

LUIZ DE FARIA

**ESTUDO DAS ATIVIDADES
EDEMATOGENICA E HEMORRÁGICA DO
VENENO DE *Bothrops lanceolatus* EM
RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Campinas 1996

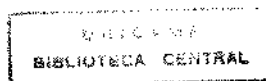




Fig. 223. *Bothrops lanceolatus*, juvenile; Martinique, West Indies.
Photo by Hans Boos.

LUIZ DE FARIA

**ESTUDO DAS ATIVIDADES
EDEMATOGENICA E HEMORRÁGICA DO
VENENO DE *Bothrops lanceolatus* EM
RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Campinas 1996

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F225e Faria, Luiz de
Estudo das atividades edematogênicas e hemorrágica do veneno de
Bothrops Lanceolatus em ratos / Luiz de Faria. Campinas, SP : [s.n.],
1996.

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

1. Veneno. 2. Edema. 3. Hemorragia. I. Albetiza Lôbo de
Araújo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

LUIZ DE FARIA

**ESTUDO DAS ATIVIDADES
EDEMATOGENICA E HEMORRÁGICA DO
VENENO DE *Bothrops lanceolatus* EM
RATOS**

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia do Enfermeiro Luiz de Faria.

Campinas, 01 de outubro de 1996


Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo
- Orientadora -

Campinas 1996



UNICAMP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof.ª Dr.ª Albertiza Leão de Araújo

Membros:

1. Prof.ª Dr.ª Albertiza Leão de Araújo *Albertiza Leão de Araújo*
2. Prof. Dr. Carlos Alberto Flores *Carlos A. Flores*
3. Prof. Dr. Carmine Antonio de Souza *Carmine Antonio de Souza*

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

Data:

01/10/96

A

DEUS, pela força espiritual dispensada em minha vida para tudo quanto O tenho solicitado.

A

Vicente e Leonídia, meus pais, os quais, mesmo não tendo frequentado escola, se preocuparam com minha educação escolar, matriculando-me na escola rural do Barroão, em Socorro. Sebastião, Maria, Fátima, Neuza e Jemima, meus irmãos. Caetano, José, Abílio e Luziana, meus cunhados.

A

Maria e Adolfo, hospitaleiros admirados, pais da Carmem, mãe dos meus filhos, Breno e Túlio, parte de minha história, tornando tudo mais significativo e cheio de coragem na busca de novas conquistas.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, pelo convívio, entusiasmo, incentivo e pela oportunidade de estar em contato com a pesquisa científica.
- Ao Dr. Cassian Bon, do Instituto Pasteur, pelo fornecimento do veneno de *Bothrops lanceolatus*.
- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Flores, pelas sugestões, colaboração e visão críticas sempre relevantes.
- Ao Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza, pelas correções, críticas e sugestões bastante pertinentes.
- À Profa. Dra. Lara Cury, pelos comentários e sugestões.
- Ao Prof. Dr. Fábio Bucarechi, pelas sugestões e críticas.
- Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela colaboração, pelo acompanhamento, sugestões, críticas, fornecimento das drogas e uso de aparelhos para realizar este trabalho.
- Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pelas sugestões, crítica e auxílio.
- Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Magna, pelo auxílio nas análises estatísticas.
- Ao Prof. Sebastião Rodrigues Cordeiro, pela revisão gramatical.

- À colega de laboratório, Ana Olívia de Souza, pelo convívio e colaboração.

- A Sílvia Regina Seccoli, Ivani Aparecida de Souza, José Luiz Donato e demais colegas do Departamento de Farmacologia pelo incentivo, colaboração, e os momentos vividos.

- Aos docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
I - INTRODUÇÃO.....	3
II - OBJETIVOS.....	13
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 - Animais.....	14
3.2 - Veneno.....	14
3.3 - Soro Anti <i>Bothrops lanceolatus</i>	14
3.4 - Fármacos e Reagentes.....	14
3.5 - Tratamentos.....	15
3.5.1 - Mepiramina e Ciproheptadina.....	15
3.5.2 - HOE 140.....	15
3.5.3 - Captopril.....	15
3.6 - Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico.....	15
3.6.1 - Dexametasona.....	15
3.6.2 - Indometacina.....	16
3.6.3 - BW A4C.....	16
3.7 - Iloprost.....	16
3.8 - Efeito do soro anti <i>Bothrops lanceolatus</i> sobre o edema e a hemorragia induzidos pelo VBL.....	16
3.9 - Determinação do aumento de volume de pata (edema).....	17
3.9.1 - Avaliação da hemorragia induzida pelo VBL "in natura" em músculo esquelético de ratos.....	17
3.9.2 - Reagente de Drabkin.....	18
3.9.3 - Curva padrão de hemoglobina.....	19
3.9.4 - Análise estatística.....	20

IV - RESULTADOS	21
4.1 - Aumento de volume de pata (edema)	21
4.2 - Efeito do iloprost sobre o edema.....	22
4.3 - Efeito do tratamento com fármacos sobre o edema	22
4.4 - Efeito do soro anti <i>Bothrops lanceolatus</i>	23
V - DISCUSSÃO	44
VI - CONCLUSÕES	49
VII - ABSTRACT	50
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

A capacidade de venenos ofídicos induzirem efeitos locais é bem conhecida. Nesta trabalho, investigamos o edema e a hemorragia, induzidos pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) "in natura" e/ou aquecido, em ratos. O edema foi induzido por injeção subplatar (12,5-100 µg/pata) e quantificado por hidropletismógrafo. A hemorragia foi induzida por injeção intramuscular (0,25-64 µg), no músculo gastrocnêmio esquerdo, e expressada como a quantidade de hemoglobina(hb) acumulada no músculo, determinada pelo método de cianometemoglobina. Com todas as doses do veneno testada, o edema apresentou resposta máxima 15 minutos após a administração. A resposta máxima foi observada com o VBL na dose de 75 µg/pata (salina controle = $0,09 \pm 0,001$ ml e veneno = $1,09 \pm 0,05$ ml, n=7), e desapareceu dentro de 24 horas. O efeito máximo hemorrágico foi observado com 32 µg do VBL (salina controle = $1,23 \pm 0,06$ mg hb/g de tecido e veneno = $6,77 \pm 0,69$ mg hb/g de tecido, n=6), e desapareceu dentro de 72 horas. O VBL aquecido (97°C, 30 segundos) reduziu o edema em 70% e aboliu completamente a atividade hemorrágica. A administração concomitante do VBL (75 µg) aquecido, com o iloprost (0,1 µg), potencializou o edema em duas vezes. Pré-tratando-se os ratos com mepiramina (6mg/kg), ciproheptadina (6mg/kg), mepiramina e ciproheptadina (6 mg/kg), 15 minutos antes; dexametasona (1 mg/kg), 2 horas antes; BW A4C (10 mg/kg) e Hoe 140 (0,6 mg/kg), 30 minutos antes; inibiram o edema induzido pelo VBL aquecido (75 µg), associado ao iloprost (0,1 µg), em 28%, 55%, 77%, 63%, 35% e 30%; respectivamente. A co-administração do VBL aquecido (75 µg), com o captopril (300 µg), potencializou o edema em 44%, mesmo na ausência do iloprost. A indometacina (10mg/kg) não foi efetiva. A incubação do soro anti*Bothrops lanceolatus* (antiVBL) com o VBL "in natura", neutralizou completamente o efeito hemorrágico mas aboliu somente parcialmente (45%) o

edema. A administração intravenosa do antiVBL imediatamente após a injeção subplantar ou intramuscular do VBL, neutralizou 30% do edema e 38% da hemorragia. Quando o antiVBL foi incubado com o VBL aquecido associado ao iloprost, e administrado na pata dos ratos, a neutralização foi discreta (em torno de 30%), e foi observado somente com a menor proporção (0,125 ml antiVBL/mg VBL). Quando administrado por via intravenosa imediatamente após a injeção do veneno aquecido, foi completamente ineficaz. Estes resultados, indicam que o VBL induz edema na pata e hemorragia no músculo de ratos. O VBL aquecido induz edema livre de hemorragia. O antiVBL neutralizou completamente o efeito hemorrágico e inibiu somente parcialmente o edema, quando foi pré-incubado com o VBL. O antisoro foi pouco efetivo em neutralizar ambas as atividades quando foi administrado por via intravenosa. Estas observações indicam que histamina, serotonina, bradicinina e produtos da lipoxigenase estão envolvidos no edema causado pelo veneno de *Bothrops lanceolatus*.

I - INTRODUÇÃO

O mais velho relato sobre veneno de serpentes foi escrito em papiro, no Egito antigo, cerca de 1600 a.C.. Como ilustrado por Sustrate, e posteriormente por Nagarjuna, 800-700 a.C., o veneno de serpente era usado com o objetivo de prolongar a vida e essa foi, talvez, a primeira ilustração na história do uso medicinal de venenos de serpentes. Francisco Redi, em 1664, demonstrou que certos venenos necessitam ser injetados na pele para produzirem seus efeitos, o que levou Felice Fontana, em 1766, a iniciar o estudo toxicológico e a pesquisa científica sobre venenos ofídicos.

No final do século XIX, Silas Weir Mitchell (1886) publicou importantes observações sobre venenos de várias espécies, enfatizando que na composição das secreções havia substâncias com propriedades tóxicas para imobilizar, matar e digerir a presa (Devi, 1968; Condrea, 1979).

São conhecidas aproximadamente 2500-3000 espécies de serpentes. Deste total, cerca de 15% são venenosas e estão taxonomicamente classificadas em cinco famílias: *Viperidae*, *Crotalidae*, *Elapidae*, *Hydrophidae* e *Colubridae* (Mengden, 1983; Mehrtens, 1987). As espécies pertencentes às famílias *Viperidae*, *Crotalidae* e *Elapidae* são as de maior importância médica (Warrel & Fenner, 1993) e produzem veneno por duas glândulas exócrinas especializadas, que se localizam na boca (Kochva, 1987). Geralmente os venenos apresentam coloração branca, amarela ou laranja e são classificados de acordo com seus princípios tóxicos e modos de ação (Ohsaka, 1979). Os venenos ofídicos contêm grande número de proteínas, bem como compostos não protéicos com diferentes atividades biológicas. Em geral, as proteínas correspondem a 90% do peso seco e possuem grande importância fisiopatológica, podendo ou não apresentar ações enzimáticas importantes. Muitas destas proteínas são toxinas ou enzimas com propriedades tóxicas (Moura da Silva e col., 1990). Outros compostos são encontrados em menor

proporção, tais como: organofosforados, íons metálicos e materiais orgânicos não protéicos (Devi, 1968).

Os venenos de serpentes pertencentes às famílias *Crotalidae* e *Viperidae*, além de efeitos sistêmicos ou letais, causam efeitos locais caracterizados por edema, hemorragia e necrose (Ohsaka e col. 1966; Rosenfeld, 1971; Ownby, 1984; Gutiérrez & Lomonte, 1989), evidenciando um fenômeno complexo e até então pouco compreendido (Ohsaka, 1979).

O edema pode ser provocado por vários mecanismos, como infecções parasitárias, obstruindo vasos linfáticos (filariose); obstruções venosas (trombose venosa profunda); dificuldade no retorno do sangue venoso (insuficiência cardíaca); desnutrição grave ou patologia renal com perda de proteínas plasmáticas (queda na pressão coloidosmótica); remoção ganglionar cirúrgica (para evitar disseminação de câncer); mastectomia radical (exerese de mama cancerosa); insuficiência renal; fenômenos auto-ímmunes; traumas; outras infecções etc.. Estes são tipos de edema, onde permanece a integridade vascular sem aumento de permeabilidade, estando incluídos, portanto, somente os desequilíbrios hidrostático e coloidosmótico (Junqueira & Carneiro, 1995; Bonta & Noordhoek, 1973).

Após qualquer lesão tecidual, ocorre um espectro de fenômenos celulares e sistêmicos, pelos quais o hospedeiro tenta restaurar e manter a homeostasia. Esta reação, denominada inflamação, é uma resposta protetora no sentido de destruir, diluir ou remover o agente causador. Ocorre em qualquer parte do organismo e é útil à sua defesa (Belante, 1980; Gallin e col. 1988).

Julius Cohnheim (1889) forneceu uma das primeiras descrições microscópicas da inflamação, observando, em mesentério de rã, uma hiperemia ativa com extravasamento de plasma (liquordiapedese), de leucócitos (diapedese leucocitária ou leucodiapedese) e de hemácias (eritrodiapedese). Os elementos extravasados (plasma e células) formam o exsudato inflamatório. Os leucócitos polimorfonucleares ou granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) são as primeiras células a chegarem ao local lesado. Inicialmente, se aderem às paredes das vênulas pós-capilares e, através destas, migram para o

sítio inflamado, atraídos por substâncias com propriedades quimiotáticas (Dale e col. 1994), como, por exemplo, fatores do complemento ativado, como fragmento C5a (Macmillan & Foster, 1988). Particularmente, os neutrófilos fagocitam, destroem e digerem microorganismos. Os monócitos e linfócitos compoem os leucócitos mononucleares ou agranulócitos. Os monócitos chegam ao local inflamado horas após os polimorfos nucleares e aí se transformam em macrófagos, fagocitando microorganismos, fragmentos de tecidos e polimorfonucleares mortos. Além disso, apresentam o material antigênico aos linfócitos, quando se inicia a resposta imune. Também secretam fatores que estimulam a angiogênese, de fundamental importância no processo de reparação. As inflamações são divididas em agudas, ou de evolução rápida, e crônicas, ou de evolução lenta (Garcia Leme, 1979).

Além dos fenômenos locais observados na resposta inflamatória aguda, ocorrem também reações sistêmicas. Dentre elas, duas respostas fisiológicas estão associadas. A primeira envolve a alteração no centro regulador hipotalâmico, com geração da resposta febril; a segunda, alteração no metabolismo hepático (Dinarello e col., 1988; Dinarello e col., 1991). O fígado é o principal alvo dos mediadores inflamatórios sistêmicos e é, também, o órgão responsável por determinar o nível de metabólitos essenciais, para suprir o organismo durante a fase crítica de estresse. Assim, as células do fígado respondem a muitos dos fatores que são liberados na fase aguda. Esta resposta é caracterizada por importante mudança no transporte de íons e metabólitos, na atividades de muitas vias metabólicas e na coordenação da síntese e liberação de proteínas plasmáticas da fase aguda.

No sítio do tecido lesado, possivelmente como um mecanismo de proteção, são liberadas citocinas (por ex., IL-1, IL-6 e TNF), consideradas como reguladoras da resposta febril. Estas citocinas medeiam a febre através da indução da síntese de prostaglandinas da série E2 (Dinarello e col., 1988, 1991). Ao mesmo tempo, as interleucinas um e seis podem atuar no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estimulando a síntese de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), com subsequente produção de cortisol. Isto promove o retorno do

ACTH aos níveis normais por "feedback" negativo, uma vez que os corticosteróides inibem a expressão gênica das citocinas. As ações dos mediadores que são responsáveis pela regulação da expressão gênica no fígado pertencem a quatro categorias: 1) tipo IL - interleucinas, IL-6, IL-11, LIF-fator inibidor de leucemia, OSM-oncostatim M e CNTF-fator neutrófico ciliar); 2) tipo IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , TNF α -fator de necrose tumoral α e TNF β); 3) glicocorticóides e 4) fatores de crescimento (insulina, HGF-fator de crescimento de hepatócito, FGF-fator de crescimento de fibroblasto e TGF β -fator de crescimento de tumoral). As citocinas atuam como estimuladoras da expressão gênica de fase aguda, enquanto os glicocorticóides e os fatores de crescimento atuam mais como moduladores das ações das citocinas. Além disso, o fígado também supre os componentes necessários para defesa imediata no sítio do tecido lesado, limitando a lesão do tecido, eliminando os agentes nocivos, bem como auxiliando o reparo tecidual (Baumann & Galdie, 1994).

Conforme a natureza ou constituição do exsudato, as inflamações agudas podem ser serosa, hemorrágica, purulenta e fibrinosa. A hemorragia, na inflamação, se caracteriza pelo grande número de hemácias no exsudato, conferindo-lhe cor vermelha. O exsudato hemorrágico aparece por: maior lesão vascular produzida diretamente por agentes inflamatórios, ou estase intensa e prolongada devido à ação do estímulo flogógeno ou hiperemia passiva pré-existente (Faria, 1988). A hiperemia e o aumento de temperatura, observados durante a resposta inflamatória, ocorrem por causa do aumento do fluxo sanguíneo em consequência da vasodilatação. A vasodilatação é causada por mediadores produzidos pela interação do agente causador com células teciduais (histamina, prostaglandinas E₂ e I₂, fator de ativação plaquetária, serotonina e outros) e por alguns mediadores plasmáticos (bradicinina), que atuam sobre as arteríolas e os esfíncteres pré-capilares (Dale e col., 1994). Alguns destes mediadores, como a histamina e o fator de ativação plaquetária, também são responsáveis pela fase inicial do aumento da permeabilidade vascular, que é favorecido por vários fatores: 1) afastamento das células endoteliais entre si; 2) contração celular induzida por mediadores que interagem

sobre proteínas contrácteis, alargando os espaços interendoteliais e o contato do endotélio com a membrana basal; 3) lesão, até necrose do endotélio (Faria, 1988). Este fenômeno tem início logo após a lesão do tecido (Williams, 1994), evoluindo com edema, eritema, aumento de temperatura e dor. A dor, do tipo inflamatório, se deve à estimulação dos nociceptores de nervos aferentes por mediadores químicos, tais como a bradicinina e a histamina, além de um aumento da pressão sobre o tecido lesado (Dale e col., 1994).

A bradicinina foi descoberta no Brasil, em 1949, por Rocha e Silva e Beraldo & Rosenfeld. É um peptídeo de baixo peso molecular (nonapéptido) causador de hiperemia e permeabilidade venular e capilar. Origina-se de um cinógeno existente no plasma, ativado pela calicreína, que provém da pré-calicreína ativada por um derivado do fator XII da coagulação, ou fator Hageman, após ser ativado por contato com o colágeno. Não é quimiotáxica e tem vida curta, sendo inativada rapidamente pela cininase II. (Faria, 1988; Robins, 1991). A descoberta da bradicinina foi uma das mais importantes contribuições na área de venenos ofídicos, o que possibilitou a Ferreira, em 1965, verificar que o veneno de *Bothrops jararaca* não só liberava bradicinina como possuía um componente que amplificava seus efeitos (BPF: bradykinin-potentiating factor). A bradicinina e a histamina, quando liberadas, despolarizam os nociceptores quando os seus limiares de excitabilidade encontram-se diminuídos. A redução do limiar de excitação denomina-se hiperalgesia e é induzida por derivados do ácido araquidônico (PGE₂, PGI₂, PGD₂), bem como por aminas simpaticomiméticas, principalmente a dopamina. Drogas que bloqueiam a liberação e/ou ações destes mediadores inibem a dor do tipo inflamatória (Ferreira, 1985; Lorenzetti & Ferreira, 1985; Nakamura & Ferreira, 1987).

Os mediadores citógenos, ou de origem celular, são principalmente a histamina e a serotonina e os eicosanóides são provenientes do ácido araquidônico.

No homem a histamina encontra-se nos grânulos dos mastócitos, nos basófilos, bem como nas plaquetas. É formada a partir do aminoácido histidina e é

liberada por fatores inespecíficos (trauma, toxinas) ou específicos (reação antígeno-anticorpo, pólen, alimentos e drogas ou medicamentos). Estes alérgenos estimulam a produção do anticorpo IgE, que se liga e sensibiliza a membrana dos mastócitos, liberando histamina, leucotrienos, fator de ativação plaquetária e PGD₂. A histamina age sobre a microcirculação através dos receptores H₁, provocando dilatação de arteríolas, de esfíncteres pré-capilares e de vênulas e, através de mecanismos reflexos vasomotores, aumentam a permeabilidade vascular. Ainda, dependendo dos receptores H₁, causa, no músculo liso, contração do íleo, dos brônquios, dos bronquíolos e do útero. Em receptores H₂, a histamina estimula a secreção gástrica, pode modular resposta de células como linfócitos e apresenta atividade quimiotóxica para eosinófilos. Assim, a histamina é importante, principalmente, quando se inicia a resposta inflamatória e nas reações de hipersensibilidade imediata mediadas pela IgE (Dahlén e col., 1983; Rang & Dale, 1993; Dale e col., 1994).

A serotonina provém das plaquetas e das células enterocromafins do intestino delgado e, principalmente, dos mastócitos de roedores, como ratos e camundongos. Também provoca vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular (Robbins, 1991).

É provável que as prostaglandinas E e I sejam os agentes mais importantes no processo inflamatório. As prostaglandinas são produtos da metabolização do ácido araquidônico pela enzima cicloxigenase. Esta metabolização dá origem a endoperóxidos cíclicos (PGG₂ e PGH₂), instáveis, originando as prostaglandinas e os tromboxanos. Atualmente, são conhecidas duas formas de cicloxigenase (cox 1 e cox 2). A cox 1 é encontrada nos vasos sanguíneos, estômago e rins, enquanto que a cox 2 é produzida no local inflamado; por citocinas e mediadores da inflamação. Três produtos, originados pela via da ciclooxygenase, são de grande importância no processo inflamatório: 1) tromboxano A₂ (TXA₂), um potente agregante plaquetário e vasoconstrictor sanguíneo; 2) prostaciclina (PGI₂), um potente inibidor de agregação plaquetária e vasodilatador, liberado predominantemente por células endoteliais na parede dos vasos e 3) as prostaglandinas mais estáveis, PGE₂, PGF₂ α e

PGD2, que possuem ações sobre o tônus e a permeabilidade vascular. A aspirina e a indometacina, dentre outros fármacos antiinflamatórios não esteróides, inibem a ciclooxigenase (Needleman e col. 1986; Salmon e Higgs, 1994). A lipooxigenação do ácido araquidônico leva à formação de hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETES), que são imediatamente transformados em hidroxiácidos hidroxiieicosatetraecóicos (HETES), originando os leucotrienos, agentes com propriedades pró-inflamatórias (Ford-Hutchinson e col. 1980). O leucotrieno B4 é potente agente quimiotáxico para neutrófilos, eosinófilos e monócitos (Salmom & Higgs, 1994). Promove ainda a agregação de leucócitos (PMN), a degranulação e geração de superóxido, além de causar adesão de neutrófilos ao endotélio venular e a migração transendotelial (Palmbiad e col. 1981). Os leucotrienos C4, D4 e E4 causam todos vasoconstrição, broncoespasmo e aumento de permeabilidade vascular, por ação direta, ou potencializando a ação da histamina e da bradicinina (Samuelson, 1987; Faria, 1988; Robbins, 1991). Drogas como o BW A4C (Tateson e col., 1988; Higgs e col., 1988) e o BW 755C (Randall, 1980) inibem a lipooxigenase.

O edema provocado pelos venenos de serpentes da família *Viperidae* parece ser devido a uma ação indireta do veneno, através da liberação de mediadores autofarmacológicos, como cininas, histamina, serotonina e prostaglandinas (Rothschild & Rotschild, 1979). A liberação destes mediadores, indiretamente, pode contribuir, também, para outros efeitos importantes causados por estes venenos, como isquemia, por tumefação e compressão local (Chapman, 1968).

A hemorragia local, observada após a injeção de venenos de serpentes, é uma das características do envenenamento botrópico (Rosenfeld 1971; Gutierrez e col. 1981). Esta hemorragia caracteriza-se pela presença de grande número de hemácias no espaço extravascular, e pode ser demonstrada com os venenos de *B. insulares* (Selistre e col., 1990), *B. jararacussu* (Moura da Silva e col., 1991), *B. jararaca* (Kamiguti e col., 1991) e *B. lanceolatus* (Souza & Lôbo de Araújo, 1995).

Muitas das hemorraginas isoladas são responsáveis pela indução do fenômeno hemorrágico local em pacientes envenenados (Mandelbaum, 1984; Civello e col., 1983; Mori e col., 1984; Tan e Saifunddin, 1990a; Yonaha e col., 1991). Toxinas hemorrágicas, isoladas de venenos de serpentes, foram caracterizadas como enzimas proteolíticas que hidrolisam diferentes substratos (Tu, 1988; Civello e col., 1983; Mandelbaum e col., 1984; Nikai e col., 1984) e são capazes de romper capilares, provocando o extravasamento de elementos sanguíneos para o tecido extravascular (Queiroz e col. 1985). Estas toxinas hemorrágicas atuam sobre a membrana basal, causando ruptura e perda da integridade vascular, ou sobre as paredes dos vasos sanguíneos, resultando em lesão das junções intercelulares endoteliais, levando a extravasamento simultâneo de eritrócitos e albumina (Ohsaka, 1979).

O envenenamento por picada de serpentes constitui um problema importante de saúde pública no Brasil (Alves, 1990), na América (Bolanos, 1982) e no mundo (Swaroop & Grab; 1954, 1956). No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos é causada por espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*. No estado de São Paulo, 86% dos acidentes notificados, de 1986 a 1990, foram causados por espécies de serpentes botrópicas, dentre as quais principalmente as *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *B. neuwiedi* (Cardoso, 1985; Secretaria de Estado da Saúde, 1993). Estes venenos são caracterizados por:

- exercer intensa atividade proteolítica (Houssay & Negrete, 1918; Mebs, 1970;
- coagular o plasma sanguíneo (Vital Brazil & Vellard, 1928; Klobusitzky, 1961);
- produzir hemorragia sistêmica (Bjarnason & Tu, 1978; Fabiano & Tu, 1981);
- causar pronunciado efeito local, como hemorragia e necrose tecidual, ocasionando sequelas com perda de tecido, que podem levar à amputação da extremidade afetada (Vital Brazil, 1911; Jimenez-Porras, 1973);
- liberar substâncias farmacologicamente ativas, tais como a histamina e a bradicinina (Rothschild & Rothschild, 1979), levando à formação de edema, que se desenvolve rapidamente após a inoculação do veneno (Rosenfeld, 1971; Amaral e col. 1987);

- causar choque circulatório, podendo levar à morte (Brasil 1982a).

O gênero *Bothrops* conta ainda com vários outros representantes no continente Americano. Três outras espécies endêmicas são também reconhecidas: *B. insularis*, na ilha da Queimada Grande, na costa do Brasil; *B. carabaeus*, em Sta. Lúcia, nas Antilhas, e *B. lanceolatus*, na Ilha Martinica, na América Central, (Hoge & Romano Hoge, 1978; 1979). A *Bothrops lanceolatus* foi descrita pela primeira vez por Lacépède, em 1789. É uma serpente de grande porte, que habita as regiões úmidas de florestas tropicais de encostas rochosas, tendendo a ser arborícola (Campbell & Lamar, 1989), e apresenta a maioria das atividades das *Bothrops* brasileiras (Lôbo de Araújo, 1987, 1990). Pacientes atendidos em hospitais da Martinica, por picada da serpente *Bothrops lanceolatus*, apresentaram as seguintes complicações: edema, dor e alterações sistêmicas, com embolia pulmonar, enfarte do miocárdio e enfarte cerebral. A terapia anticoagulante preventiva e a soroterapia precoce e específica apresentaram eficácia limitada na prevenção destas complicações (Thomas e col., 1995).

Os efeitos locais induzidos pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são difíceis de serem neutralizados pelos antivenenos específicos, enquanto que para as complicações sistêmicas esta terapia é geralmente mais efetiva (Gutiérrez e col., 1981, 1985; Lomonte, 1985; Lomonte e col., 1987). Isso pode estar relacionado ao rápido desenvolvimento dos efeitos locais, enquanto que os sistêmicos, que resultam em letalidade, se desenvolvem mais lentamente (Gutierrez, 1987). Ainda há a possibilidade de os efeitos locais produzidos pelos venenos botrópicos ocorrerem por componentes com diferentes ações farmacotóxicas ou que atuem sinergicamente, potencializando-os. Estas variações se devem, em parte, às diferentes localizações geográficas e ontogenéticas (Gutiérrez e col., 1990) e têm implicações práticas no esquema de produção de antivenenos. Desta forma, é recomendado que os antivenenos sejam produzidos utilizando-se venenos coletados em cada região geográfica, visto que a habilidade neutralizante de um antiveneno, contra um veneno específico, depende do veneno incluído na mistura antigênica (Gutierrez e col.,

1988a). Entretanto, visto que frequentemente isto não é seguido, é essencial investigar a capacidade neutralizante de antivenenos preparados contra os venenos das serpentes da região onde os acidentes são mais frequentes (Otero e col., 1995).

Acreditamos que o isolamento dos componentes e/ou estudo dos fenômenos em separado poderão elucidar as diferentes combinações e possíveis sinergismos, já que estudos da composição antigênica de venenos botrópicos apresentaram diferenças imunológicas entre venenos da mesma espécie (Schenberg, 1958, 1961, 1963). Este fato foi verificado em estudos sobre fatores hemorrágicos isolados do veneno de *Bothrops neuwiedi* (NHFa e NHFb) e de *Bothrops jararaca* (HF1, HF2 e HF3) por Mandelbaum e col., 1976, utilizando soro homólogo ou heterólogo preparados em coelho e cavalo, respectivamente (Mandelbaum e col., 1988).

Sendo o veneno de *Bothrops lanceolatus* pouco estudado e os efeitos locais difíceis de serem controlados com soros convencionais (Gutiérrez e col., 1986; Rojas e col., 1987), utilizamos fármacos com propriedades farmacológicas conhecidas e o soro anti*Bothrops lanceolatus* nos estudos das atividades edematogênica e hemorrágica, na tentativa de melhor compreendermos a complexidade do envenenamento ofídico e de contribuirmos com possíveis alternativas terapêuticas.

II- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- ❶ Avaliar a resposta inflamatória aguda (edema) induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura" e/ou aquecido, em pata de ratos, e determinar os possíveis mediadores envolvidos nesta resposta.
- ❷ Avaliar a atividade hemorrágica local induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura" em músculo estriado esquelético de ratos.
- ❸ Avaliar a capacidade neutralizante do soro anti*Bothrops lanceolatus*, sobre as atividades edematogênica e hemorrágica.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos "Wistar" pesando entre 130-180 g, provenientes do centro de bioterismo da Unicamp. Os animais foram mantidos no biotério do departamento, sob ciclo de luz, na temperatura ambiente, recebendo água e ração *ad libitum*, até a realização dos experimentos.

3.2 - Veneno

O veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) foi gentilmente cedido pela "Unité des Venins" do instituto Pasteur (Paris-França). A solução-mãe (7,5 mg/ml) foi preparada em salina 0,9%, aliquotada, mantida a -20°C e descongelada imediatamente antes da realização dos experimentos.

3.3 - SORO ANTI*Bothrops lanceolatus*

O soro anti*Bothrops lanceolatus* (antiVBL), obtido de soro de cavalo, foi gentilmente cedido pela "Unité des Venins" do instituto Pasteur (Paris-França). Foi utilizado previamente incubado com o VBL ou por inoculação intravenosa.

3.4 - Fármacos e Reagentes

Mepiramina, ciproheptadina, composto 48/80, captopril, bradicinina, indometacina e carragenina(Sigma Chemical CO.); Hoe 140 (Pharma Syntesis-Hoechst AG); dexametasona (INAF); BW A4C (Wellcome Research Laboratories); iloprost (Shering); hemoglobina (Wiener Laboratórios SAIC-Rosário Argentina); DMSO (Fisher Scientific CO.); heptano, ferricianeto de

potássio e cianeto de potássio (Merk S.A Rio de Janeiro, RJ); éter etílico e cloreto de sódio (Chemco-São Paulo, SP) e bicarbonato de sódio (Reagen).

3.5 - TRATAMENTOS

3.5.1 - Mepiramina e Ciproheptadina

Os animais foram tratados com mepiramina (M, 6 mg/kg), (Ho & Hwang, 1991), ciproheptadina (C, 6 mg/ kg) ou associação de ambas por via intraperitoneal (ip) 15 minutos antes da administração do veneno (75 µg). Os animais-controle receberam salina 0,9%, nas mesmas condições experimentais.

3.5.2 - Hoe 140 (D-Arg[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷Dic⁸]-bradiginina)

Os animais foram tratados com Hoe 140 (0,6 mg/kg por via intravenosa (iv), 30 minutos antes da administração concomitante de VBL (75 µg) e iloprost (0,1 µg), na região subplantar. O grupo-controle recebeu salina 0,9%, nas mesmas condições experimentais.

3.5.3 - Captopril

O captopril (300 µg) foi co-administrado na região subplantar com o VBL (75 µg). O grupo-controle recebeu somente o VBL (75 µg), nas mesmas condições experimentais.

3.6 - Inibidores do Metabolismo do Ácido Araquidônico

3.6.1 - Dexametasona

Os animais foram tratados com dexametasona (dexa, 1 mg/kg), (Rao e col., 1993), por via subcutânea (sc), 2 horas antes de receberem injeção de VBL (75

µg), na região subplantar. O grupo-controle recebeu salina 0,9%, nas mesmas condições experimentais.

3.6.2 - Indometacina

Os animais foram tratados com indometacina (indo, 10 mg/kg), (Trebien & Calixto, 1989; Barja-Fidalgo e col., 1992; Rao e col., 1993), por via intraperitoneal (ip), 30 minutos antes de receberem injeção de VBL (75 µg), na região subplantar. O grupo controle recebeu salina com 2,5% de bicarbonato de sódio. A efetividade da indometacina foi previamente confirmada em animais que receberam, na região subplantar, carragenina (100 µg/pata).

3.6.3 - BW A4C (N-(3-phenoxyynamyl) acetohydroxamic acid

Os animais foram previamente tratados com BWA 4C (BW, 10 mg/kg), (Tateson e col., 1988), por via intraperitoneal (ip), 30 minutos antes de receberem o VBL (75 µg), na região subplantar. O grupo-controle recebeu salina com 50% de DMSO (dimetil sulfóxido), nas mesmas condições experimentais.

3.7 - Iloprost

O iloprost, análogo à PGI₂ (0,1 µg), foi co-administrado na região subplantar com o VBL (75 µg). Os animais-controle receberam somente iloprost (0,1 µg) ou salina 0,9% (0, 1ml), nas mesmas condições experimentais.

3.8 - EFEITO DO SORO ANTIBothrops lanceolatus SOBRE O EDEMA E A HEMORRAGIA INDUZIDOS PELO VBL

O efeito do antiVBL foi determinado incubando-se 30 minutos em banho-maria a 37°C com o VBL (75 µg) "in natura" e/ou aquecido a 97°C durante 30

segundos. A seguir o antiVBL incubado com o VBL "in natura" foi administrado na pata e/ou no músculo. O edema foi determinado 15 e 30 minutos após e a hemorragia, 3 horas após. O antiVBL incubado com o VBL aquecido foi também administrado na pata e/ou no músculo. O edema e a hemorragia foram determinados nos mesmos tempos acima descritos. Da mesma maneira as atividades edematogênica e hemorrágica foram determinadas num grupo de animais que recebeu o antiVBL por via intravenosa imediatamente após injeção subplantar com o VBL (75 µg) "in natura" e/ou aquecido. A atividade hemorrágica foi determinada apenas com o veneno "in natura", seguindo-se a mesma metodologia acima descrita.

3.9 - DETERMINAÇÃO DO AUMENTO DE VOLUME DE PATA (EDEMA) INDUZIDO PELO VBL

Grupos de cinco a sete animais anestesiados com éter etílico receberam, na região subplantar, 0,1 ml da solução do veneno de *Bothrops lanceolatus* (12,5 - 100 µg). O volume das patas foi determinado antes (volume basal) e após o estímulo com o VBL, nos intervalos de tempo 1/4, 1/2, 2, 4, 6 e 24 horas, utilizando-se um hidropletismógrafo (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). O aumento de volume foi determinado pela diferença entre o volume das patas tratadas com VBL e os volumes basais de cada pata previamente determinados. O edema foi avaliado, também, com o VBL aquecido a 97°C durante 30 segundos. Os resultados foram expressos como média ± erro-padrão das médias e comparados com grupos de animais-controle que receberam o mesmo volume de salina.

3.9.1 - AVALIAÇÃO DA HEMORRAGIA INDUZIDA PELO VBL "IN NATURA" EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS

Grupos de seis animais foram anestesiados com éter etílico e receberam, por via intramuscular (im), na região posterior do músculo gastrocnêmio

(Roberto, 1981), 0,1 ml da solução do VBL "in natura" (0,25 - 64 μ g). O músculo contralateral foi utilizado como controle, recebendo o mesmo volume de salina. Os animais receberam o VBL "in natura" (8 μ g) e foram sacrificados nos tempos 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 24, 48 e 72 horas, para determinar o curso temporal. Para a curva dose-resposta, os animais receberam VBL "in natura" nas doses 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 μ g e foram sacrificados 3 horas após. Antes de serem sacrificados, os animais foram perfundidos com 100 ml de salina 0,9% no ventrículo esquerdo com drenagem pelo átrio direito (foto 1). Os músculos foram dissecados com instrumental cirúrgico, pesados e acondicionados a -20°C durante a noite. A seguir, as amostras foram tratadas com reagente de Drabkin (6 ml/g), homogeneizadas em triturador (Tecnal Marconi, mod. 102, série 892571) e centrifugadas, em centrífuga 641038, tipo T21 (Heinz Janetzki KG, Germany), a 4000 rpm durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram recentrifugados em centrífuga refrigerada modelo J2-21 (Bekman, U.S.A.), rotor JA-21, a 18500 rpm durante 30 minutos. A cada 2 ml dos sobrenadantes, foram adicionados 0,5 ml de heptano, homogeneizado em agitador eletromecânico tipo 1005 (Biomatic, Porto Alegre, Brasil) e novamente centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos. A hemorragia foi determinada de acordo com o método de cianometemoglobina (Ownby e col., 1984; Pelissari e col., 1993), com algumas modificações, dosando-se a quantidade de hemoglobina em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kontron Spectrophotometer, Suíça), a 540 nm. A concentração de hemoglobina foi obtida multiplicando-se a absorbância encontrada pelo fator (x). Este fator foi previamente determinado através de uma curva-padrão de hemoglobina. Os resultados encontrados foram divididos pelos pesos dos respectivos músculos. A quantidade de hemoglobina foi expressa em mg/g de tecido.

3.9.2 - REAGENTE DE DRABKIN

Reagente de Drabkin: bicarbonato de sódio (2 g), ferricianeto de potássio (0,394 g) e cianeto de potássio (0,108 g) com volume final (1000 ml) completado

com água destilada. Este reagente, estável durante um mês, foi mantido em temperatura ambiente na ausência de luz.

3.9.3 - CURVA-PADRÃO DE HEMOGLOBINA

Ao reagente de Drabkin (1,5; 3; 6; 9; 12 e 15 ml), foram adicionados 20 μ l de hemoglobina padrão (14,8 g/dl). Os tubos foram agitados e a curva padrão determinada em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kontron Spectrophotometer, Suíça), a 540 nm. O fator (x) foi encontrado dividindo-se a somatória das concentrações de hemoglobina pela somatória das respectivas absorbâncias.

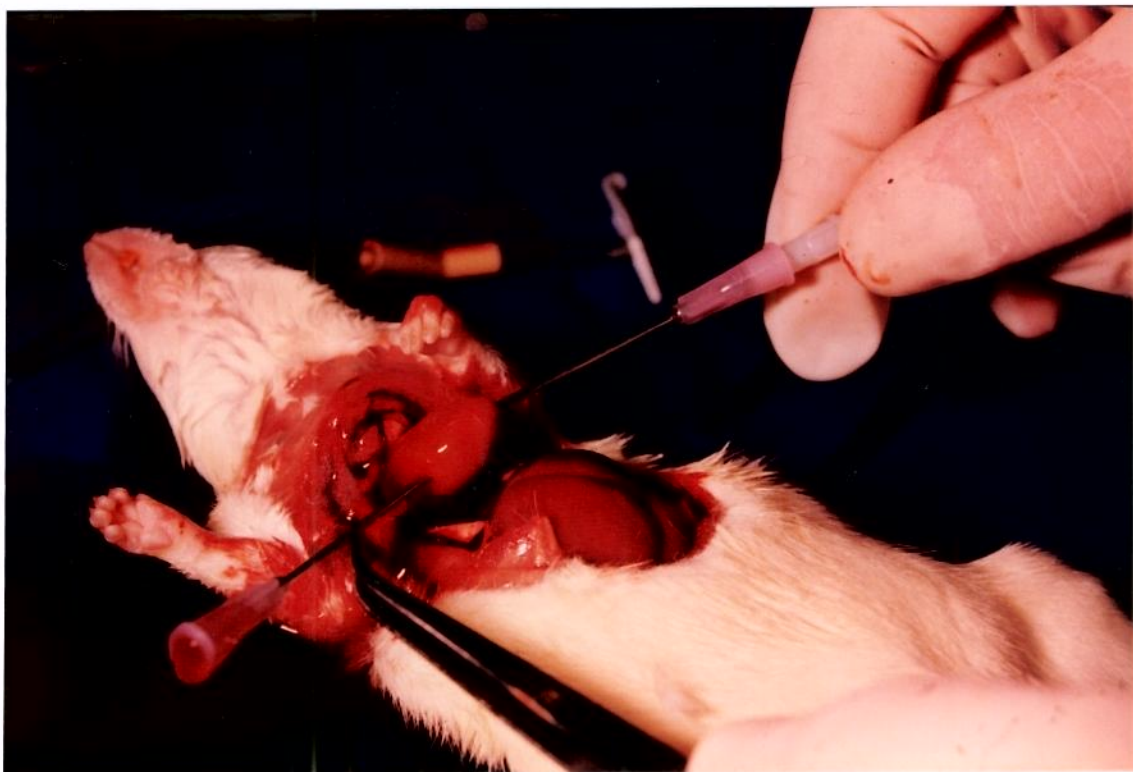


Foto 1. Lavagem parenteral com salina. Imediatamente antes da parada cardíaca foram perfundidos 100 ml de salina 0,9% no ventrículo esquerdo com drenagem pelo átrio direito.

3.9.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste "T" de Student (Siegel, 1979) não pareado e/ou pareado. Em todas as análises os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

IV - RESULTADOS

4.1 - AUMENTO DE VOLUME DE PATA (EDEMA) INDUZIDO PELO VENENO DE *Bothrops lanceolatus*

O aumento de volume de pata induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) foi determinado em diferentes concentrações (12,5; 25; 50; 75 e 100 µg). Em todas as concentrações testadas, o veneno induziu aumento de volume de pata acompanhado de hemorragia. A resposta máxima foi observada com o veneno injetado na dose de 75 µg/pata (salina, controle = $0,09 \pm 0,001$ ml e veneno = $1,09 \pm 0,05$ ml, n = 7; figura 1 e foto 2). A figura 2 ilustra o curso temporal do aumento de volume de pata induzido por 50 µg do veneno de *Bothrops lanceolatus*. O efeito máximo ocorreu 15 minutos após o estímulo (salina, controle = $0,09 \pm 0,001$ ml e veneno = $0,89 \pm 0,04$ ml, n = 7), apresentando queda gradativa, desaparecendo após 24 horas. As demais concentrações apresentaram resultados semelhantes. O veneno de *Bothrops lanceolatus* induziu aumento de volume da pata, dose e tempo dependentes (figuras 1 e 2).

Verificando-se que o edema foi acompanhado de hemorragia e sendo este um efeito local importante, determinou-se, também, a dose-resposta e o curso temporal deste fenômeno, através da dosagem de hemoglobina, no músculo esquelético. Para isso utilizamos diferentes concentrações do veneno (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 µg), administradas no músculo gastrocnêmio. O VBL induziu hemorragia máxima na dose de 32 µg (salina, controle = $1,23 \pm 0,07$ mg hb/g de tecido e veneno = $6,77 \pm 0,69$ mg hb/g de tecido; figura 3 e foto 3). A dose mínima necessária para induzir hemorragia estatisticamente significativa foi de 0,5 µg (salina, controle = $1,23 \pm 0,07$ mg hb/g de tecido e veneno = $1,85 \pm 0,10$ mg hb/g de tecido; figura 3). Como mostra a figura 4, a hemorragia induzida após a administração de 8 µg do veneno foi máxima entre o intervalo de 1 a 3

horas, decaindo progressivamente a seguir, e desaparecendo dentro de 72 horas. A hemorragia induzida pelo VBL ocorreu, também, de forma dose e tempo-dependente (figuras 3 e 4).

Aquecendo-se o veneno de *Bothrops lanceolatus*, determinou-se o edema por ele induzido.

O aquecimento do veneno a 97°C durante 30 segundos, previamente à administração subplantar, induziu edema, dose e tempo-dependente (figuras 5 e 6), porém de magnitude menor (30%; figura 5), em relação ao veneno "in natura" (figura 1). Neste caso, não se observou, visualmente, hemorragia local. O que foi confirmado determinando-se a hemorragia, dosando-se a hemoglobina liberada no músculo 3 horas após a injeção de 32 µg de VBL aquecido (figura 7).

4.2 - EFEITO DO ILOPROST SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO VBL AQUECIDO

Neste experimento, se utilizou iloprost em associação ao veneno aquecido, com o objetivo de verificar se o vasodilatador, iloprost, seria capaz de potencializar o edema não hemorrágico causado pelo VBL previamente aquecido a 97°C durante 30 segundos. Como mostra a figura 8, o iloprost (0,1 µg) co-administrado com o VBL aquecido (75 µg) foi capaz de potencializar o edema, quando comparado à resposta reduzida induzida pelo veneno aquecido, sozinho. Este edema continuou ausente de hemorragia (foto 4). A partir de então, nossos experimentos foram acompanhados do vasodilatador iloprost.

4.3 - EFEITO DO TRATAMENTO COM FÁRMACOS SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO VBL AQUECIDO

No sentido de verificar quais os possíveis mediadores envolvidos no edema induzido pelo VBL, os animais foram tratados com: mepiramina, ciproheptadina, indometacina, BW A4C, dexametasona, captopril e Hoe 140, previamente à administração do veneno com o iloprost, determinando-se o edema 15 e 30 minutos após. Como podemos observar na figura 9, o edema foi inibido pela mepiramina, ciproheptadina, dexametasona, BW A4C, mas não pela indometacina. A utilização concomitante de mepiramina e ciproheptadina acarretou inibição de 77% da resposta edematogênica.

Hoe 140 foi capaz, também, de inibir significativamente o edema (figura 10). Por outro lado, captopril potencializou o efeito edematogênico do veneno, mesmo na ausência de iloprost (figura 10).

Nossos resultados sugerem que histamina, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico e bradicinina podem estar envolvidos no edema induzido por esse veneno.

4.4 - EFEITO DO SORO ANTIB*Bothrops lanceolatus* SOBRE O EDEMA E A HEMORRAGIA INDUZIDOS PELO VBL "IN NATURA" E AQUECIDO.

Com o intuito de verificar a efetividade do soro antiVBL, sobre o edema e a hemorragia, prosseguimos nosso estudo, tratando os animais com o soro antiVBL, no sentido de avaliar sua capacidade neutralizante sobre a hemorragia induzida em músculo pelo VBL "in natura" e sobre o edema induzido na pata pelo VBL "in natura" e/ou aquecido associado ao iloprost.

Para isto, utilizamos o antiVBL previamente incubado com o VBL ou inoculado por via intravenosa. Como ilustra a Figura 11, a efetividade do antiVBL sobre o aumento de volume de pata (edema) foi máxima na proporção de 1 ml de antiVBL/mg de VBL. O edema foi inibido em 45%, porém acompanhado de hemorragia. Na proporção de 2 ml de antiVBL/mg de VBL a inibição foi a mesma, mas livre de hemorragia. Em decorrência deste resultado, verificamos se o antiVBL, nesta proporção, era também efetivo em relação à hemorragia provocada pelo VBL "in natura" no músculo. Como mostra a Figura

12, o antiVBL incubado com o VBL, nestas condições, foi capaz de neutralizar completamente a hemorragia induzida pelo veneno. Quando tratamos os animais com o antiVBL, por administração intravenosa, imediatamente após a administração subplantar de VBL "in natura" (75 µg) ou administração intramuscular (32 µg), verificamos que a capacidade neutralizante foi de 30% para o edema, (figura 13) e de 38% para a hemorragia, (figura 14), mesmo aumentando-se a proporção do antiVBL/VBL em cinco vezes. Por outro lado, na pré-incubação do antiVBL com o VBL (75 µg), previamente aquecido, associado ao iloprost (0,1 µg), a inibição do edema foi discreta, 30% (figura 15) e somente ocorreu na proporção de 0,125 ml de antiVBL/ mg de VBL. Já, com a inoculação intravenosa após a administração subplantar do VBL aquecido associado ao iloprost, mesmo aumentando-se dez vezes a proporção, o antiVBL foi completamente ineficaz para inibir o edema (figura 16).

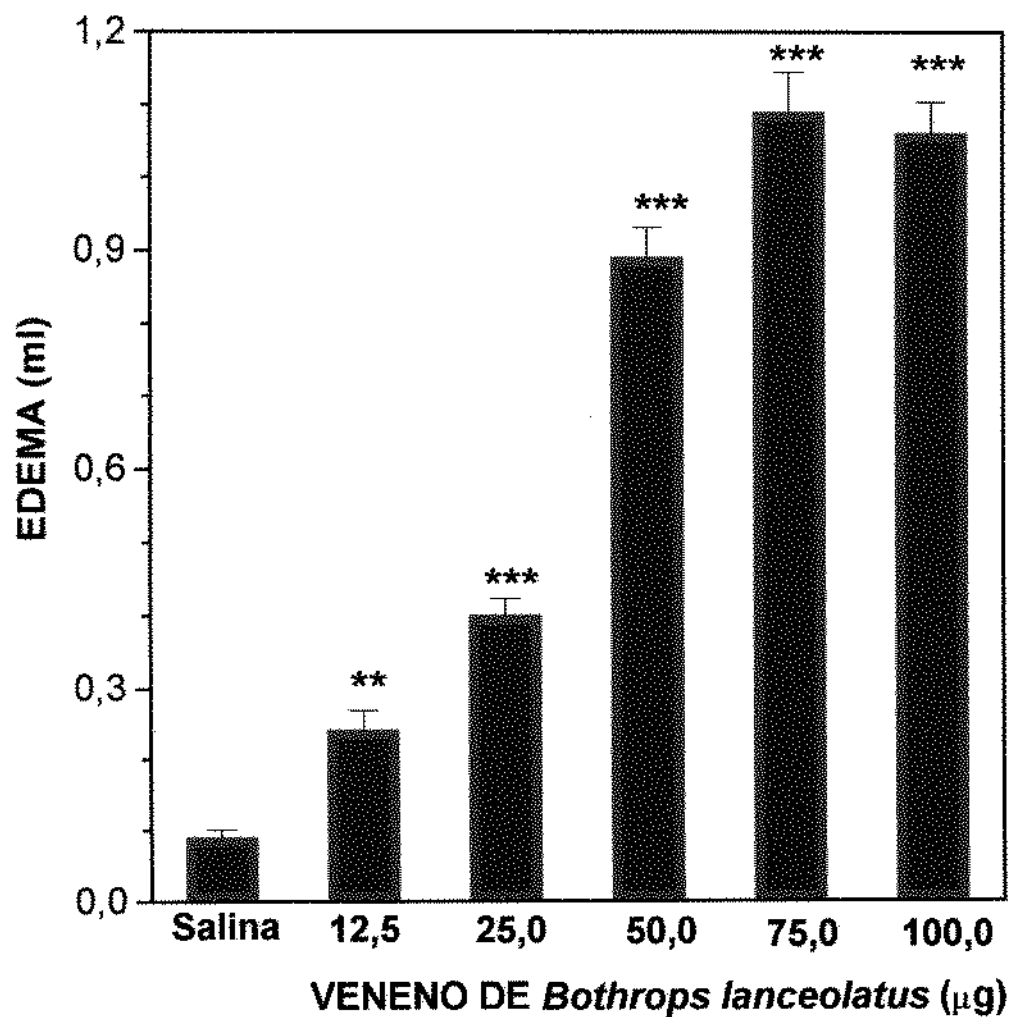


Figura 1. Aumento de volume de pata (edema) em ratos, induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura". Os animais receberam diferentes doses do veneno na região subplantar posterior esquerda. O volume da pata foi determinado 15 minutos após as injeções. O grupo-controle foi constituído por animais tratados com salina nas mesmas condições. Cada barra representa a média \pm EPM de 7 animais, **p < 0,01, ***p < 0,001, comparados com o controle.



Foto 2. Edema hemorrágico em pata de rato. O animal foi fotografado minutos após receber 75 μ g do veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura" e 0,1 ml de salina (B).

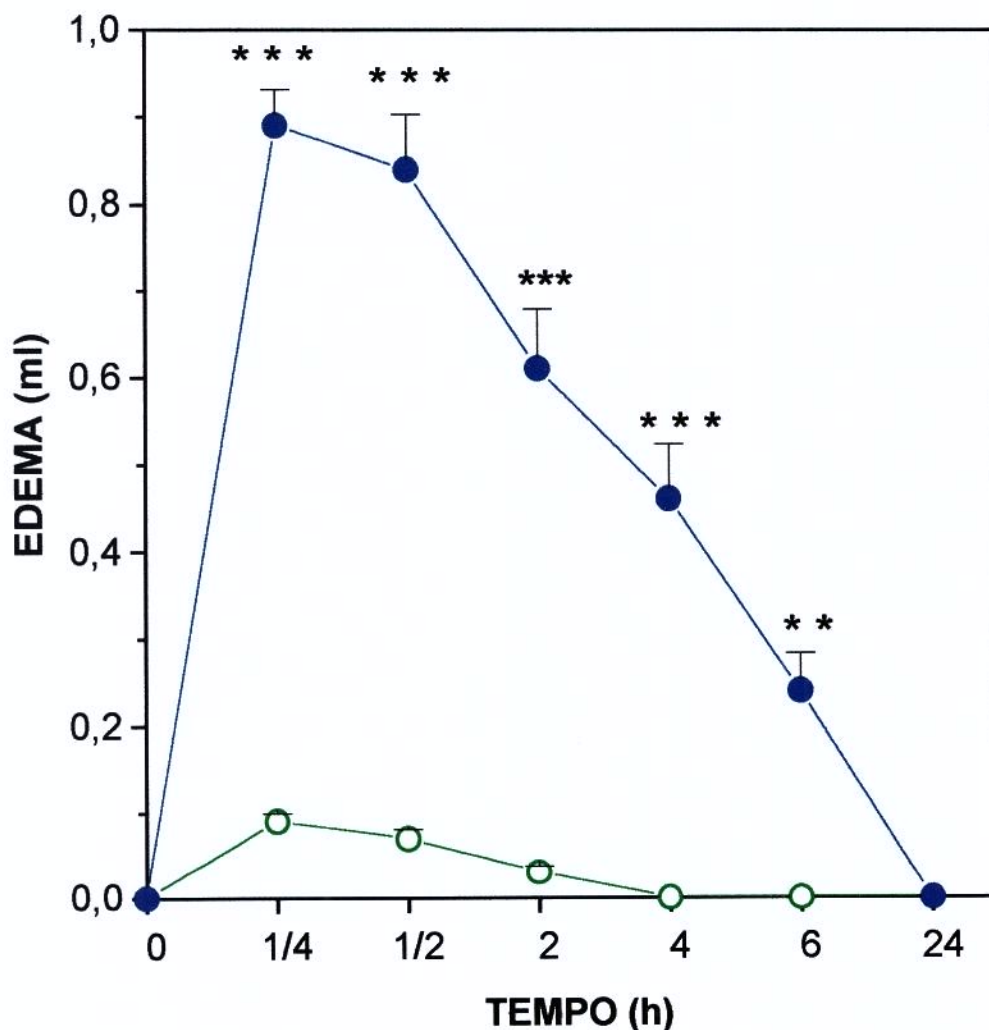


Figura 2. Curso temporal do aumento de volume de pata em ratos, induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura". Os animais receberam, na região subplantar, 50 μ g (●) do veneno. O volume da pata foi determinado em diferentes tempos após a administração do veneno ou da salina. O grupo-controle recebeu salina (○) nas mesmas condições experimentais. Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 animais, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparados com os controles.

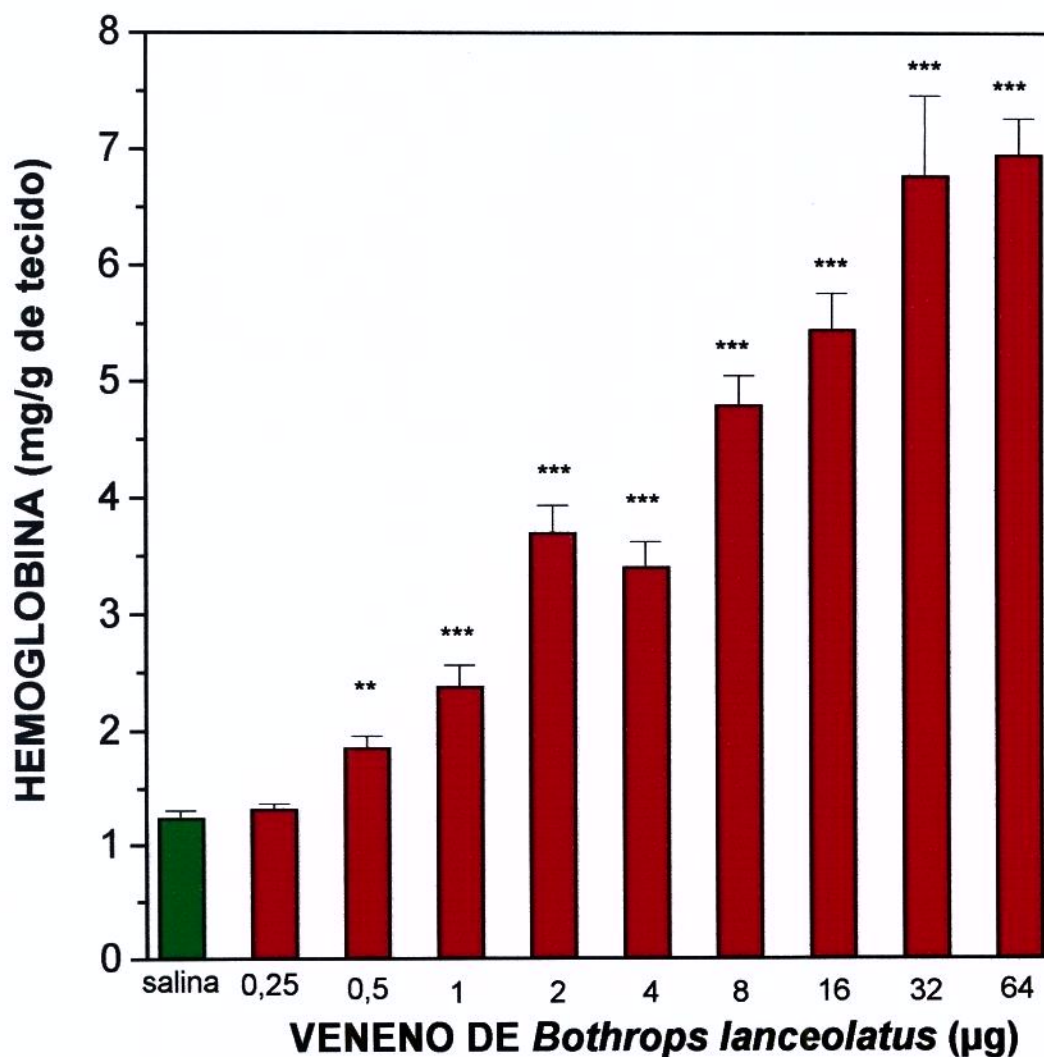


Figura 3. Efeito dose-resposta da hemorragia local em músculo esquelético de ratos induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* “in natura”. O VBL foi administrado, no músculo gastrocnêmio esquerdo, em diferentes concentrações. A quantidade de hemoglobina liberada foi determinada por espectrofotômetro, 540 nm, 3 horas após. O controle foi constituído pelos mesmos animais que receberam salina no músculo contralateral. Cada barra representa a média \pm EPM de 6 animais, **p < 0,01, ***p < 0,001, comparados com o controle.

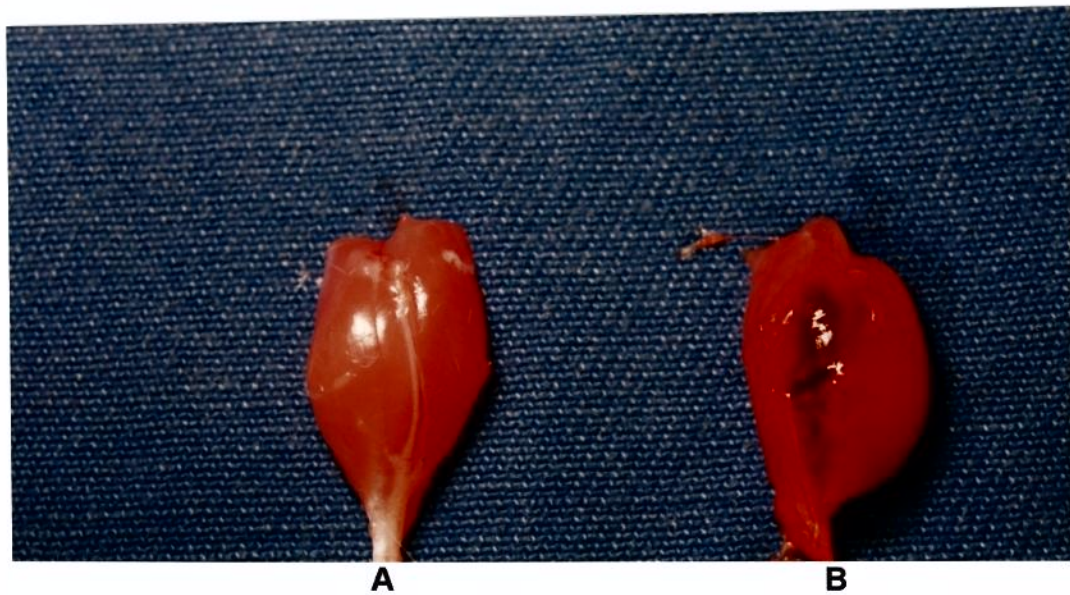


Foto 3. Hemorragia local em músculo esquelético de rato. Os músculos gastrocnêmios foram dissecados e fotografados 1 hora após receberem 32μ veneno de *Bothrops lanceolatus* (B) e 0,1 ml de salina (A).

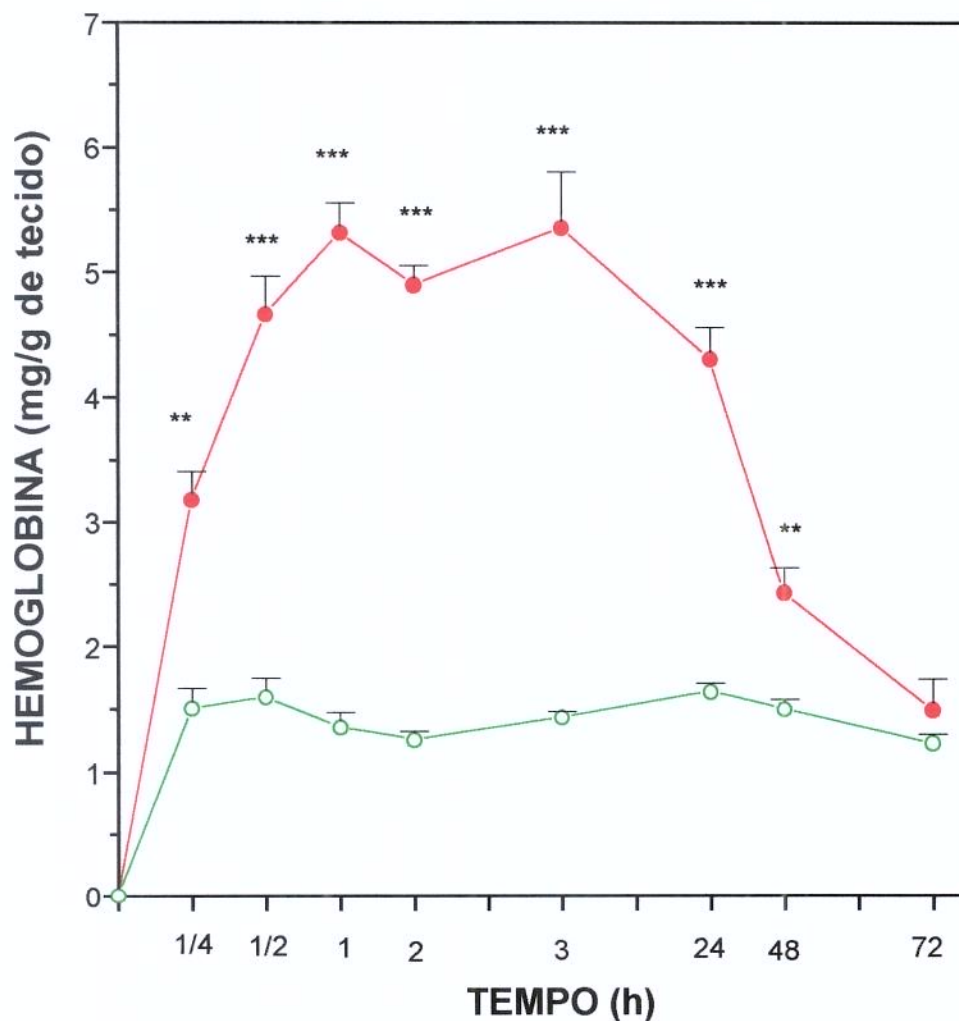


Figura 4. Curso temporal da hemorragia local em músculo esquelético de ratos, induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* “in natura”. O VBL, 8 µg (●), foi injetado no músculo gastrocnêmio esquerdo. Os animais foram sacrificados após a administração do VBL nos tempos indicados. A quantidade de hemoglobina foi determinada por espectrofotômetro a 540 nm. O controle foi constituído pelos mesmos animais que receberam salina (○) no músculo contralateral. Cada ponto representa a média ± EPM de 6 animais, **p < 0,01, ***p < 0,001 comparados com os controles.

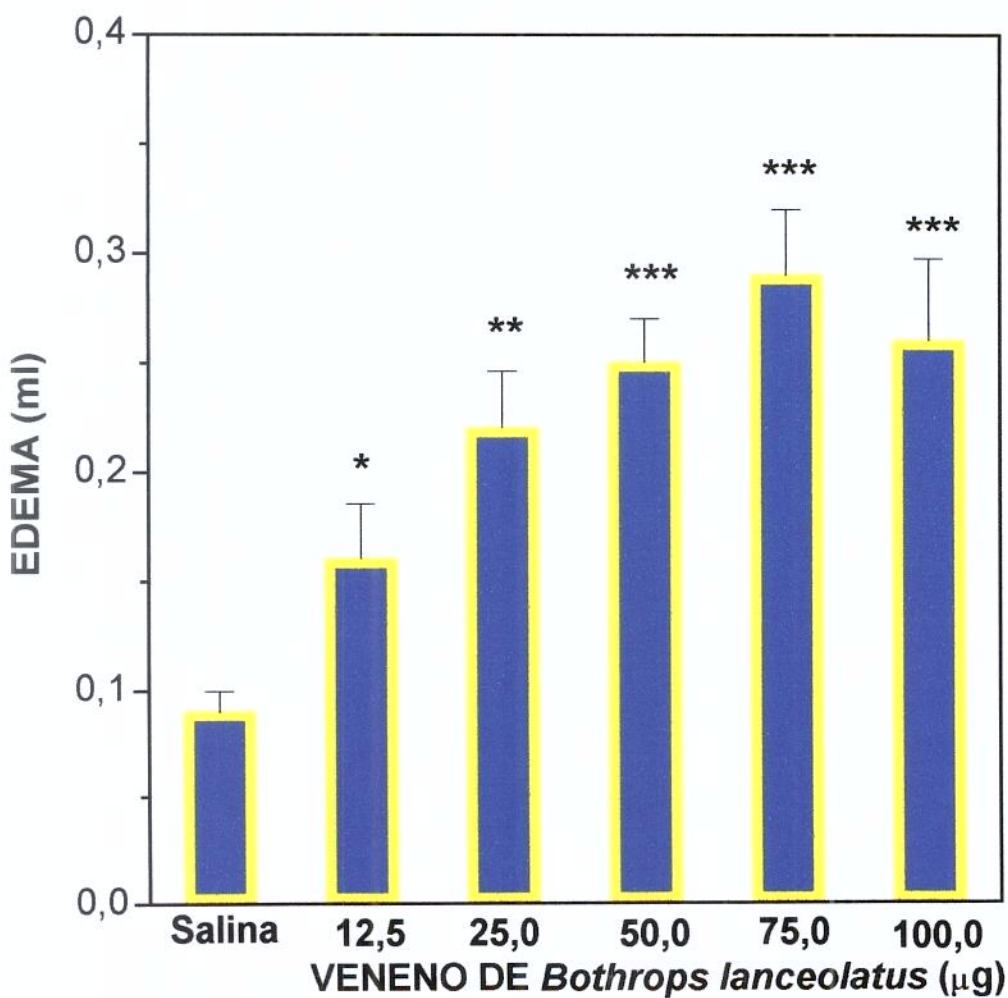


Figura 5. Edema de pata em ratos, induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* aquecido. Diversas doses de veneno, previamente aquecido a 97°C durante 30 segundos, foram injetadas nos animais. O volume de pata (edema) foi determinado 15 minutos após a administração do VBL. O grupo-controle recebeu salina nas mesmas condições experimentais. Cada barra representa a média \pm EPM de 7 animais, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparados com o controle.

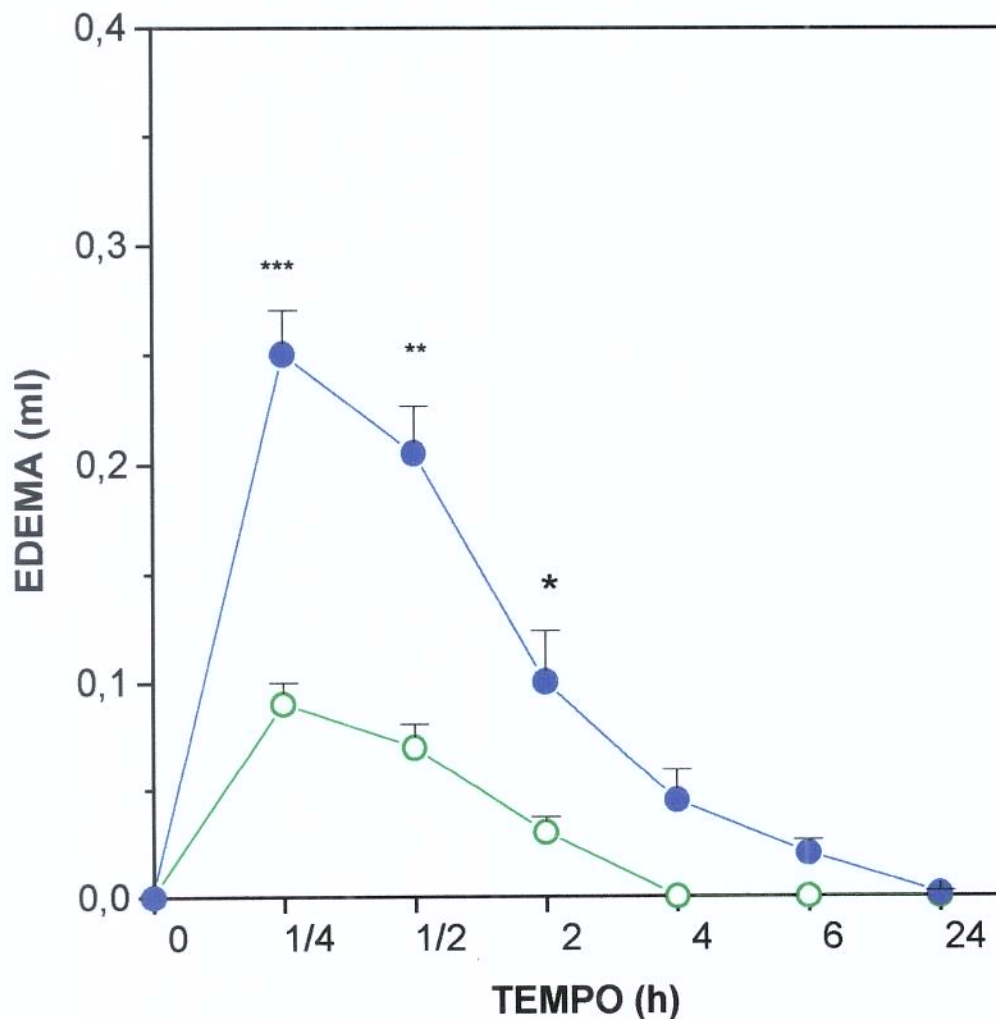


Figura 6. Curso temporal do edema de pata em ratos, induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* aquecido. Cinquenta microgramas (50 μ g) do veneno (●), aquecido a 97°C durante 30 segundos, foram injetados na região subplantar esquerda dos animais. O volume da pata foi determinado em diferentes tempos, após a administração do veneno ou da salina. O grupo-controle recebeu salina (○) nas mesmas condições experimentais. Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 animais, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparados com o controles.

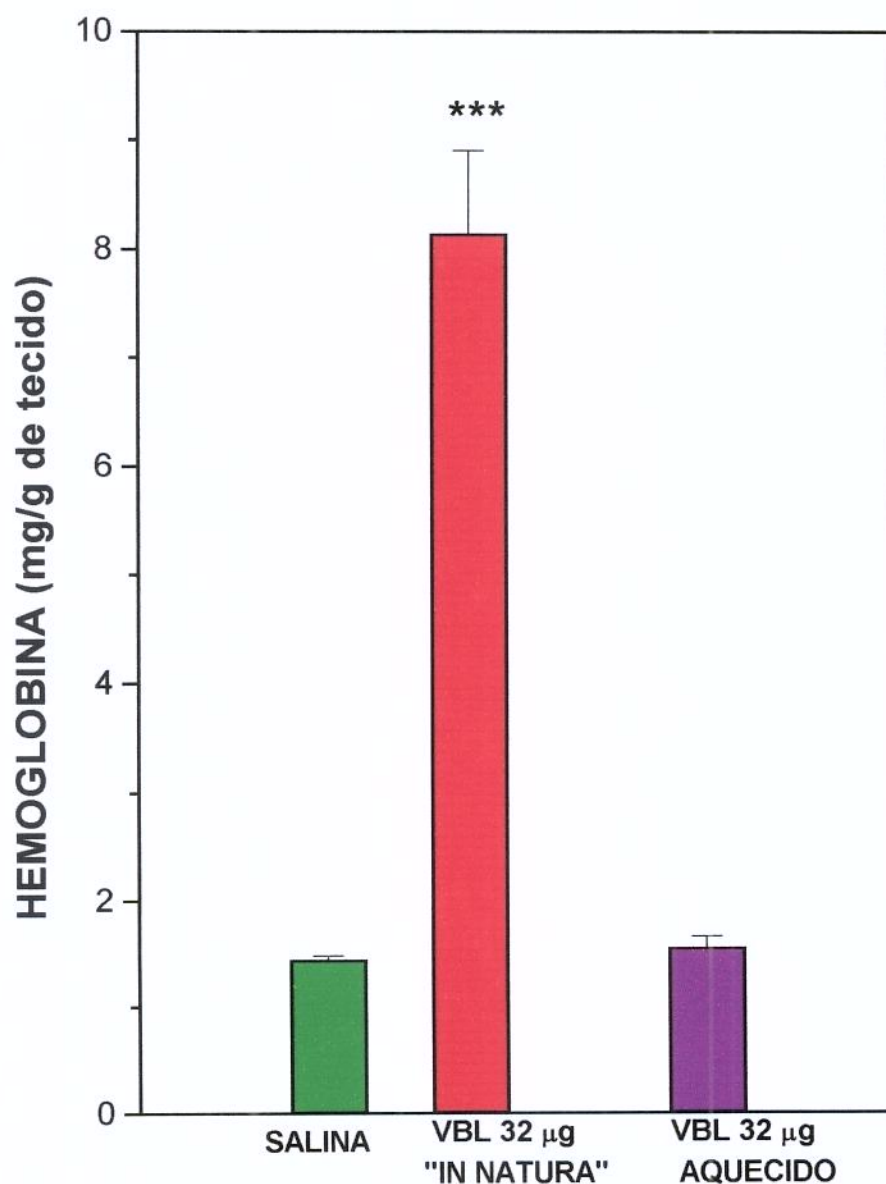


Figura 7. Efeito do aquecimento prévio do veneno de *Bothrops lanceolatus* sobre a hemorragia, em músculo esquelético de ratos. O VBL (32 µg) "in natura" ou aquecido a 97°C durante 30 segundos foi administrado no músculo gastrocnêmio esquerdo. O controle, músculo contralateral, recebeu salina nas mesmas condições. Os animais foram sacrificados 3 horas após as injeções. A quantidade de hemoglobina liberada foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Cada barra representa a média ± EPM de 6 animais, ***p < 0,001, comparado com o controle.

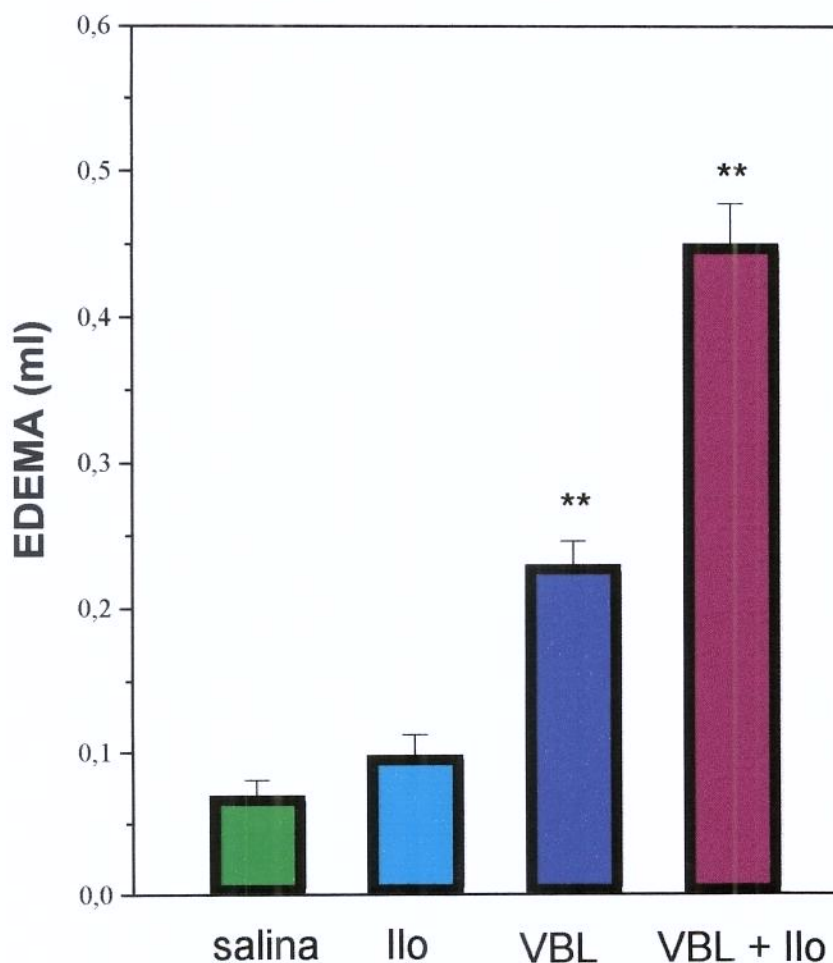


Figura 8. Efeito do iloprost sobre o edema de pata, em ratos, induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* aquecido. O iloprost (Ilo, 0,1 μ g) foi injetado na região subplantar sozinho ou co-administrado com o VBL (75 μ g) previamente aquecido a 97°C durante 30 segundos. Os controles estão representados pelos grupos de animais que receberam salina ou VBL (75 μ g) sem iloprost, nas mesmas condições experimentais. O edema foi determinado 30 minutos após as injeções. As barras representam as médias \pm EPM de 7 animais, ** $p < 0,01$ comparados com os controles.



Foto 4. Edema não hemorrágico em pata de rato. O animal foi fotografado minutos após receber $75 \mu\text{g}$ do veneno de *Bothrops lanceolatus* aquecido a 97°C durante 30 segundos associado a $0,1 \mu\text{g}$ de iloprost (A) e $0,1 \text{ ml}$ de soro (B).

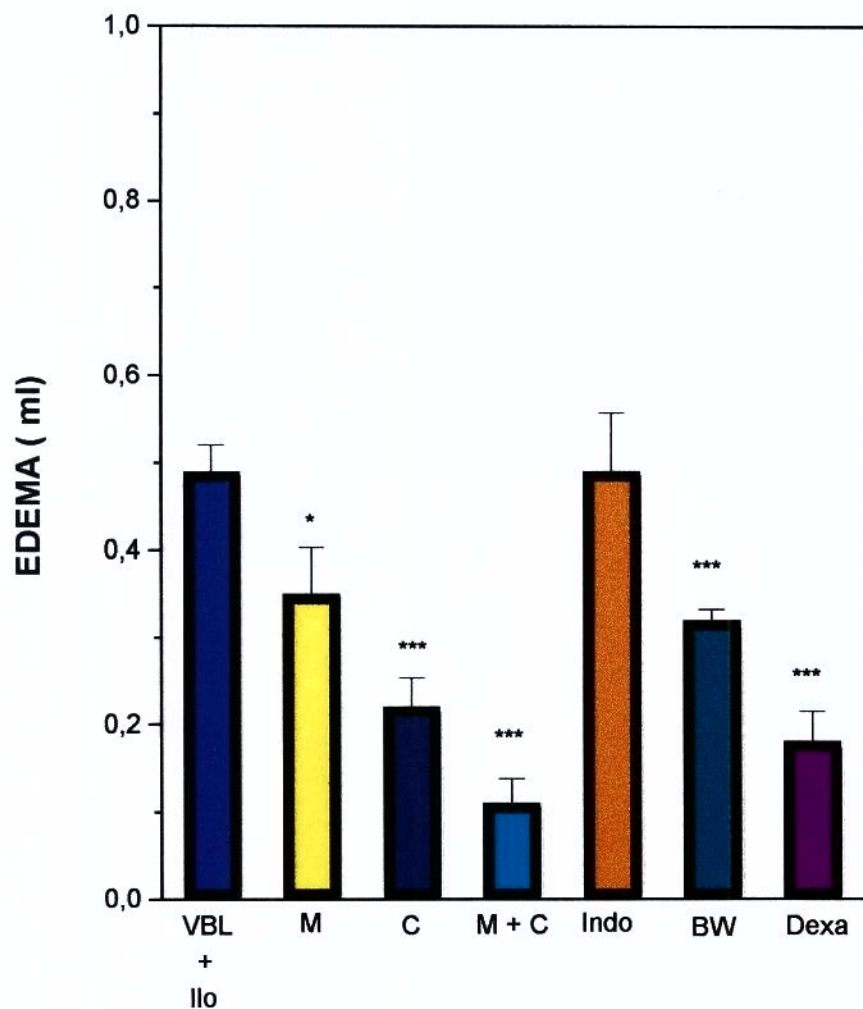


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com fármacos sobre o edema de pata, em ratos, induzido pelo VBL aquecido associado ao iloprost. Os animais receberam mepiramina (m, 6 mg/kg-ip), ciproheptadina (c, 6 mg/kg-ip), mepiramina e ciproheptadina (m + c, 6 mg/kg-ip), BW A4C (BW, 10 mg/kg-ip) e dexametasona (dexa, 1 mg/kg-sc) e a seguir receberam, na região subplantar, injeção de VBL (75 µg) aquecido a 97°C durante 30 segundos, associado ao iloprost (Ilo, 0,1 µg). O grupo-controle recebeu VBL com iloprost. O edema foi determinado 15 minutos após a co-administração de VBL e iloprost. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais, *p < 0,05, ***p < 0,001 comparados com o controle.

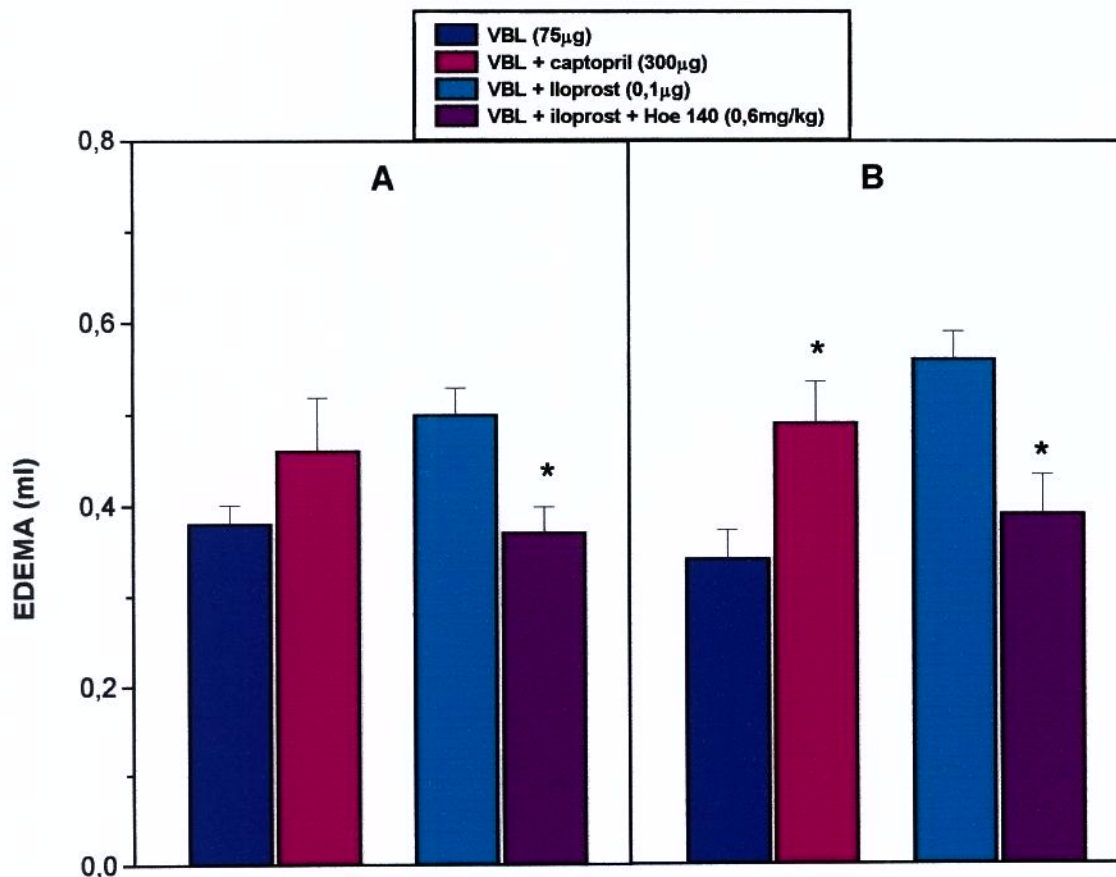


Figura 10. Efeito do captopril e do Hoe 140 sobre o edema de pata em ratos, induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* aquecido. O VBL (75 µg) aquecido a 97°C durante 30 segundos foi administrado na região subplantar sozinho e/ou co-administrado com o captopril (300 µg) sem iloprost. Após a administração do Hoe 140 (0,6 mg/kg-iv), os animais receberam na região subplantar o VBL aquecido (75µg) associado ao iloprost (0,1 µg). O grupo-controle não foi pré-tratado com o Hoe 140. O edema foi determinado 15 minutos (A) e 30 minutos (B) após as injeções. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais, * p < 0,05, comparados com os controles.

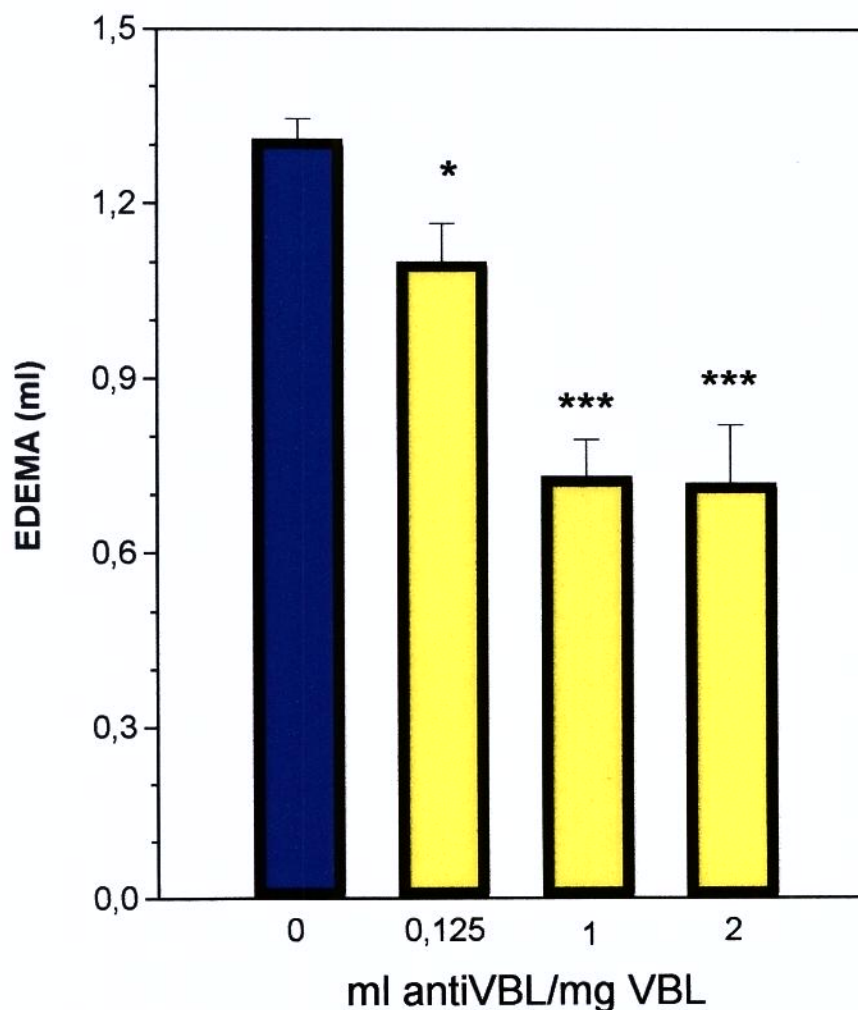


Figura 11. Efeito da pré-incubação do soro anti*Bothrops lanceolatus* sobre o aumento de volume de pata (edema), em ratos, induzido pelo VBL “in natura”. O antiVBL, nas proporções indicadas, previamente incubado a 37°C durante 30 minutos com o VBL (75 µg) “in natura”, foi administrado na região subplantar esquerda. O grupo-controle recebeu apenas 75 µg de VBL. O aumento de volume (edema) foi determinado 15 minutos após as injeções. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais, *p < 0,05, *p < 0,001, comparados com o controle.**

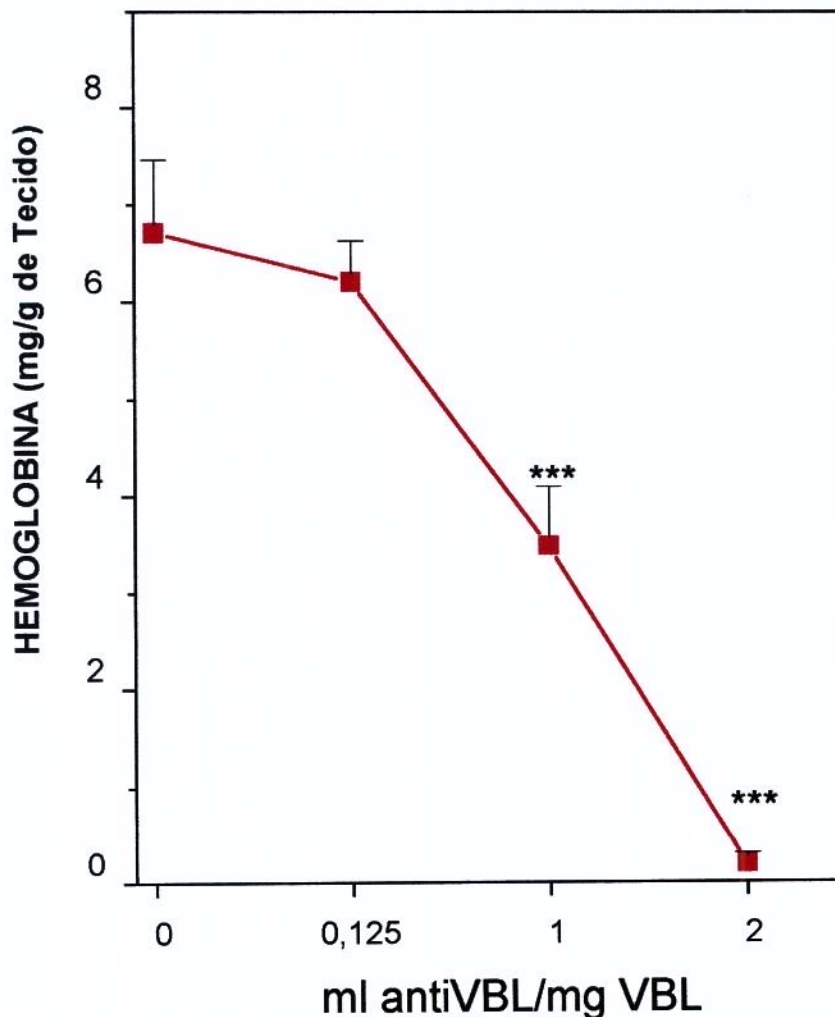


Figura 12. Efeito da pré-incubação do soro anti*Bothrops lanceolatus* sobre a hemorragia induzida pelo VBL “in natura” em músculo esquelético de ratos. O antiVBL, nas proporções indicadas, previamente incubado a 37°C durante 30 minutos com o VBL (32 µg) “in natura” foi administrado (im) no músculo gastrocnêmio esquerdo. O grupo-controle recebeu apenas 32 µg de VBL. Os animais foram sacrificados 3 horas após as injeções. A quantidade de hemoglobina foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm . Cada quadrado representa a média ± EPM de 6 animais, ***p < 0,001, comparados com o controle.

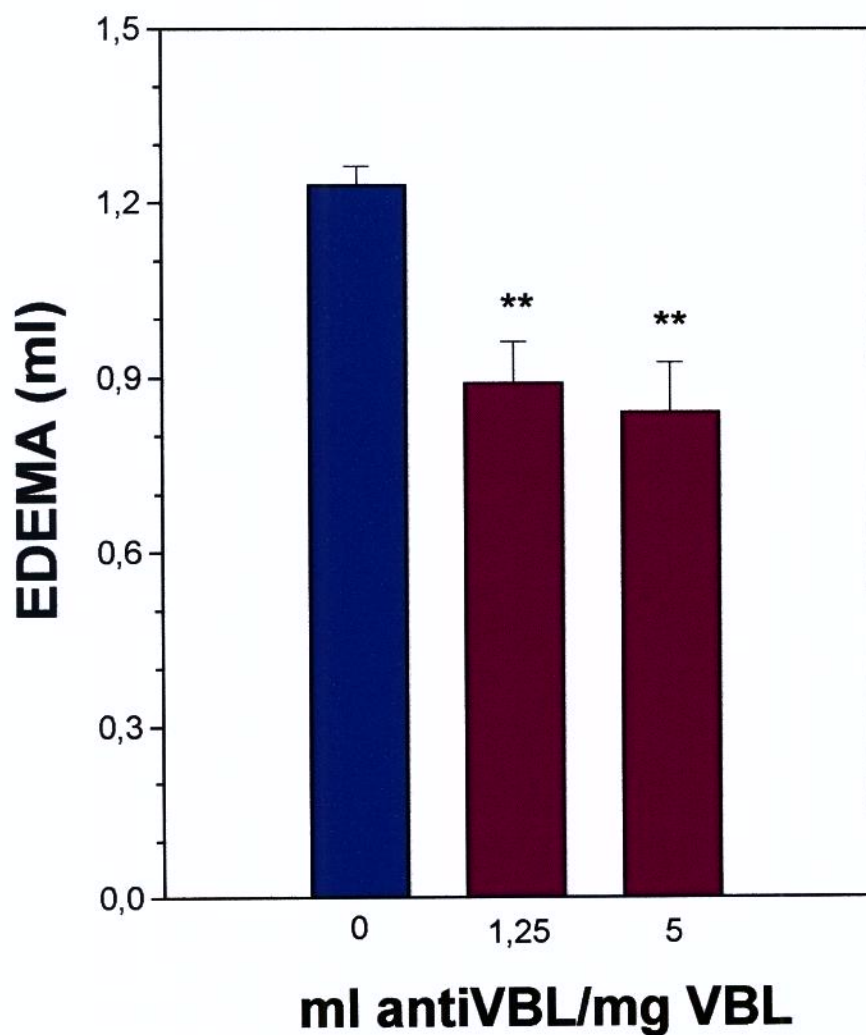


Figura 13. Efeito do soro anti*Bothrops lanceolatus* sobre o aumento de volume de pata (edema), em ratos, induzido pelo VBL “in natura”. O antiVBL, nas proporções indicadas, foi administrado (iv) em uma das veias da cauda, imediatamente após a injeção subplantar de 75 µg de VBL “in natura”. O grupo- controle recebeu apenas 75 µg de VBL. O volume de pata (edema) foi determinado 15 minutos após a administração do VBL. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais, **p < 0,01, comparados com o controle.

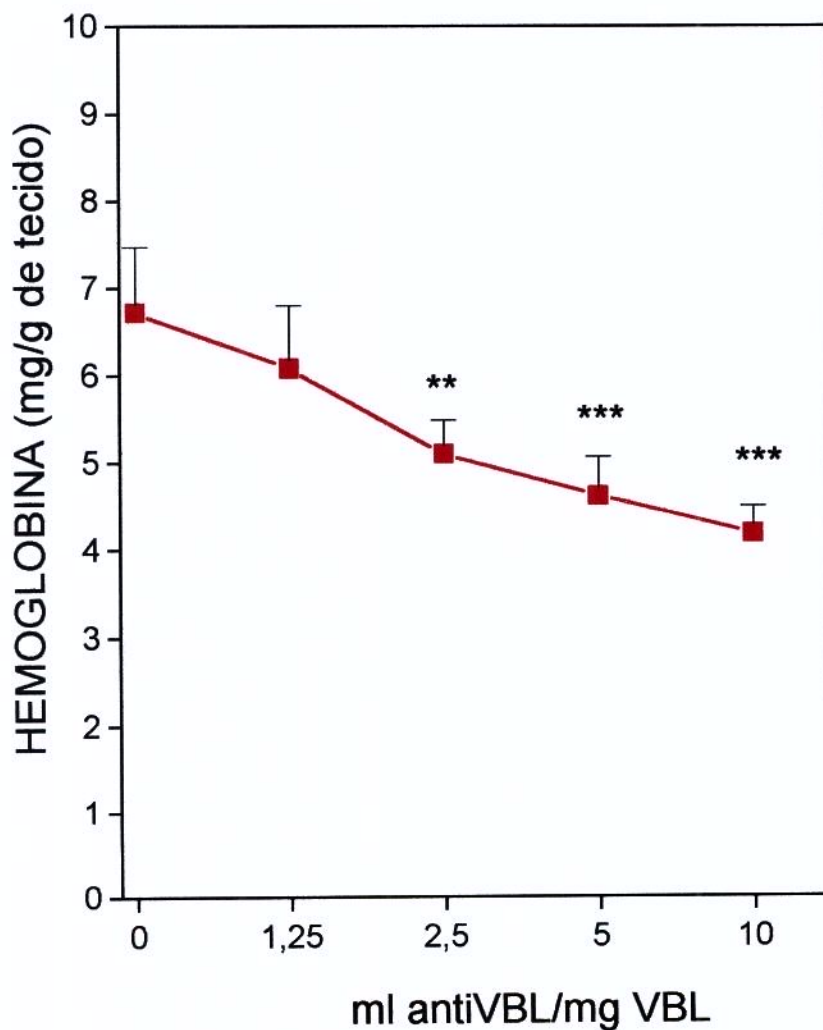


Figura 14. Efeito do soro anti*Bothrops lanceolatus*, sobre a hemorragia em músculo esquelético de ratos, induzida pelo VBL “in natura”. O antiVBL, nas proporções indicadas, foi administrado (iv), em uma das veias da cauda, imediatamente após a administração de 32 μ g de VBL “in natura” (im), no músculo gastrocnêmio esquerdo. O grupo controle recebeu apenas 32 μ g de VBL. Os animais foram sacrificados 3 horas após. A quantidade de hemoglobina foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Cada quadrado representa a média \pm EPM de 6 animais, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparados com o controle.

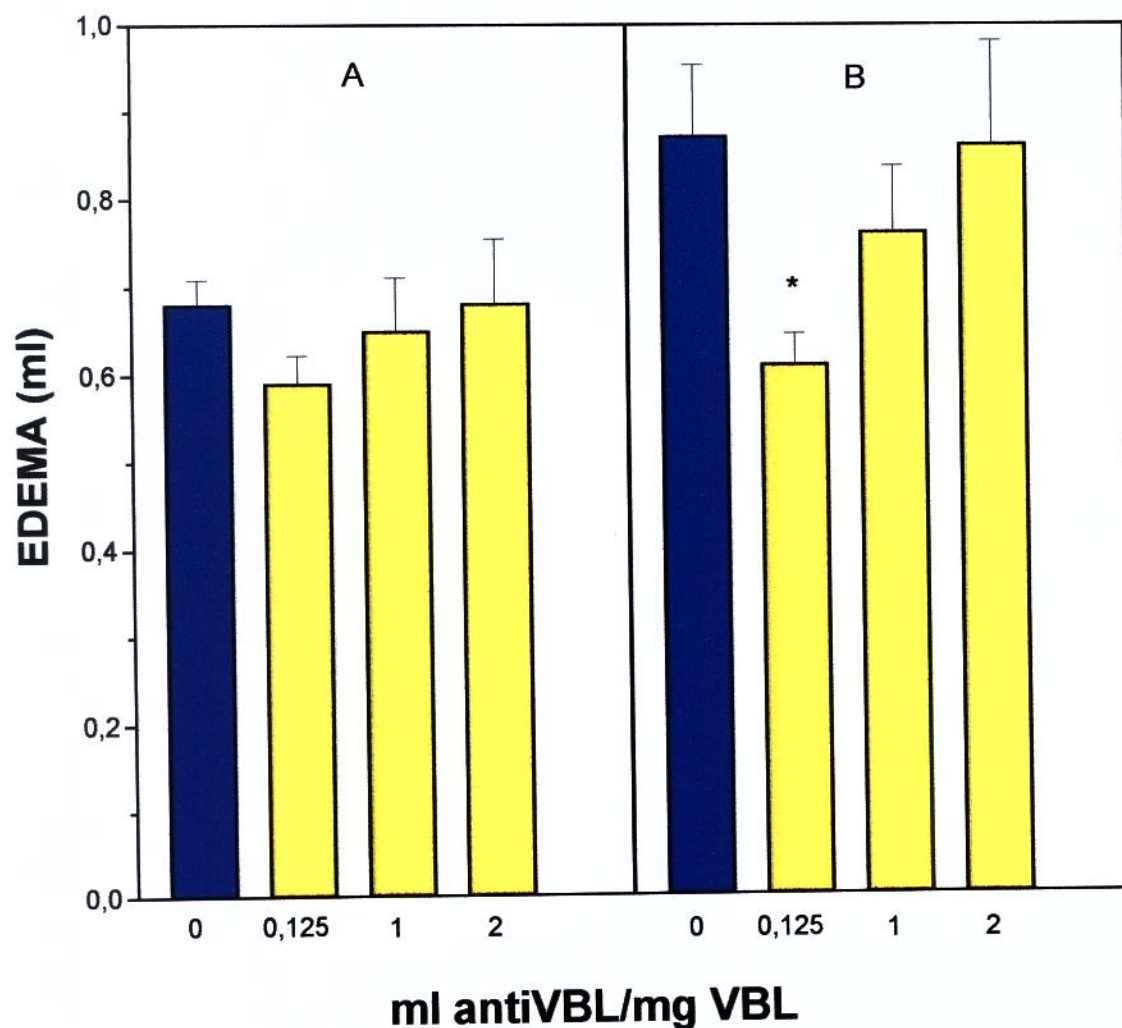


Figura 15. Efeito da pré-incubação do soro anti*Bothrops lanceolatus* sobre o edema de pata, em ratos, induzido pelo VBL aquecido. O antiVBL, nas proporções indicadas, previamente incubado a 37°C durante 30 minutos com o VBL (75 µg) aquecido a 97°C durante 30 segundos, associado ao iloprost (0,1 µg), foi administrado na região subplantar esquerda. O grupo-controle recebeu o VBL (75 µg) associado ao iloprost (0,1 µg). O edema foi determinado 15 minutos (A) e 30 minutos (B) após as injeções. Cada barra representa a média ± EPM de 5 animais, *p < 0,05, comparado com o controle.

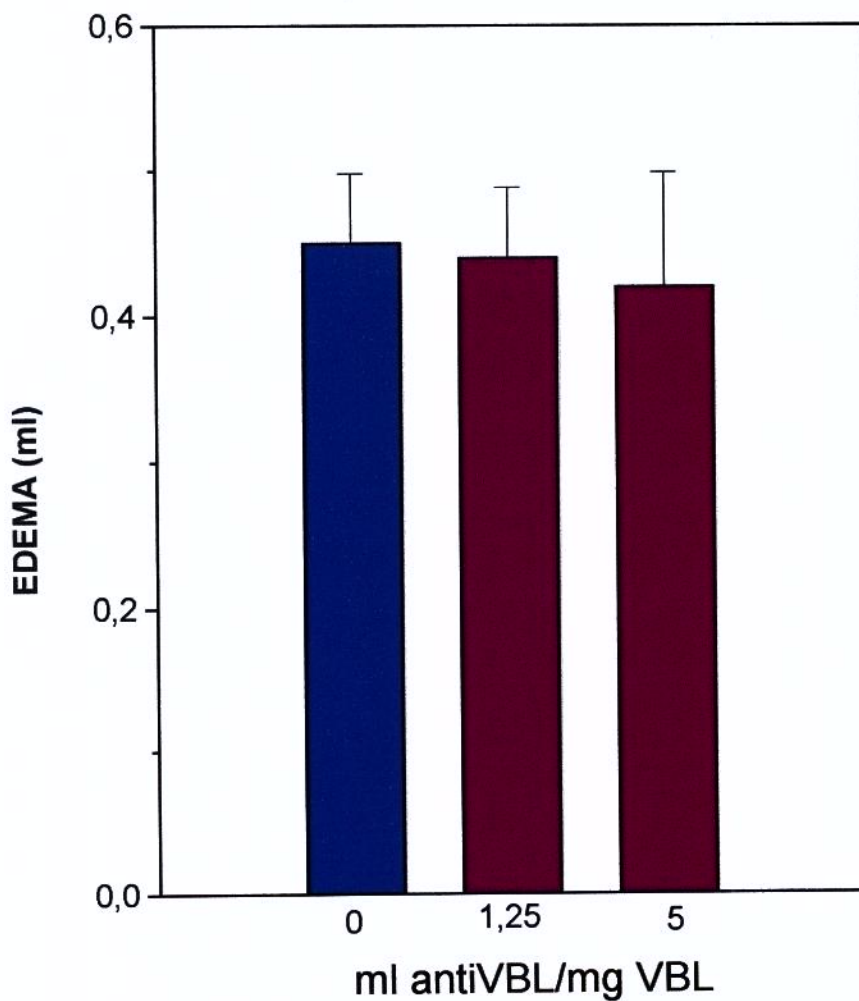


Figura 16. Efeito do soro anti*Bothrops lanceolatus* sobre o edema de pata, em ratos, induzido pelo VBL aquecido. O antiVBL, nas proporções indicadas, foi administrado (iv) em uma das veias da cauda, imediatamente após a administração subplantar de 75 μ g de VBL previamente aquecido a 97°C durante 30 segundos, associado a 0,1 μ g de iloprost. O grupo-controle recebeu o VBL (75 μ g) associado ao iloprost (0,1 μ g). O edema foi determinado 15 minuto após as injeções. Cada barra representa a média \pm EPM de 5 animais.

V - DISCUSSÃO

O aumento de volume de pata de rato (edema), observado com o veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura", foi dose e tempo-dependente e acompanhado de hemorragia. Estes fenômenos são também observados com outros venenos do gênero *Bothrops* (Trebien & Calixto, 1989; Selistre e col. 1990; Perales e col., 1992).

Conforme demonstrado previamente, é interessante notar que o edema induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura", em camundongos, ocorreu também de forma dose e tempo-dependente, porém livre de hemorragia (Souza, 1995). Este fato foi também verificado por Vargaftig, 1974, com o veneno de *Bothrops jararaca*.

Como a hemorragia, nas nossas condições experimentais, acompanha o edema e aparece logo após a inoculação do veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura", determinou-se a dose mínima hemorrágica (DHM) do VBL, necessária para induzir hemorragia estatisticamente significativa. Da mesma forma do que o observado para o edema, a hemorragia é também um fenômeno dose e tempo-dependente. Estes dados estão de acordo com observações de Ownby e col., 1984, para os venenos de *Crotalus atrox* e *Crotalus viridis viridis*.

Verificando que, na espécie animal em estudo, o VBL "in natura" induz o edema acompanhado de hemorragia, decidimos testar o efeito do aquecimento sobre este fenômeno. O aquecimento eliminou completamente a hemorragia. O edema induzido pelo VBL aquecido, embora reduzido, ocorreu de forma dose e tempo-dependente, como verificado para o VBL "in natura". Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores realizados com o veneno de *Bothrops jararaca* (Vargaftig, 1974; Trebien & Calixto, 1989) e o veneno de *Agkistrodon acutos* (Sugihara e col., 1984). Nossos resultados sugerem que proteínas hemorrágicas estão também envolvidas no edema induzido pelo VBL "in natura", mas não descartam a idéia de que a redução do edema causado pelo aquecimento pode ser decorrente de alteração na liberação de outros

mediadores. Além disso, a discreta atividade edematogênica induzida pelo VBL aquecido, quando comparada ao edema causado pelo VBL "in natura", indica que também componentes termorresistentes e termolábeis estão envolvidos no edema induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus*. Estes fatos nos alertaram e nos levaram a verificar se o uso de um vasodilatador seria capaz de potencializar o edema induzido pelo VBL, já que é conhecida a capacidade dos vasodilatadores de promoverem sinergismos no edema inflamatório (Williams & Peck, 1977; Williams, 1979). Realmente, com a co-administração do VBL com o iloprost, houve um sinergismo de potenciação. Este fato já foi demonstrado com o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e metabólitos da cascata do ácido araquidônico (prostaglandinas) (Brain & Williams, 1985; Williams & Monlei 1973; Teixeira e col., 1993).

O edema induzido pelo VBL aquecido (75µg/pata), potencializado quando co-administrado com o iloprost (0,1 µg), continuou ausente de hemorragia. A incapacidade do VBL induzir hemorragia, nestas condições, também foi confirmada dosando-se a hemoglobina liberada na pata, uma hora após a co-administração do VBL aquecido com o iloprost (resultados não mostrados).

Fármacos com atividades farmacológicas conhecidas foram utilizados na tentativa de averiguar quais os possíveis mediadores envolvidos no edema inflamatório induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus*.

O edema induzido pelo VBL aquecido associado ao iloprost foi inibido por mepiramina e ciproheptadina. Possivelmente, pela degranulação de mastócitos com liberação destas aminas, como já foi demonstrado para o veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* (Chiu e col., 1989).

O aumento do edema de pata, provocado pela co-administração do captopril, com o VBL na ausência de iloprost, pode sugerir que cininas também participem deste edema. Evidências adicionais sugerindo a participação de cininas (bradicinina) foram encontradas no tratamento dos animais com o Hoe 140, o qual inibiu o edema induzido pelo VBL. Componentes de venenos de serpentes com atividade liberadora de bradicinina já haviam sido relatados por Rocha e Silva e col. (1949), Cohen e col. (1970) e, mais recentemente, Teng e

col. (1992). Além disso, tanto a liberação de bradicinina quanto a potencialização de atividade de cininas já foram demonstradas com o veneno de *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva e col., 1949; Ferreira, 1965; Ferreira e col., 1992).

É bem conhecida a participação de metabólitos da cascata do ácido araquidônico como mediadores da resposta inflamatória induzida por venenos de serpentes (Vishwanath e col., 1987; Haworth e col., 1988; Trebien & Calixto, 1989). O envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico, possivelmente leucotrienos, foi levantado quando tratamos os animais com dexametasona e BW A4C, um inibidor da lipooxigenase. Estes fármacos também inibiram significativamente o edema por nós verificado. Como já verificado com os venenos de *Bothrops alternatus* e *Bothrops erythromelas* (Flores e col., 1993) e o veneno de *Bothrops jararaca* (Perales, 1992), os leucotrienos atuam conjuntamente com outros mediadores da resposta inflamatória, promovendo vasodilatação, hipotensão e exsudação. O corticóide atua indiretamente sobre a enzima PLA₂, através da síntese de lipocortina, bloqueando a cascata do ácido araquidônico (Flower, 1989) e os produtos de sua metabolização. Além deste efeito, o corticóide poderia estar agindo diretamente em células residentes, leucócitos e/ou células endoteliais, inibindo a liberação de citocinas e ou outros mediadores, participantes da resposta inflamatória (Ribeiro e col., 1991; Flores e col., 1993). O não-envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase foi por nós demonstrado quando utilizamos a indometacina e o edema permaneceu inalterado. Este resultado foi diferente do observado por Trebien & Calixto (1989) e Perales (1992), para o veneno de *Bothrops jararaca*. A indometacina, embora não efetiva no edema induzido pelo VBL, no induzido pela carragenina (100µg/pata), que duas horas após apresentou índice máximo de $0,60 \pm 0,05$ ml, a mesma reduziu o edema para $0,16 \pm 0,04$ ml, tendo sido administrada 30 minutos antes da carragenina. Nossos resultados indicam que, tanto aminas biogênicas, como metabólitos do ácido araquidônico, pela via da lipooxigenase, possivelmente leucotrienos, e

cininas, como a bradicinina, são mediadores importantes da resposta inflamatória induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus*.

Vital Brazil, no início do século (1901a, b, 1903), imunizando cães e cabritos com veneno de cascavel ou de jararaca, reconheceu, pela primeira vez, a especificidade imunológica dos venenos ofídicos. Observou também que, enquanto o soro produzido com o veneno de jararaca não neutralizava os efeitos do veneno crotálico, o soro anticrotálico pouco neutralizava os efeitos induzidos com o veneno de jararaca.

Além do tratamento com fármacos, também verificamos a capacidade neutralizante do soro anti*Bothrops lanceolatus* sobre o edema e a hemorragia, induzidos pelo VBL. Para isso, o antiVBL foi utilizado tanto pré-incubado como administrado por via intravenosa.

O antiVBL pré-incubado com o VBL "in natura" neutralizou totalmente a hemorragia; o edema, nas mesmas condições experimentais, foi neutralizado em torno de 50%. A neutralização da hemorragia pelo antiVBL, associada ao fato de o VBL aquecido não induzir hemorragia no músculo, comprova, também, que o(s) componente(s) hemorrágico(s) neutralizado(s) pelo antiVBL é(são) termolábil(eis). Já, em relação ao aumento de volume (edema), estão presentes tanto componentes termorresistentes quanto termolábeis, uma vez que esta atividade continuou presente e também reduzida para o VBL aquecido.

É conhecida a propriedade de anticorpos da classe IgE se ligarem na superfície de mastócitos, provocando sua degranulação com liberação de substâncias capazes de induzirem edema (Calich & Vaz, 1989; Moura da Silva, 1991).

A discreta efetividade do antiVBL em inibir o edema induzido pelo VBL aquecido pode estar associada ao fato de que o antiVBL foi capaz de induzir edema quando injetado na pata dos ratos. Este edema foi inibido significativamente quando tratamos os animais com ciproheptadina (resultados não mostrados), indicando que aminas participam do edema induzido pelo antiVBL. A liberação de aminas de mastócitos já foi demonstrada com os soros botrópicos e crotálicos (Antunes, 1987). Quando administramos o antiVBL, por

via intravenosa, a capacidade neutralizante para o edema e a hemorragia foi menos eficaz, quando comparada com a do pré-incubado. Possivelmente, isto ocorre pelo fato de os efeitos locais se instalarem rapidamente, logo após a picada (Gutiérrez e col., 1987), o que dificultaria a neutralização desses efeitos pelos anticorpos, que chegariam ao local depois que o efeito já se estabelecera (Russel & Gonçalves, 1973; Gutiérrez e col., 1981, 1985, 1987; Ownby e col., 1984). Ainda há a possibilidade de o antiveneno não ter acesso ao local da picada, não possuir anticorpos contra os componentes responsáveis pelos efeitos locais ou chegar em quantidades insuficientes para neutralizar as toxinas responsáveis por esses efeitos (Ferreira e col., 1992).

As atividades edematogênica e hemorrágica, induzidas pelo VBL, também foram neutralizadas pelo soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan (resultados não mostrados), indicando a presença de reações cruzadas entre o veneno de *Bothrops lanceolatus* e o veneno das *Bothrops* brasileiras. Este fato já foi relatado por Otero e col. (1995), investigando a capacidade neutralizante de vários tipos de antivenenos, sobre os efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox*.

Desta forma, antagonistas da bradicinina, drogas anti-inflamatórias, assim como anti-histamínicos e anti-serotónínicos, podem constituir importantes alternativas terapêuticas associadas à soroterapia, no tratamento da lesão inflamatória provocada pelo acidente botrópico.

Os resultados apresentados elucidaram alguns fatos importantes que contribuirão para novas fontes de estudos, no sentido de melhor compreender a complexidade do envenenamento botrópico.

VI - CONCLUSÕES

- ❶ O veneno de *Bothrops lanceolatus* "in natura", em ratos "Wistar", induz edema de pata e hemorragia em músculo esquelético de forma dose e tempo-dependente;
- ❷ O veneno de *Bothrops lanceolatus*, quando aquecido, perde a atividade hemorrágica e apresenta ação edematogênica reduzida. Este edema foi potencializado pelo Iloprost;
- ❸ A atividade edematogênica do veneno de *Bothrops lanceolatus* envolve a participação de histamina, serotonina, bradicinina e metabólitos do ácido araquidônico pela via da lipooxigenase.
- ❹ O soro anti*Bothrops lanceolatus*, incubado com o VBL "in natura", neutraliza completamente a atividade hemorrágica e parcialmente a edematogênica. Quando injetado por via intravenosa, foi menos efetivo para neutralização de ambas as atividades.

VII - ABSTRACT

The ability of snake venoms to induce local effects is well known. In this thesis, the oedema and hemorrhage induced in rats by heated and non-heated *Bothrops lanceolatus* venom (BLV) was investigated. Oedema was induced by the subplantar injection of venom (12.5-100 µg/paw) and was quantified by hydroplethysmography at various times thereafter. Hemorrhage was induced by injecting venom (0.25 - 64 µg) into the left gastrocnemius muscle and was expressed as accumulation of extravascular hemoglobin(hb) as determined by the cyanomethemoglobin method. With all of the venom doses tested, the oedematogenic response peaked within 15 min. The maximal response was observed at a venom dose of 75 µg/paw (saline control = 0.09 ± 0.001 ml and venom = 1.09 ± 0.05 ml, n=7) and disappeared within 24h. The maximum hemorrhagic effect was observed with 32 µg of BLV (saline control = 1.23 ± 0.06 mg hb/g of tissal and venom = 6.77 ± 0.69 mg hb/g of tissal, n=6) and disappeared within 72h. Heating BLV (97°C, 30 sec) reduced the oedema by 70% and completely abolished the hemorrhagic activity. The combined administration of heated BLV (75 µg) with iloprost (0.1 µg) potentiated the oedema two-fold. Pre-treating the rats with mepyramine (6 mg/kg), cyproheptadine (6 mg/kg), mepyramine and cyproheptadine (6 mg/kg each, 15 min before), dexamethasone (1 mg/kg 2 h before), BW A4C (10 mg/kg) and Hoe 140 (0.6 mg/kg each 30 min before), inhibited the oedema induced by heated BLV (75 µg) plus iloprost (0.1 µg) by 28%, 55%, 77%, 63%, 35% and 30%; respectively. The co-administration of heated BLV (75 µg) with captopril (300 µg) potentiated the oedema by 44%, even in the absence of iloprost. Indomethacin (10 mg/kg) had no effect on the oedematogenic response. Pre-incubating native (non-heated) BLV with antiBLV antiserum completely neutralized the hemorrhagic effect but only partially abolished (45%) the oedema. The intravenous administration of antiBLV antiserum immediately after the subplantar

or intramuscular injection of venom neutralized 30% of the oedema and 38% of the hemorrhage. When antiBLV antiserum was incubated with heated BLV plus iloprost and injected into rat paws, the neutralization was discrete (about 30%) and was observed only with the lowest proportion (0.125 ml antiBLV/mg BLV) tested. When administered intravenously immediately after the injection of heated venom, there was no neutralization whatsoever. These results indicate that non-heated BLV induces oedema in the paw and hemorrhage in the muscle of rats while heated BLV induces oedema without hemorrhage. AntiBLV antiserum completely neutralized the hemorrhagic effect and only partially inhibited the oedema when it was preincubated with BLV. The antiserum was less effective in neutralizing both activities when administered intravenously. These observations indicate that bradykinin, histamine, serotonin and lipoxygenase products are involved in the oedema caused by *Bothrops lanceolatus* venom.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.A. *Cartilha de Ofidismo*, Ministério da Saúde, Brasília, DF., p.29., 1990.

AMARAL, C.F.S.; DOURADO, H.V.; KOUYOUMDJIAN, J.A.; CARDOSO, J.L.; CAMPOS, J.A.; AZEVEDO-MARQUES, M.; LOPES, P.F.A. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*. Ministério da Saúde, Brasília, DF. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, pp. 1-53, 1987.

ANTUNES, E. Poder neutralizante de soros antiofídicos sobre a atividade liberadora de histamina de venenos ofídicos. *Tese de mestrado, apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp, para obtenção do Título em Ciências*, p. 32-34, 1987.

BARJA-FIDALGO, C.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. *Inflammation* 16: 1-12, 1992.

BAUMAN, H. & GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunol. Today*. 15: 74-80, 1994.

BELLANTI, J.A. *Imunologia*, 2ª ed., Interamericana, Rio de Janeiro, p.3-23, 1980.

- BJARNASON, J.B. & TU, A.T. Hemorrhagic toxins from western diamond rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. *Biochemistry* 17: 3395-3404, 1978.
- BOLANOS, R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primeira parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev. Cost. Cien. Méd.* 3: 165-184, 1982.
- BONTA, I.L. & NOORDHOEK, J. Anti-inflammatory mechanism of inflamed-tissue factor. *Agents Actions*, 3: 348-356. In: *Snake Venoms*. Lee, C. Y. (Ed), Springer-Verlag, Berlin, p. 641, 1973.
- BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 86: 855-860, 1985.
- BRAZIL, O. V. Peçonhas In: *Farmacodinâmica*. (Corbett C. E.,ed.). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.pp. 1044-1074, 1982.
- CALICH, V.L.G. & VAZ, C.A.C. *Imunologia Básica*. 1a ed.Artes Médicas, 1989.
- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. *The Venomous Reptiles of America*. Comstock Publishing, Ithaca. pp.180-226, 1989.
- CARDOSO, J.L. Snakebites at hospital Vital Brazil. A study of 2908 cases. *Toxicon* 23: 558, 1985.

- CHAPMAN, D. The symptomatology, pathology and treatment of the bites of venomous snakes of Central and Southern Africa. In: *Venomous Animals and Their Venoms, Vol. 1, Venomous Vertebrates*. (Buchrel, W., Bucherl, E., Deulofeu, V. eds.). Academic Press. New York. pp. 463-527, 1968.
- CHIU, H.F.; CHEN, I.J.; TENG, C.M. Edema formation and degranulation of mast cells by a basic phospholipase A2 purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon*. 27: 115-125, 1989.
- CIVELLO, D.J.; DUONG, H.L.; GEREN, C.R. Isolation and characterization of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. *Biochemistry* 22: 749-755, 1983.
- COHEN, I.; ZUR, M.; KAMINSKI, E.; de VRIES, A. Isolation and characterization of kinin-releasing enzyme of *Echis coloratus* venom. *Biochem. Pharmacol.* 19: 785-793, 1970.
- COHNHEIM, J. (1889). Lectures in general pathology. (Translated by Mckee, A. D., from the second German edition, Vol. I.) London, New Sydenham Society. In: *Patologia Estrutural e Funcional*, México, Nueva Editorial, Interamericana. pp.33-72, 1991.
- CONDREA, E. Hemolytic effects of snake venoms. In: *Snake venoms*. (Lee, C.Y., ed.) Springer-Verlag, Berlin.p. 448, 1979.
- DAHLÉN, S.E.; HANSSON, G.; HEDQUIST, P.; BJORCK, T.; GRANSTROM, E.; DAHLEN, B. Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C4, D4 and E4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1712-1716, 1983.

DALE, M.M. & FOREMAN, J.C. Histamine as a mediator of allergic and inflammatory reactions. In: *Textbook of Immunopharmacology*. (Dale, M.M.; Foreman, J.C.; Fan, T-P.D. eds.). editora, Oxford. pp. 123-130, 1994.

DALE, M.M.; FOREMAN, L.C.; FAN, T-P.D. Introduction to the immunology and pathology of host defense mechanisms. In: *Textbook of Immunopharmacology*. (Dale, M. M., Foreman, J. C., Fan, T-D. D. eds.). editora, Oxford. pp. 1-17, 1994.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: *Venomous animals and their venoms*. vol. I (Bucherl, W., Buckely, E., Deulofeu, V. eds) Academic Press, New York. pp. 119-165, 1968.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S. News concepts on the pathogenesis of fever. *Rev. Infect. Dis.* 10: 168-189, 1988.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res.* 562: 199-206, 1991.

FABIANO, R.J. & TU, A.T. Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin from prairie rattlesnake venom. *Biochemistry* 20: 21, 1981.

FARIA, J.L. Mecanismos de defesa do organismo. In: *Patologia geral: fundamentos das doenças com aplicações clínicas*. 3a ed. Guanabara, Rio de Janeiro. pp. 134-253, 1988.

- FERREIRA, S.H. A bradykinin potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.* 24: 163-169, 1965.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandin hyperalgesia and the control of inflammatory pain. In: *Pharmacology of inflammation*, (Bonta, I.L., Bray, M.A., Parnham, J. M., eds.), editora, Amsterdam. pp. 107-116 1985.
- FERREIRA, M.L.; MOURA DA SILVA, A.M.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon* 30: 1591-1602, 1992.
- FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon* 31: 1551-1559, 1993.
- FLOWER, R.J. Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A2. In: *Antiinflammatory steroid action. Basic and clinical aspects*, (Schleimer, R.P.; Clamor, H.N.; Oronsky, A.L., eds.). Academic Press, New York, pp.48-66 1989.
- FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M.A.; DOIG, M.V.; SHIPLEY, M.E.; SMITH, M.J. H. Leukotriene B: A potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286: 264-265, 1980.
- GALLIN, J.I.; DOLDSTEIN, U.M.; SNYDERMAN, R.S. Overview. In: *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. (Gallin, J.L., Goldstein, I.M., Snyderman, R.S. eds). Raven Press, New York. pp. 1-3, 1988.
- GARCIA LEME, J. Métodos experimentais no estudo da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumat.* 19: 146-150, 1979.

- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500, 1981.
- GUTIÉRREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23: 887-893, 1985.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; CERDAS, L. Comparative study of edema-forming activity of Costa Rica snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.* 85C: 171-175, 1986.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.E.; CERDAS, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon* 25: 713-720, 1987.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26: 411-413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan.* 51: 211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ÁVILA, C.; CAMACHO, Z.; LOMONTE, B. ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon* 28: 419-426, 1990.

- HAWORTH, D.; HERON, J.R.M.; CAREY, F. Rat paw hyperalgesia and oedema in response to NMDA and *Naja naja* phospholipase A2. *Br. J. Pharmacol.* 93: 145p, 1988.
- HIGGS, G.A.; FOLLENFANT, R.L.; GARLAND, L.G. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: effects on acute inflammatory responses. *Br. J. Pharmacol.* 94: 547-551, 1988.
- HO, C.L. & HWANG, L.L. Local edema induced by the black-bellied hornet venom and its components. *Toxicon* 29: 1033-1042, 1991.
- HOGUE, A.R. & ROMANO HOGUE, S.A.R.W.L. Poisonous snakes of the world. Part I - Checklist of the pit vipers Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. *Mem. Inst. Butantan* 42/43: 179-310, 1978 /1979.
- HOUSSAY, B.A. & NEGRETE, J. Estudios sobre venenos de serpentes. III. Action de los venenos de serpientes sobre las substâncias proteicas. *Rev. Inst. Bacteriol. (Dep. Nac. Higiene)* 1: 341, 1918.
- JIMENEZ-PORRAS, J.M. Reptile toxins. In: *Biology Data Book*, vol. II, 2nd ed p. 697. Rochville Pibe: Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), 1973.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO J. *Histologia básica*. 8^a, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. pp. 69-94, 1995.
- KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; DESMOND, H.; HUTTON, R.A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 29: 1097-1105, 1991.

- KLOBUSITZKY, D. Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms. *Am. J. Med. Sci.* 242: 107, 1961.
- KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* 25: 65-106., 1987.
- LOBO DE ARAÚJO, A. & RADVANYI, F. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25: 1181, 1987.
- LOBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J.L.; MORENO, R.A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Comparison of the phospholipase A2, blood-clotting, caseinolytic, esterolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 28: 601, 1990.
- LOMONTE, B. Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23: 173, 1985.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MORENO, E.; CERDAS, L. Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 25: 443. 1987.
- LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 375-381, 1985.
- MacMILLAN, R.M. & FOSTER, S.J. Leukotriene B4 and inflammatory disease. *Agent Actions* 24: 14-119, 1988.

- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M. Some physical and biochemical characteristics of HF2 one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins* 1: 111-121, 1976.
- MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* 22: 193-206, 1984.
- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Hemorrhagic factors from the venoms of two species of *Bothrops* snakes. *Anais do XI Simpósio Anual da Acad. Ciências do Estado de São Paulo*, vol. 1: 9, 1988.
- MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.* 1: 335, 1970.
- MEHRTENS, J. Living snakes of the world. Sterling Publishing, New York, pp. 480, 1987.
- MENGDEN, G. The taxonomy of Australian elapid snakes. *Rec. Austral. Mus.*, 35: 195-222, 1983.
- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. Purification of a proteinase (Ac5-proteinase) and characterization of hemorrhagic toxins from the venom of the hundred-pace snake *Agkistrodon acutus*. *Toxicon* 22: 451-461, 1984.
- MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M. Differences in the distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon* 28: 1292-1301, 1990.

- MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M.; MOTA, I.
Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. *Toxicon*. 29: 1471-1480, 1991.
- NAKAMURA, M. & FERREIRA, S.H. Peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 135: 145-153, 1987.
- NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B.A.; MORRISON, A.R.; LEFKOWITH, J.B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 69-102, 1986.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A.T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Archs. Biochem. Biophys.* 231: 309-319, 1984.
- OHSAKA, A.; OMORI-SATOH, T.; KONDO, S.; MURATA, R. Biochemical and pathological aspects of hemorrhagic principles in snake venoms with special reference to habu *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Mem. Inst. Butantan.* 33: 193-205, 1966.
- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema forming effects of snake venoms. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. vol. 52. (Lee, C.Y., ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 480-546, 1979
- OTERO, R.; NUÑEZ, V.; OSORIO, R.G.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIRALDO, C.A. Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapaná equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon*. 33: 809-815, 1995.

- OWNBY, C.L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: *Rattlesnake venoms. Their actions and treatment.* (In, A.T., ed). Marcel Pekker, New York. pp.163-209, 1982.
- OWNBY, C.L.; COLBERG, T.R.; ODELL, G.V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: Ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon*. 22: 227-233, 1984.
- PALMBLAD, F. Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood* 58: 658, 1981.
- PELISSARI, C.B.; STINGHEN, S.T.; NASCIMENTO, A.J.; LEONART, M.S.S. Cyanomethemoglobin method padronization for supernatant hemoglobin determination. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 25: 14-16, 1993.
- PERALES, J.; AMORIM, C.Z.; ROCHA, S.L.G.; DOMONT, G.B.; MOUSSATCHÉ. H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antiothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Agent Actions* 37: 250-259, 1992.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. MANDELBAUM, F.R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 23: 341-345, 1985.
- RANDALL, R.W.; EAKINS, K.W.; HIGGS, G.A.; SALMON, J.A.; TATESON, J.E. Inhibition of arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxygenase of leukocytes by indomethacin and compound BW 755 C. *Agents Actions*. 10: 533-555, 1980.

- RANG, H.P. & DALE, M.M. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: *Farmacologia*, Guanabara Koogan Rio de Janeiro. pp. 152-174, 1993.
- RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoyephorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* 17: 723-741, 1993.
- RIBEIRO, R.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunology*. 73: 472-477, 1991.
- ROBBINS, S.I.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. Inflamação e reparo. In: *Patologia estrutural e funcional*. Nueva Editorial Interamericana. México.pp. 33-72, 1991.
- ROBERTO G. *Anatomia dos animais domésticos*. 5ª ed.vol.1, Interamericana, Rio de Janeiro, pp.351-423, 1981.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENVELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-156, 1949.
- ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.A.; GENE, J.A.; GOMEZ, M.; CERDAS, L. Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 35: 59-67, 1987.

- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous animal and their venoms*. vol. 1 (Bucherl, W., Buckely, E., Deulofeu, V., eds.). Academic Press. New York. pp. 345-403 1971.
- ROTHSCHILD, A.M. & ROTHSCCHILD, D.Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: *Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. vol. 52. (Lee, C. Y., ed.) Springer-Verlag, Berlin. p. 591, 1979.
- RUSSELL, F.E.; RUZIC, N.; GONZALES, H. Effectiveness of antivenin (*Crotalidae*) polyvalent following injection of *Crotalus* venom. *Toxicon* 11: 461-464, 1973.
- SALMON, J.A. & HIGGS, G.A. The eicosanoids: generation and actions. In: *Textbook of Immunopharmacology*. (Dale, M.M., Foreman, J.C., Fan, T-D.D., eds), editora, Oxford, pp. 131-142, 1994.
- SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S-E; LINDGREN, J.A.; ROUZER, C.A.; SERHAN, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*.237: 1085-1272, 1987.
- SCHENBERG, S. Estudo comparativo da composição do veneno de *Bothrops neuwidii* em placas de Ouchterlony. *Ciênc. Cult.* 10: 163, 1958.
- SCHENBERG, S. Análise imunológica (micro-difusão em gel) de venenos individuais de *Bothrops jararaca*. *Ciênc. e Cult.* 13: 225, 1961.

- SCHENBERG, S. Immunological (Ouchterlony method) identification of intrasubspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon* 1: 67, 1963.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância Epidemiológica*. São Paulo, p. 13-28, 1993.
- SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; DE SOUZA, G.E.P.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 28: 261-273, 1990.
- SIEGEL, S. In: *Estatística não paramétrica*. McGraw-Hill do Brasil-Ltda, Rio de Janeiro pp. 302-305, 1979.
- SOUZA, A.O. Avaliação da capacidade edematogênica do veneno de *Bothrops lanceolatus* em pata de camundongos. Tese de mestrado em farmacologia, Depto. de farmacologia, UNICAMP, p. 28, 1995.
- SUGIHARA, H.; NIKAI, T.; MORI, N. purification of a Proteinase (Ac₅-proteinase) and characterization of hemorrhagic toxins from the venom of the hundred-pace snake (*Agkistrodon acutus*). *Toxicon*. 22: 451-461, 1984.
- SWAROOP, S. & GRAB, B. Snakebite mortality in the world. *Bull. World. Hlth. Org.* 10: 35-76, 1954.
- SWAROOP, S. & GRAB, B. The snakebite mortality problem in the world. In: *Venomous Animals and their venoms*. vol.1 (Burchel, W., Buckley, E., Deulofeu, V., eds). Academic Press. New York, pp. 439-446, 1956.

- TAN, N.H. & SAIFUDDIN, M.N. Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Toxicon* 28: 385-392, 1990.
- TATESON, J.E.; RANDALL, R.W.; REYNOLDS, C.H.; JACKSON, W.P.; BHATTACHERJEE, P.; SALMON, J.A.; GARLAND, L.G. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 94: 528-539, 1988.
- TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J.; HELLWELL, P.G. E-Type prostaglandins enhance local oedema formation and neutrophil accumulation but suppress eosinophil accumulation in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.* 110: 416-422, 1993.
- TENG, C.M.; HSU, M.F.; WANG, J.P. Comparison of kinin-forming and amidolytic activities of four trimucases, oedema-producing and kinin-releasing enzymes, from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *J. Pharm. Pharmacol.* 44: 306-310, 1992.
- THOMAS, L.; TYBURN, B.; BUCHER, B.; PECOUT, F.; KETTERLE, J.; RIEUX, D.; SMADJA, D.; GARNIER, D.; PLUMELLE, Y. and the research group on snake bites in Martinique. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 419-426, 1995.
- TREBIEN, H.A. & CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions* 26: 292-300, 1989.

- TU, A.T. Hemorrhagic factors. Hemorrhagic proteases from snake venoms . In: *Hemostasis and animal venoms*. (Pirkle, H., Markland, F.S., eds.), Marcel Dekker, New York. pp. 425-455, 1988.
- VARGAFTIG, B.B.; BHARGAVA, N.; BONTA, I.L. Haemorrhagic and permeability increasing of *Bothrops jararaca* and other Crotalidae venoms as related to amine or kinin release. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52 (Lee, C.Y., ed.), Springer-Verlag, Berlin. p. 671-673, 1979.
- VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A2 enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon* 25: 501-515. 1987.
- VITAL BRAZIL. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. I. O veneno de algumas espécies brasileiras. *Rev. Med. São Paulo*, 4: 296-300, 1901a.
- VITAL BRAZIL. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. II. Tratamento das mordeduras de cobra. *Rev. Med. São Paulo*, 4: 375-380, 1901b
- VITAL BRAZIL. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III. Tratamento das mordeduras de cobras. *Rev. Med. de São Paulo*, 6: 265, 1903.
- VITAL BRAZIL. A defesa contra o ophidismo, São Paulo, Brasil. In: *Venomous Animals and their venomus* (1968). Bucherlrl, W.; Buckley, E. E. e Deulofeu, V. (Eds.), New York, London, v. 1, p. 119-121, 1911.

VITAL BRAZIL & VELLARD, J. Action coagulante et anticoagulante des venims. *Ann. Inst. Pasteur* 42: 403, 1928.

WARRELL, D.A. & FENNER, P.J. Venomous bites and stings. *Br. Med. Bull.* 49: 423-439, 1993.

WILLIAMS, T.J. & MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature.* 246: 215-217, 1973.

WILLIAMS, T.J. & PECK, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature.* 270: 530-532, 1977.

WILLIAMS, T.J. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes in inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 65: 517-524, 1979.

WILLIAMS, T.J. Vascular changes in inflammation and mechanisms of oedema formation. In: *Textbook of immunopharmacology.* (DALE, M.M.; FOREMAN, J. C.; Fan, T-D.D., eds.), editora, Oxford, p. 211-217, 1994.

YONAHARA, K.; IHA, M.; TOMIHARA, Y.; NOZAKI, M.; YAMAKAWA, M. Characterization of three hemorrhagic factors from the venom of Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon* 29: 703-711, 1991.