

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

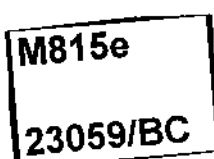
ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA,
EM RATOS, INDUZIDA POR VENENOS DE SERPENTES DO
GÊNERO *Bothrops* EM ESTÁGIOS DISTINTOS DE
DESENVOLVIMENTO

SUSANA ELISA MORENO

Dissertação apresentada ao Departamento
de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP, para obtenção do
título de mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS ALBERTO FLORES

CAMPINAS - SP
1994



SUSANA ELISA MORENO

ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA,
EM RATOS, INDUZIDA POR VENENOS DE SERPENTES DO
GÊNERO *Bothrops* EM ESTÁGIOS DISTINTOS DE
DESENVOLVIMENTO

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 Bióloga Susana Elisa Moreno.

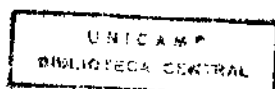
Campinas, 21 de outubro de 1994

Prof. Dr. Carlos Alberto Flores

Orientador -

CAMPINAS - SP

1994



Ao André
Por tornar tudo significativo

Ao meu pai, pelo carinho e "paitrocínio" nos estudos.
À minha mãe, pelo amor e incentivo constantes.
Às minhas irmãs amigas em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Flores por sua orientação, pela oportunidade e encorajamento, pela confiança depositada e também por seus ensinamentos e exemplo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira pelo decisivo apoio inicial.

Ao Prof. Dr. Augusto S. Abe e ao Biólogo Paulo Roberto Manzani pelo incentivo, amizade e pela maioria dos venenos utilizados, sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci por colocar seu laboratório sempre à disposição.

Ao Prof. Dr. J. R. Giglio pela ajuda na realização das dosagens bioquímicas.

À Prof^a. Dr^a. Júlia Prado Franceschi pelo apoio e entusiasmo e por manter seu laboratório sempre aberto.

Ao Biólogo Luiz Henrique A. Pedrosa pela doação do veneno de *Bothrops neuwiedi*.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pelo empenho na tradução dos textos e sugestões sempre oportunas.

Às amigas Mônica Cristina Toffoli e Ana Sílvia Miguel pelo companheirismo indispensável ao longo do curso de pós-graduação.

À Sílvia Helena Lisboa Oliveira pelo apoio técnico e amizade.

Aos técnicos Airton e Miguel pelo carinho e dedicação nos trabalhos realizados.

À todos do Departamento de Farmacologia, pela ajuda, atenção sobretudo, grande amizade que nos uniu ao longo destes anos.

Aos amigos do Departamento de Biofisiofarmacologia da UFMS pela indispensável colaboração.

Ao CAPES, FAPESP e FAEP-UNICAMP pelo suporte financeiro durante a execução deste trabalho.

Aos animais que utilizamos para experimentação, pois através deles podemos conhecer mais um pouco a Inteligência da Vida.

ÍNDICE

RESUMO	3
I. INTRODUÇÃO	5
1.1 FENÔMENOS VASCULARES DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA.....	5
1.2 FENÔMENOS CELULARES DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA.	9
1.3 DIVERSIDADE BIOQUÍMICA E DE ATIVIDADE EM VENENOS OFÍDICOS.....	11
1.3.1. <i>Diferenças interespecíficas</i>	12
1.3.2. <i>Diferenças intraespecíficas</i>	13
1.4. VENENOS BOTRÓPICOS E INFLAMAÇÃO.....	14
II. OBJETIVOS.....	17
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. ANIMAIS.....	18
3.2. VENENOS.....	18
3.3. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL.....	19
3.4. EDEMA DE PATA	19
3.5. PRÉ-TRATAMENTO COM DROGAS.....	20
3.6. AQUECIMENTO DOS VENENOS.....	20

3.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	21
3.8. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA	21
3.9. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	22
3.9.1. <i>Corante de Rosenfeld modificado</i>	22
3.9.2. <i>Líquido de Turck</i>	22
3.9.3. <i>Solução de Albumina 3%</i>	23
3.9.4. <i>Solução Salina Tamponada (PBS): solução concentrada 10x(g/l)</i>	23
3.9.5. <i>Reagentes para dosagem de proteínas - Método modificado de Lowry</i>	23
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
IV. RESULTADOS	25
4.1. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E VENENOS BOTRÓPICOS	29
4.1.1. <i>Curva dose-resposta da migração de neutrófilos</i>	29
4.1.2. <i>Curso temporal de migração de neutrófilos</i>	30
4.1.3. <i>Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos</i>	31
4.1.4. <i>Efeito do aquecimento dos venenos sobre a migração de neutrófilos</i>	32
4.2. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR VENENOS DE SERPENTES JOVENS	33
4.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADES FOSFOLIPÁSICA	34
4.4. EDEMA DA PATA INDUZIDO POR VENENOS BOTRÓPICOS.....	35
4.4.1. <i>Curva dose-resposta do edema de pata e venenos de serpentes adultas e jovens</i>	35
4.4.2. <i>Curso temporal do edema e venenos de serpentes adultas e jovens</i>	36
4.4.3. <i>Efeito de drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata de VBJ adulta e jovem</i>	37
4.4.4. <i>Efeito de drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata de VBM adulta e jovem</i>	38
4.4.5. <i>Efeito de drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata de VBN adulta e jovem</i>	39
V. DISCUSSÃO	40
ABSTRACT	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

RESUMO

RESUMO

No presente trabalho se estuda a resposta inflamatória induzida por venenos de 3 serpentes de gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*) em estágios distintos de desenvolvimento, utilizando-se os modelos de peritonite e edema de pata.

Os venenos de *Bothrops moojeni* (VBM), *Bothrops jararaca* (VBJ), *Bothrops neuwiedi* (VBN) induzem migração de neutrófilos, de maneira dose-dependente, para a cavidade peritoneal de ratos, com diferentes graus de intensidade, devido, provavelmente, a variações interespecíficas existentes entre eles. O veneno de VBM se mostrou mais potente em causar peritonite. A inibição deste fenômeno pelo pré-tratamento dos ratos com dexametasona e NDGA sugeriu que derivados do ácido araquidônico, principalmente derivados lipooxigenados, possam estar participando da resposta quimiotática para neutrófilos. Verificou-se, também, que o tratamento pelo calor (90° C por 10 min) causou significativa redução da atividade, sugerindo a presença de um(s) componente(s) termolábel(eis) nos venenos brutos.

O uso de venenos de serpentes jovens mostrou acentuada diferença no efeito quimiotático para neutrófilos, em relação aos venenos de serpentes adultas. A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida por venenos de serpentes jovens foi, em média, 5 vezes menor. Os VBJ, VBM e VBN de serpentes jovens e adultas induziram uma resposta edematogênica dose-dependente, com efeito máximo obtido após injeção de 10 µg de veneno/pata. Nesta dose, os venenos de serpentes adultas mostraram-se equipotentes,

entretanto, nas doses menores, diferenças de intensidade puderam ser observadas. O VBM se mostrou mais ativo que o VBJ e VBN. Com os venenos de serpentes jovens, o VBN mostrou-se mais efetivo em induzir uma resposta edematogênica, enquanto o VBM e VBJ se mostraram equipotentes.

O estudo do curso temporal do edema de pata, com a dose de 10 µg de veneno/pata, mostrou que o efeito edematogênico máximo, induzido por veneno de serpentes adultas, ocorreu na primeira hora para os VBJ e VBN e nos 30 minutos iniciais para o VBM. Por outro lado, para os venenos de serpentes jovens, o pico do efeito ocorreu 15 minutos após a infecção dos venenos. O edema local, em todos casos, persistiu até a quarta hora após a injeção do estímulo.

Os pré-tratamentos dos ratos com dexametasona, NDGA e metisergida inibiram o edema de pata induzido por VBJ, VBM e VBN jovens e adultos. A meclizina foi efetiva para os VBM jovens e adulto, VBJ jovem e VBN adulta. A indometacina inibiu apenas o edema induzido por VBJ jovem.

Como a quantidade de proteína total presente nos venenos de serpentes jovens e adultas se mostraram equivalentes, diferenças de atividade devem refletir alterações qualitativas nos venenos.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1 Fenômenos vasculares da reação inflamatória

Como resultado de uma injúria, trauma ou infecção do tecido, uma complexa série de reações são desencadeadas com o intuito de prevenir a progressão da lesão, isolando ou destruindo o agente lesivo e ativando processos de reparo, que são necessários para retornar o organismo a sua função normal. Estes processos homeostáticos são conhecidos como inflamação.

Essa resposta do organismo, ou mais especificamente, dos tecidos vascularizados, manifesta-se de maneira estereotipada, isto é, a resposta obedece a um padrão semelhante, independente da natureza do estímulo. Apesar disso, podem ocorrer pequenas variações dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou do órgão afetado e da coexistência de estados patológicos (ROCHA E SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

Após o desencadeamento da reação inflamatória observa-se uma primeira fase, denominada fase aguda. A seguir, a reação pode cronificar-se, dependendo do estímulo ser ou não persistente, ou, então, ocorrer a resolução do processo devido a eliminação dos agentes causadores (SEGDWICK & WILLOUGHBY, 1985).

Durante o desenvolvimento da fase aguda ocorrem fenômenos vasculares e celulares que levam ao surgimento dos quatro sinais cardeais da inflamação, calor, dor, rubor e tumor, descritos por Cornelius Celsus, no início da era cristã. A perda de função do tecido, ou órgão lesado, foi introduzida posteriormente como o quinto sinal cardinal, por Virchow (citado em: ROCHA E SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo. Na inflamação ocorre destruição ou isolamento do agente lesivo e na reparação, tanto quanto possível, há o restabelecimento da normalidade. Neste processo ocorre substituição do tecido lesado por células da mesma linhagem daquelas injuriadas ou por células do tecido conjuntivo (tecido cicatricial), ou ainda, uma combinação destes fenômenos. No entanto, a substituição do tecido original pelo cicatricial pode comprometer a função do órgão, e, dependendo da extensão da substituição, pode inclusive ocasionar a perda de sua função (GLYNN, 1978).

O aumento do fluxo sangüíneo na área lesada, devido à dilatação e engurgitamento dos capilares e arteríolas, bem como o recrutamento de uma nova parcela desses vasos, que normalmente estão hipofuncionantes, causam aumento de fluxo sangüíneo (eritema ou rubor), com elevação da temperatura local (calor).

A vasodilatação se deve à ação de mediadores, preferencialmente, a nível arteriolar. Entre estes mediadores citam-se, entre outros, a bradicinina, a histamina, as prostaglandinas da série E (PGE) e a prostaciclina (PGI₂), sendo estes metabólitos do ácido araquidônico os principais mediadores responsáveis por este fenômeno (HURLEY, 1978; WILLIAMS, 1984). Tem sido descrito, também uma arteríolo-dilatação mediada pelo reflexo axo-axonal (HUA, 1986). Nos capilares e vênulas a vasodilatação passiva é causada, principalmente, por distensão.

O aumento da permeabilidade a nível venular ocasiona o extravasamento de proteínas para os tecidos, o qual somado ao aumento da pressão de filtração, devido à vasodilatação, leva a formação de edema (tumor). O aumento de permeabilidade se deve a ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais venulares, induzindo a contração das mesmas, com surgimento de solução de continuidade entre elas. Isto permite a

passagem para o interstício de substâncias de alto peso molecular (proteínas, por exemplo), as quais são filtradas em condições fisiológicas. A lista de mediadores que são liberados na reação inflamatória e que induzem aumento de permeabilidade é muito extensa (WILLIAMS, 1984; MAJNO, 1985). Entre estes mediadores estão: cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-aceter, C5a (quinto componente do sistema complemento ativado) e substâncias liberadas localmente das terminações nervosas (taquicinas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (WILLIAMS, 1984; HUA, 1986). O exsudato formado permite a liberação de maior quantidade de mediadores de origem plasmática e celular, como a bradicinina, fatores de coagulação e fibrinolíticos, componentes do complemento, citocinas, o que amplifica o processo. Além disso, formam-se fatores que opsonizam os agentes injuriantes e fatores que induzem migração de células de defesa. A rede de fibrina que se forma no local inflamado impede a disseminação dos agentes lesivos (bactérias principalmente) e serve de suporte para a migração celular (WILLIAMS, 1984).

Na inflamação a dor se deve à estimulação dos nociceptores por mediadores químicos, tais como, bradicinina e histamina. Normalmente estes mediadores, nas concentrações em que são liberados no foco inflamatório, somente despolarizam estes receptores quando seus limiares de excitabilidade encontram-se diminuídos. Esta redução do limiar de excitação, denominada hiperalgesia, é ocasionada por derivados do ácido araquidônico (PGE_2 , PGI_2 , PGD_2) e por aminas simpaticomiméticas (dopamina, principalmente). Drogas que bloqueiam a liberação e/ou as ações destes mediadores inibem a dor inflamatória (FERREIRA, 1985; LORENZETTI & FERREIRA, 1985; NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

No espectro de reações sistêmicas da inflamação, duas respostas fisiológicas, em particular, estão associadas com a reação de fase aguda (RFA). A primeira envolve a alteração no centro hipotalâmico regulador da temperatura corporal, gerando uma resposta febril (DINARELLO et al., 1991). A segunda envolve alterações no metabolismo e regulação gênica do fígado (KOJ, 1985). Várias citocinas liberadas no sítio da lesão inflamatória (IL-1, TNF, IL-6 e IL-8), estão envolvidas na regulação da resposta febril, possivelmente como um mecanismo de proteção. Estas citocinas, exceto IL-8, mediam a febre através da indução da

síntese de prostaglandinas da série E₂ (DINARELLO, 1988; DINARELLO, 1991). Ao mesmo tempo, a IL-1 e IL-6 podem agir diretamente induzindo a liberação de ACTH, com subsequente produção de cortisol ou corticosterona (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Isto promoveria um feed-back negativo, uma vez que os corticosteróides inibem a expressão gênica das citocinas. Outro evento sistêmico associado ao processo inflamatório é a elevação dos níveis plasmáticos de uma série de proteínas, caracterizadas conjuntamente como proteínas de fase aguda (BILLINGHAM & GORDON, 1976). O fígado é o principal alvo dos mediadores inflamatórios sistêmicos, e é também o órgão responsável pela determinação dos níveis de metabólitos essenciais providos ao organismo durante os estágios críticos de stress. Além disso, o fígado supre a necessidade de componentes para a defesa imediata no sítio da reação inflamatória, bem como limita a lesão tecidual, eliminando agentes prejudiciais e estimulando o tecido de reposição. O aumento da concentração sérica destas proteínas deve-se a uma maior atividade de síntese hepática. A resposta do fígado é caracterizada por proeminentes mudanças no transporte de íons e metabólitos, na atividade de muitas vias metabólicas e na estimulação de proteínas de fase aguda (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

O grupo de mediadores que alteram, na RFA, a expressão gênica de proteínas de fase aguda, em hepatócitos, pertencem a quatro grandes categorias: 1. tipo IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , TNF α e TNF β); 2. tipo IL-6 (IL-6, IL-11, LIF, oncostatina M (OSM) e fator neurotrófico ciliar (CNTF)); 3. glicocorticóides; 4. fatores de crescimento (insulina, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento de fibroblastos). As citocinas agem como primeiros estimuladores da expressão gênica das proteínas de fase aguda, enquanto as glicocorticóides e fatores de crescimento atuam como moduladores das ações das citocinas (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

1.2 Fenômenos celulares da reação inflamatória.

As células mais comumente associadas ao início da cascata de eventos da resposta de fase aguda da inflamação são os macrófagos dos tecidos ou monócitos sanguíneos.

Tem sido demonstrado que os macrófagos residentes participam do desenvolvimento de vários eventos descritos como de fase aguda. Recentemente sugeriu-se que os macrófagos residentes podem ser considerados como células de alarme (FERREIRA, 1980), ou seja, são responsáveis pela iniciação da mobilização de neutrófilos da circulação para as regiões de injúria, bem como pelo desencadeamento de outros eventos inflamatórios, como edema e dor (CUNHA & FERREIRA, 1986). Outros eventos tais como degranulação de mastócitos e indução da agregação plaquetária, podem também resultar na liberação de mediadores que são quimiotáticos para macrófagos e monócitos. Os macrófagos ativados liberam um amplo espectro de mediadores, dos quais a Interleucina 1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF α), parecem ser especialmente importantes no desencadeamento das próximas etapas da reação inflamatória. Estas citocinas agem causando a liberação de tipos secundários de citocinas (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Como resultado, moléculas quimiotáticas para neutrófilos, tais como IL-8, emergem para o local (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

Foi recentemente demonstrado que, após a migração, leucócitos tornam-se sintetizadores e liberadores de citocinas no tecido alvo (LLOYD & OPPENHEIM, 1992).

Nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios, a célula leucocitária predominante no foco é o neutrófilo. Com o passar do tempo surgem, progressivamente, outros tipos celulares. Atualmente, acredita-se que o retardo no aparecimento dos macrófagos se deve ao fato dos monócitos migrarem em velocidade menor do que a dos neutrófilos. A resposta mais precoce dos neutrófilos circulantes, na vigência de um processo inflamatório localizado, é a sua adesão à parede do endotélio venular. Vários mediadores inflamatórios, entre os quais a IL1, TNF α , leucotrieno B4, PAF-aceter e C5a, aumentam a adesividade entre

os neutrófilos e as células endoteliais dos vasos. Uma vez aderidos, os neutrófilos migram através da parede das vênulas e se dirigem ao foco de lesão. A liberação de substâncias quimiotáticas, formando um gradiente entre a lesão e os vasos, é fundamental para que o processo ocorra (HARKNESS, 1981).

Os estudos sobre as substâncias quimiotáticas envolvidas na migração dos neutrófilos para o foco inflamatório ainda não são conclusivos, existindo inclusive resultados contraditórios. A participação de fragmentos do sistema complemento estimulando a migração de polimorfonucleares para o foco inflamatório é bem conhecida. Existem extensas revisões demonstrando que na vigência de certas reações inflamatórias ocorre ativação do sistema complemento, com liberação do fragmento C5a que é quimiotático para neutrófilos (WILKINSON, 1978; MACMILLAN & FOSTER, 1988; YANCEY, 1988).

O leucotrieno B₄ (LTB₄), um metabólito do ácido araquidônico, formado por ação das enzimas lipooxigenases, apresenta também, potente atividade quimiotática para neutrófilos. Além desta, outras substâncias são descritas como quimiotáticas para estas células, entre as quais, o PAF-aceter, a calicreína, fibrino-peptídeos, fragmentos da parede de bactérias, peptídeos sintéticos (FMLP), linfocinas e monocinas (ALTMAN, 1978; SMITH et al., 1980; REYNOLDS, 1983; WILKINSON, 1984; FANTONE, 1985; BEUTLER & CERAMI, 1986). Estes dados demonstram claramente que a migração de neutrófilos é multimediada, ou seja, vários mediadores liberados no foco inflamatório são quimioatraentes para estas células.

Ainda, em relação à migração de neutrófilos para o foco inflamatório, SOUZA et al., em 1988, demonstraram que a migração deste tipo de célula para a cavidade peritoneal de rato induzida por carragenina, endotoxina ou zimosan são reduzidas após depleção aos macrófagos peritoneais, através de lavagem desta cavidade, ou potencializadas se a população de macrófagos for aumentada, através de administrações prévias de tiogludato.

Fatores quimiotáticos para neutrófilos, obtidos de macrófagos alveolares de diversas espécies, incluindo o homem, foram demonstrados por vários autores. Estes fatores são obtidos após estimulação destas células com diferentes estímulos, tais como: LPS, látex,

complexos imunes de imunoglobulinas (Igs), zimosan, bactérias, etc. (HUNNINGHAKE et al., 1978; DAUBER & ALISON, 1980; PENNINGTON et al., 1985; MARTIN et al., 1987; LEE, 1987). CUNHA et al., em 1986 demonstrou que macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos, quando estimulados com LPS, liberam no sobrenadante, um fator (denominado MNCF), que é capaz de induzir a migração de neutrófilos, quando injetado no peritônio de ratos normais. A existência destes fatores corroboram o conceito de macrófagos como “células de alarme” (FERREIRA, 1980).

1.3 Diversidade bioquímica e de atividade em venenos ofídicos

Cerca de 15% das aproximadamente 2500 - 3000 espécies de serpentes conhecidas são venenosas, e podem ser taxonomicamente classificadas em cinco famílias: Viperidae, Crotalidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (MENGDEN, 1983; MEHRTENS, 1987). Destas, as Viperidae, Crotalidae e Elapidae são de maior importância médica (WARREL & FENNER, 1993).

O veneno das serpentes é produzido por um par de glândulas exócrinas especializadas, situadas na boca (KOCHVA, 1987), e é uma complexa mistura de moléculas de natureza química diversa (JIMÉNEZ-PORRAZ, 1970; TU, 1977). Através de técnicas bioquímicas de separação, cerca de 70 peptídeos podem ser detectados em um único veneno (PERKINS et al., 1993). Uma melhor caracterização dos componentes dos venenos, inclui proteínas (com ou sem ação enzimática) e peptídeos, com ampla variação de ações farmacológicas e tóxicas. Historicamente, os venenos tem sido classificados de acordo com atividade farmacológica predominante, como neurotóxico, hemorrágico, coagulante e outras. Contudo, esta caracterização é muito simplista e incorreta de acordo com conhecimentos à respeito da complexidade e heterogeneidade dos venenos das diferentes espécies (RUSSEL et al., 1975).

As diferentes atividades dos venenos de serpentes podem ser atribuídas a componentes ou toxinas específicas, embora seja possível que diferentes toxinas possam agir sinergisticamente na indução de um efeito, e uma determinada toxina pode ter mais que uma ação (JIMÉNEZ-PORRAZ, 1968, 1970; KINI & IWANAGA, 1986).

1.3.1. Diferenças interespecíficas

A sistematização do estudo da diversidade dos venenos de serpentes iniciou-se com BRAZIL (1901) e BRAZIL & PESTANA (1909), paralelamente ao estudo da soroterapia. Nestes trabalhos os autores relatam as diferenças básicas entre os venenos dos três principais gêneros que ocorrem no Brasil, definidos na época como *Elaps* (*Micrurus*), *Crotalus*, *Lachesis* (*Bothrops*). As variações nos venenos de espécies botrópicas são descritas desde mudanças na cor, até diferenças nas ações básicas como hemólise, coagulação, toxicidade, etc.. GONÇALVES & VIEIRA (1950) analisaram o perfil eletroforético de diferentes espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (*B. jararaca*, *B. atrox*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *Crotalus durissus*), encontrando um perfil diferente para cada espécie.

JONES (1976) comparou os venenos de três espécies de *Agkistrodon*: *A. contortrix*, *A. piscivorus*, *A. bilineatus* e verificou que os padrões eletroforéticos variavam geograficamente, tanto inter como intra espécies, e concluiu que algumas bandas eletroforéticas podem ser utilizadas como instrumento taxonômico. YOUNG et al., (1980) comparou as proteínas dos venenos de subespécies de *Crotalus viridis* e obteve resultados que, juntamente com dados morfológicos, poderiam ser utilizados para formar um quadro mais completo das relações filogenéticas entre as espécies estudadas. Estas variações observadas entre os venenos de serpentes podem ser dependentes de muitos fatores, tais como: origem geográfica, sazonalidade, sexo, alimentação, idade e variação individual (WILLEMSE, 1978).

1.3.2. Diferenças intraespecíficas

Com relação ao estudo do veneno de serpentes jovens os artigos datam de 1926. Nesta época, eram voltados para a verificação da presença ou não de veneno nas glândulas dos filhotes. Já TRINQUIER & CECCALDI (1948), compararam o poder tóxico das glândulas de veneno de *Bitis gabonica* e *Bitis nasicornis* recém nascidas, encontrando maior capacidade tóxica nos filhotes de *B. gabonica*.

A toxicidade letal dos venenos de filhotes foi determinada por vários autores (FIERO et al., 1972; MINTON, 1967; THEAKSTON & REID, 1978; GUTIERREZ et al., 1986; MEIER & FREYVOGEL, 1980; LOMONTE et al., 1983). Todos os resultados obtidos, para qualquer gênero ou espécie de serpente, mostraram que o veneno dos filhotes possui maior toxicidade que o dos adultos.

MINTON (1975) seguiu a toxicidade do veneno de uma serpente *Crotalus atrox* durante o período de vinte anos (cinco coletas). Na primeira amostra de veneno coletada, obteve uma DL_{50} de 11,65 mg/kg, enquanto que na última amostra o valor encontrado foi de 28,00 mg/kg.

A primeira observação de que acidentes com serpentes jovens diferiam dos acidentes com serpentes adultas, no Brasil, é de CASAL (1817).

ROSENFELD et ali. (1958) investigaram o paralelismo entre as atividades coagulante e proteolítica dos venenos botrópicos, encontrando para *Bothrops jararaca* uma variação muito grande na atividade coagulante entre jovens e adultos. RIBEIRO & JORGE (1987), num estudo retrospectivo (1981 - 1985) de prontuários de acidentes por *B. jararaca* adultas e filhotes, mostraram que nos acidentes causados por serpentes jovens, o que mais comumente ocorria eram, alterações na coagulação sangüínea. KOUYOUMDJIAN et al. (1987) relataram acidentes ofídicos causados por *B. moojeni*, correlacionando o quadro clínico com o tamanho das serpentes. Um tempo de coagulação prolongado foi encontrado

igualmente nos dois grupos, porém os efeitos locais foram muito mais graves nos acidentes causados por serpentes adultas.

FURTADO (1987) em um estudo com *B. moojeni*, em diferentes idades, demonstrou que: os teores protéicos mantêm-se constante nas diferentes idades; ocorrem variações qualitativas dos componentes protéicos dos venenos nas diferentes idades; a atividade coagulante sobre o plasma humano é mais intensa com o veneno de serpentes jovens, diminuindo a ação a partir de 20 meses de idade, época concordante com a maturação sexual desta espécie; os venenos de serpentes jovens são mais tóxicos, diminuindo progressivamente a toxicidade com o desenvolvimento das serpentes.

1.4. Venenos botrópicos e inflamação

A reação inflamatória localizada é a principal característica do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* (ROSENFELD, 1971; SAWAI, 1980). Venenos botrópicos são capazes de induzir vários efeitos locais que são caracterizados por vasodilatação, edema, hemorragia e dor. Estes sinais são similares aos observados na reação inflamatória aguda (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; TREBIEN & CALIXTO, 1989) e sua gravidade está diretamente relacionada com a quantidade de veneno injetada, bem como com o local da picada (ROSENFELD, 1971). Em adição a estes sintomas, existe um componente celular associado ao envenenamento botrópico, levando a formação de um infiltrado inflamatório, como foi descrito para *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1986). Há, contudo, pouca informação sobre os mecanismos da migração de leucócitos induzida por estes venenos.

Além do componente celular da inflamação (GUTIÉRREZ et al., 1980; GUTIÉRREZ et al., 1986), um considerável efeito edematogênico é observado após injeção do veneno dessas serpentes, tanto em casos de acidentes ofídicos em humanos, como em animais de laboratório (ROSENFELD, 1971; BOLANOS, 1974; GUTIÉRREZ et al., 1986). O edema pode indiretamente contribuir para outras ações lesivas dos venenos, causando

compressão do tecido e isquemia (LOMONTE et al., 1993), estando, em parte, relacionado com a capacidade destes venenos liberarem aminas biogênicas, incluindo serotonina e histamina (ROTHSCHILD & ROTHSCCHILD, 1979). A participação de outros autacóides também tem sido relatada, entre eles a bradicinina, potenciando a atividade de outros mediadores da inflamação (ROCHA E SILVA et al., 1949; FERREIRA, 1965), causando um significativo aumento da permeabilidade vascular (VARGAFITG et al., 1974) e da conseqüente resposta edematogênica. A hemorragia induzida pelo veneno é causada por proteínas específicas (hemorraginas), que têm sido caracterizadas em várias espécies incluindo *Bothrops jararaca* (MANDELBAUM et al., 1976), *B. neuwiedi* (MANDELBAUM et al., 1984) e *B. moojeni* (ASSAKURA et al., 1985). Esta e outras enzimas do veneno (fosfolipases e algumas proteases) podem estar envolvidas na formação de edema, via ação direta sobre células endoteliais ou sobre a ativação da cascata do complemento (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Dependendo do tempo transcorrido entre o envenenamento e o tratamento específico, pode ocorrer necrose, acompanhada por leucocitose e neutrofilia (KAISER & MICHL, 1971). A dor, um evento consistente em acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, rapidamente difunde-se através da região afetada (ROSENFELD, 1971) e tem sido atribuída à liberação de mediadores inflamatórios, entre os quais a bradicinina e a histamina (ROTHSCHILD & ROTHSCCHILD, 1979). Estas substâncias são conhecidas por causar dor em várias espécies animais, incluindo em humanos (NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

Entre os vários componentes protéicos dos venenos botrópicos envolvidos na gênese e manutenção das lesões inflamatórias locais, tem sido sugerido que a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) desempenha um papel importante (BASAVARAJAPPA & GOWDA, 1992; FLORES et al., 1993). Em termos de gênese dos mediadores do processo inflamatório, enzimas PLA₂ estão envolvidas com a mobilização do ácido araquidônico de fosfolipídeos de membrana (HIGGS et al., 1984). Essa enzima é capaz de mimetizar várias das alterações fisiopatológicas induzidas pela injeção de venenos brutos (KINI & EVANS, 1989; BASAVARAJAPPA & GOWDA, 1992). Em geral assume-se que fosfolipases básicas são mais tóxicas que as ácidas e neutras (FLETCHER et al., 1980). No entanto, a toxicidade e

outras alterações fisiopatológicas causadas por esta enzima, *in vivo*, podem não estar relacionadas ao grau de atividade enzimática *in vitro* (ROSENBERG et al., 1983; FLETCHER et al., 1980; CONDREA et al., 1981).

Tem sido demonstrado que as ações lesivas locais de muitos venenos não é neutralizada de forma eficaz pelos soros anti-ofídicos convencionais (GUTIÉRREZ et al., 1986; ROJAS et al., 1987). Desta forma, o estudo com drogas para controle da reação inflamatória local, para se estabelecer uma base racional das alternativas terapêuticas, é fundamental. Além disso, poucos estudos comparativos, inter e intraespecificamente, estão disponíveis, principalmente considerando-se as serpentes do gênero *Bothrops* mais comuns no Estado de São Paulo.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram estudar a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, o edema de pata , em ratos, induzidos por venenos de três serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*), em estágios distintos de desenvolvimento (jovens e adultos). Observou-se, também o efeito do pré-tratamento com drogas antiinflamatórias e do aquecimento dos venenos sobre essas ações.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 140 e 150 g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico e tiveram livre acesso a água e alimentos.

3.2. Venenos

Foram utilizados venenos de *Bothrops jararaca* (VBJ), *B. moojeni* (VBM) e *B. neuwiedi* (VBN) jovens e adultas. Os venenos das serpentes adultas foram cedidos pelo Departamento de Zoologia/UNICAMP (Biólogo Paulo Roberto Manzani), Departamento de Fisiologia/UNESP - Rio Claro (Prof. Dr. Augusto S. Abe) e Departamento de Bioquímica/USP - Ribeirão Preto (Biólogo Luiz H. Anzolini Pedrosa), respectivamente. Os venenos das serpentes jovens, caracterizadas segundo os critérios estabelecidos por SAZIMA (1991), foram cedidos pelo Departamento de Zoologia/UNICAMP. Todas serpentes das quais

foram extraídos os venenos tinham como procedência o Estado de São Paulo. Os venenos extraídos foram secos em câmara de vácuo e mantidos em geladeira.

3.3. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

Os venenos foram injetados, i.p., em doses que variaram de 10-160 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$, por animal. Este efeito foi comparado com a migração induzida pela injeção de 1,0 ml de PBS. Após vários intervalos de tempo (4, 8, 12, 24 e 48 horas), a cavidade peritoneal foi lavada com 10 ml de PBS-Heparina-SAB (soro albumina bovina 3%, p/v) e, após leve massagem do peritônio, foi coletado o maior volume possível do lavado peritoneal. Em seguida, foram feitas as contagens total e diferencial dos leucócitos. Para contagem total, foram diluídos 20 μl do lavado peritoneal em 400 μl de solução de Turk, e a contagem das células foi feita em câmara de Neubauer. Feito isso, o lavado peritoneal foi, então, centrifugado (1500 rpm/2 min., a temperatura ambiente) e o sobrenadante, descartado. O precipitado leucocitário foi ressuspenso com 300 μl de SAB 3% (p/v). A partir desta suspensão celular foram realizados esfregaços, corados com corante Rosenfeld e, em seguida, foi procedida a contagem diferencial, em microscópio óptico (objetiva de imersão). Os resultados foram expressos em número de neutrófilos/cavidade (SOUZA & FERREIRA, 1985).

3.4. Edema de pata

O edema de pata em ratos foi quantificado por pletismografia (WINDER et al., 1957). Após anestesia dos animais com éter, 0,1 ml da solução de veneno, em diferentes concentrações (4, 20, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), foi injetado na região subplantar da pata posterior esquerda. O mesmo volume de veículo (salina 0,9%) foi injetado na pata de animais controle. O fenômeno foi analisado 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 horas após a injeção do estímulo. O aumento da

pata foi obtido pela diferença dos volumes antes e após a injeção de veneno, sendo expresso em ml.

3.5. Pré-tratamento com drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: Dexametasona (0,5 mg/kg) e Metisergida (5,0 mg/kg), ambas diluídas em salina; Indometacina (2,0 mg/kg), diluída em bicarbonato de sódio 5% e Meclizina (25 mg/kg) e NDGA (50 mg/kg) diluídas em salina e etanol absoluto, numa proporção máxima correspondente a 10% do volume total.

Todas drogas foram administradas subcutaneamente 1 hora antes da injeção do estímulo, com exceção da Dexametasona que foi administrada 2 horas antes. Os grupos de animais controle receberam, subcutaneamente, o veículo correspondente a cada droga. Esses veículos não causaram alterações estatisticamente significantes no desenvolvimento do edema induzido pelos vários venenos. Desta forma, nos gráficos estão representados os valores controles de edema e migração de neutrófilos induzidos por cada veneno, apenas dos animais pré-tratados com salina.

As medidas da migração de neutrófilos foram feitas sempre 4 horas após a injeção de venenos das serpentes adultas. As medidas do edema de pata foram feitas 1 hora após a injeção dos venenos das serpentes adultas e 15 minutos para os venenos de serpentes jovens.

3.6. Aquecimento dos venenos

Os venenos foram aquecidos em banho-maria a 90° C por 10 minutos (TREBIEN & CALIXTO, 1989), a seguir resfriados e injetados na cavidade peritoneal (80 µg/ml) ou na

pata (10 µg/0,1 ml) dos animais. A atividade migratória ou edematogênica foi avaliada nos tempos estabelecidos no protocolo para os pré-tratamentos e comparada com a dos venenos não aquecidos.

3.7. Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas totais dos venenos foi determinado pelo método modificado de LOWRY (HARTREE, 1972). Uma alíquota de 0,1 ml da solução protéica foi diluída em água destilada para um volume final de 1,0 ml, ao qual foi adicionado 0,9 ml do reagente A de Lowry (ver item 9.5). Os tubos foram colocados em banho-maria a 50° C por 10 minutos e resfriados a temperatura ambiente. A seguir foi adicionado 0,1 ml do reagente B (ver item 9.5) aos tubos, que permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos, depois dos quais foram acrescentados 3,0 ml do reagente C (ver item 9.5). Os tubos foram levados, novamente, ao banho-maria por 10 minutos. A leitura da densidade ótica foi realizada em um espectrofotômetro KONTRON-UVIKON 810, à um comprimento de onda de 650 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteína por mg de veneno.

3.8. Atividade fosfolipásica

A atividade da fosfolipase A foi determinada por titulação potenciométrica com NaOH 0,1M. Como substrato foi usado uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema para 100 ml de água). Para o ensaio, 10 ml desta emulsão foram diluídos para 30 ml, juntamente com deoxicolato de sódio e CaCl₂ nas concentrações de 2,7 mM e 6,0 mM, respectivamente. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados até pH 8,0 a 40° C. Nessas condições a reação seguiu, essencialmente, uma cinética de ordem zero. O método de dosagem constituiu em medir-se o tempo necessário para que o pH do tubo de reação atingisse

8,0. A medida foi sempre feita dentro do limite de tempo máximo (3 minutos), no qual a correlação entre a velocidade de quebra enzimática e a quantidade da enzima é linear (HAAS et al., 1968), na presença de um número de equivalentes de base constante. A atividade foi expressa como μEq de ácido graxo por minuto. A atividade específica é dada pelo número de μEq da base consumida por minuto por mg de proteína. Uma unidade (U) de fosfolipase A corresponde a um μEq de ácido graxo liberado por minuto por mg de proteína. Os resultados foram expressos em U/ml de correspondem a média de quatro determinações de uma mesma amostra de veneno.

3.9. Reagentes e soluções

Todos os reagentes e soluções utilizados foram de grau analítico ou P.A., obtidos, principalmente, da MERCK, SIGMA, REAGEN ou RIEDEL.

3.9.1. Corante de Rosenfeld modificado

Giensa azul-eosina	0,97g
May-Greenwald-eosina	0,53g
Metanol p.a	1,00g

3.9.2. Líquido de Turck

ácido acético	2,0 ml
água destilada q.s.p.	100 ml

Após foram adicionados alguns cristais de azul de metileno, cuja função foi a de aumentar o contraste para a contagem de leucócitos na câmara de Neubauer.

3.9.3. Solução de Albumina 3%

Albumina bovina (Sigma, USA)	3,00g
água destilada q.s.p	100 ml

Colocar a albumina sobre a água destilada e deixar em repouso até completa dissolução. Armazenar em geladeira.

3.9.4. Solução Salina Tamponada (PBS): solução concentrada 10x(g/l)

NaCl	80,0g
KCl	2,00g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	28,9g
KH ₂ PO ₄	2,00g
água destilada q.s.p.	1,00l

A solução de trabalho foi obtida pela diluição (1/10) da solução acima.

3.9.5. Reagentes para dosagem de proteínas - Método modificado de Lowry

Reagente A

Tartarato de sódio e potássio	2,0 g
Carbonato de sódio	100 g

Dissolver em 10 ml de NaOH 1N e completar para 1000 ml com água destilada.

Reagente B

Tartarato de sódio e potássio	2,0g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,0g

Dissolver em 10 ml de NaOH 1N e completar para 90 ml com água destilada.

Reagente C

Determinou-se a concentração de Folin ciocalteau por titulação com NaOH 1,0 N e diluiu-se a solução inicial de forma a se obter uma solução 0,16 N. Esta solução deve ser preparada no momento de cada ensaio.

Os reagentes A e B podem ser armazenados, por até 6 meses, em recipientes de polietileno, à temperatura ambiente.

3.10. Análise estatística

Aos resultados obtidos foram efetuados cálculos estatísticos para determinação das médias e erros-padrões das médias. A comparação entre grupos, para determinação dos níveis de significância estatística, foi realizado Teste "t" de Student (SNEDECOR, 1963), para comparações simples, ou por ANOVA seguida de Teste de Duncan, para comparações múltiplas (DUNCAN, 1955).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A figura 1 mostra a extensão da migração de neutrófilos induzida por VBJ, VBN e VBM. Os venenos causaram uma resposta migratória de neutrófilos dose-dependente, com efeito máximo obtido com 160 µg de veneno/rato, e apresentaram diferentes graus de atividade. A migração induzida por VBM foi, em média, 25 a 45% mais intensa que aquela induzida por VBJ e VBN, respectivamente. Pelos resultados obtidos, o veneno bruto de *B. neuwiedi* foi o menos ativo.

O VBJ foi consistentemente hemorrágico, em todas doses, variando de traços hemorrágicos para as doses menores à intensa, na dose de 160 µg mas a hemorragia observada não compromete os resultados obtidos. Os outros venenos não provocaram hemorragia nas doses usadas (resultados não mostrados).

O curso temporal da migração de neutrófilos (Figura 2) mostrou que o efeito máximo ocorreu na quarta hora e persistiu de maneira estatisticamente diferente do controle, por 12 horas após a injeção dos venenos (80 µg/rato). Vinte e quatro horas após, apenas o VBM causou uma migração de neutrófilos significativamente maior que a do controle. Na 48ª hora não se observou migração de neutrófilos com nenhum dos venenos estudados. Desta forma, o VBM não apenas mostrou-se como o mais efetivo, como seus efeitos permaneceram evidentes por um tempo maior.

O pré-tratamento dos animais com Dexametasona (0,5 mg/kg) ou NDGA (50 mg/kg) causou inibição acentuada (40-70%) da migração de neutrófilos causada pelos

venenos, sendo que aquela induzida por VBN foi completamente abolida. Já o tratamento com Indometecina (2,0 mg/kg) foi incongruente, potenciando a migração de neutrófilos induzida por VBJ, não alterando a migração induzida por VBM e inibindo parcialmente (50%) o fenômeno para o VBN (Figura 3).

O efeito da temperatura (aquecimento a 90° C por 10 minutos) sobre a atividade quimiotática para neutrófilos dos VBJ, VBN e VBM está mostrado na tabela 1. O aquecimento causou uma redução de cerca de 40% da atividade para o VBM e VB em relação aos venenos controles, enquanto que para o VBN esta redução foi de 94%. Estes resultados sugerem que um componente termolábil está relacionado com o efeito quimiotático dos venenos. O efeito hemorrágico descrito para o VBJ foi também abolido pelo aquecimento (resultados não mostrados).

A tabela 2 mostra os resultados de migração de neutrófilos obtidos com uso (80 µg/rato) de VBJ, VBM e VBN de serpentes jovens. Na mesma tabela, estão colocados os resultados mostrados na Figura 1, para os venenos das mesmas três espécies na idade adulta, para comparação. Observa-se que os venenos de serpentes jovens causaram uma discreta, porém estatisticamente significativa, migração de neutrófilos. Porém este efeito foi, respectivamente, cerca de 3, 4 e 7 vezes menor que aquele provocado pelos venenos de VBJ, VBN e VBM adultas.

Como a quantidade de proteína total presente nos venenos de serpentes jovens e adultas se mostraram equivalentes (Tabela 3), diferenças de atividades devem refletir alterações qualitativas nos venenos. Qualitativamente, foi feita apenas a dosagem da atividade fosfolipásica A(PLA) dos venenos de serpentes jovens e adultas. Observa-se que o VBM apresentou uma importante redução (cerca de 40%) no conteúdo de PLA (Tabela 3). Para o VBJ, independente da idade das serpentes, os níveis de atividade da enzima foram próximos (diferença em torno de 25%). Já para o veneno de *B. neuwiedi* jovens, o conteúdo de PLA foi cerca de 1,5 vezes maior que em serpentes adultas.

O estudo do curso temporal, com a dose de 10 µg de veneno de serpentes adultas/pata, mostrou que o efeito edematogênico máximo ocorreu na primeira hora, para os

VBJ e VBN e nos 30 minutos iniciais, para o VBM (Figura 4A). O edema local, nos três casos, persistiu até a quarta hora após a injeção do estímulo. Com exceção do tempo de 1 hora, em todos os outros tempos experimentais a reação edematogênica foi mais intensa para o VBM. Os VBJ e VBN mostraram-se equipotentes em todos os tempos analisados. Os venenos de serpentes jovens (10 µg/pata) apresentaram efeito máximo, diferente do observado com venenos de serpentes adultas, 15 minutos após a injeção, persistindo, também, até a quarta hora. Nesse caso o VBN mostrou-se mais efetivo em induzir a resposta edematogênica, enquanto que os VBM e VBJ se mostraram equipotentes, em todos os tempos analisados (Figura 4B). A partir destes resultados, os demais estudos foram realizados, respectivamente 1 hora e 15 minutos, após a injeção dos venenos de serpentes jovens e adultas.

A figura 5A mostra a extensão do edema de pata induzido por VBJ, VBM e VBN de serpentes adultas. Os venenos causaram uma resposta edematogênica dose-dependente, com efeito máximo obtido após a injeção de 10 µg de veneno/pata. Nessa dose os venenos mostraram-se equipotentes, não havendo diferenças estatisticamente diferentes no edema induzido. Entretanto, em doses menores estas diferenças puderam ser observadas. O VBM, nas doses de 0,4 e 2,0 µg/pata, foi cerca de duas vezes mais ativo que o VBJ e VBN. Nas doses utilizadas nos ensaios, nenhum dos venenos mostrou-se hemorrágico. Os venenos de serpentes jovens também induziram uma resposta edematogênica dose-dependente. Observa-se que na dose de 10 µg/pata o VBN mostrou-se mais potente, enquanto que nas doses menores não houve diferenças significantes entre os três venenos (Figura 5B).

Os pré-tratamentos dos ratos com o corticóide, Dexametasona, com o inibidor duplo de ciclo e lipooxigenase, NDGA, ou com o antagonista serotoninérgico, Metisergida, inibiram o edema de pata induzido pelo VBJ de serpentes adultas e jovens. A Indometacina, (inibidora da síntese de prostaglandinas), inibiu apenas o edema induzido por VBJ jovem, não alterando a resposta causada pelo veneno da serpente adulta. A Mecilizina, antagonista seletivo de receptores H₁, foi efetiva somente na redução do edema de pata induzido por veneno de serpentes jovens. O aquecimento dos venenos, nos dois casos, reduziu a resposta edematogênica, porém de maneira mais acentuada no VBJ adulta (Figura 6).

O edema induzido por VBM de serpentes adultas e jovens, foi inibido por Dexametasona, NDGA, Metisergida e Meclizina. Somente a Indometacina não alterou a resposta desencadeada por estes venenos. O tratamento dos venenos pelo calor inibiu acentuadamente sua atividade edematogênica (Figura 7).

A Figura 8 mostra que, os pré-tratamentos com Dexametasona, NDGA ou Metisergida, inibiram o edema induzido por VBN de serpentes adultas e jovens, porém esta inibição foi mais acentuada para o veneno de jovens. A Meclizina, por sua vez, foi capaz de inibir o edema causado somente pelo VBN adulta. A Indometacina, foi ineficaz nas duas situações. Ao contrário, potencializou, embora de maneira não estatisticamente significativa, a reação inflamatória induzida pelo veneno de serpentes jovens.

Em relação ao aquecimento dos venenos, de maneira geral, observou-se que os venenos das serpentes adultas são mais termolábeis que os venenos das serpentes jovens.

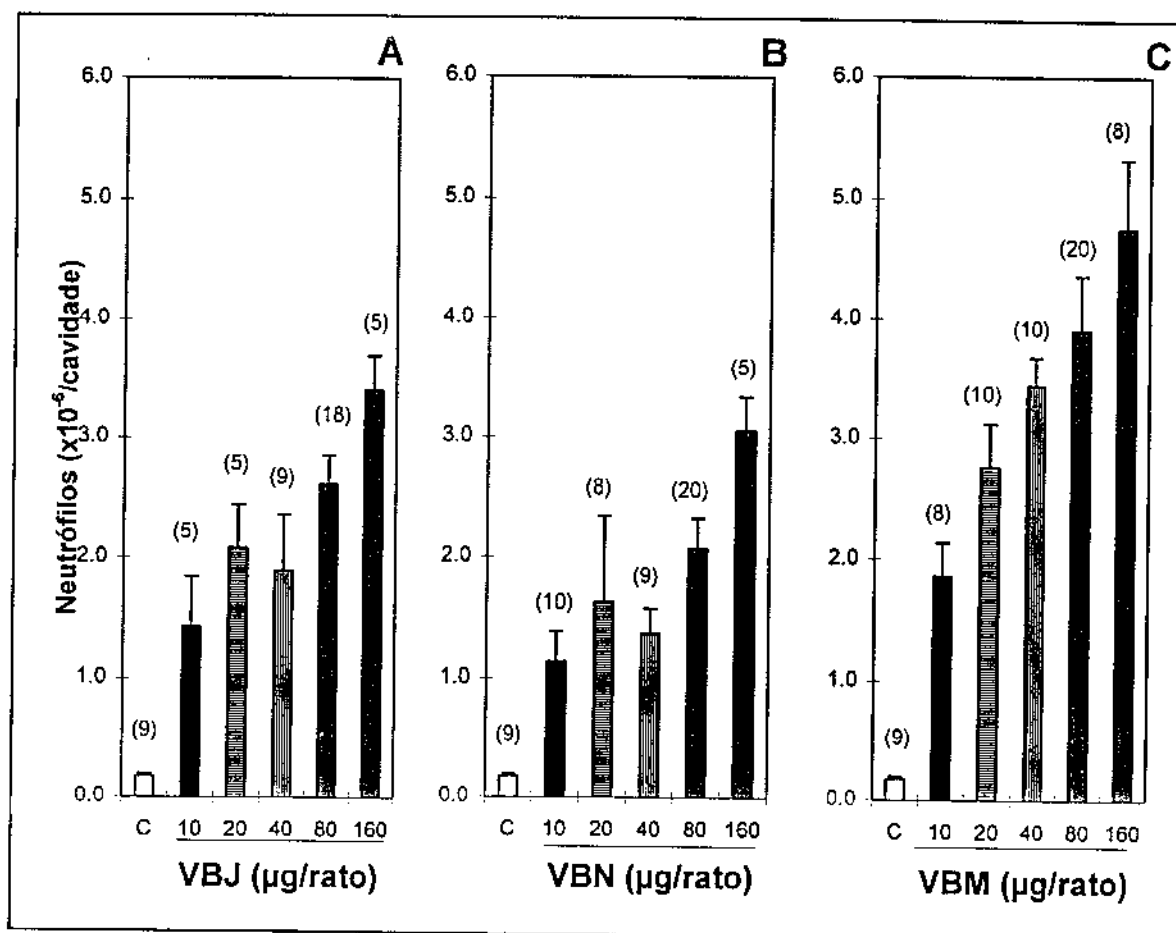


Figura 1 - Os venenos de *B. jararaca* (VBJ; Painei A), *B. neuwiedi* (VBN; Painei B) ou *B. moojeni* (VBM; Painei C) induzem migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, de forma dose-dependente. Animais controle (C) receberam 1,0 ml de PBS. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção dos venenos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM. O número entre parênteses representa o número de animais utilizados. Em todas as doses utilizadas a migração induzida pelos venenos botrópicos foi estatisticamente diferente ($p < 0.05$) do Grupo C (ANOVA; Teste de Duncan).

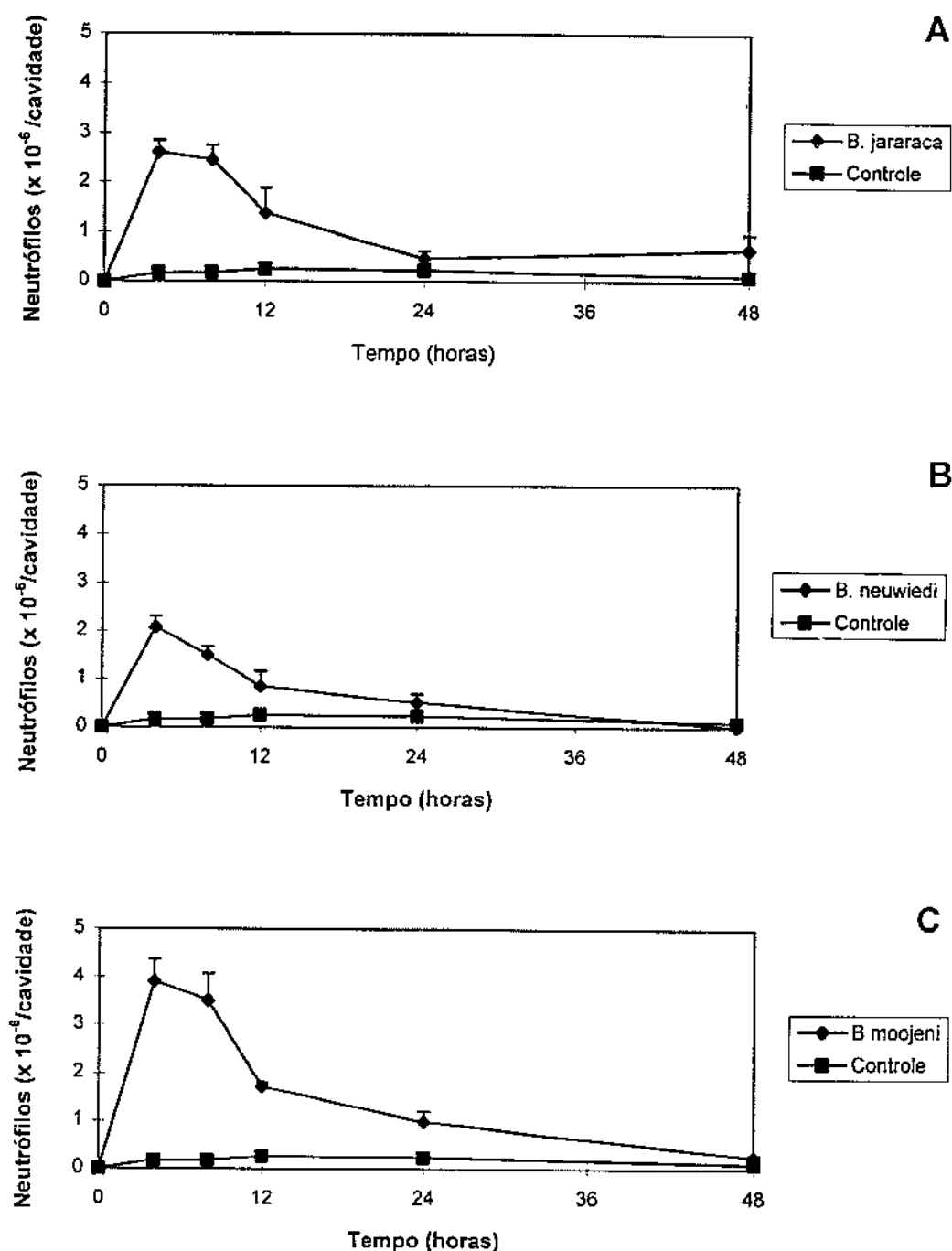


Figura 2 - Curso temporal da migração de neutrófilos induzida pelos venenos de *B. jararaca* (VBJ; Painei A), *B. neuwiedi* (VBN; Painei B) ou *B. moojeni* (VBM; Painei C). Animais controle receberam 1,0 ml de PBS (grupo controle). A dose utilizada para cada veneno foi de 80 μ g/animal. Os resultados representam a média $\pm$ EPM. O número de animais utilizados foi no mínimo 5 para cada grupo e tempo experimental. A migração induzida pelos venenos botrópicos foi estatisticamente diferente ($p < 0.05$) do grupo controle até a 12ª hora. (ANOVA; Teste t de Student para amostras não pareadas).

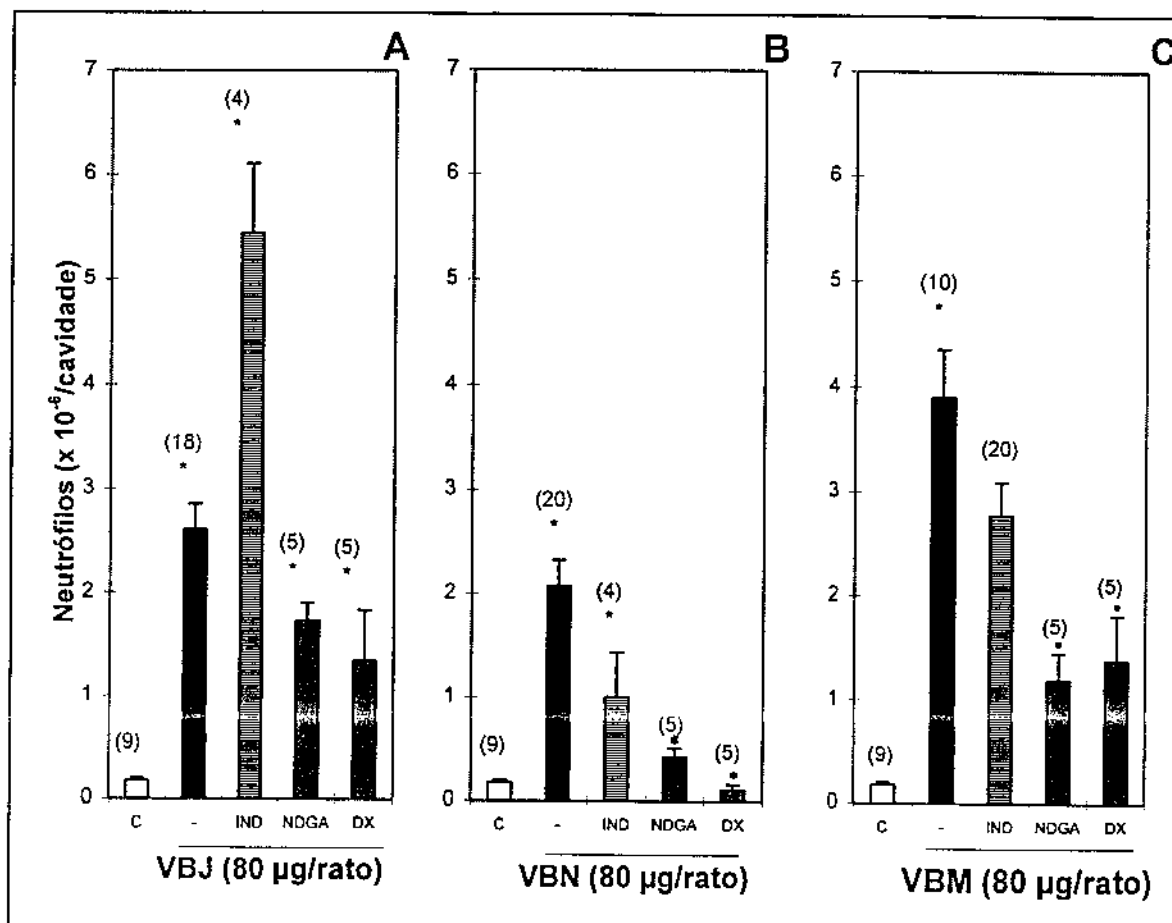


Figura 3 - Efeito do tratamento com drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelos *B. jararaca* (VBJ; Painel A), *B. neuwiedi* (VBN; Painel B) ou *B. moojeni* (VBM; Painel C). Ácido Nordihidroguaiarético NDGA; 50 mg/kg) e Indometacina (IND; 2,0 mg/kg) foram administrados 1 hora antes da injeção dos venenos (80 µg/animal) e Dexametasona (0,5 mg/kg) 2 horas antes. Animais controle (C) receberam 1,0 ml de PBS. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção dos venenos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM. O número entre parênteses representa o número de animais utilizados. * $p < 0.01$, em relação ao grupo controle (ANOVA; Teste de Duncan).

TABELA 1 - Efeito do aquecimento prévio dos venenos de *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* sobre a atividade quimiotática para neutrófilos, *in vivo*.

Veneno	Tratamento	Neutrófilos (x 10 ⁶ /cavidade)	n
VBJ	Controle	2.61 ± 0.25	18
	Aquecido	1.54 ± 0.20*	5
VBN	Controle	2.08 ± 0.25	20
	Aquecido	0.13 ± 0.10	5
VBM	Controle	3.91 ± 0.45	10
	Aquecido	2.53 ± 0.10*	4

Os resultados representam a média ± EPM. A dose de veneno injetada foi 80 µg/rato. O valor da migração induzida pela injeção de PBS foi 0.18 ± 0.03 x 10⁶/cavidade (n=25).

* p < 0.05; Teste t de Student, em relação ao grupo controle

n = número de animais

TABELA 2 - Efeito da injeção de venenos (80 µg/rato) de serpentes do gênero *Bothrops*, em estágios distintos de desenvolvimento (jovens e adultos), sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de rato.

Veneno	Idade da serpente	Neutrófilos (x 10 ⁻⁶ /cavidade)	n
VBJ	Jovem	0.69 ± 0.10	5
	Adulto	2.61 ± 0.25	18
VBN	Jovem	0.48 ± 0.18	5
	Adulto	2.08 ± 0.25	20
VBM	Jovem	0.53 ± 0.11	5
	Adulto	3.91 ± 0.45	10

Os resultados representam a média ± EPM. A dose de veneno injetada foi 80 µg/rato. O valor da migração induzida pela injeção de PBS foi 0.18 ± 0.03 x 10⁶/cavidade (n=25). Os valores da migração foram todos estatisticamente diferentes do valor do grupo PBS, no mínimo ao nível de p < 0.05 (ANOVA; Teste de Duncan)

n = número de animais

TABELA 3 - Dosagem de Proteínas Totais e Atividade Fosfolipásica A (PLA) dos venenos de *B. jararaca* (VBJ), *B. moojeni* (VBM) e *B. neuwiedi* (VBN) adultos e jovens

Veneno	Idade da serpente	Proteínas	PLA
		µg/ml de veneno	U/ml
VBJ	Jovem	970	35
	Adulto	992	26
VBN	Jovem	920	61
	Adulto	930	97
VBM	Jovem	897	97
	Adulto	888	38

As proteínas totais foram determinadas pelo método modificado de LOWRY e os resultados representam a média de três determinações. A atividade PLA foi determinada pelo método HAAS et al, (1967) e os resultados representam a média de duas determinações

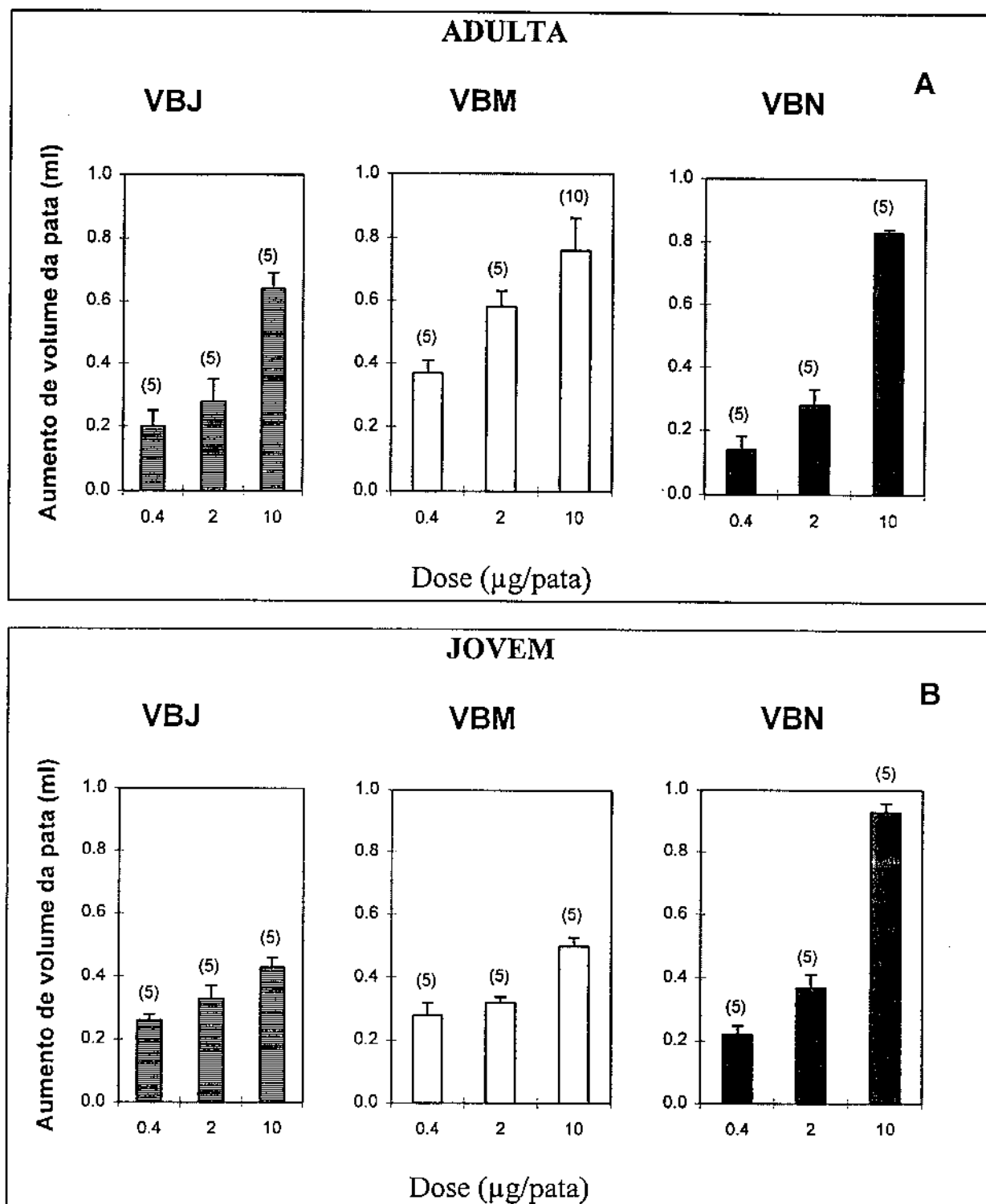


Figura 4 - Os venenos de *B. jararaca* (VBJ), *B. moojeni* (VBM) e *B. neuwiedi* (VBN) adultos induzem edema de pata, em ratos, de forma dose-dependente. Paineil A: veneno de serpentes adultas. Paineil B: veneno de serpentes jovens. O edema foi avaliado 1 hora após injeção dos venenos das serpentes adultas e 15 minutos para os das jovens. Neste tempo, o valor do volume da pata após injeção i.p.l. de salina foi $0,09 \pm 0,04$ ml ($n=5$). Os resultados representam a média $\pm$ EPM. O número entre parênteses representa o número de animais utilizados.

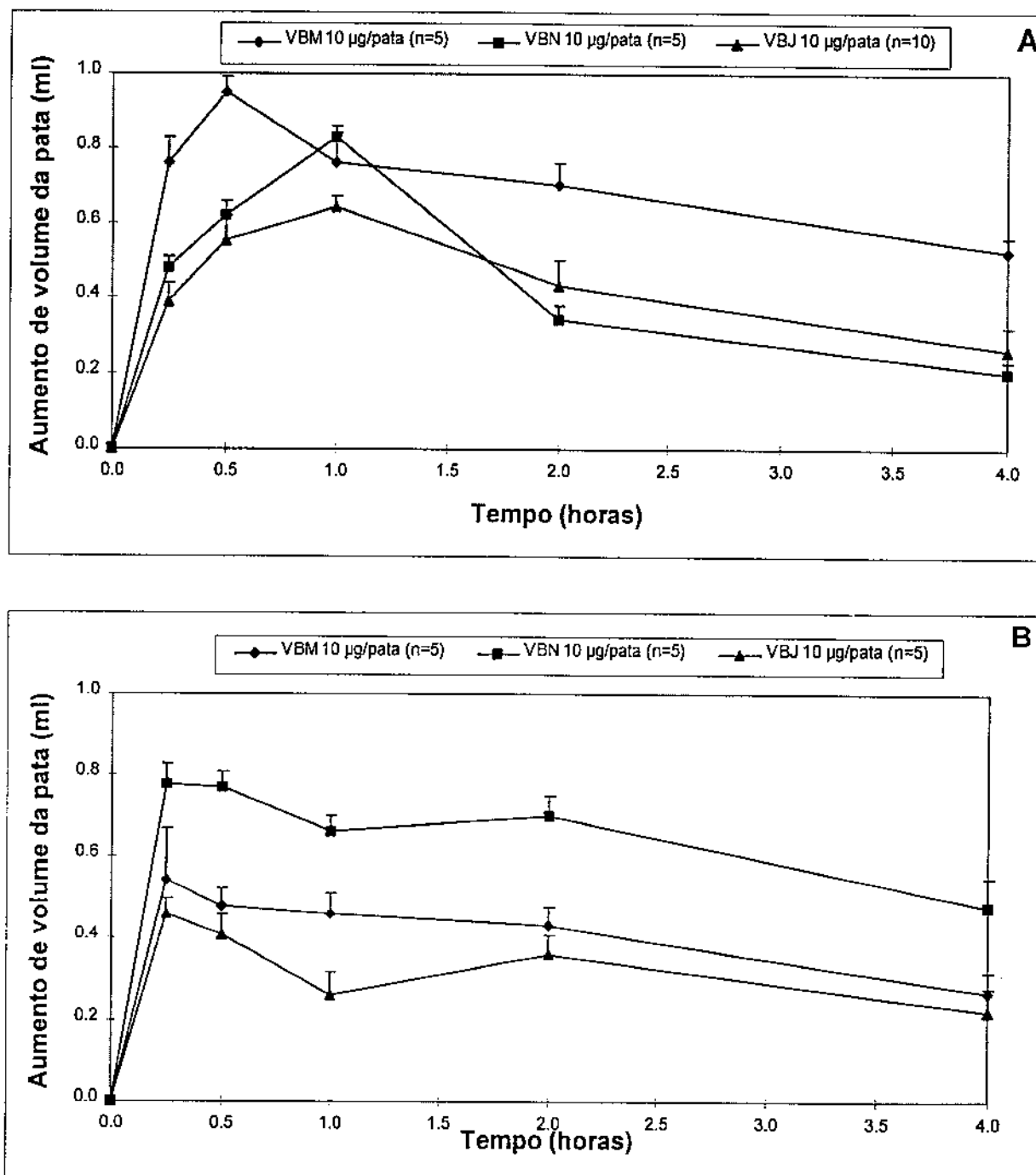


Figura 5 - Curso temporal do edema de pata induzido pelos venenos (10 µg/pata) de *B. jararaca* (VBJ), *B. moojeni* (VBM) e *B. neuwiedi* (VBN). Painei A: veneno de serpentes adultas. Painei B: veneno de serpentes jovens. Os resultados representam a média ± EPM. Foram utilizados 5 animais para cada grupo e tempo experimental.

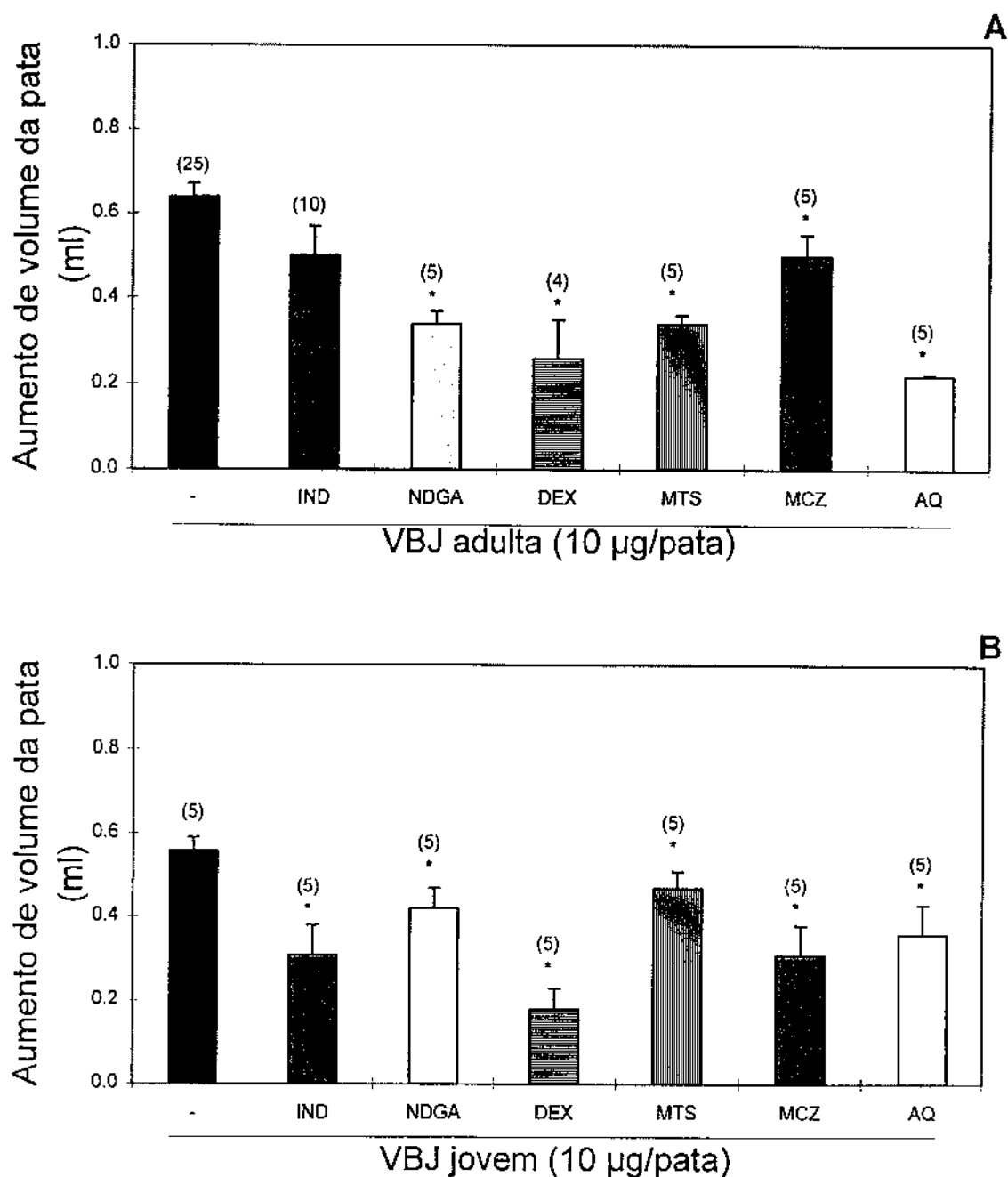


Figura 6 - Efeito do pré-tratamento dos animais com drogas e do aquecimento (90° C; 10 min.) do veneno (10 µg/pata) sobre o edema de pata induzido pelos venenos de *B. jararaca* (VBJ) adultas (Painel A) e jovens (Painel B). Indometacina (IND. 2,0 mg/kg), NDGA (50 mg/kg), Metisergida (MTS. 5,0 mg/kg) e Meclizina (MCZ. 25 mg/kg) foram administrados 1 hora antes do veneno (10 µg/pata); Dexametasona (DEX. 0,5 mg/kg) 2 horas antes. O edema foi avaliado 1 hora após a injeção do veneno das serpentes adultas e 15 minutos após o das jovens. Os resultados representam a média ± EPM. O número entre parênteses representa os animais utilizados. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste de Duncan).

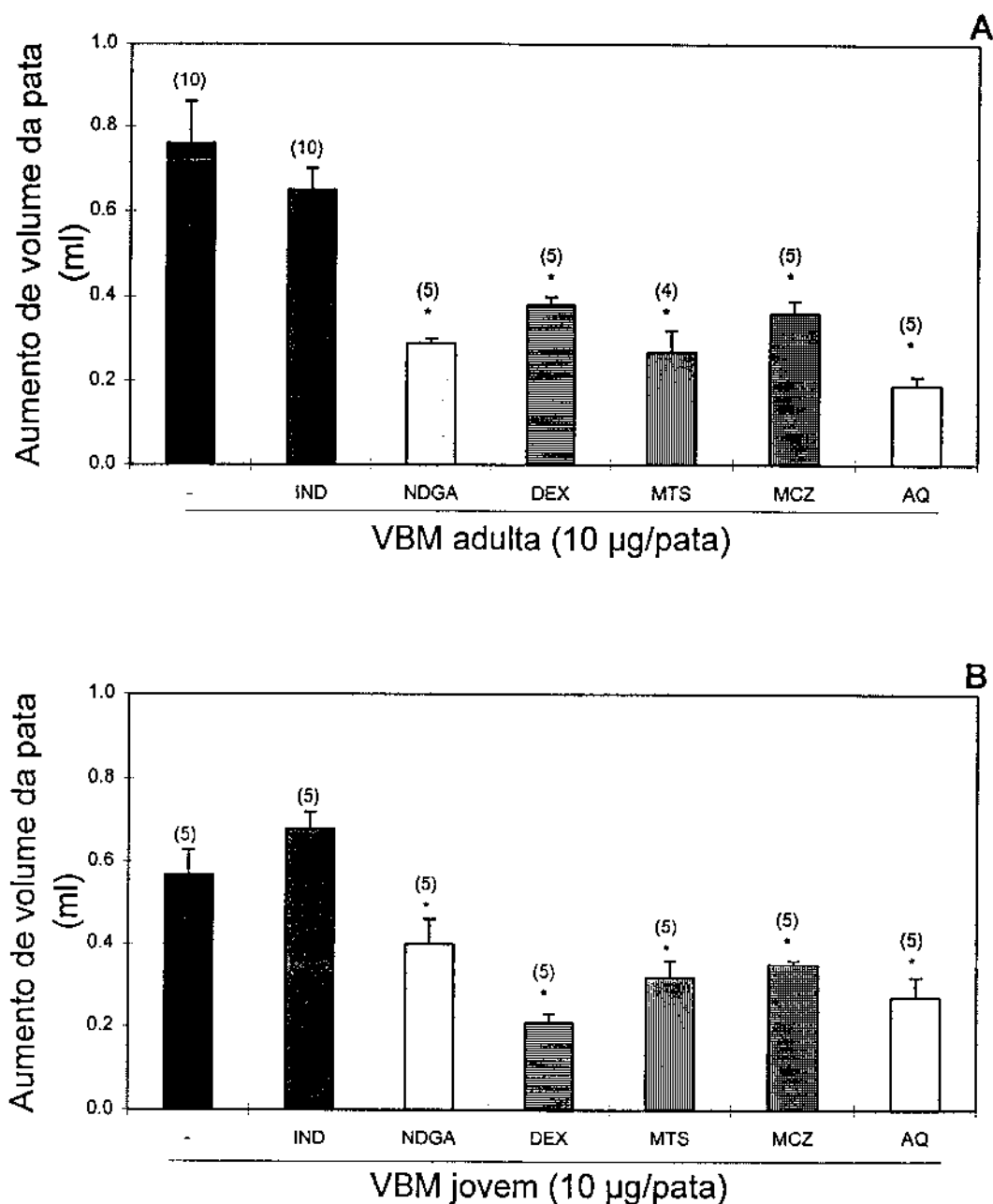


Figura 7 - Efeito do pré-tratamento dos animais com drogas e do aquecimento (90° C; 10 min.) do veneno (10 µg/pata) sobre o edema de pata induzido pelos venenos de *B. moojeni* (VBM) adultas (Painel A) e jovens (Painel B). Indometacina (IND. 2,0 mg/kg), NDGA (50 mg/kg), Metisergida (MTS. 5,0 mg/kg) e Meclizina (MCZ. 25 mg/kg) foram administrados 1 hora antes do veneno (10 µg/pata); Dexametasona (DEX. 0,5 mg/kg) 2 horas antes. O edema foi avaliado 1 hora após a injeção do veneno das serpentes adultas e 15 minutos após o das jovens. Resultados como média ± EPM. O número entre parênteses representa os animais utilizados. * p < 0,05, em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste de Duncan).

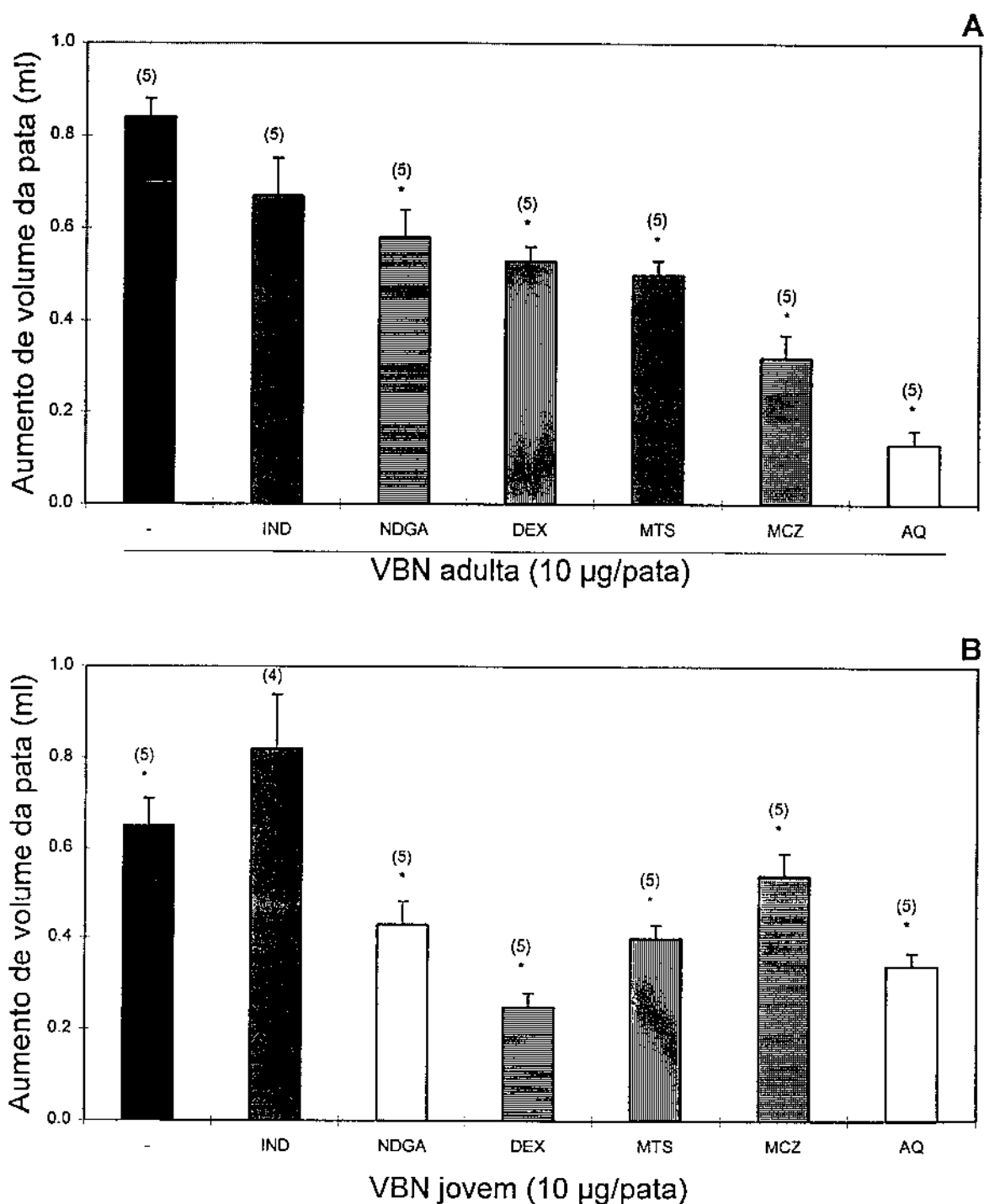


Figura 8 - Efeito do pré-tratamento dos animais com drogas e do aquecimento (90° C; 10 min.) do veneno (10 µg/pata) sobre o edema de pata induzido pelos venenos de *B. neuwiedi* (VBN) adultas (Painel A) e jovens (Painel B). Indometacina (IND. 2,0 mg/kg), NDGA (50 mg/kg), Metisergida (MTS. 5,0 mg/kg) e Meclizina (MCZ. 25 mg/kg) foram administrados 1 hora antes do veneno (10 µg/pata); Dexametasona (DEX. 0,5 mg/kg) 2 horas antes. O edema foi avaliado 1 hora após a injeção do veneno das serpentes adultas e 15 minutos após o das jovens. Os resultados representam a média ± EPM. O número entre parênteses representa os animais utilizados. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste de Duncan).

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstram que o VBJ, VBN e VBM de serpentes adultas, induziram uma migração de neutrófilos e edema de pata, de maneira dose-dependente, em ratos. O aquecimento prévio dos venenos, demonstrou que este efeito foi, em parte, devido a presença de componente(s) termolábel(eis). Como os venenos apresentaram conteúdo de proteínas totais semelhantes (ver Tabela 3), pode-se concluir que o VBM foi mais potente que os demais. O efeito do VBM em causar migração de neutrófilos foi de maior duração, refletindo, provavelmente, sua maior potência em relação aos VBJ e VBN. Por outro lado, 48 horas após a injeção i.p. dos venenos, o número de neutrófilos não foi diferente daquele observado na cavidade de animais tratados com PBS.

O uso de venenos de serpentes jovens demonstrou uma menor na atividade quimiotática para neutrófilos, em relação aos venenos de serpentes adultas, indicando que diferenças intraespecíficas devem, ser consideradas.

Tem sido demonstrado que a toxicidade dos venenos de filhotes, em muitos gêneros e espécies, é maior que a dos venenos de serpentes adultas (MINTON, 1975, 1967; FIERO et al., 1972; THEAKSTON & REID, 1978; GUTIÉRREZ et al., 1980; MEIER & FREYVOGEL, 1980; LOMONTE et al., 1983). Estes dados podem refletir diferenças na atividade de cada veneno, provavelmente devido à variações interespecíficas entre venenos botrópicos. Estas variações incluem desde mudanças na cor até diferenças nas ações básicas, tais como, hemólise, coagulação e toxicidade sistêmica, podendo ser utilizadas, inclusive,

juntamente com caracteres morfológicos, como instrumento taxonômico (JONES, 1976; YONG et al., 1980). Apesar destas evidências, deve ser ressaltado que na maioria destes trabalhos as diferenças de ações entre venenos de serpentes jovens e adultas estão relacionadas a toxicidade sistêmica, pouco relacionados com a gravidade das lesões locais. Neste sentido, sabe-se, por exemplo, que os acidentes ofídicos com cascavéis são de severo quadro de reações sistêmicas tóxicas, incluindo extenso bloqueio neuro-muscular, mioglobínúria e nefrotoxicidade (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985), muito embora não se observem efeitos locais. Já os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados pelo grave quadro de lesão local.

Como a migração de neutrófilos induzidas por venenos botrópicos de serpentes jovens, foi de baixa intensidade, o pré-tratamento com drogas antiinflamatórias foi feito apenas com os venenos provenientes de serpentes adultas.

A migração de neutrófilos foi inibida pelo pré-tratamento dos animais com NDGA (50 mg/kg), um inibidor tanto da ciclo como da lipoxigenase (TATESON et al., 1983), e com dexametasona (0,5 mg/kg), um inibidor da fosfolipase A₂, via liberação de lipocortina (FLOWER, 1989). Estes resultados reforçam a demonstração de FLORES et al. (1993) de que derivados da lipoxigenação, como o LTB₄ (FORD-HUTCHINSON et al., 1984), estão participando da resposta quimiotática destes venenos. Tem sido descrito que macrófagos são capazes de liberar LTB₄ (LEWIS & AUSTEN, 1988) Provavelmente, a principal fonte geradora de LTB₄ endógeno, sejam os macrófagos peritoniais residentes, ativados pelos venenos. A hipótese é viável pois FLORES et al. (1993) demonstraram que migração de neutrófilos induzida por veneno de *Bothrops alternatus* e *B. erythromelas*, era potenciada pelo tratamento prévio dos animais com tioglicolato. Sabe-se que este tratamento aumenta o número de macrófagos peritoniais residentes (RIBEIRO et al., 1991), e que estes podem funcionar como células de alarme (FERREIRA, 1980) e responder, à presença de substâncias estranhas, com a liberação de mediadores responsáveis pelo início de reações sistêmicas e locais, características de um processo inflamatório agudo, entre elas o recrutamento de neutrófilos (NATHAN, 1987). Entretanto, existem evidências na literatura sugerindo que o LTB₄ no rato, não é o principal agente quimioatraente para neutrófilos (FOSTER et al., 1986).

O inibidor da ciclooxigenase, Indometacina (HIGGS et al., 1984), potenciou a migração de neutrófilos induzida por VBJ, inibiu aquela induzida por VBN e não alterou o fenômeno para o VBM. A potenciação promovida pela Indometacina pode ser devida ao deslocamento da via metabólica do ácido araquidônico para a via da lipooxigenase, assumindo-se que a via da ciclooxigenase foi inibida pela droga (PIPER, 1984). Desta forma, deve estar ocorrendo uma maior síntese e liberação de LTB₄. O fato da Indometacina não alterar a resposta obtida com o VBM, pode significar que estamos trabalhando no limite máximo de geração de metabólitos do ácido araquidônico, desta forma, não ocorrendo potenciação da migração de neutrófilos. A inibição por Indometacina, da migração de neutrófilos induzida por VBN, não é fácil de ser compreendida. Não há dúvidas que o LTB₄ participa do fenômeno, uma vez que a dexametasona e o NDGA inibiram o processo. Entretanto tem sido descrito que a indometacina pode estar inibindo eventos moleculares envolvidos no processo de locomoção/migração destas células, tais como, alterações dos níveis de cálcio e nucleotídeos cíclicos, expressão de moléculas de adesão e liberação de fatores quimiotáticos (ABRAMSON et al., 1990; BARJA-FIDALGO et al., 1992). Tem sido sugerido que tais efeitos não estão relacionados com sua ação inibitória sobre a via da ciclooxigenase (ABRAMSON et al., 1990). Por outro lado, estas diferenças de sensibilidade aos tratamentos com drogas constituem mais uma evidência a favor de possíveis variações qualitativas na composição dos venenos, e provavelmente diferenças no mecanismo de indução da resposta inflamatória.

Ainda em relação ao efeito de drogas sobre a migração de neutrófilos induzida por estes venenos, vale ressaltar, que o tratamento com Dexametasona apresentou um efeito similar ao observado com uso do NDGA, reforçando a hipótese de que os mediadores quimiotáticos envolvidos são derivados primariamente da cascata do ácido araquidônico. Esta sugestão é reforçada pela demonstração de que os venenos de botrópicos possuem importante atividade fosfolipásica. Tem sido descrito que a PLA₂ é um dos principais componentes destes venenos (BAVASARAJAPPA & GOWDA, 1992). Recentemente demonstrou-se que a migração de neutrófilos induzida por *Bothrops erythromelas* e *B. alternatus* era maior para aqueles com maior atividade da enzima. Além disso, quando os venenos eram aquecidos (90°

C por 10 min.) previamente, tanto a atividade fosfolipásica, como a atividade quimiotática eram reduzidas (FLORES et al., 1993). No presente trabalho foram determinadas atividades fosfolipásicas dos venenos, entretanto nenhuma correlação entre a atividade da enzima e a migração de neutrófilos pode ser feita, com exceção para o VBM, que apresentou a maior atividade fosfolipásica e também a maior capacidade em induzir a migração de neutrófilos. Parece ser este o único veneno que reforça a hipótese levantada por FLORES et al. Vale ressaltar que nem sempre as alterações fisiopatológicas causadas por PLA, *in vivo*, estão relacionadas ao grau de atividade enzimática *in vitro* (FLETCHER et al., 1980; CONDREA et al., 1981; ROSENBERG et al., 1983). Além das fosfolipases, proteases de venenos podem estar envolvidas na inflamação aguda, agindo diretamente sobre células endoteliais ou na cascata do complemento (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989).

Além dos derivados da via a lipoxigenase, macrófagos ativados liberam um amplo espectro de mediadores, dos quais citocinas como IL-1 e TNF parecem ter especial importância desencadeando outras séries de reações, agindo localmente ou à distância, promovendo a liberação secundária de outras citocinas. Embora algumas destas já possam ter sido liberadas inicialmente por macrófagos, é sua liberação secundária que amplifica o sinal que desencadeia as reações de fase aguda da resposta inflamatória. Como resultado, surge no foco da lesão substâncias quimiotáticas para neutrófilos e para células mononucleares. Foi recentemente demonstrado que após a migração, neutrófilos também tornam-se capazes de sintetizar e liberar citocinas, como por exemplo TNF e fatores quimiotáticos para neutrófilos (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

No presente trabalho verificou-se que o aquecimento, nas mesmas condições descritas por FLORES e colaboradores, dos VBJ, VBM e VBN causou importante redução de suas atividades quimiotáticas para neutrófilos. Este fato demonstra que este efeito está relacionado à presença de componente(s) termolábel(eis) nos venenos brutos. Além disto, demonstra que o efeito quimiotático não deve-se à contaminação por endotoxina, pois esta substância quimiotática para neutrófilos é resistente ao calor.

É possível que diferenças no estágio de desenvolvimento das serpentes possam determinar a gravidade do acidente. Assim, KOUYOUMDJIAN et al., (1989) mostraram que a maior diferença clínica entre pacientes picados por *B. moojeni* jovens e adultos estava no grande incremento das ações locais - edema, necrose e infecção secundária - nos acidentes causados por serpentes adultas. O autor descreveu que estes efeitos poderiam estar relacionados à quantidade de veneno inoculado ou à diferenças na sua ação, e que os acidentes com serpentes adultas apresentavam grandes possibilidades de complicações locais evolutivas, mesmo após terapia com antiveneno em doses adequadas. A confirmação dos dados aqui apresentados pode ter importantes repercussões clínicas. O fato dos venenos de serpentes jovens do gênero *Bothrops* não causarem migração de neutrófilos significativa, sugere que estas células não desempenham papel fundamental no desenvolvimento de lesões locais. Desta forma, na ausência do sinal clínico característico dos acidentes com serpentes deste gênero, é possível que possa vir a ocorrer uma certa confusão inicial para o diagnóstico, principalmente, com os acidentes causados por cascavéis. Além da ausência de reação local, se existe também alguma semelhança com o tipo de reação de toxicidade sistêmica causada por estes venenos é uma questão em aberto para futuras investigações.

Em relação ao estudo de edema de pata, em linhas gerais, a comparação entre as atividades edematogênicas máximas dos venenos de serpentes jovens e adultas mostra que: 1. o VBM de serpentes jovens apresentou uma redução drástica (cerca de 50%) da sua atividade edematogênica, quando comparada a do veneno de serpentes adultas; 2. os VBN e VBJ apresentaram atividades comparáveis, independente do estágio de desenvolvimento das serpentes; 3. em todos os casos a reação foi mais precoce com o veneno de serpentes jovens. Como a quantidade de proteína total presente nos venenos de serpentes jovens e adultas se mostraram equivalentes (Tabela 3), diferenças de atividades devem refletir diferenças qualitativas e ou quantitativas dos componentes venenos. Quando se analisou o envolvimento de PLA presente nos venenos botrópicos, na fisiopatologia do edema de pata, observou-se que, diferentemente do que ocorreu com a migração celular, houve uma relação entre o edema e o conteúdo da enzima. Quando se analisou o envolvimento de PLA presente nos venenos botrópicos, na fisiopatologia ao edema de pata, observou-se que, assim como na migração de

células induzida por estes venenos, não foi possível se estabelece uma correlação direta entre a atividade enzimática “in vitro” o edema de pata, o que não descarta a participação da enzima no fenômeno, pois, além da atividade enzimática “in vitro” nem sempre se correlacionar com suas ações “in vivo” (FLETCHER et al., 1980), vários autores descreveram o envolvimento da PLA na gênese do edema de pata induzido por venenos de serpentes, principalmente através da indução da liberação de histamina por mastócitos (CHIU et al., 1989; CALHOUN et al., 1989; CIRINO et al., 1989), que parece estar intimamente relacionada às fases iniciais do edema de pata induzido por venenos botrópicos, principalmente de serpentes jovens, uma vez que a resposta obtida com estes venenos é mais precoce que a desencadeada por venenos de serpentes adultas.

Os dados apresentados em relação ao efeito do pré-tratamento com drogas sobre o edema de pata, são concordantes com os descritos por TREBIEN & CALIXTO (1989). Existem divergências apenas em relação aos dados obtidos com o aquecimento dos venenos. Segundo esses autores, o calor não alterou a atividade edematogênica do veneno de *B. jararaca*, o que contrasta com os dados aqui apresentados. Houve redução da atividade edematogênica dos venenos de todas as espécies estudadas, embora variações na intensidade da inibição possam ser observadas. Este resultado indica que as lesões inflamatórias induzidas pelos venenos botrópicos são dependentes, pelo menos em parte, da presença de um(s) fator(es) termolábil(eis).

O fato do edema induzido pelos venenos de todas espécies de serpentes estudadas, ser inibido pelo pré-tratamento com Dexametasona e NDGA, reforça a hipótese de que metabólitos do ácido araquidônico tem papel fundamental no processo. O corticóide atua indiretamente, via indução da síntese de lipocortinas (FLOWER, 1989), sobre a enzima PLA₂, bloqueando assim, a cascata do ácido araquidônico e a liberação de seus produtos. O NDGA atua diretamente sobre as vias da lipo e ciclooxygenase, bloqueando as enzimas envolvidas (HIGGS et al., 1984). Assim, os resultados obtidos não apenas reforçam o envolvimento de alguns mediadores na fisiopatologia do acidente botrópico, como também indicam estes grupos de drogas como alternativas para o tratamento da lesão inflamatória, independente da espécie em questão ou seu estágio de desenvolvimento. Além do efeito sobre a cascata do

ácido araquidônico, a dexametasona poderia estar agindo diretamente em células residentes e/ou células endoteliais, impedindo a liberação de citocinas e/ou outros mediadores participantes do processo inflamatório (RIBEIRO et al., 1991; FLORES et al., 1993). Assim, LOMONTE (1993) demonstrou que o veneno de *Bothrops asper* induz a liberação de IL-6. Esta citocina está envolvida na modulação da resposta de fase aguda de processos inflamatórios (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

O pré-tratamento com indometacina indicou que a via das ciclooxygenases da cascata do ácido araquidônico, não está envolvida na resposta edematogênica, uma vez que este antiinflamatório não alterou a resposta edematogênica aos venenos botrópicos, com exceção do VBJ jovem. Este fato reforça os resultados com Dexametasona e NDGA, sobre a participação de leucotrienos nestas lesões.

Estes resultados estão em desacordo com aqueles obtidos por TREBIEN E CALIXTO (1989). No entanto, estes autores usaram uma dose de 5,0 mg/kg, considerada elevada e capaz de inibir, também, a formação de leucotrienos (ARIGONI-MARTELLI, 1984).

Os resultados aqui apresentados mostram também que a serotonina é um importante mediador da resposta edematogênica induzida por estes venenos, pois este efeito foi inibido, para todos os venenos, pelo tratamento com Metisergida. Assim, também os anti-serotonênicos podem se constituir em importante alternativa terapêutica, associados a drogas antiinflamatórias. Já o tratamento com o anti-histamínico, Meclizina, mostrou que a histamina está envolvida nas lesões induzidas por VBM, independente do estágio de desenvolvimento. Sabe-se que os venenos botrópicos contém e são capazes de liberarem histamina (ROTHSCHILD & ROTHSCHILD, 1979). Os resultados aqui apresentados confirmam dados de literatura mostrando que a histamina está envolvida na formação de edema induzido pela maioria dos venenos botrópicos, independentemente do estágio de desenvolvimento. A não-inibição do edema induzido por VBM de serpentes adultas e por VBN de serpentes jovens pode refletir a maior capacidade liberadora de histamina por estes venenos. Esta hipótese deve ser comprovada analisando-se, por exemplo, a capacidade liberadora de histamina de

mastócitos pelos venenos e a dependência da dose de anti-histamínio necessária para causar o mesmo nível de inibição

Vários componentes dos venenos têm sido descritos como envolvidos na gênese e manutenção das alterações locais. Estes componentes são bioquimicamente heterogêneos e pode variar desde aminas biogênicas tipo histamina (TILMISANY et al., 1986) a peptídeos ou proteínas como as fosfolipases (VISHWANATH et al., 1985, 1987, 1988; MARSHALL et al., 1989; TENG et al., 1989; LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989; WANG & TENG, 1990a, 1990b, 1991, 1992; LIU et al., 1991; TAN et al., 1991; FERRER & MORENO, 1992; NAIR, 1993), esterases (OHTANI & TAKHASHI, 1983; OGUCHI, 1986; TENG et al., 1989; WANG & TENG, 1991), proteases (TENG et al., 1989), enzimas liberadoras de cininas (calicreínas, cininogenases; MEBS, 1970, VARGAFTIG, 1974; BJARNASON et al., 1983, SAMEL et al., 1987; BAILEY, 1991) e lecitinas (LOMONTE et al., 1990).

Entre os vários mecanismos descritos na indução do edema por componentes purificados do veneno estão: degranulação de mastócitos com liberação de histamina / serotonina (CHIU et al., 1989; CALHOUN, 1989; CIRINO, 1989; WANG & TENG, 1990; MORENO et al., 1992; LLORET & MORENO, 1993), atração de neutrófilos (WANG & TENG, 1991; FLORES et al., 1993) com formação de radicais superóxidos (WANG & TENG, 1991, 1992), indução da síntese/liberação prostaglandinas e leucotrienos (LTB₄) em mastócitos (WANG & TENG, 1991), liberação de bradicinina (ROCHA E SILVA et al., 1949; COHEN et al., 1970; VARGAFTIG et al., 1974; TENG et al., 1992), liberação de peptídeos vasoativos diferentes da bradicinina (OGUCHI et al., 1986), indução da liberação de EDRF (KOLB & KOLB-BACHOFEN, 1992) via estimulação do endotélio por bradicinina (CIRINO et al., 1991), potenciação da atividade da bradicinina por peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA; FERREIRA et al., 1992) e liberação de substâncias de reação lenta (agora identificadas como LTC₄ e seus metabólitos LTD₄ e LTE₄; (LAM & AUSTEN, 1992; HUANG, 1984).

Todos estes dados sugerem que o edema induzido por venenos de serpentes é de origem multifatorial, e assim, um único inibidor ou droga não poderá inibi-lo totalmente (BONTA et al., 1979; DETRAIT & JACOB, 1988; TREBIEN & CALIXTO, 1988).

Uma proposta geral sobre o mecanismo de ação dos venenos botrópicos e o envolvimento da PLA, como uma etapa central, na geração de mediadores e desencadeamento das lesões locais está mostrado na Figura 9. Estão representados também, os locais de atuação dos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais. De acordo com esta hipótese, os venenos botrópicos poderiam promover uma lesão inflamatória local, através de vias distintas. Estes venenos atuariam estimulando células residentes à liberar citocinas, que agiriam sobre células endoteliais, músculo liso vascular, leucócitos polimornucleares e outras, ou os venenos botrópicos poderiam agir diretamente sobre estas células. Nos dois casos haveria liberação de PLA₂, que induziria a formação e liberação de uma série de mediadores envolvidos na resposta inflamatória (enzimas lisossomais, PAF, ácido araquidônico, espécies ativas de oxigênio). Os venenos poderiam ainda estar liberando diretamente a PLA₂, que atuaria da mesma forma na gênese dos mediadores da lesão inflamatória local (baseado em PRUZANSKI & VADAS, 1991).

A observação de que antivenenos comumente utilizados para a soroterapia da picada de cobra mostra uma eficácia bastante limitada na neutralização das lesões locais induzidas por venenos (GUTIÉRREZ, 1981, 1986; LOMONTE, 1985; ROJAS, 1987), sugere a necessidade de terapias alternativas e/ou complementares para o acidente ofídico. Além de ajudar no desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas, o estudo de venenos pode também ser utilizado como ferramenta para o esclarecimento de mecanismos básicos da inflamação.

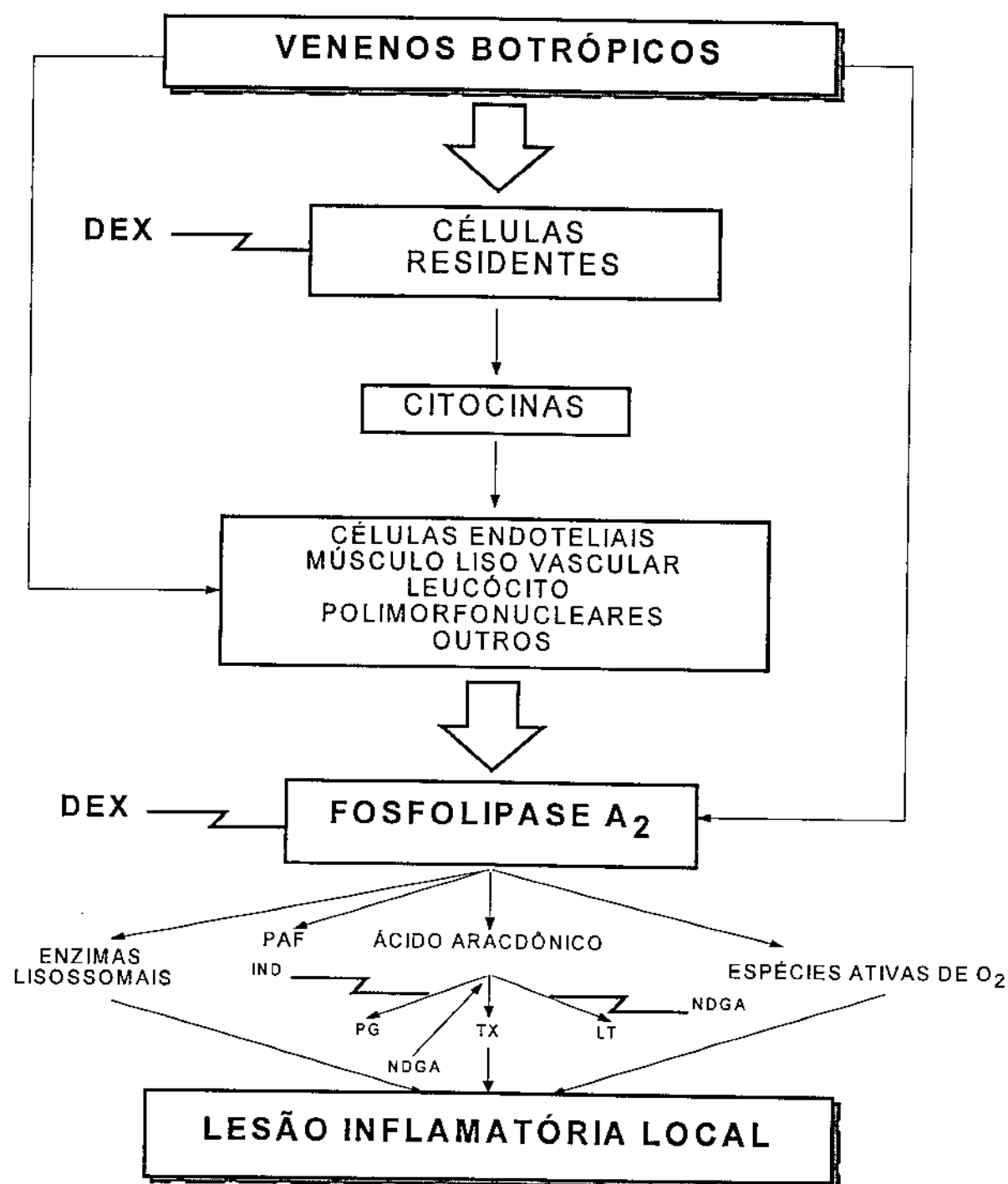


Figura 9 - Representação esquemática do envolvimento de fosfolipase A₂ na fisiopatologia da lesão inflamatória local desencadeada por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Nele está o indicados, também, os locais de ação de drogas antiinflamatórias. (Baseado em PRUZANSKI & VADAS 1991).

ABSTRACT

ABSTRACT

This thesis examines the inflammatory response induced in the rat peritoneal cavity and in the rat hind paw by the venom obtained from young and adult specimens of *Bothrops jararaca*; *B. neuwiedi* and *B. moojeni*.

The venoms of adult *B. moojeni* (BMV), *B. jararaca* (BJV) and *B. neuwiedi* (BNV) induced dose-dependent neutrophil migration into the rat peritoneal cavity. The intensity of this response varied among the venoms and probably reflects interspecific variations in their ability to induced this phenomenon. BMV was the most potent in causing peritonitis. Pre-treating the rats with dexamethasone and NDGA inhibited the peritonitis. This result suggests that arachidonic acid derivatives, particularly products of the lipoxygenase pathway, may be involved in this chemotactic response of neutrophils. Heating the venoms to 90° C for 10 min. significantly reduced their chemoattractant activity and indicates that the fraction(s) responsible is/are thermolabile. Compared to those from adult snakes, the venoms from young snakes were markedly less potent (about 5-fold less) at inducing neutrophil chemotaxis into the rat peritoneal cavity.

Venom from young and adult snakes of the above three species induced a dose-dependent edematogenic reaction in the rat hind paw with the maximum response being obtained at a venom dose of 10 µg/paw. At this dose, there was no difference in the responses induced by the venoms from adult snakes of each species although at lower doses minor variations were noted once again, BMV was the most potent in causing this edema. In

contrast, the venom from young snakes was 50% less potent than that adult snakes. The venoms of young snakes, the response induced by BNV was greater than that caused by BMV and BJV which in turn were equipotent.

A time course study of the edematogenic response induced by 10 μ g of venom/paw showed that the maximum effect with the venom from adult snakes occurred within the first hour for BJV and BNV, and within the first 30 min. for BMV. For the venoms from young snakes, the maximum effect was obtained 15 min. after injection.

Based on the foregoing observations, the following conclusions can be made: 1) BMV from young snakes has a markedly lower edematogenic potency (about 50%) compared with that measured in the venom of adult snakes, 2) BNV and BJV have similar potencies, regardless of whether the venom is from young or adult snakes, and 3) in all cases, the maximum reaction obtained earlier with the venom from younger snakes. Since the venoms of both young and adult snakes had similar total protein contents, the differences in their potencies most likely reflect qualitative variations in their composition.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABRAMSON, S. B. B.; CHERKSEY, D.; GUDE, J.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, M. R.; PHILIPS, L.; BLAU; G. WEISSMANN (1990) Nonsteroidal antiinflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. **Inflammation**, 14: 11 -13.
- ALTMAN, L. C. (1978) Chemotactic lymphokines: A review. In: Leukocyte Chemotaxis. pp. 267-287 (GALLI, J. C. and QUIE, P. G., Eds.) New York, Raven Press.
- ARRIGONI-MARTELI, E. (1985) Drug treatment of inflammation: requirements and expectations. In: The Pharmacology of Inflammation-Handbook of Inflammation, Vol. 5, pp. 1-26 (BONTA, I. L.; BRAY, M. A.; PARNHAM, M. J., Eds.) Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford.
- ASSAKURA, M. T., REICHL, A. P., ASPERTI, M. C. & MANDELBAUM, F. R. (1985) Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, 23:691-706.
- AZEVEDO-MARQUES, P.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. (1985) Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American Rattlesnake (*Crotalus durrisus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, (4):631-636.

- BAILEY, G. S.; AL-JOUFI, A.; RAWAT, S.; SAMITH, D. C. (1991) Neutralization of kinin-releasing enzymes of crotalid venoms by monospecific and polyspecific antivenoms. **Toxicon**, 29:777-781.
- BARJA-FIDALGO, C.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. (1992) Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. **Inflammation**, 16:1-12.
- BASAVARAJAPPA, B. S. & GOWDA, V. T. (1992) Comparative characterization of two phospholipases A₂ from indian cobra (*Naja naja naja*) venoms. **Toxicon**, 30:1227-1238.
- BAUMANN, H. & GAULDIE, J. (1994) The acute phase response. **Immunology Today**, 15(2):74-80.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. (1986) Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of same biological coin. **Nature**, 320:584-588.
- BILINGHAM, M. E. J. & GORDON, A. H. (1976) The role of acute phase reaction in inflammation. **Agents Actions**, 6:195-199.
- BJARNASON, J. B.; BARISH, A.; DIRENZO, G. S.; CAMPBELL, R.; FOX, J. W. (1983) Kaliikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.** 258:12566-12573.
- BOLANOS, R., (1974) Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Editora Universal de Costa Rica, San José, 133pp.
- BONTA, I. L.; VARGAFTIG, B. B.; BOHM, G. M. (1979) Snake venoms as an experimental tool to induce and study models of microvessels damage. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol 52, Snake Venoms (LEE, C. Y., Eds.), pp. 629-683. Berlin, Springer-Verlag.
- BRAZIL, V. & PESTANA, B. R. (1909) Nova contribuição ao estudo de envenenamento ophidico. **Revista Médica de São Paulo**, 19:375-382.

- BRAZIL, V. (1901) Contribuição ao estudo do veneno ophidico. **Revista Médica de São Paulo**, 15:255-260.
- CALHOUN, W.; YU, J.; CHAU, T. T.; MARSHALL, L. A.; WEICHMAN, B. M.; CARLSON, R. P. (1989) Pharmacologic modulation of D-49 phospholipase A₂-induced paw edema in the mouse. **Agents Actions**, 27:418-421.
- CASAL, A. (1817) *Cacografia Brasílica*. No: Dicionário Histórico das palavras portuguesas de origem tupi (CUNHA, A. G., 1978) Ed. Melhoramento - São Paulo, p. 174.
- CHIU, H. F.; CHEN, I. J.; TENG, C. M. (1989) Edema formation and degranulation of mast cells by a basic phospholipase A₂ purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon**, 27:115-125.
- CIRINO, G.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; REGOLI, D. (1991) Effects of bradykinin antagonists, NG-monomethyl-L-arginine and L-GN-nitroarginine on phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. **Gen. Pharmacol.**, 166:801-804.
- CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R. J. (1989) Study of phospholipase A₂-induced edema in rat paw. **Eur. J. Pharmacol.**, 166:505-510.
- COHEN, I., ZUR, M., KAMINSKI, E. and VRIES, A. (1970) Isolation and characterization of kinin-releasing enzyme of *Echis coloratus* venom. **Biochem. Pharmacol.**, 19:785-793.
- CONDREA, E.; FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. (1981) Effects of modification of one histidine residue on the enzymatic and pharmacological properties of a toxic phospholipase A₂ from *Hemachatus haemachatus* and *Naja naja naja* snake venoms. **Toxicon**, 19:61-71.
- CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S.H. (1986) The release of a neutrophil chemotacti factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, 129:65-76.

- CUNHA, F. Q.; SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. (1986) Macrophages stimulates with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an "in vivo" demonstration. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 19:775
- DAUBER, J. R. & ALISON, A. C. (1980) Secretion of chemotaxins by guinea pig lung macrophages. The spectrum of inflammatory cell responses. **Exp Lung Res.**, 1:23-32.
- DETRAIT, J. & JACOB, J. (1988) Antagonists of mouse paw edema induced by habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. **Jap. J. Exp. Med.**, 58:249-259.
- DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I; LEES, J; COCEANI, F. (1991). Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. **Brain Research** 562:199-206.
- DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M. (1988) New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev. Infec. Dis.* 10(1)168-189.
- DUNCAN, D. B. (1955) Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**, 11:1-42.
- FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. (1992) Biologically active peptides from *Bothrops jararacussu* venom. In: Contributions to Autacoid Pharmacology, pp.209-214. Basel, Birkhauser Verlag.
- FERREIRA, S. H. (1965) A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of the *B. jararaca*. **Br. J. Pharmac.**, 24:163-165.
- FERREIRA, S. H. (1980) Are macrophages the body alarm cell? **Agents Actions**, 10:229.
- FERREIRA, S. H. (1985) Prostaglandin hyperalgesia and the control of inflammatory pain. In: Pharmacology of Inflammation, pp. 107-116 (BONTA, I.L., BRAY, M.A. and PARNHAM, J.M., Eds.), Amsterdam - New York, Oxford.
- FERRER, X. & MORENO, J. J. (1992) Effects of copper, iron and zinc on oedema formation induced by phospholipase A₂. **Comp. Biochem. Physiol.**, 102C:325-327.

- FIERO, M. K.; SEIFERT, M. W.; WEAVER, T. J.; BONILLA, C. A. (1972) Comparative study of juvenil and adult prairie rattlesnake (*Crotalus v. viridis*) venoms. **Toxicon**, **10**:81-82.
- FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C.; RYAN, M.; ROSENBERG, P. (1980) Comparason of a relatively toxic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* snake venom with that of a relatively A₂ from *Hemachtus haemachatus* snake venom. II. Pharmacological properties en relationship to enzymatic activity. **Bioch. Pharmac.**, **29**:1565-1574.
- FLORES, C. A.; ZAPPELINI, A.; PRADO-FRANCASCHI, J. (1993) Lipoxigenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* ans *B. alternatus* vemons. **Toxicon**, **31** (12):1551-1560.
- FLOWER, R. J. (1989) Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A₂. In: Antiinflammatory steroid action. Basic and clinical aspects, pp.48-66 (SCHLEIMER, R. P.; CLAMOR, H. N.; ORONSKY, A. L., Eds.). New York: Academic Press.
- FONTONE, J. C. (1985) Mechanisms of chemotactic factors stimulation of polymorphonuclear leukocytes: modulation by prostaglandins. In: Inflammatory Mediators. pp. 127-148 (HIGGS, G.A. and WILLIAMS, T.J., Eds.) MacMillan.
- FORD-HUTCHIUSON, A. W.; BRUNET, G.; SAVARD, P.; CHARLESON, S. (1984) Leukotriene B₄ polymorphonuclear leukocytes and inflammatory exudates in the rat. **Prostaglandins**, **28**:13-27.
- FOSTER, S. J.; McCORMICK, M. E.; HOWARTH, A.; AKED, D. (1986) Leukocyte recruitment in the sub-cutaneous sponge implant model of acute anflammation in the rat is not mediated by leukotiene B₄. **Bioch. Pharmac.**, **35**:1709-1717.
- FURTADO, M. F. D. (1987) Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (HOGE, 1965) em função da idade das serpentes. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da USP/SP, para obtenção do título de Doutor.

- GLYNN, L. E. (1978) Regeneration and repair. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 50/I, pp. 206-230 (VANE, J. R. & FERRIERA, S. H., Eds.) Springer-Verlag.
- GONÇALVES, J. M. & VIEIRA, L. G. (1950) Estudo sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. *Anais Acad. Bras. Ciências*, **32**(1):141-150.
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*, **51**:211-223.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O.; BOLANOS, R. (1980a) Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*, **18**:603-610.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R. (1980b) Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.*, **28**:341-346.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, 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.; CERDAS, L. (1986) Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev. Biol. Trop.*, **34**:209-219.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CERDAS, L. (1986) Comparative study of edema-forming activity of Costa Rica snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.*, **85C**:171-175.
- HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. (1968) Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, **159**:103-117.
- HARKNESS, R. A. (1981) The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leukocyte, and its biochemistry. *Molecular Aspects in Medicine*, **4**(3/4):191-207.

- HARTREE, E. F. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, **48**:422-427.
- HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VANE, J. R. (1984) Eicosanoids in inflammation. **Ann. Clin. Res.**, **16**:287-299.
- HUA, X. Y. (1986) Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Acta Physiol. Scand.**, **551**(supl.):1-44.
- HUANG, H. C. (1984) Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipases A₂ of *Vipera russelli* snake venom. **Toxicon**, **22**:359-372.
- HUNNINGHAKE, G. W.; GALLIN, J. I; FAUCI, A. S. (1978) Immunologic reactivity of the lung. The in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. **Am. Rev. Resp. Dis.** **117**:15-23.
- HURLEY, J. V. (1978) The sequence of early events. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 50/I, pp. 26-67 (VANE, J. R. & FERRIERA, S. H., Eds.) Springer-Verlag.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. (1968) Pharmacology of peptides and proteins in snake venoms. **Ann. Rev. Pharmacol.**, **8**:299-318.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. (1970) Biochemistry of snake venoms. **Clin. Toxicol.**, **3**:389-431.
- JONES, J. M. (1976) Variations of venom protein in *Agkistrodon* snakes from North America. **Copeia**, **3**:558-562.
- KAISER, E. & MICHL, H. (1971) Chemistry and pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: Venomous animals and their venoms, vol. 2, pp.307-318. (BUCHERL, W. & BUCKLEY, E.E., Eds.). New York: Academic Press.
- KINI, R. M. & EVANS, H. J. (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, **27**:229-237.

- KINI, R. M. and IWANAGA, S. (1986) Structure-function relationships of phospholipases. II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon**, **24**:895-905.
- KOCHVA, E. (1987) The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, **25**:65-106.
- KOJ, A. (1985) In: The Acute Phase Response to Injury and Infection. (GORDON, A. H. & KOJ, A., Eds.), pp. 139-144, Elsevier.
- KOJ, A.; GAULDIE, J.; BAUMANN, H. (1993) Biological perspectives of cytokine and hormone networks. In: Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications (MACKIEWICZ, A.; KUSHNER, I.; BAUMANN, H., Eds.), pp. 275-287. Boca Raton, CRC Press.
- KOLB, H. & KOLB-BACHOFEN, V. (1992) Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunol. Today**, **13**:157-150.
- KOUYOUMDJIAN, J. A. & POLIZELLI, C. (1989) Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**(2): 84-90.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; FONSECA, M. G.; FARES, G. F.; NAKAOSKI, S. C. B.; ANANIAS, M. P.; KOUYOUMDJIAN, N. C. V. (1987). Acidentes ofídicos causados por *B. moojeni* na região de São José do Rio Preto: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **20** (Supl.): 53-54.
- LAM, B. K. & AUSTEN K. F. (1992) Leukotrienes: biosynthesis, release and actions. In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates (GALLIN, J.I., GOLDSTEIN, I.M. and SNYDERMAN, R., Eds.), pp. 139-147. New York, Raven Press.
- LEE, T. H. (1987) Interactions between alveolar macrophages, monocytes and granulocytes. Implications for airway inflammation. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **135**:S14-S17.

- LEWIS, R. A. & AUSTEN, K. F. (1988) Leukotrienes. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. pp. 121-128 (GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R., Eds.) New York: Raven Press.
- LIU, C. S., CHEN, J. M., CHANG, C. H., CHEN, S. W., TENG, C. M. and TSAI, I. H. (1991) The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Bioch. Biophys. Acta*, **1077**:400-408.
- LLORET, S. & MORENO, J. J. (1993) Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon*, **31**:949-956.
- LLOYD, A. R. & OPPENHEIM, J. J. (1992) Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunology Today*, **13**(5):169-172.
- LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J. M. (1989) A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. *Toxicon*, **27**:725-733.
- LOMONTE, B. (1985) Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta atenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, **23**:173-176.
- LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; RAMÍREZ, G. (1990) Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). *Toxicon*, **28**:75-81.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; 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**(2):93-105

- LOMONTE, B.; GENE, J. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. (1983) Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascavel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. **Toxicon**, **21**:379-384.
- LORENZETTI, B. B. & FERREIRA, S. H. (1985) Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, **114**:375-381.
- MacMILLAN, R. M. & FOSTER, S. J. (1988) Leukotriene B₄ and inflammatory disease. **Agents Actions**, **24**:(1/2):114-119.
- MAJNO, G. (1985) Inflammatory mediators: where are they going? In: **Inflammatory mediators**. pp. 1-6 (Higgs, G.A. and Williams, T. J., Eds) Macmillan.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; 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.; ASSAKURA, M. T. (1976) Some physical and biochemical characteristics to FH₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*, Vol 1, pp. 111-121 (OSHAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAY, Y., Eds.). London Plenum Press.
- MARSHALL, L. A.; CHANG, J. Y.; CALHOUN, W.; YU, J.; CARLSON, R. P. (1989) Preliminary studies on phospholipase A₂-induced mouse paw edema as a model to evaluate antiinflammatory agents. **J. Cell. Biochem.**, **40**:147-155.
- MARTIN, T. R.; RAUGI, G.; MERRITT, T. L.; HENDERSON, W. R. (1987) Relative contribution of leukotriene B₄ to the neutrophil chemotactic produced by the resident human alveolar macrophage. **J. Clin. Inv.**, **80**:1114-1124.
- McMANUS, L. M. (1986) Pathobiology of platelet-activating factor. **Pathol. Immunopathol. Res.**, **5**:104-117.
- MEBS, D. (1970) A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int. J. Biochem.**, **1**:335-342.

- MEHRTENS, J. (1987) Living snakes of the world, 480 pp. New York, Sterling Publishing.
- MEIER, J. & FREYVOGEL, T. A. (1980) Comparative studies on venoms of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). **Toxicon**, **24**:41-46.
- MENGDEN, G. (1983) The taxonomy of Australian elapid snakes. **Records Australian Museum**, **35**:195-222.
- MINTON (1967) Observations on toxicity and antigenic makeup of venoms from juvenile snakes. In: Animal Toxins (RUSSEL, F. E. & SAUNDERS, P. R., Eds.) Oxford, Pergamon Press. p. 211-222
- MINTON, S. A. (1967) Observations on toxicity and antigenic makeup of venoms from juvenile snakes. In: Animal Toxins, pp. 211-222 (RESSEL, F.E., SANDERS, P.R., Eds.) Oxford: Pergamon Press.
- MINTON, S. A. (1975) A note on the venom of an aged rattlesnake. **Toxicon**, **22**:828-830.
- MORENO, J. J.; FERRER, X.; ORTEGA, E.; CARGANICO, G. (1992) PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. **Agents Actions**, **36**:258-263.
- NAIR, X.; NETTLETON, D; CLEVER, D; TRAMPOSCH, K. M.; GHOSH, S.; FRANSON, R. C. (1993) Swine as a model of skin inflammation: phospholipase A₂-induced inflammation. **Inflammation** **17**:205-215.
- NAKAMURA, M. & FERREIRA, S. H. (1987) Peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmac.**, **135**:145-153.
- NATHAN, C. F. (1987) Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, **79**:319-324.
- OGUCHI, Y.; SUDA, T.; SUZUKI, T.; OHTANI, Y.; TAKAHASHI, H. (1986) Isolation and physiological action of capillary permeability increasing-enzyme from the venom of *Agkistrodon caliginosus*. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **198**:557-564.

- OTHANI, Y & TAKAHASHI, H. (1983) Purification of a capillary permeability increasing-enzyme from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (kankoku-mamushi). *Toxicon*, 21:871-878.
- PENNINGTON, J. E.; ROSSING, T. H.; BOERTH, L. W.; LEC, T. H. (1985) Isolation and partial characterization of a human alveolar macrophage-derived neutrophil-activating factor. *J. Clin. Invest.*, 75:1230-1237.
- PERKINS, J. R.; PARKER, C. E.; TOMER, K. B. (1993) The characterization of snake venoms using capillary eletrophoresis in conjuntion with eletrospray mass spectrometry: black mambas. *Eletrophoresis*, 14:458-468.
- PIPER, P. J. (1984) Formation and action of leukotrienes. *Physiol. Rev.*, 64(2):744-761.
- PRUZANSKI, W. & VADAS, P. (1991) Phospholipase A₂ - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunology Today*, 12,(5):143-146.
- REYNOLDS, H. Y. (1983) Lung inflammation: role of endogenous chemotactic factors in attracting polymorphonuclear granulocytes. *Am. Rev. Resp. Dis.* 127:516-525.
- RIBEIRO, L. A. & JORGE, M. T. (1987) Acidente por *Bothrops jararaca* adulta e filhote: diferenças clínicas, epidemiológicas e na capacidade de alterar a coagulação sangüínea. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.*, 20 (supl.) 54.
- RIBEIRO, R.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. (1991) IL-8 causes in vivo neutrophil migration by cell-dependent mechanism. *Immunology*, 73:472-477.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. (1949) Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma by snake venoms and trypsin. *J. Physiol.*, 156:261-273.
- ROCHA E SILVA, N. O. (1978) Brief history of inflammation In: handbook of experimental Pharmacology. vol 50 / I pp: 6-25 (Vam, J. R. and Ferreira S. H., Eds). Springer-Verlag.

- ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. A.; GENE, J. A.; GOMEZ, M.; CERDAS, L. (1987) Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por le antiveneno polivalente producido en Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.**, **35**:59-67.
- ROSENBERG, P.; CONDREA, E.; RUPUANO, B. E.; SOONS, K. R.; YANG, C. C. (1983) Dissotiation of pharmacological and enzymatic activites of snake venom phospholipase A₂ by modification of carboxylate groups. **Bioch. Pharmac.**, **32**:3525-3530.
- ROSENFELD, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment snake bites in South America. In: **Venomous animal and their venoms**. pp. 345-403 (BUCHERL, W. & BUCKLEY, E.E., Eds.). New York: Academic Press.
- ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A; NAHAS, L. (1958) Regeneration of fibrinogen after defibrination by bothropic venom in man and in dogs. Relationships with clotting and bluding time. *Revta Clinic. S. Paulo*, (34) 36-44.
- ROTHSCHILD, A. M. & ROTHSCCHILD, Z. (1979) Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: **Snake venoms. handbook of experimental pharmacology**, vol 52, pp. 591-628. Berlin: Springer.
- RUSSEL, F. E., CARLSON, R. W., WAINSCHEL, J.; OSBORNE, A. H. (1975) Snake venom poisoning in the United States. Experiences with 550 cases. **J.A.M.A.**, **233**:341-344.
- SAMEL, M.; SIIGUR, E.; SIIGUR, J. (1987) Purification and characterization of two arginine ester hydrolases from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Toxicon**, **25**:379-388.
- SAWAI, Y. (1980) Studies on snakebites in the Asian areas. In: **Natural Toxins**. pp.25-32 (EAKER, D. & WADSTROM, T., Eds.) Oxford: Pergamon Press.
- SAZIMA, I. (1991) Caudal luring in two neotropical pitvipers, *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu*. **Copeia**, **1**:245-248.

- SEDGWICK, A. D. and WILLOUGHBY, D.A. (1985) Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Handbook of inflammation, vol 5, pp. 27 - 47 (Bonta, I, L., Bray, M. A. and Parnham, M. J., Eds) Elsevier.
- SMITH, N. J. H. (1980). LEUKOTIENE, B: A potential mediators of inflammation. **J. Pharm. Pharmacol**, 32: 517-518.
- SNEDECOR, G. W. (1963) Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. **The Iowa University Press**, Iowa.
- SOUZA , G. E. P. & FERREIRA, S. H. (1985) Blockade by antimacrophage serum of migration of PMN neutrophil into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Action**, 17:97-103.
- SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S. H. (1988) Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is induced by macrophage depletion. **Agents Action**, 24:377
- TAN, N. H., SAIFUDDIN, M. N.; YONG, W. Y. (1991) The edema inducing activity of phospholipase A₂ enzymes. **Bioch. Int.**, 23:175-181.
- TATESON, J. E.; RANDALL, REYNOLDS, C. H., JACKSON, W. P., BHATTACHERJEE, P.; SALMON, J. A.; GARLAND, L. G. (1988) Seletive inhibition of arachidonate 5-lipoxigenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. **Br. J. Pharmac.**, 94:528-539.
- TENG, C. M., HSU, M. F.; WANG, J. P. (1992) Comparesion of kinin-forming and amidolytic activities of four trimucases, oedema-producing and kinin-releasing enzymes, from *Trimeresurus mucroscquamatus* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, 44:306-310.
- TENG, C. M.; WANG, J. P.; PENG, H. C.; OUYANG, C. (1989) Edema-producing proteins isolated from *Trimeresurus mucroscquamatus* snake venom. **Toxicon**, 27:899-905.

- THEAKSTON, R. D. G. & REID, H. A. (1978) Change in the biological properties of venom from *Crotalus atrox* with ageing. *Period. Biol.*, **80** (supl. 1):123-133.
- TILMISANY, A. K., MUSTAFA, A. A., ABDEL-AZIZ, A.; OSMAN, O. H. (1986) Evidence for the presence of histamine in Gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom. *Toxicon*, **24**:1159-1161.
- TREBIEN, H. A. & CALIXTO, J. B. (1989) Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions*, **26**:292-300.
- TRINQUIER, E. & CECCALDI, J. (1948) Toxicité des glandes salivaires chez quelques viperides africains à leur naissance. *C. R. Séanc. Soc. Biol.*, 441.
- TU, A. T. (1977) *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, 560 pp. New York, Wiley and Sons.
- VARGAFTIG, B. B., BHARGAVA, N., & BONTA, L. L. (1974) Haemorrhagic and permeability increasing effects of *Bothrops jararaca* and other *Crotalidae* venoms as related to amine or kinin release. *Agents Actions*, **4**:163-168.
- VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. (1985) Purification of an edema-inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* venom and its interaction with aristolochic acid. *Toxicon*, **23**:617.
- VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. (1987) Characterization of tree edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon*, **25**:501-505.
- VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. (1988) Purification and partial biochemical characterization of an edema inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. *Toxicon*, **26**:713-720.
- WANG, J. P. & TENG, C. M. (1990a) Comparison of the enzymatic and edema-producing activities of two venom phospholipase A₂ enzymes. *Eur. J. Pharmacol.*, **190**:347-354.

- WANG, J. P. & TENG, C. M. (1990b) Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A₂ enzymes isolated from *Trimeresurus mucroscquamatus* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, **42**:846-850.
- WANG, J. P. & TENG, C. M. (1991) Effects of anti-inflammatory drugs on rat hind-paw swelling caused by phospholipase A₂ from *Naja naja atra* venom. **Naunyn-Schmiedeberg's Archs. Pharmacol.**, **344**:377-381.
- WANG, J. P. & TENG, C. M. (1992) Roles of PMN leukocytes, platelets and some mediators in rat hind-paw oedema induced by two phospholipase A₂ enzymes from *Trimeresurus mucroscquamatus* snake venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, **44**:300-305.
- WARRELL, D. A. & FENNER, P. J. (1993) Venomous bites and stings. **Br. Med. Bull.**, **49**:423-439.
- WEISSMAN, H. F.; BARTOW, T.; LEPPA, M. K. (1990) Soluble human complement receptor type 1: *in vivo* inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. **Science**, **249**:146-151.
- WILKINSON, P. C & ALLAN, R. B. (1978) Assay Systems for measuring Leukocyte Locomotion: an overview. In: **Leukocyte chemotaxis**, pp 1-23 (Gallin, J. I. & Quie, P. G., Eds) New York, Raven Press.
- WILKINSON, P. C. (1984) Textbook of immunopharmacology, pp. 217-231 (Dale, M. M. S and Foreman, J. C., Eds) Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- WILLEMSE, G. T. (1978) Individual variation in snake venom. **Comp. Bioch. Physiol.**, **61(b)**:553-557.
- WILLIAMS, T. J. (1984) Mechanisms of inflammatory oedema formations. In: Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 210-216.
- WINDER, C. V.; MAX, J.; BEEM, M. A. (1957) Rapid foot volume measurements on unanesthetized rat and the question of a phenylbutazone effect on anaphylactoid oedema. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, **112**:147-182.

- YANCEY, K. B. (1989) Biological properties of human C5a: Selected in vitro and in vivo studies. **Clin. Exp. Immunol.**, **71**: 207-210.
- YOUNG, R. A.; MILLER, M. D.; OCHSNER, D. C. (1980) The Grand Canyon rattlesnake (*Crotalus viridis abyssus*): comparison of venom protein profiles with other *Viridis* subspecies. **Comp. Biochemic. Physiol.**, **66**:601-603.