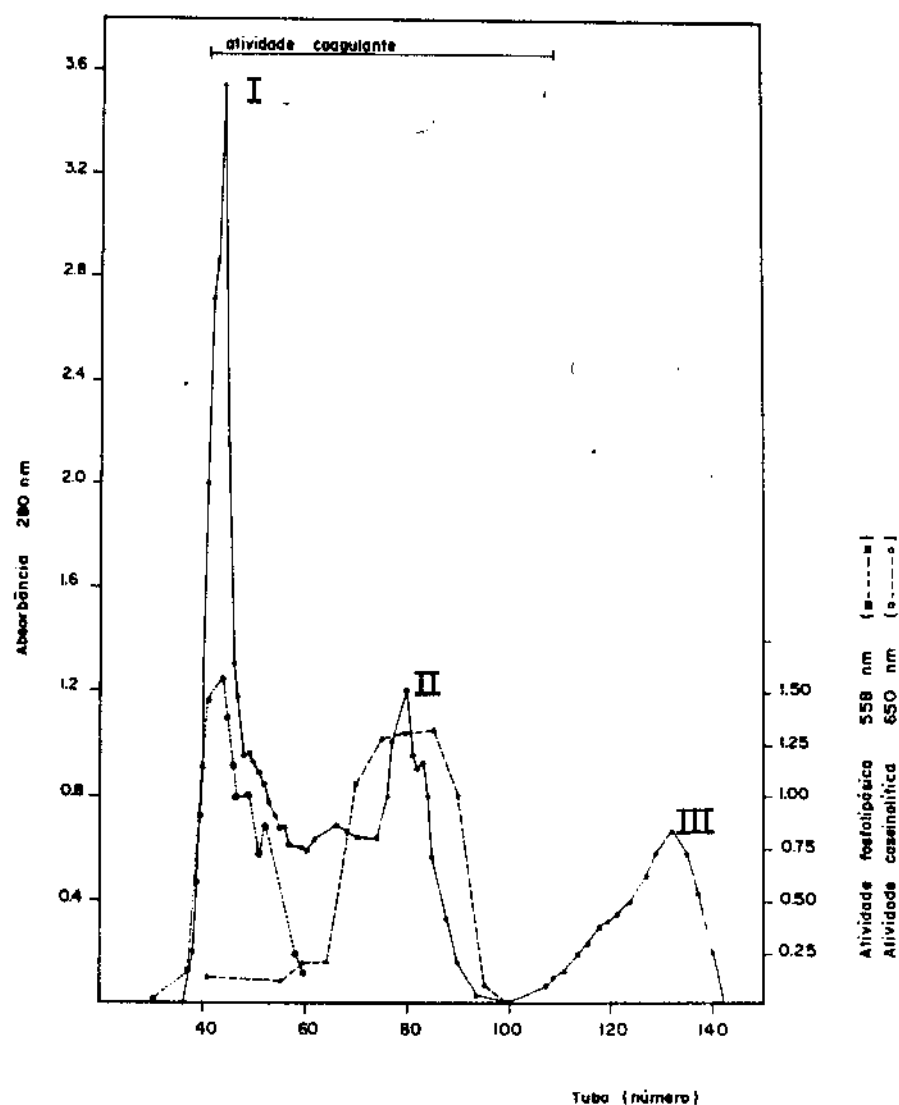


Figura 2A: Fracionamento do veneno de *B. erythromelas* em Sephadex G-75. Dissolveram-se 100 mg da peçonha em 6 ml de salina 0,85% e adicionaram-se à coluna (90 x 2 cm) de Sephadex equilibrado com tampão Tris-HCl (100 mM; pH 7,4). Frações de 2,0 ml foram coletadas a um fluxo de 30 ml/h, a 5°C. As atividades coagulante, proteolítica (caseinolítica) e fosfolipásica são apresentadas.

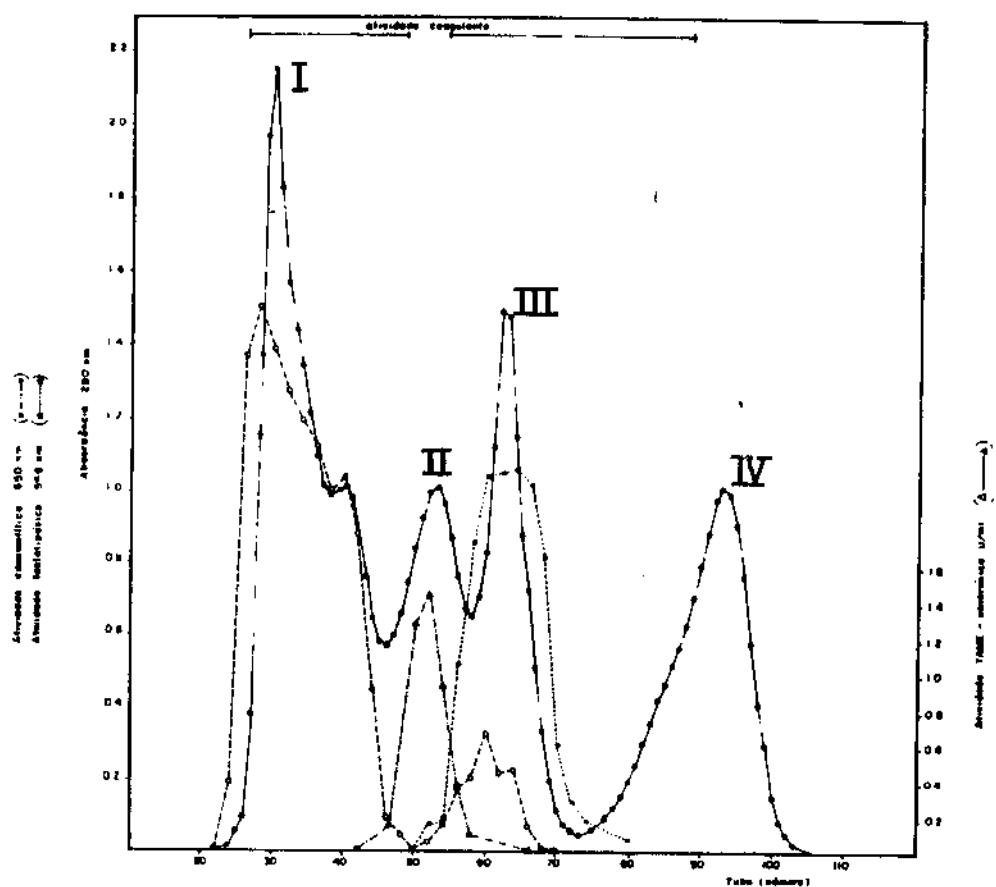


Figura 2B: Fracionamento do veneno de *B. erythromelas* em Sephadex G-100. Dissolveram-se 100 mg da peçonha em 6 ml de salina 0,85% e adicionaram-se à coluna (90 x 2 cm) de Sephadex equilibrado com tampão Tris-HCl (100 mM; pH 7,4). Frações de 2,5 ml foram coletadas a um fluxo de 30 ml/h, a 5°C. As atividades coagulante, proteolítica (caseinolítica), TAME-esterásica e fosfolipásica são apresentadas.

3- ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.1- VENENO TOTAL

Na Tabela II, observamos que a peçonha de *B. erythromelas* apresentou atividades fosfolipásica, proteolítica, TAME-esterásica, hemorrágica e coagulante, atividades estas, presentes também na peçonha de *B. jararaca*. Com relação à atividade fosfolipásica, verificamos que não houve diferença significativa entre as peçonhas de *B. erythromelas* e *B. jararaca* quanto à eficácia em degradar a lecitina de ovo solubilizada em colato de sódio. Verificou-se o mesmo padrão em relação à atividade proteolítica, medida sobre a caseína. Por outro lado, observamos que a atividade TAME-esterásica da peçonha de *B. jararaca* foi 2,5 vezes superior a encontrada para a peçonha de *B. erythromelas*. Quanto à atividade hemorrágica, verificamos que a quantidade de peçonha necessária para a formação de um halo hemorrágico de proporções padronizadas foi cerca de seis vezes maior para a peçonha de *B. erythromelas* do que para a peçonha de *B. jararaca*. No entanto, observamos que com relação à atividade coagulante, a relação se inverteu, e a peçonha de *B. erythromelas* superou a peçonha de *B. jararaca*, em mais de dez vezes, na eficácia em coagular o plasma citratado.

	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. jararaca</i>
Proteolítica (U/mg peçonha)	2,49	2,32
TAME-esterásica (U/mg peçonha)	0,40	1,05
Fosfolipásica (umoles/min x mg)	3,20	2,60
Hemorrágica (Dose mínima- μ g)	2,00	0,35
Coagulante (Dose mínima- μ g)	1,50	10,00

TABELA II: Atividades enzimáticas das peçonhas de *B. erythromelas* e de *B. jararaca*.

3.2- FRAÇÕES

Nas Figs. 2A e 2B, observamos que o pico I de ambos os fracionamentos apresentou atividade proteolítica. No entanto, no fracionamento em Sephadex G-100, verificamos o aparecimento de um segundo pico de atividade proteolítica (pico III) porém, de menor intensidade. Detectamos a atividade fosfolipásica nos picos II do fracionamento em Sephadex G-75 e III do fracionamento em Sephadex G-100. Por sua vez, a atividade TAME-esterásica somente foi revelada no fracionamento

em Sephadex G-100, correspondendo ao pico II. No fracionamento em Sephadex G-75, localizamos a atividade coagulante entre as frações 41 e 99 (picos I e II). Já no fracionamento em Sephadex G-100, a atividade coagulante esteve presente nos picos I, III, e porção ascendente do pico IV. Exceto pela presença de atividade coagulante na porção ascendente do pico IV do fracionamento B, nenhuma outra atividade enzimática foi detectada neste pico ou no pico III do fracionamento A.

4- PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA, RESPIRAÇÃO E TEMPO DE COAGULAÇÃO DE CÃES ANESTESIADOS

4.1- ANIMAIS CONTROLE

A Fig. 3 mostra um registro típico do choque produzido por 25 $\mu\text{g/kg}$ da peçonha de *B. erythromelas* injetados na veia femoral ("bolus"). Observamos que a queda da pressão arterial média induzida pela peçonha revelou a presença de dois componentes distintos. O primeiro manifestou-se por uma queda rápida, de pequena intensidade, seguida de rápida recuperação, que no entanto demonstrou ser parcial devido ao segundo componente hipotensor, responsável pelo choque. Verificamos que o primeiro componente determinou uma queda média de 51,2 mm Hg (Fig. 4), enquanto o segundo componente hipotensor determinou uma queda máxima de 76,8 mm Hg (Fig. 5). Aos 15 minutos observou-se uma recuperação de 50% dos níveis pressóricos e aos 120 minutos, valores próximos aos basais.

Na vigência do choque verificou-se diminuição da amplitude respiratória, que em 58,8% dos animais evoluiu para taquipnéia seguida de apnéia e morte (Fig. 6).

Com relação ao tempo de coagulação, observou-se que o tempo médio para ocorrência da coagulação foi de 144 segundos. Entretanto, imediatamente após a administração da peçonha, verificou-se um estado de hipercoagulabilidade (31 segundos). Aos 15 minutos o sangue apresentou-se incoagulável, efeito este que se manteve até 120 minutos.

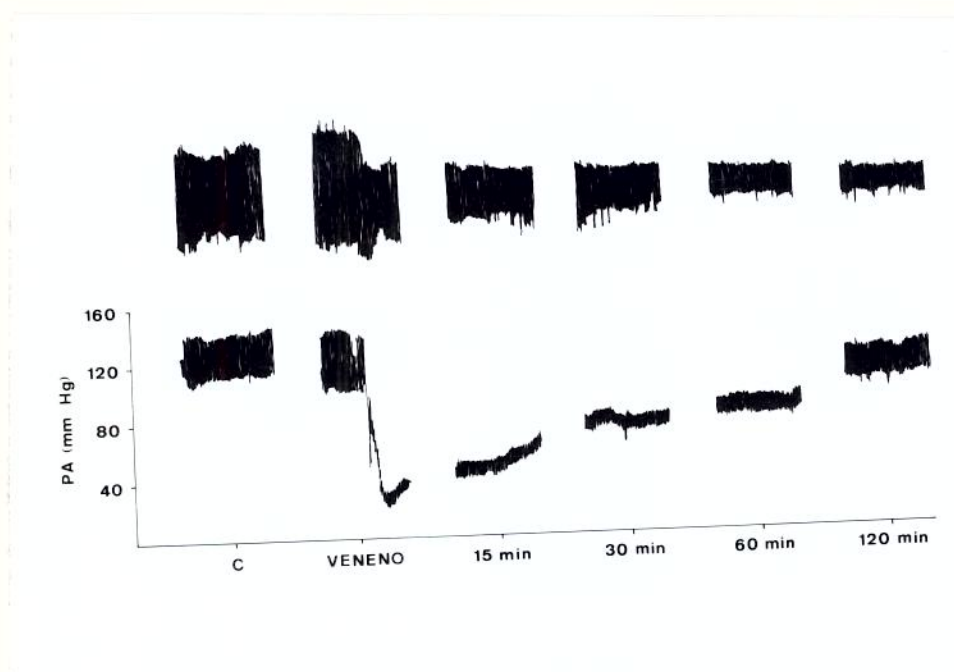


Figura 3: Efeito da peçonha de *B. erythromelas* sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados. A figura corresponde a um registro típico de 1 dos 5 animais sobreviventes (fêmea, 11,0 kg)

C - Estado anterior à administração da peçonha (basal)

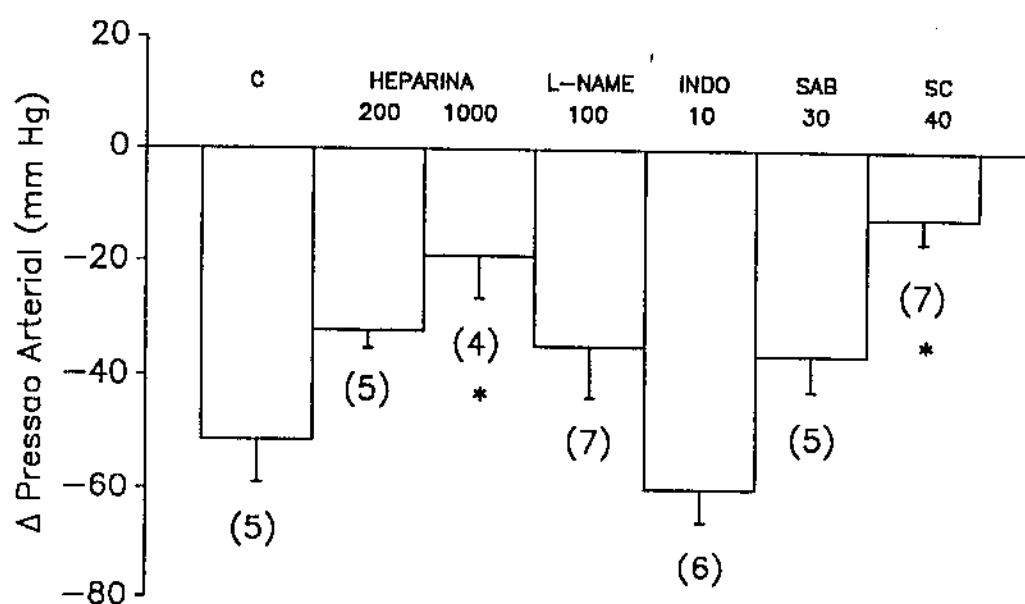


Figura 4: Inibição do primeiro componente hipotensor do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) em cães anestesiados pelo pré-tratamento com heparina (1000 UI/kg) e sulfato de celulose (SC, 40 mg/kg). A utilização de NW-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 mg/kg), indometacina (INDO, 10 mg/kg) ou soro antibotrópico (SAB, 30 ml para 5 mg de veneno) foi ineficaz. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM. Os valores entre parêntesis indicam o número de animais utilizados.

ANOVA; teste de Duncan (* $p < 0,05$)

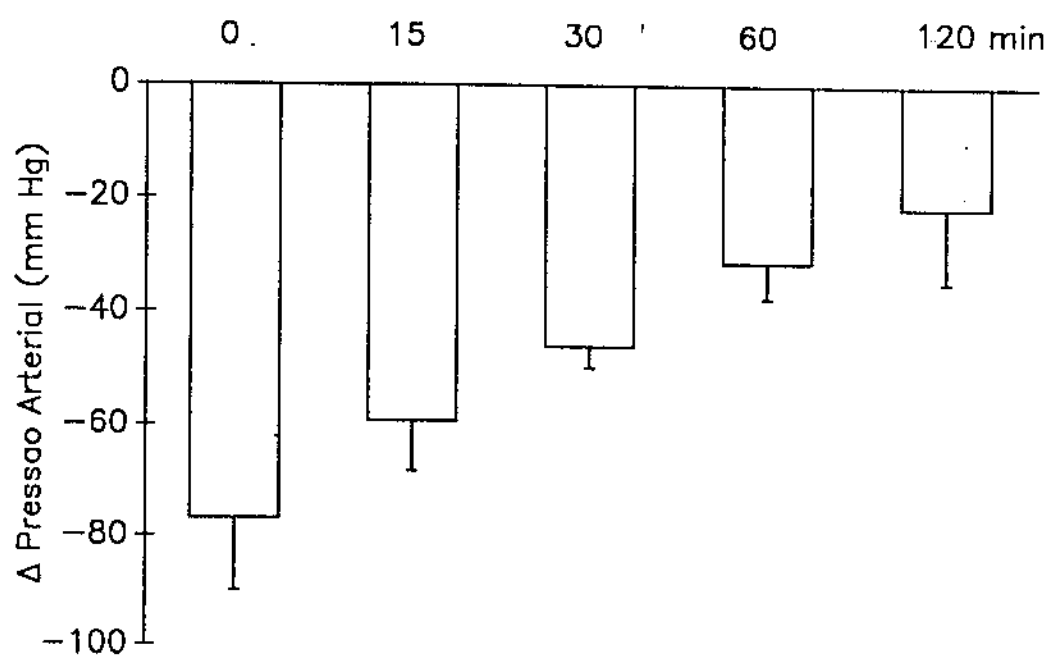


Figura 5: Curso temporal do segundo componente hipotensor após a administração do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) em cães anestesiados. Cada tempo experimental representa a média $\pm$ EPM de 5 determinações.

Teste t-Student para amostras pareadas (* $p < 0,05$)

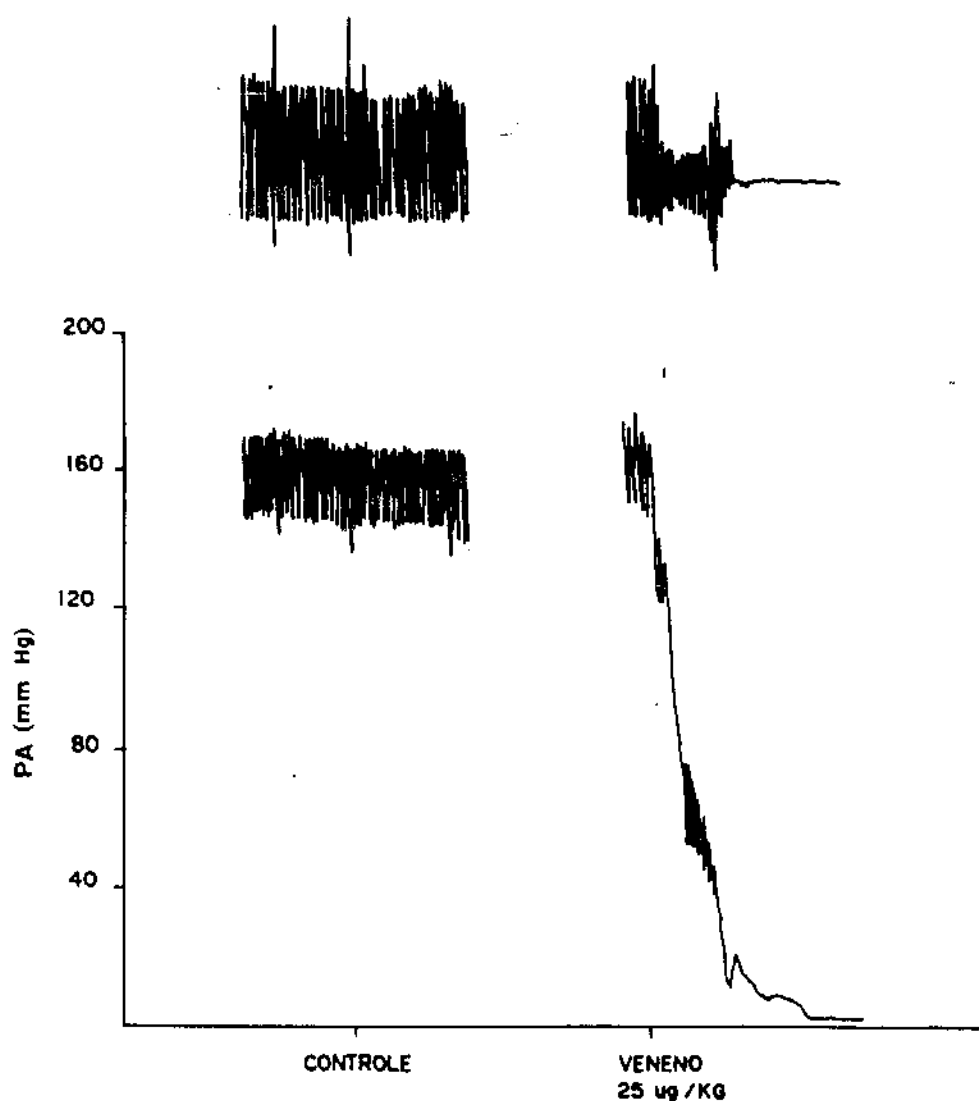


Figura 6: Efeito do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados. A figura corresponde a um registro típico da morte observada em 58,8% dos animais controle (7 em 12). Imediatamente após a administração do veneno observa-se uma diminuição da amplitude respiratória, a qual é seguida por um quadro de hiperpnéia que evolui para apnéia e morte.

4.2- ANIMAIS PREVIAMENTE TRATADOS COM HEPARINA

As Figs. 7 e 8 mostram um registro típico das alterações pressóricas produzidas pela peçonha de *B. erythromelas* em animais previamente tratados com heparina na dose de 200 (Fig. 7) e 1000 UI/kg (Fig 8). Verificamos que o primeiro componente hipotensor foi reduzido significativamente pela heparina na dose de 1000 UI/kg (Fig. 4). Por outro lado, o segundo componente hipotensor não foi significativamente alterado (Fig. 9). Verificou-se alteração na amplitude respiratória, mas todos os animais sobreviveram.

Quanto ao tempo de coagulação verificou-se que, para a dose de 200 UI/kg, o tempo inicial médio foi de 116 segundos; após a administração da peçonha, foi de 150 segundos. Para a dose de 1000 UI/kg, o tempo inicial médio foi de 75 segundos, e a coagulação não ocorreu após a administração da peçonha (o tempo máximo de observação foi de 5 minutos).

4.3- ANIMAIS PREVIAMENTE TRATADOS COM SULFATO DE CELULOSE

A Fig. 10 mostra um registro típico do choque produzido pela peçonha de *B. erythromelas* em animais previamente tratados com sulfato de celulose. Observamos que esta substância (20 mg/kg) produziu um profundo decréscimo da pressão arterial média ($90,0 \pm 15,4$ mm Hg de queda, $n=6$), tornando o sangue incoagulável. A recuperação dos níveis pressóricos ocorreu, em média, depois de 30 minutos. A administração de uma segunda dose de sulfato de celulose (20 mg/kg) não produziu alterações nos níveis pressóricos. Após a administração da peçonha, verificou-se que o primeiro componente hipotensor foi marcadamente inibido (Fig. 4) e o tempo de latência para a ocorrência do fenômeno foi retardado (o início da queda ocorreu, em média, em mais de um minuto, contra 15 segundos nos animais controle); por outro lado, nenhuma alteração foi verificada em relação ao segundo componente (Fig. 11). As alterações respiratórias estiveram ausentes e todos os animais sobreviveram. Observou-se também que o sangue, após a

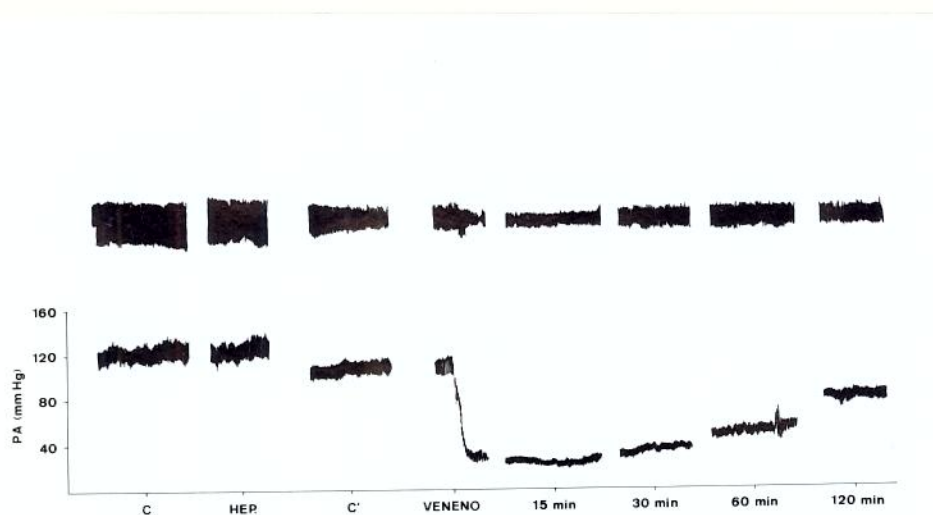


Figura 7: Efeito do veneno de *B. erythromelas* ($25 \mu\text{g/kg}$) sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados que foram previamente tratados com heparina (200 UI/kg , HEP.). A figura corresponde a um registro típico de 1 dos 5 animais estudados (fêmea; $7,6 \text{ kg}$). Todos os animais sobreviveram.

C - Estado anterior ao pré-tratamento (basal)

C' - Controle após o pré-tratamento

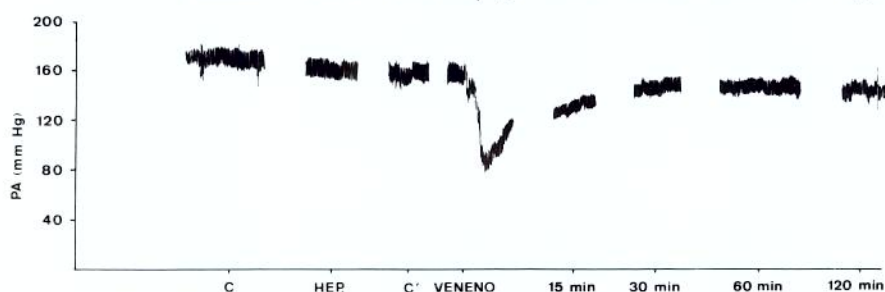


Figura 8: Efeito do veneno de *B. erythromelas* (25 $\mu\text{g/kg}$) sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados que foram previamente tratados com heparina (1000 UI/kg, HEP.). A figura corresponde a um registro típico de 1 dos 4 animais estudados (macho; 11,3 kg). Todos os animais sobreviveram.

C - Estado anterior ao pré-tratamento (basal)

C' - Controle após o pré-tratamento

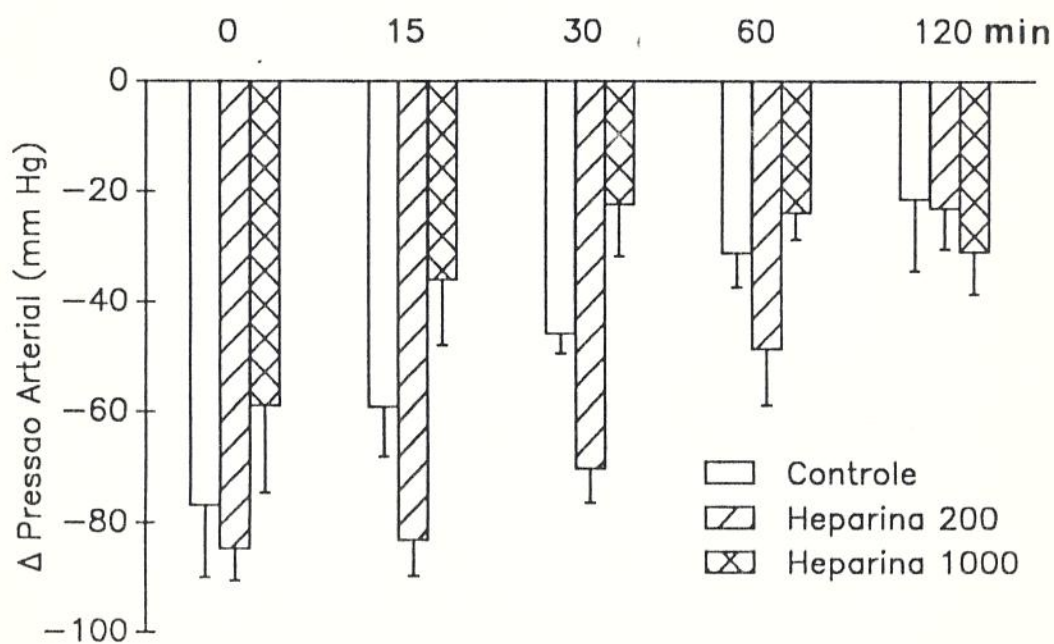


Figura 9: Efeito do pré-tratamento com heparina (200 e 1000 UI/kg) sobre o curso temporal do segundo componente hipotensor após a administração do veneno de *B. erythromelas* (25 μ g/kg). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 determinações para o grupo controle, 5 para heparina na dose de 200 UI/kg e 4 para a dose de 1000 UI/kg.

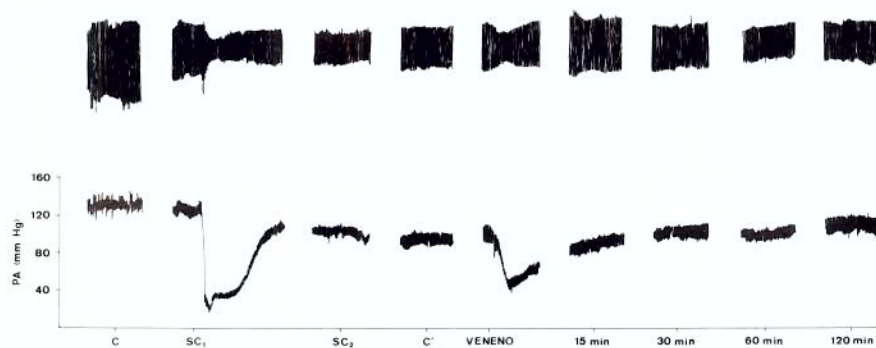


Figura 10: Efeito do veneno de *B. erythromelas* (25 μ g/kg) sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados que foram previamente tratados com sulfato de celulose (20 mg/kg, SC₁ = SC₂). A figura corresponde a um registro típico de 1 dos 7 animais estudados (fêmea; 11,0 kg). Todos os animais sobreviveram.

C - Estado anterior ao pré-tratamento (basal)

C' - Controle após o pré-tratamento

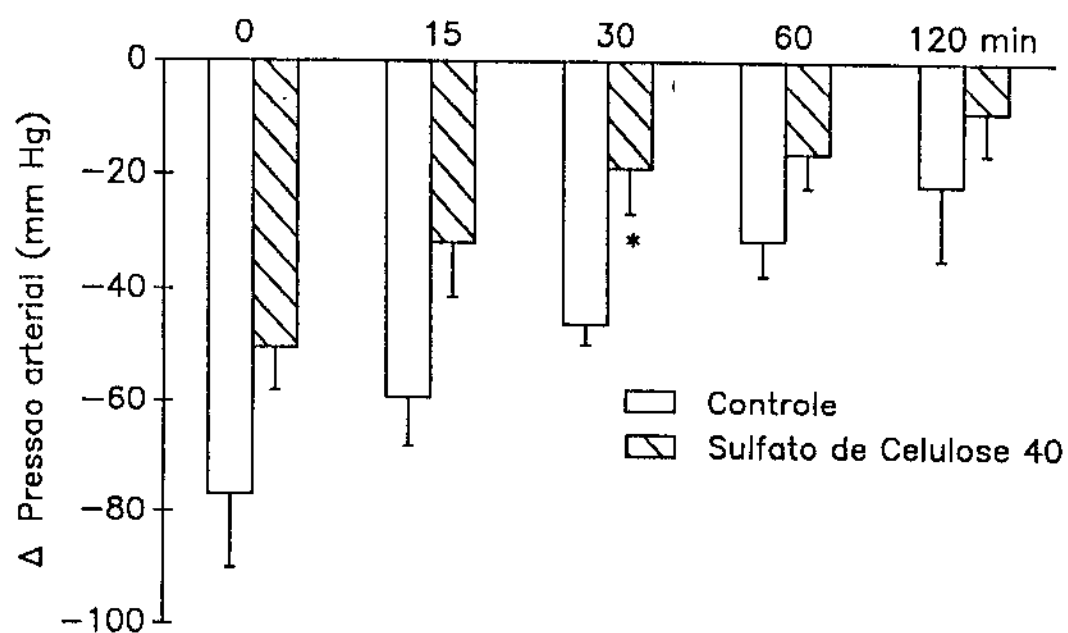


Figura 11: Efeito do pré-tratamento com sulfato de celulose (40 mg/kg) sobre o curso temporal do segundo componente hipotensor após a administração do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) em cães anestesiados. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de 5 determinações para o grupo controle e 7 para o grupo tratado.

Teste de t-Student (* $p < 0,05$)

administração da peçonha, não coagulou (tempo de coagulação inicial média igual a 118 segundos).

4.4- ANIMAIS PREVIAMENTE TRATADOS COM L-NAME

A Fig. 12 apresenta um registro típico das alterações pressóricas induzidas pela peçonha de *B. erythromelas* em animais previamente tratados com L-NAME. Observou-se que, na dose utilizada, esta substância determinou um profundo decréscimo da pressão arterial média, em todos os animais utilizados ($80,8 \pm 13,9$ mm Hg de queda, $n=7$), com rápida recuperação (10 minutos). Após a administração da peçonha, nenhuma alteração foi notada em relação aos índices de queda pressórica, ou seja, os valores encontrados não diferiram daqueles dos animais controle (Figs. 4 e 13). No entanto, observou-se uma recuperação nitidamente mais rápida a partir de 15 minutos ($p < 0,05$). Alterações respiratórias estiveram presentes, mas todos os animais sobreviveram.

O tempo de coagulação inicial foi, em média, igual a 96 segundos; após o pré-tratamento foi igual a 83 segundos, e após a administração da peçonha, registrou-se um tempo de 30 segundos.

4.5- ANIMAIS PREVIAMENTE TRATADOS COM INDOMETACINA

A Fig. 14 apresenta o registro das alterações pressóricas produzidas pela peçonha de *B. erythromelas* em animais previamente tratados com indometacina. Com relação ao primeiro componente hipotensor, nenhuma inibição foi verificada (Fig. 4), bem como com relação ao segundo componente (Fig. 15). No entanto, observou-se uma recuperação acelerada dos níveis pressóricos, com valores significativamente diferentes aos 15 minutos ($p < 0,05$). Em 50% dos casos, observou-se que o segundo componente hipotensor foi completamente abolido. Houve alterações respiratórias, mas todos os animais sobreviveram.

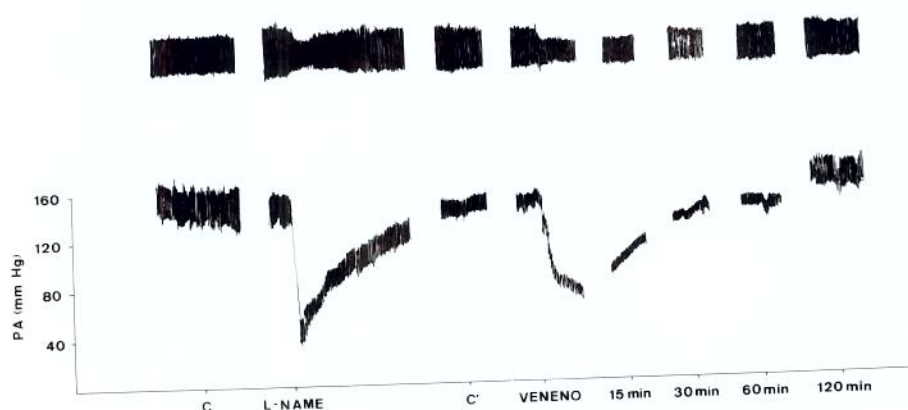


Figura 12: Efeito do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados que foram previamente tratados com N^W-Nitro-L-arginina metil éster (100 mg/kg, L-NAME). A figura corresponde a um registro típico de 1 dos 7 animais estudados (fêmea; 9,0 kg). Todos os animais sobreviveram.

C - Estado anterior ao pré-tratamento (basal)

C' - Controle após o pré-tratamento

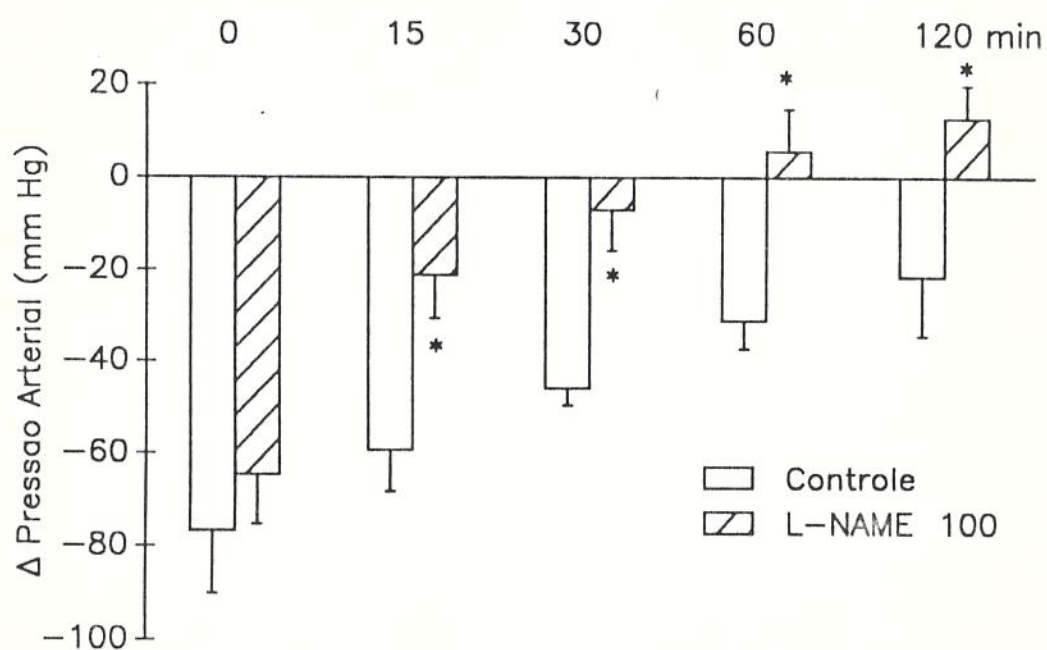


Figura 13: Efeito do pré-tratamento com NW-Nitro-L-arginina metil éster (100 mg/kg, L-NAME) sobre o curso temporal do segundo componente hipotensor após a administração do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) em cães anestesiados. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 determinações para o grupo controle e 7 para o tratado.

Teste de t-Student (* $p < 0,05$)

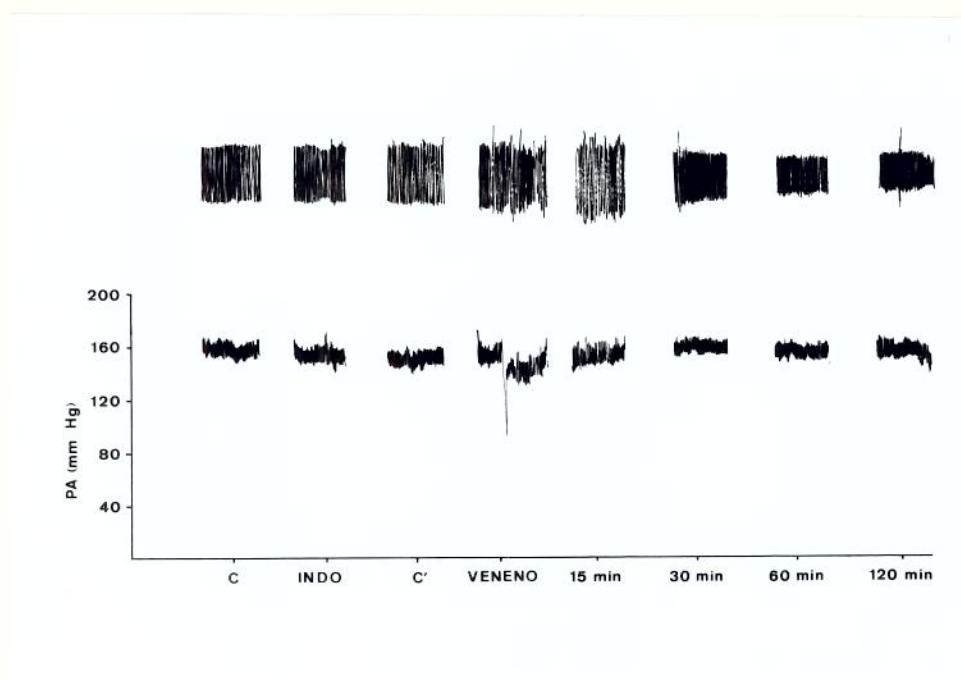


Figura 14: Efeito do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados que foram previamente tratados com indometacina (10 mg/kg, INDO). A figura corresponde a um registro típico obtido em 50% dos animais, onde o segundo componente hipotensor foi completamente abolido (macho; 6,0 kg). Todos os animais sobreviveram.

C - Estado anterior ao pré-tratamento (basal)

C' - Controle após o pré-tratamento

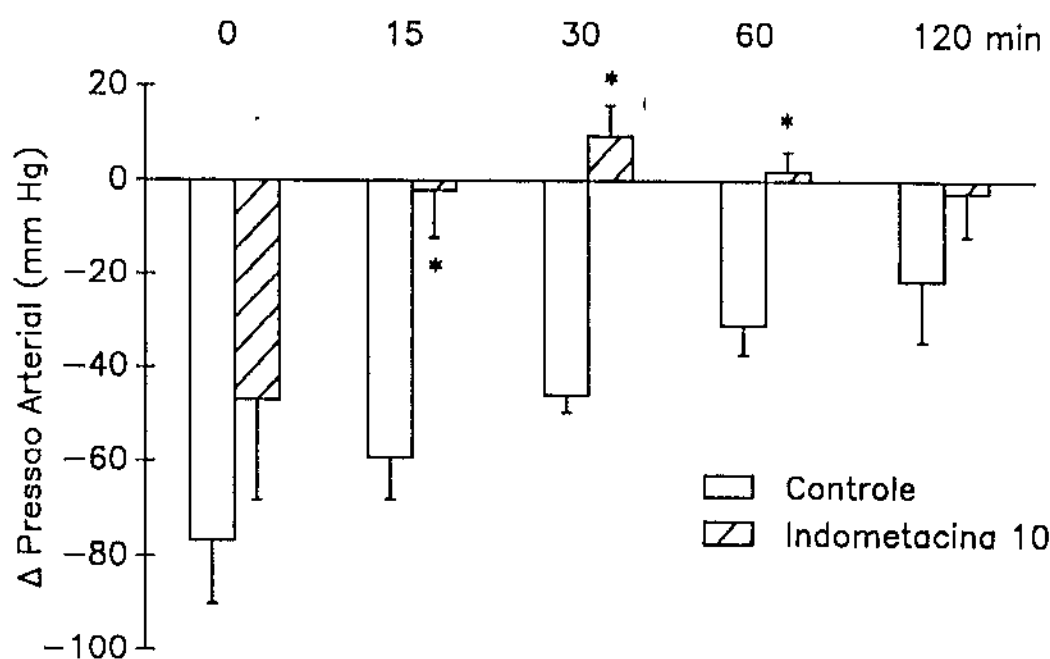


Figura 15: Efeito do pré-tratamento com indometacina (10 mg/kg) sobre o curso temporal do segundo componente hipotensor após a administração do veneno de *B. erythromelas* (25 µg/kg) em cães anestesiados. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 determinações para o grupo controle e 6 para o tratado.

Teste de t-Student (* $p < 0,05$)

O tempo de coagulação inicial, foi, em média, igual a 130 segundos, decaindo para 69 segundos, após o pré-tratamento e para 24 segundos após a administração da peçonha.

4.6- ANIMAIS PREVIAMENTE TRATADOS COM SULFATO DE CELULOSE E INDOMETACINA

A Fig. 16 apresenta um registro típico do efeito do pré-tratamento com sulfato de celulose e indometacina sobre o efeito hipotensor da peçonha de *B. erythromelas*. Verificou-se que a combinação destas substâncias foi eficaz em bloquear completamente os efeitos da peçonha sobre a pressão arterial média. Nenhuma alteração respiratória foi observada e todos os animais sobreviveram.

O tempo de coagulação inicial foi, em média, igual a 92 segundos. Após o pré-tratamento com sulfato de celulose, o sangue tornou-se incoagulável, estado este que se manteve ao longo de 120 minutos.

4.7- ANIMAIS PREVIAMENTE TRATADOS COM SORO ANTIBOTRÓPICO

A Fig. 17 apresenta um registro típico das alterações pressóricas induzidas pela peçonha de *B. erythromelas* em animais previamente tratados com soro antibotrópico do Instituto Butantan, na dose de 30 ml para 5 mg de peçonha. A proteção recomendada por este Instituto é de 1 ml para 5 mg da peçonha de *B. jararaca*. Esta dose, bem como as doses de 3 e 10 ml para 5 mg, foi por nós testada, e os resultados não diferem daqueles encontrados para os animais controle (dados não apresentados). Quando utilizamos a dose de 30 ml para 5 mg da peçonha de *B. erythromelas* verificamos que este composto não foi eficaz em alterar nenhum dos dois componentes hipotensores (Figs. 4 e 18), acelerando, no entanto, a recuperação dos níveis pressóricos a partir de 30 minutos. As alterações respiratórias, mesmo presentes, não determinaram a morte dos animais.

Por sua vez, o soro antibotrópico foi eficaz em evitar o estado de incoagulabilidade sanguínea (Tabela III).

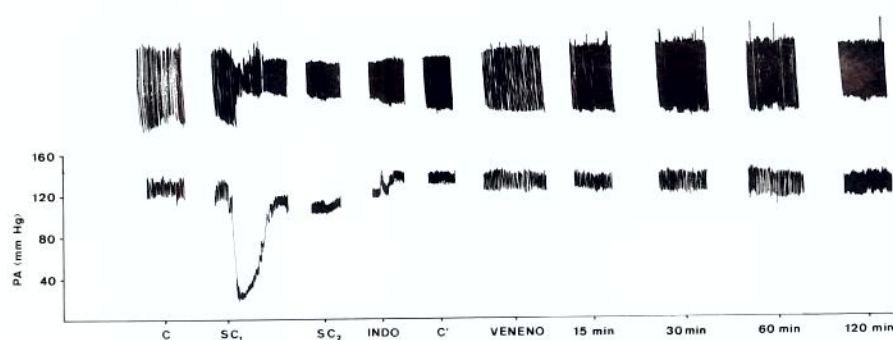


Figura 16: Inibição do efeito hipotensor do veneno de *B. erythromelas* (25 μ g/kg) em cães anestesiados que foram previamente tratados com sulfato de celulose (20 mg/kg, SC₁ = SC₂) e indometacina (10 mg/kg, INDO). A figura corresponde a um registro típico de 1 dos 4 animais estudados (macho; 8,9 kg).

C - Estado anterior aos pré-tratamentos (basal)

C' - Controle após os pré-tratamentos

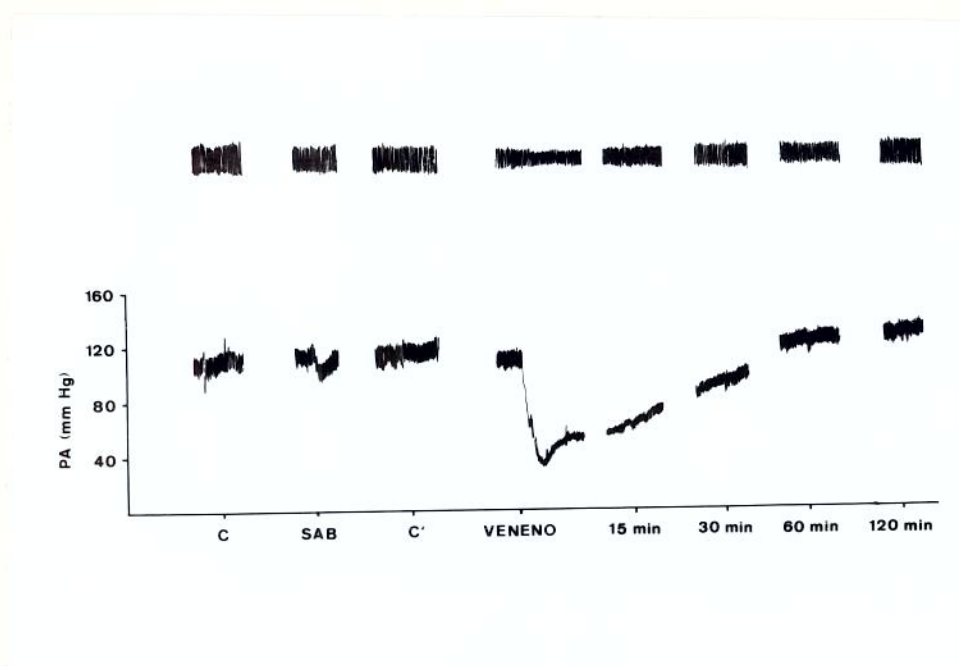


Figura 17: Efeito do veneno de *B. erytromelas* (25 $\mu\text{g/kg}$) sobre a pressão arterial (carotídeana) e a respiração de cães anestesiados que foram previamente tratados com soro antibotrópico (30 ml para 5 mg de veneno, SAB). Esta dose corresponde a 30 vezes à proteção preconizada pelo Instituto Butantan. A figura corresponde a um registro típico de 1 dos 5 animais estudados (fêmea; 5,4 kg). Todos os animais sobreviveram.

C - Estado anterior ao pré-tratamento (basal)

C' - Controle após o pré-tratamento

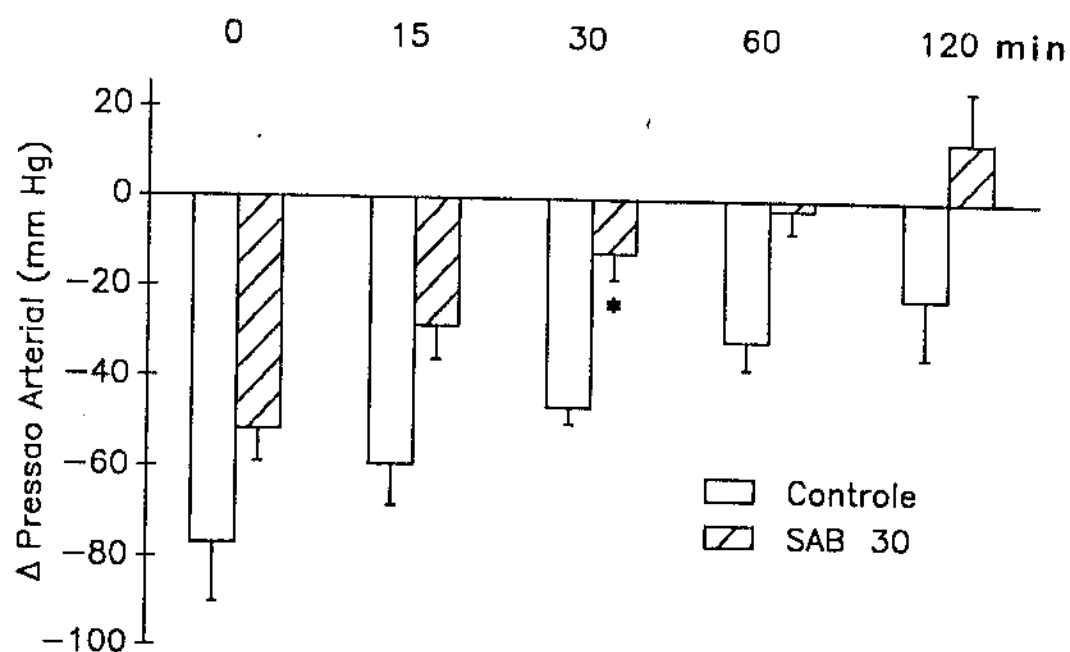


Figura 18: Efeito do pré-tratamento com SAB (30 ml para 5 mg de veneno) sobre o segundo componente hipotensor após a administração da peçonha de *B. erythromelas* (25 $\mu\text{g/kg}$) em cães anestesiados. Cada valor representa a média $\pm$ EPM de 5 determinações.

Teste de t-Student (* $p < 0,05$)

Tempo (min)	TC (seg)
-30 (Basal)	131 seg
-15 (Após SAB)	103 seg
0 (Após peçonha)	50 seg
15	160 seg
30	144 seg
60	105 seg
120	112 seg

TABELA III: Tempo de coagulação (TC) do plasma citratado de cães anestesiados que foram previamente tratados com soro antibotrópico (SAB) na dose de 30 ml para 5 mg de peçonha.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade diferem dos descritos por Vellard em 1938, que referiu ser a peçonha de *B. erythromelas* cerca de 10 vezes mais tóxica do que a de *B. jararaca*. Entretanto confirmaram os dados de Furtado et al. (1991), que relataram uma DL₅₀ igual a 3,03 mg/kg em camundongos injetados pela via intraperitoneal. Interessante é a elevada toxicidade para pintainhos. Fato semelhante ocorre com a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (Vital Brazil et al., 1966), onde até mesmo os sinais que precedem a morte sugerem efeitos da peçonha sobre a junção neuromuscular. Estes sinais traduzem-se por ptose palpebral, fraqueza muscular generalizada, especialmente no que se refere à musculatura cervical e evoluem para dispnéia, convulsões e morte. Estas observações sugerem efeitos neurotóxicos para a peçonha de *B. erythromelas*, fato este que foi descrito por Vellard, já em 1938.

Com relação aos efeitos cardiovasculares induzidos pela administração endovenosa da peçonha em cães, observamos que a resposta hipotensora revelou dois componentes distintos. O primeiro componente hipotensor foi significativamente reduzido pelos pré-tratamentos com sulfato de celulose e heparina (1000 UI/kg). Para o sulfato de celulose, este efeito inibitório poderia ser explicado pelo fato de este composto ser um agente depletor do cininogênio plasmático de alto peso molecular (Rothschild, 1968a,b). Paralelamente, sabe-se que, proteases, tais como tripsina, calicreína e nagarse, são capazes de liberar cininas a partir de tal cininogênio e conseqüentemente, promover o choque quando injetadas endovenosamente (Corrado et al., 1966). Considerando-se que na peçonha de *B. erythromelas* existem proteases, as quais foram detectadas em ambos os fracionamentos realizados, é provável que tais enzimas estejam envolvidas na

liberação de cininas. Na vigência do pré-tratamento com sulfato de celulose, tal liberação estaria prejudicada (consumo de substrato), explicando assim a inibição observada.

A heparina promoveu efeitos semelhantes aqueles obtidos com sulfato de celulose. A heparina catalisa a reação trombina-antitrombina III. Além disso, a antitrombina inibe outros fatores da coagulação sanguínea, tais como, fatores X, IX, XI e XII ativados, além da calicreína plasmática (Majerus et al., 1990), que é a enzima responsável pela conversão do cininogênio de alto peso molecular em bradicinina. O precursor da calicreína, a pré-calicreína é uma proteína inativa que está ligada ao cininogênio plasmático na proporção de 1:1 (Kaplan & Silverberg, 1987). A pré-calicreína, por sua vez, é ativada pelo fator de Hageman ativado, uma protease que é comum aos sistemas gerador de cininas e de coagulação (Garrison, 1990). A inibição múltipla de fatores da coagulação pela antitrombina III explicaria a redução da resposta do primeiro componente hipotensor também pela maior dose de heparina utilizada, devido, provavelmente à interferência na síntese de bradicinina. Resta aqui dizer que ambos os pré-tratamentos aboliram completamente a letalidade, que foi observada em 58,8% dos animais controle. Considerando-se ainda, que o sulfato de celulose também é capaz de depletar cerca de 69% do fibrinogênio circulante no rato (Rothschild & Almeida, 1969), verificamos que ambos os compostos estudados apresentam duas características em comum, refletidas na capacidade destas substâncias em alterar a coagulação sanguínea, bem como o sistema gerador de cininas.

Com relação ao efeito destas drogas sobre a coagulação, nossos dados estão parcialmente de acordo com resultados de Rothschild & Almeida (1969), que verificaram que ratos previamente tratados com sulfato de celulose ou heparina desenvolveram proteção contra o efeito letal da peçonha de *B. jararaca*, ainda que o sulfato de celulose não tenha tornado o sangue incoagulável. Em vista de tais

resultados, estes autores sugerem que a coagulação intravascular disseminada seja a "causa mortis" neste envenenamento experimental. Considerando-se que a peçonha de *B. erythromelas* apresenta uma atividade coagulante bastante superior a da *B. jararaca*, tal fato poderia também ser verdadeiro em nossos experimentos, uma vez que a dose de 200 UI/kg de heparina também foi eficaz em evitar a letalidade, embora não tenha alterado o primeiro componente hipotensor.

Com relação ao segundo componente hipotensor, observamos que o pré-tratamento dos animais com indometacina aboliu esta resposta em 50% dos casos, permitindo, no entanto, uma sobrevida de 100% dos animais empregados. Quando associamos sulfato de celulose com indometacina, verificamos que as alterações na pressão arterial média foram completamente inibidas. Diante deste resultado, acreditamos que bradicinina esteja envolvida na primeira fase hipotensora e que eicosanóides com ação vasodilatadora, tais como prostaciclina e/ou prostaglandina E₂ participem na segunda fase.

Neste ponto várias hipóteses podem ser levantadas no sentido de se entender o mecanismo pelo qual o veneno é capaz de liberar eicosanóides. É sabido que a própria bradicinina é capaz de liberar prostaciclina de células endoteliais (D'Orleans-Juste et al., 1989) e desta forma, poderíamos supor que a primeira fase induziria a segunda. No entanto, essa hipótese não foi confirmada em nossos experimentos realizados com sulfato de celulose ou heparina, os quais inibiram parcialmente a primeira fase sem no entanto interferir na segunda fase. Além disso, deve-se lembrar que fosfolipase A₂ foi também detectada em nossos fracionamentos, e que esta enzima, atuando sobre fosfolipídeos de membrana, gera ácido araquidônico, o qual por sua vez, pode ser convertido em eicosanóides por ação da enzima ciclo-oxigenase. De fato vários são os mecanismos possíveis para a liberação de prostaglandinas por este veneno. Futuras investigações se fazem

necessárias para se tentar elucidar qual ou quais são os fenômenos envolvidos em tal liberação.

Curiosos são os resultados obtidos com a administração prévia de L-NAME, um inibidor da síntese de óxido nítrico (NO; Rees et al., 1990). Este efeito parece ser decorrente de uma inibição competitiva a nível da enzima NO sintetase, responsável pela conversão de L-arginina em NO. A administração de L-NAME a ratos provoca uma hipertensão dose-dependente a qual é acompanhada de bradicardia que tende à reversão com altas doses de L-NAME (Rees et al., 1990). Já em gatos (Van Gelderen et al., 1991), a administração endovenosa deste inibidor não modificou parâmetros hemodinâmicos, tais como frequência cardíaca, pressão arterial média, débito cardíaco, volume de sangue ejetado ou resistência periférica total. No entanto quando administrado a cães, verificamos um profundo decréscimo da pressão arterial média, efeito este que não podemos explicar até o presente momento. Essas diferenças falam a favor de que o efeito evocado pelo L-NAME em animais, é espécie-dependente.

Nossos resultados falam a favor de que o NO participe de alguma forma na hipotensão determinada pela administração endovenosa do veneno de *B. erythromelas*, ou seja, que o veneno libere NO "in vivo", o que revela um novo conceito que está de acordo com o fato de que a síntese de NO pelas células endoteliais desempenha um papel fundamental na regulação da pressão arterial, bem como do fluxo sanguíneo para os diversos órgãos. Considerando-se que o efeito vasodilatador da bradicinina é endotélio-dependente, e ocorre via liberação associada de NO e prostaciclina (Marín & Sanchez-Ferrer, 1990; Hyslop & de Nucci, 1991), era de se esperar que tal pré-tratamento inibisse o primeiro componente hipotensor, o que, no entanto, não foi observado. Por outro lado foi possível detectar uma recuperação significativamente acelerada dos níveis pressóricos, em relação aos animais controle, após a administração do veneno. Estes resultados encontram apoio em uma proposição feita por Aisaka et al. (1989) de que

a hipotensão induzida pela acetilcolina em cobaia é o resultado de duas fases: uma vasodilatação imediata a qual é resistente ao bloqueio por L-NMMA (NG-monometil-L-arginina), um outro inibidor da síntese de NO, e uma vasodilatação posterior, de maior duração, a qual é susceptível a tal bloqueio. Desta forma, estes autores sugerem que somente a segunda fase requer a síntese de NO a partir da L-arginina. Esta hipótese corrobora nossos resultados, explicando o porquê da não inibição do primeiro componente e a recuperação acelerada dos níveis pressóricos, ou seja, a ausência da manutenção do efeito vasodilatador do segundo componente.

Com relação à utilização do soro antibotrópico, obtivemos resultados que merecem uma cuidadosa discussão. Na dose recomendada pelo Instituto Butantan, verificamos que nem mesmo a letalidade foi abolida. Um aumento de 10 vezes na dose foi necessário para evitar a letalidade, e mesmo um aumento de 30 vezes na dose, não foi eficaz em alterar a hipotensão evocada pelo veneno, ou seja, os resultados não diferiram daqueles obtidos com os animais controle. Este resultado é bastante conflitante com o fato de ser o soro antibotrópico a terapia clássica para o tratamento de envenenamentos ofídicos. Na verdade, desde novembro de 1972, há um trabalho clínico-científico realizado por Tinoco, propondo o uso da heparina como uma alternativa ao soro antiofídico, baseando-se no fato de a coagulação intravascular disseminada ser um fenômeno presente nos envenenamentos por *B. jararaca*. Após estudos em animais de experimentação, este autor estendeu seus estudos a um grupo de pacientes picados por tal serpente, obtendo os seguintes resultados: 1) Redução do período de internação, 2) Redução do custo do atendimento, 3) Eliminação do uso de soroterapia específica, 4) Benefício dos pacientes, com sua pronta recuperação, capacitando-os imediatamente para o retorno ao trabalho e 5) Eliminação total do aparecimento de sequelas.

Dentre outros parâmetros avaliados, verificamos que o veneno, imediatamente após sua administração, determina uma breve fase de

hipercoagulabilidade, a qual é seguida de incoagulabilidade sanguínea, que perdura por 120 minutos (tempo máximo de observação). A incoagulabilidade sanguínea é uma constante nos envenenamentos botrópicos. Em um estudo realizado no Hospital Vital Brazil (Instituto Butantan, São Paulo), pacientes admitidos até 28 horas e 55 minutos após o envenenamento apresentaram este fenômeno (Sano-Martins et al., 1990). A reversão deste efeito em nossos experimentos somente foi possível com a utilização do soro antibotrópico, o qual manteve o sangue coagulável ao longo de todo o experimento.

A respeito da letalidade, nos parece claro que as alterações na coagulação, associadas à hipotensão, são responsáveis pela morte. Com relação às alterações hemodinâmicas, Peng (1951), estudando o veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* em coelhos, sugere que a queda da pressão arterial média tem origem periférica através da dilatação dos vasos da pele e de músculos. A taquipnéia observada imediatamente após a administração da peçonha é devida a ações reflexas no seio carotídeo. A morte, segundo este autor, ocorre em decorrência da falência circulatória, prejudicando a oxigenação do SNC, com consequente paralisia do centro respiratório. Mais ainda, respiração artificial, atropinização ou secção dos vagos constituem manobras ineficazes na recuperação dos níveis pressóricos, o que também foi por nós verificado em relação ao veneno de *B. erythromelas* (dados não apresentados).

Frente a estes resultados podemos sugerir o seguinte: proteases contidas no veneno liberam bradicinina a partir do cininogênio de alto peso molecular. Fosfolipase A₂ poderia gerar eicosanóides responsáveis pela segunda fase hipotensora enquanto o NO estaria envolvido na manutenção do estado hipotensor. A atenuação de um ou mais desses efeitos parece tornar o animal menos susceptível à coagulação intravascular disseminada, confirmando a hipótese de que alterações na coagulação, bem como na pressão arterial determinem a morte.

Em conclusão, acreditamos que o uso do soro antibotrópico como opção exclusiva no tratamento de pacientes picados por *B. erythromelas* e talvez por outras espécies, não seja eficaz em evitar todos os efeitos consequentes ao envenenamento. A associação do soro antibotrópico a agentes anticoagulantes como a heparina, a anti-inflamatórios não esteroidais (e até esteroidais) e talvez, a inibidores da síntese de óxido nítrico, poderia ser uma alternativa futura no tratamento de acidentes ofídicos, considerando-se as diferenças existentes na composição dos venenos das diversas espécies de *Bothrops* brasileiras.

CONCLUSÕES

- 1- A toxicidade da peçonha de *B. erythromelas* foi maior para pintainhos do que para camundongos, efeito este que foi o inverso do observado para a peçonha de *B. jararaca*.
- 2- O fracionamento da peçonha de *B. erythromelas* revelou o aparecimento de 3 picos em Sephadex G-75 e de 4 em Sephadex G-100. As atividades coagulante, proteolítica (caseinolítica) e fosfolipásica foram detectadas em ambos os fracionamentos. A atividade TAME-esterásica somente foi detectada em Sephadex G-100.
- 3- Em cães anestesiados, a peçonha de *B. erythromelas* determinou um profundo decréscimo da pressão arterial média, o qual apresentou dois componentes distintos. Os pré-tratamentos utilizados sugerem a participação de bradicinina (primeiro componente) e de eicosanóides com ação vasodilatadora (prostaciclina ou prostaglandina E₂) e de óxido nítrico (segundos componentes) neste fenômeno.
- 4- As alterações hemostáticas, traduzidas por hipercoagulabilidade seguida de incoagulabilidade sanguínea, somente foram revertidas com o uso do soro antibotrópico.
- 5- Anticoagulantes, anti-inflamatórios não esteroidais (e até esteroidais) e talvez, inibidores da enzima NO sintetase possam ser associados ao soro antibotrópico como terapia futura e/ou alternativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISAKA, K.; GROSS, S.S.; GRIFFITH, O.W.; LEVI, R. L-arginine availability determines the duration of acetylcholine-induced systemic vasodilation *in vivo*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 163: 710-717, 1989
- ALVES, A.L.; GIMENEZ, A.R.M.; VENTURA, D.V.R.; MORAES, F.L.B.; BELLUOMINI, H.E.; CANTER, H.M.; STACIARINI, I.; FEDERSONI Jr., P.A.; SANTOS, R.Q.; LEITE, S.G.F. **Cartilha de Ofidismo (Cobral)**, p. 29, 1990
- ANGUS, J.A. & COCKS, T.M. Endothelium-derived relaxing factor. **Pharmac. Ther.**, 41: 303-351, 1989
- BOFFA, M.C. & BOFFA, G.A. Correlations between the enzymatic activities and the factors active on blood coagulation and platelet aggregation from the venom of *Vipera aspis*. **Biochim. Biophys. Acta**, 354: 275-290, 1974
- BOQUET, P. History of Snake Venom Research. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**, Springer-Verlag, Berlin, 1979, p. 3-14
- CONDREA, E. Hemolytic effects of snake venoms. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**. Berlin, Springer-Verlag, 1979. p. 448-479
- CORRADO, A.P.; REIS, M.L.; CARVALHO, I.F.; DINIZ, C.R. Bradykininogen and bradykinin in the cardiovascular shock produced by proteolytic enzymes. **Biochem. Pharmacol.**, 15: 959-970, 1966

- CUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H.S.; SABO, E.F. ; ONDETTI, M.A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, 16: 5484-5491, 1977
- DENENBERG, V.H. Statistics and experimental design for behavioral and biological researchers. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 1976
- DENSON, K.W.E. Coagulant and anticoagulant action of snake venoms. **Toxicon**, 7:5-11, 1969
- DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. Some proteolytic activity of snake venoms. **J.Biol. Chem.**, 216: 17, 1955
- DINIZ, C.R.; CARVALHO, I.F.; DOS REIS, M.L.; CORRADO, A.P. Bradykininogen in some experimental conditions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VASO-ACTIVE POLYPEPTIDES: BRADYKININ AND RELATED KININS. 15-20, Ribeirão Preto, SP, 1966
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Kinins act on B₁ or B₂ receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.**, 96: 920-926, 1989
- DUNCAN, D.B. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**, 11(1): 1-42, 1955

- FERREIRA, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit. J. Pharmacol.**, 24: 163-169, 1965
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-376, 1980
- FURTADO, M^aF.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female and their offspring. **Toxicon**, 29(2): 219-226, 1991
- GARRISON, J.M. & PEACH, M.J. Renin and Angiotensin. In: GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8^a ed. New York, Macmillan, 1990. p. 749-763
- GARRISON, J.C. Histamine, Bradykinin, 5-Hydroxytryptamine, and their antagonists. In: GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8^a ed. New York, Macmillan, 1990. p. 575-599
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the LOWRY method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, 116: 553, 1972
- HUMMEL, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37, p. 1393, 1959

- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. The mechanisms and significance of the coupled release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and prostacyclin (PGI₂) from endothelial cells. **Wien. Klin. Wochenschr.**, 103(14): 422-434, 1991
- IGNARRO, L.J. & KADOWITZ, P.J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 25: 171-191, 1985
- KAPLAN, A.P. & SILVERBERG, M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. **Blood**, 70 (1): 1-15, 1987
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.** 13: 43, 1960
- KRAMER, C.Y. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. **Biometrics**, 12(3): 307-310, 1956
- LEE, C.Y. & LEE, S.Y. Cardiovascular effects of snake venom. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**. Springer-Verlag, Berlin, 1979, p. 547-590
- LÔBO DE ARAÚJO, A. & RADVANYI, F. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. **Toxicon**, 25: 1181-1188, 1987

- MAJERUS, P.W.; BROZE Jr., G.J.; MILETICH, J.P.; TOLLEFSEN, D.M. Anticoagulant, Thrombolytic, and Antiplatelet Drugs. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8^a ed. New York, Macmillan, 1990. p. 1311-1331
- MANDELBAUM, F.R.; REICHEL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, 20(6): 955-972, 1982
- MARIN, J. & SANCHEZ-FERRER, C.F. Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. **Gen. Pharmacol.**, 21(5): 575-587, 1990
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S. ; BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost.**, 41(2): 314-328, 1979
- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**. Berlin, Springer-Verlag, 1979. p. 480-546
- OUYANG, C. & HUANG, T. Potent platelet aggregation inhibitor from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, 757: 332-341, 1983
- OYANG, C.; YEH, H. ; HUANG, T. A potent platelet aggregation inhibitor purified from *Agkistrodon halys* (mamushi) snake venom. **Toxicon**, 21(6): 797-804, 1983

- PENG, M.T. Action of the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* on circulation and respiration. *Mem. Fac. Med. Nat. Taiwan Univ.* **1**, 215-222, 1951
- RAPAPORT, S.P. Distúrbios adquiridos da coagulação. In: RAPAPORT, S.P. *Hematologia*. 2a. São Paulo, Roca, 1990, p. 414-425
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 746-752, 1990
- ROCHA e SILVA, M. & BERALDO, W.T. Um novo princípio autofarmacológico (bradicinina) liberado do plasma sob a ação de venenos de cobra e da tripsina. *Ciência e Cultura*, **1**(1-2): 32-35, 1949
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E.E. *Venomous Animals and Their Venoms*, Academic Press, New York-London, 1971, Vol. 2, p. 345-384
- ROSING, J.; ZWAAL, R.F.A.; TANS, G. In: PIRKLE, H. & MARKLAND, Jr., F.S. *Snake Venom Prothrombin Activators. Hemostasis and Animals Venoms*, New York, 1988, p.3-27
- ROTHSCHILD, A.M. Alterações farmacodinâmicas provocadas por sulfato de celulose, polissacarídeo aniônico, no cão e no coelho. *Rev. Bras. Pesquisas Med. Biol.*, **1**(1): 17-22, 1968a

- ROTHSCHILD, A.M. Some pharmacodynamic properties of cellulose sulphate, a kininogen-depleting agent in the rat. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** 33: 501-512, 1968b
- ROTHCHILD, A.M. & ALMEIDA, J.A. Emprêgo do sulfato de celulose e de heparina para investigar a participação de bradicinina no efeito letal do veneno de *Bothrops jararaca* no rato. **Rev. Bras. Pesquisas Med. Biol.** 2(3): 163-166, 1969
- ROTHSCHILD, A.M. & ALMEIDA, J.A. Role of bradykinin in the fatal shock induced by *Bothrops jararaca* venom in the rat. In: DE VRIES, A. & KOCHVA, E. **Toxins of Animal and Plant Origin**, Gordon & Breach, New York-London, 1972, Vol.2, p. 721-728
- ROTHSCHILD, A.M. & ROTHCHILD, D.Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**, Springer-Verlag, Berlin, 1979, p. 591-628
- SANO-MARTINS, I.; KAMIGUTI, A.S.; CHUDZINSKI, A.M.; SANTORO, M.L.; TOMY, S.C.; CASTRO, S.C.B.; KELEN, E.M.A. Estudo hematológico em pacientes com sangue incoagulável decorrente de envenenamento botrópico. In: I SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA - "PEÇONHAS E ENVENENAMENTOS NO BRASIL". 22, São Paulo, SP, 1990
- SNEDECOR, G.W. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa University Press, Iowa, 1963

- SUNG, C.P.; ARLETH, A.; SHIKANO, K.; BERKOWITZ, B. Characterization and function of bradykinin receptors in vascular endothelium cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 247(1): 8-13, 1988
- SWAROOP, S. & GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bull. World. Health. Organ.**, 10: 35-76, 1954
- TINOCO, R.C. Picada de cobra (Uso de heparina como substituto de soro antiofídico). **J. Bras. Medicina**, 23: 109-114, 1972
- TOMY, S.C.; KAMIGUTI, A.S.; GONÇALVES, L.R.; MARIANO, M. Some biological properties of *Bothrops erythromelas* venom. In: XII SIMPÓSIO ANUAL DA ACIESP SOBRE TOXINAS PROTEICAS. 12, Campinas, São Paulo, 1988
- TREBIEN, H.A. & CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, 26(3/4): 292-300, 1989
- VAN GELDEREN, E.M.; HEILIGERS, J.P.C.; SAXENA, P.R. Haemodynamic changes and acetylcholine-induced hypotensive responses after NG-nitro-L-arginine methyl ester in rats and cats. **Br. J Pharmacol.** 103: 1899-1904, 1991
- VELLARD, J. Une *Lachesis* peu connue du nord-est du Brésil, *L. erythromelas*. Etude de son venin. **C. R. Seances Biol.**, 1, p. 127, 1938

- VITAL BRAZIL, O. Farmacologia das peçonhas. In: CORBETT, C.E. **Farmacodinâmica**. 6^a. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p. 1044-1074
- VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCHI, J.; WAISBICH, E. Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. **Mem. Inst. Butantan**, 33(3): 973-980, 1966
- WEIL, C.S. Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD₅₀ or ED₅₀) and instructions for their use. **Biometrics**, pp. 249-263, 1952
- ZELLER, E.A. **The Enzymes**. Vol I, part II. New York, Academic Press, 1951, p. 987
- ZINGALI, R.B.; FRANCISCHETTI, I.M.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Biochemical and pharmacological screening of snake (Bothrops) venoms. Characterization of components acting on blood coagulation and platelet aggregation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 21: 763-765, 1988