

**LOURDES DIAS**

***“AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES  
CAUSADAS PELA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus*:  
ESTUDOS *in vivo* e *in vitro*”***

**CAMPINAS**

**2009**

---

**LOURDES DIAS**

**“ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES  
CAUSADAS PELA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus*:  
ESTUDOS *in vivo* e *in vitro*”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Stephen Hyslop

**CAMPINAS**

**2009**

iii

---

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**  
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D543a Dias, Lourdes  
Alterações cardiovasculares causadas pela peçonha de *Bothrops alternatus*: estudos *in vivo* e *in vitro*/ Lourdes Dias. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Stephen Hyslop  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas

1. *Bothrops alternatus*. 2. Farmacologia cardiovascular. 3. Toxinas.  
4. Peçonha. 5. Átrio. 6. Hemodinâmica.

I. Hyslop, Stephen. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: “Cardiovascular alterations caused by *Bothrops alternatus* venom: studys *in vivo* and *in vitro*”**

**Keywords**

- *Bothrops*
- Cardiovascular pharmacology
- Toxins
- Venom
- Atria
- Hemodynamics

**Titulação: Doutor em Farmacologia**

**Banca Examinadora: Prof. Dr. Stephen Hyslop  
Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior  
Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas  
Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Junior  
Profª. Dra. Ida Sigueko Sano-Martins**

**Data da defesa: 13/07/09**



UNICAMP

---

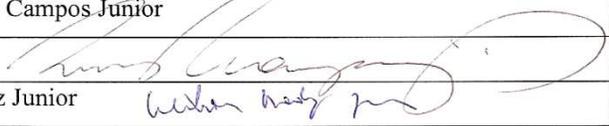
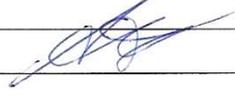
## **Banca examinadora de Tese de Doutorado**

---

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Stephen Hyslop**

---

<b>Membros:</b>	
Professor (a) Doutor (a) Ida Sigueko Sano-martins	
Professor (a) Doutor (a) Ruy Ribeiro de Campos Júnior	
Professor (a) Doutor (a) Wilson Nadruz Junior	
Professor (a) Doutor (a) Miguel Arcanjo Areas	
Professor (a) Doutor (a) Stephen Hyslop	

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

---

**Data: 13/07/2009**

---

# *DEDICATÓRIA*

*Dedico este trabalho ao meu filho **EMERSON**,  
ao meu neto **JOÃO PEDRO** e à minha nora **JAQUELINE**,  
sentidos de minha existência, na esperança de que, no decorrer de suas  
jornadas existenciais, possam quem sabe nele ver, e em quem o realizou,  
um exemplo útil ao seu caminhar.*

*Aos meus pais **Mário (in memorian)** e **Maria Soares**, que  
sempre me incentivaram e acreditaram em mim, e que em nenhum  
momento de minha caminhada deixaram de acalentar os meus  
sonhos, minha mais profunda gratidão por tanto carinho, confiança e  
credibilidade.*

*Aos meus irmãos, pela compreensão de minha constante ausência.*

*Ao Sr. **Lázaro** e Sra. **Maria Aparecida de Araújo**  
(*in memorian*), pelo carinho e confiança que em vida me dedicaram e que,  
certamente, de onde estão continuam me dedicando.*

## ***AGRADECIMENTOS***

**A DEUS,**  
*pela força e pela certeza de que se consegui chegar ao término deste trabalho, foi sem dúvida nenhuma por sua generosa e infinita bondade.*

**Ao prof. Dr. STEPHEN HYSLOP,**  
*meu orientador, pelos conhecimentos científicos que tive o privilégio de dele receber e pela enorme colaboração para que chegássemos ao fim desta jornada, cientes do dever cumprido; agradeço também a confiança em mim depositada, pois, se assim não acontecesse, não teria sido possível chegar até aqui.*

**Ao prof. Dr. Heitor Moreno Jr.,**  
*por sua valiosa contribuição para a realização deste trabalho.*

**Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, bem como ao seu coordenador prof. Dr. Edson Antunes,** *pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.*

**À FAPESP,**  
*por tornar possível a realização desta tese e a conquista desta vitória.*

***AGRADEÇO ESPECIALMENTE,***

Ao **José Ilton dos Santos**, técnico do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP, pela grande e indispensável contribuição em todos os experimentos e trabalhos realizados e também pela amizade.

Ao **Adilson José Thomaz**, técnico do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP, pela colaboração no desenvolvimento dos protocolos hemodinâmicos.

Aos funcionários do canil, especialmente à veterinária **Sônia Cano Montebelo Rachel**, pela colaboração na seleção e no cuidado dispensado aos animais.

Às amigas **Mariana Acedo Pitocco Rodrigues, Adriana Smaal e Sueli Moreira Melo** e, ao amigo **André Lisboa Rennó** pela valiosa contribuição e realização de alguns protocolos deste projeto.

Às minhas grandes amigas e irmãs (de alma) **Gracieli Prado Elias, Renata Ribeiro Bruzadelli e Soraya Maria Dias**, pelo carinho, pelo estímulo e pelo apoio moral em todos os momentos difíceis de minha caminhada.

Às grandes amigas, **Renata de Oliveira, Letícia Bignotto e Raquel Lorenzetti**, pelo amparo recebido e também pela força dada em todos os momentos.

Ao amigo **Delano Anibal da Silva**, pelo auxílio no manuseio de alguns equipamentos e por seus conhecimentos estatísticos.

Ao bioterista, **Miguel Borges da Silva**, por manter o biotério adequado à acomodação dos animais e pelo cuidado com estes.

*A todos os **outros amigos**, que tiveram a paciência de me ouvir e me incentivar a realizar este trabalho.*

*Aos **colegas de curso da Pós-Graduação**, pela amizade e pelos momentos de alegria e descontração.*

*Aos **ANIMAIS** que cederam suas vidas (meu respeito) em prol do avanço científico, em benefício do ser humano.*

## ***EPÍGRAFE***

*“Difícil descrever  
o que sentimos ao encerramento de uma tarefa.  
**Primeiro**, imensa alegria, por termos vencido o desafio;  
**depois**, alívio, por haveremos concluído o que começamos;  
e, **por último**, saudade de um período trabalhoso,  
mas profundamente gratificante,  
e que não voltará mais”*

*Melero*

## ***SUMÁRIO***

## SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS.....	xxix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xxxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxxvii
LISTA DE TABELAS.....	xli
RESUMO .....	xliv
ABSTRACT.....	xlix

## CAPÍTULO I

1 – INTRODUÇÃO.....	55
1.1 - Ações cardiovasculares de peçonhas ofídicas.....	57
1.2 - O envenenamento botrópico.....	59
1.2.1 - Principais mediadores da ação cardiovascular de peçonhas botrópicas.....	62
Peptídeos.....	62
Fosfolipase A <sub>2</sub> .....	63
Proteinases.....	65
1.3 – <i>B. alternatus</i> .....	67
2 – OBJETIVOS.....	69
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3.1 – Animais.....	75
3.2 – Peçonha.....	75
3.3 – Experimentos em cães.....	75
3.3.1 – Procedimentos experimentais gerais.....	75
3.3.1.1 – Técnica cirúrgica.....	75
3.3.1.2 – Registro dos parâmetros hemodinâmicos.....	77
3.3.1.3 – Administração da peçonha de <i>B. alternatus</i> .....	78
3.3.1.4 - Eletrocardiografia.....	79
3.3.1.5 – Avaliação dos gases sanguíneos e do pH, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , hema- tócrito e lactato.....	80

3.3.1.6 – Alterações metabólicas.....	80
3.3.1.7 – ELISA para a detecção da peçonha circulante.....	80
3.3.1.8 – Histologia.....	81
3.3.1.9 – Análise estatística.....	81
<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 – Efeitos cardiovasculares da peçonha de <i>B. alternatus in vivo</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2 – Efeitos gasométricos e metabólicos da peçonha de <i>B. alternatus in vivo</i>..</b>	<b>96</b>
<b>4.3 – Eletrocardiografia de cães injetados com peçonha de <i>B. alternatus</i>.....</b>	<b>99</b>
<b>4.4 – Histologia dos tecidos cardíaco (ventrículo esquerdo) e renal de cães     tratados com peçonha de <i>B. alternatus</i>.....</b>	<b>101</b>
<b>4.5 – Cinética da peçonha de <i>B. alternatus</i>.....</b>	<b>102</b>
<b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>

## CAPÍTULO II

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>1.1 – Ações cardíacas diretas de peçonhas ofídicas.....</b>	<b>121</b>
<b>1.2 – Componentes de peçonhas ofídicas com atuação direta em tecido     cardíaco.....</b>	<b>122</b>
<b>1.3 – Mecanismo de ação cardiotóxica de peçonhas ofídicas.....</b>	<b>122</b>
<b>1.4 – Papel de autacóides na ação cardíaca peçonhas.....</b>	<b>124</b>
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>127</b>
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>131</b>
<b>3.1 – Animais.....</b>	<b>133</b>
<b>3.2 – Peçonha.....</b>	<b>133</b>
<b>3.3 – Experimento em ratos.....</b>	<b>133</b>
3.3.1 - Átrio direito isolado incubado com peçonha de <i>B. alternatus</i> .....	133
3.3.2 – Peçonha dialisada e não dialisada.....	134
3.3.3 – Peçonha aquecida.....	135
3.3.4 – Alterações metabólicas.....	135
3.3.5 – Histologia.....	135

3.3.6 – Incubação de átrios com antagonistas e peçonha .....	136
<b>4 – RESULTADOS</b> .....	137
<b>4.1 – Efeitos da peçonha de <i>B. alternatus</i> sobre átrio direito isolado de rato...</b>	139
<b>4.2 – Liberação de enzimas pela peçonha de <i>B. alternatus</i> .....</b>	139
<b>4.3 – Análise histológica de átrio incubado com peçonha de <i>B. alternatus</i>.....</b>	142
<b>4.4 – Efeito de diferentes antagonistas sobre as alterações causadas pela peçonha de <i>B. alternatus</i> em átrio direito isolado de ratos.....</b>	144
<b>5 - DISCUSSÃO</b> .....	147
<b>6 - CONCLUSÕES</b> .....	153
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	157
<b>ANEXO</b> .....	187

## ***LISTA DE DROGAS***

## ***DROGAS***

DROGAS	PROCEDÊNCIA
Acetilcolina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Ácido ascórbico	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Adrenalina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Atenolol	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Atropina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Bradicinina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Cimetidina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Heparina	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brasil)
Histamina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Indometacina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Isoflurano	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brasil)
L-NAME	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Pirilamina	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
PLA <sub>2</sub>	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Propranolol	SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
Soro fisiológico	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brasil)
Tiopental sódico	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brasil)
Peçonha <i>B. alternatus</i>	CETA (Morungaba, SP, Brasil)

## ***LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS***

## SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPc - monofosfato de adenosina cíclica

ANOVA - análise de variância

ASC - área de superfície corporal

ATP – Adenosina trifosfato

bpm - batimentos por minuto

BPPs - peptídeos potencializadores de bradicinina

CK - creatinoquinase

CK-MB - creatinoquinase, isoforma cardíaca

CNPs - peptídeo natriurético do tipo C

DC - débito cardíaco

ECA - enzima conversora de angiotensina

ECG - eletrocardiograma

EPM - erro padrão da média

FC - frequência cardíaca

FR - frequência respiratória

GMPc - monofosfato de guanosina cíclica

Hct - hematócrito

HE - hematoxilina-eosina

IC - índice cardíaco

IL-1 - interleucina-1

IL-6 - interleucina 6

IL-8 - interleucina 8

i.m. - intramuscular

IMC - índice de massa corporal

IRA - insuficiência renal aguda

IRVP - índice de resistência vascular pulmonar

IRVS - índice de resistência vascular sistêmica

IS - índice sistólico

ITSVD - índice de trabalho do ventrículo direito

ITSVE - índice de trabalho do ventrículo esquerdo

i.v. - intravascular

LDH - lactato desidrogenase  
NO - óxido nítrico  
PA - pressão arterial  
PAD - pressão arterial diastólica  
PADM - pressão do átrio direito média  
PAM - pressão arterial média  
PAPM - pressão arterial pulmonar média  
PAS - pressão arterial sistólica  
PCPM - pressão de capilar pulmonar média  
PDE - fosfodiesterase  
PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub> - prostaciclina I<sub>2</sub>  
PLA<sub>1</sub> - fosfolipase A<sub>1</sub>  
PLA<sub>2</sub> - Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PP - Pressão de pulso  
PPC - pressão de perfusão coronariana  
rpm - rotações por minuto  
RVP - resistência vascular pulmonar  
RVS - resistência vascular sistêmica  
SBCe - deficiência de base  
SBEc - excesso de base  
SRD - sem raça definida  
SVMPs - metaloproteinase de peçonha de cobra  
TCD - túbulo contornado distal  
TCP - túbulo contornado proximal  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral- $\alpha$   
TSVD - trabalho sistólico do ventrículo direito  
TSVE - trabalho sistólico do ventrículo esquerdo  
U - unidade  
UI - unidade internacional  
UV - ultravioleta  
VS - volume sistólico

## ***LISTA DE FIGURAS***

## CAPÍTULO I

<b>FIGURA 1</b> - Alguns componentes e efeitos das peçonhas botrópicas.....	60
<b>FIGURA 2</b> - Mecanismo de ação e principais atividades das PL A <sub>2</sub> e ofídicas.....	64
<b>FIGURA 3</b> - Efeitos cardiovasculares tardios das peçonhas botrópicas.....	66
<b>FIGURA 4</b> - <i>Bothrops alternatus</i> (urutu), mostrando a distribuição geográfica desta serpente no Brasil.....	67
<b>FIGURA 5</b> - Posição do cateter de Swan-Ganz na entrada da artéria pulmonar.....	76
<b>FIGURA 6</b> - Curva do débito cardíaco.....	76
<b>FIGURA 7</b> - Diagrama esquemático do protocolo <i>in vivo</i> .....	77
<b>FIGURA 8</b> - Traçado eletrocardiográfico mostrando os dados do ECG.....	79
<b>FIGURA 9</b> - Registro fisiográfico da pressão arterial em cães anestesiados.....	87
<b>FIGURA 10</b> - Ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> e salina (controle) sobre a pressão arterial sistêmica e a pressão de perfusão coronariana.....	90
<b>FIGURA 11</b> - Ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> e salina (controle) sobre a frequência cardíaca, o débito cardíaco e o índice cardíaco.....	91
<b>FIGURA 12</b> - Ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> e salina (controle) sobre a resistência vascular sistêmica e o índice de resistência vascular sistêmica.....	92
<b>FIGURA 13</b> - Ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> e salina (controle) sobre a pressão arterial pulmonar média, pressão capilar pulmonar média e pressão atrial direita média. A resistência vascular pulmonar e o índice de resistência vascular pulmonar....	93
<b>FIGURA 14</b> - Ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> e salina (controle) sobre o trabalho e índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo e direito.....	94
<b>FIGURA 15</b> - Ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> e salina (controle) sobre o volume	

sistólico e índice sistólico.....	95
<b>FIGURA 16</b> - Efeito da peçonha de <i>B. alternatus</i> e de salina (controle) sobre a atividade enzimática da LDH, CK, lactato e glicose.....	98
<b>FIGURA 17</b> - Análise histopatológica de tecido renal e ventricular esquerdo (grupo controle e grupo tratado, respectivamente) com peçonha de <i>B. alternatus</i> .....	102
<b>FIGURA 18</b> - Cinética da peçonha de <i>B. alternatus</i> (0,3 mg/kg), após administração i.v (bolus) em plasma de cães anestesiados.....	103

## CAPÍTULO II

<b>FIGURA 1</b> - Esquema dos protocolos, realizados com átrio isolado de rato.....	134
<b>FIGURA 2</b> - Ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> e solução de Krebs (controle) sobre a frequência atrial, a força contrátil, e sobre a atividade de CK e CK-MB.....	140
<b>FIGURA 3</b> - Efeito da peçonha sob diálise, sem diálise e aquecida, ambas na dose de 1,0 mg/ml, sobre a frequência e a força contrátil. Atividade de CK e CK-MB após a incubação de átrio direito isolado de rato com a peçonha de <i>B. alternatus</i> .....	141
<b>FIGURA 4</b> - Lesão tecidual em átrio direito de rato incubado com peçonha de <i>B. alternatus</i> durante 60 min.....	143
<b>FIGURA 5</b> - Ausência do efeito da indometacina sobre a ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> em átrio direito isolado de rato.....	145
<b>FIGURA 6</b> - Efeito do L-NAME na ação da peçonha de <i>B. alternatus</i> em átrio direito isolado de rato.....	146

## ***LISTA DE TABELAS***

<b>Tabela 1.</b> Valores basais dos parâmetros hemodinâmicos diretos.....	88
<b>Tabela 2.</b> Valores basais dos parâmetros hemodinâmicos indiretos.....	89
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros gasométricos, pH, íons e hematócrito.....	97
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros eletrocardiográficos em cães anestesiados.....	100

## ***RESUMO***

## RESUMO

As peçonhas do gênero *bothrops* causam hipotensão, no entanto as alterações cardíacas e hemodinâmicas, associadas com este fenômeno não têm sido bem investigadas. Neste estudo, analisamos as alterações cardiovasculares causadas pela peçonha de *Bothrops alternatus* (urutu) em cães e, avaliamos a cardiotoxicidade desta peçonha em átrio direito isolado de rato. Em cães anestesiados com isoflurano, a peçonha (0,3 mg/kg, i.iv.) causou hipotensão imediata atingindo o ápice aos 5 minutos, seguida por uma lenta recuperação para níveis não significativamente diferentes do basal após 2h. Não foi observada recuperação no grupo tratado com a dose de 1,0 mg/kg. A hipotensão foi acompanhada por uma queda abrupta do débito cardíaco, dos trabalhos tanto do ventrículo direito quanto do esquerdo, bem como do volume e índice sistólico, os quais permaneceram reduzidos até o final do experimento. Não ocorreu alteração significativa na frequência cardíaca, no ECG, nos valores pressóricos pulmonares, nos níveis dos gases sanguíneos ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $HCO_3$ ,  $SBC_e$  e  $SBE_c$ ), e nem nos parâmetros metabólicos (pH, lactato, glicose e creatinoquinase), porém, foi observado um aumento significativo nos níveis de lactato desidrogenase logo no início do envenenamento. Nenhuma alteração histológica no tecido cardíaco foi observada, no entanto, observou-se microaneurismas e alguma descamação epitelial nos túbulos renais. Houve uma diminuição rápida da peçonha circulante, após a administração i.v., que ainda foi detectada aos 240 minutos. A peçonha de *B. alternatus* (0,5; 1,0 e 2,0 mg/ml) não alterou a frequência atrial, mas reduziu significativamente a força contrátil (redução máxima de ~76%) e aumentou acentuadamente a liberação de creatinoquinase (CK) e creatinoquinase – MB (CK-MB). A análise histopatológica mostrou extensa mionecrose dos cardiomiócitos. A peçonha dialisada (1,0 mg/ml, membrana de 2000 Da) contra NaCl 0,9 % (24h a 4 °C) não alterou a redução progressiva na força contrátil, enquanto que o aquecimento (100 °C, 20 min) aboliu esta redução; A liberação de CK e CK-MB não foi alterada pela diálise e pelo aquecimento. A atropina, o atenolol e propranolol, a cimetidina ou a indometacina não alteraram a força contrátil atrial, no entanto o L-NAME – inibidor da NOS, atenuou a redução na contratilidade, sugerindo um possível envolvimento do NO na resposta induzida pela peçonha. Estes resultados mostram que em cães, a peçonha de *B. alternatus* produziu acentuadas alterações cardiovasculares, envolvendo uma ação cardíaca direta, com

poucas alterações metabólicas. A peçonha é também tóxica para átrio isolado de rato, provavelmente em função dos efeitos proteolíticos e/ou de PLA<sub>2</sub>.

***ABSTRACT***

## ABSTRACT

*Bothrops* snake venoms cause hypotension, but the hemodynamic and cardiac alterations associated with this phenomenon have not been extensively investigated. In this study, we examined the cardiovascular changes caused by *Bothrops alternatus* (urutu) venom in anesthetized dogs and examined the cardiotoxicity of the venom in rat isolated rat atria. In isoflurane-anesthetized dogs, venom (0.3 mg/kg, i.v.) caused immediate hypotension that was maximal within 5 min followed by a slow recovery to levels not significantly different from pre-venom values after 2 h; no recovery was seen with a venom dose of 1 mg/kg. The hypotension was accompanied by an abrupt decrease in cardiac output, left and right ventricular systolic work, and systolic indices and volume that persisted without recovery until the end of the experiment. There were no significant changes in heart rate, ECG, pulmonary hemodynamics, blood gas levels ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $HCO_3$ ,  $SBC_e$  and  $SBE_c$ ) and metabolic parameters (blood pH, lactate, glucose and creatine kinase); however, a slight, significant increase in lactate dehydrogenase was seen soon after venom. There were no histological alterations in cardiac tissue, but microaneurysms and epithelial desquamation were seen in renal tubules. Circulating venom decreased rapidly after i.v. administration, but was still detectable after 240 min. Venom (0.5, 1.0 and 2.0 mg/ml) did not affect the beating rate of rat isolated right atria but significantly reduced the contractile force (maximal reduction of ~76%) and markedly increased the release of creatine kinase (CK) and CK-MB. Histological analysis revealed extensive myonecrosis. Venom dialysis (1.0 mg/ml; membrane nominal MW cut-off = 2000 Da) against 0.9% NaCl (24 h, 4°C) did not affect the decrease in contractile force whereas heating (100°C, 20 min) abolished the venom-induced reduction; CK and CK-MB release was also unaltered by dialysis but attenuated by heating. The decrease in atrial contractility was unaffected by atropine, atenolol, propranolol, cimetidine or indomethacin, but was attenuated by L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, indicating a possible role for nitric oxide in the venom-induced response. These results show that in dogs *B. alternatus* produces marked cardiovascular alterations involving a direct cardiac action, with little role for metabolic changes. The venom is also toxic to rat atria, probably as a result of venom proteolytic and/or phospholipase  $A_2$  activity.

# CAPÍTULO I

## ***INTRODUÇÃO***

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Ações cardiovasculares de peçonhas ofídicas

As peçonhas ofídicas contêm uma variedade de enzimas, peptídeos e compostos não enzimáticos com diferentes atividades biológicas. Essa diversidade na composição explica a grande variedade de efeitos cardiovasculares produzidos por essas peçonhas, tais como coagulopatias, hemorragia, hipotensão, choque e insuficiência renal aguda (IRA).

Quando injetadas por via endovenosa em mamíferos, as peçonhas ofídicas geralmente causam hipotensão, que consiste numa acentuada queda da pressão arterial em 15 a 60 segundos, chegando ao máximo em aproximadamente 5 min, seguido por um período de recuperação parcial (dependendo da dose de peçonha), e então de uma rápida ou gradual queda da pressão, terminando em morte (Lee e Lee, 1979; Rothschild e Rothschild, 1979). Esse fenômeno é comum às peçonhas das mais variadas espécies, tais como a *Bitis arietans* (Osman e Gumaa, 1974; Schaeffer *et al.*, 1985), *Bitis gabonica* (Zaki *et al.*, 1976; Hyslop e Marsh, 1991), *Bothrops erythromelas* (Zapellini, 1991), *Bothrops moojeni* (Andrade, 1996), *Cerastes cerastes* (Abdalla *et al.*, 1992), *Crotalus atrox* (Russell *et al.*, 1962; Halmagyi *et al.*, 1965; Mesquita *et al.*, 1991), *Crotalus horridus* (Witham *et al.*, 1953), *Crotalus viridis helleri* (Carlson *et al.*, 1975; Schaeffer *et al.*, 1979, 1984), *Lachesis muta* (Granados-Zuniga e Aragón-Ortiz, 1998), *Notechis scutatus scutatus* (Francis *et al.*, 1993; Tibballs, 1998a), *Pseudonaja* spp. (Tibballs *et al.*, 1989), *Trimeresurus flavoviridis* (Kinjo *et al.*, 1990) e *Viper lebetina* (Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004). Com algumas peçonhas, como a da cascavel sulamericana *Crotalus durissus terrificus*, a queda inicial na pressão arterial é seguida por uma hipertensão transitória (choque trifásico) (Vital Brazil *et al.*, 1966).

A hipotensão e o choque profundo causados por peçonhas de serpentes são devidos, em grande parte, à liberação de substâncias vasoativas que atuam, principalmente, sobre a vasculatura (Mebs, 1978; Lee e Lee, 1979; Rothschild e Rothschild, 1979; Hawgood, 1982; Aird, 2002), embora em alguns casos uma ação cardíaca direta (Kempsford e Hawgood, 1987; Santos *et al.*, 1990; Alloatti *et al.*, 1991; Tibballs *et al.*, 1989, 1991; Abdalla *et al.*, 1992; Alzahaby *et al.*, 1995; van Aswegen *et*

*al.*, 1996; al-Shammary *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2001) possa contribuir para os efeitos observados. Ainda, em outros casos, a hipotensão pode ter uma origem central (Telang *et al.*, 1976; Raina *et al.*, 1977a,b), pode ser devido à trombose pulmonar e à isquemia miocárdica (Tibballs, 1998a,b; Tibballs *et al.*, 1989, 1991) ou pode ser causada por bloqueio neuromuscular e paralisia respiratória em decorrência da presença de neurotoxinas (Mebs, 1978; Karlsson, 1979; Ogay *et al.*, 2005).

As alterações hemodinâmicas que contribuem para esta hipotensão variam entre peçonhas, podendo envolver uma queda na resistência periférica (mesentérica e ilíaca) e pulmonar, no débito cardíaco e no volume sistólico, com ou sem alteração na frequência cardíaca e no eletrocardiograma. Há, frequentemente, acúmulo de sangue em leitos vasculares como o mesentérico devido à vasodilatação extensa (Witham *et al.*, 1953; Russell *et al.*, 1962; Halmagyi *et al.*, 1965; Adams *et al.*, 1981; Cevese *et al.*, 1983; Tibballs *et al.*, 1989). Esses efeitos podem ser exacerbados por acidose metabólica (pH<7,3 e níveis de ácido láctico aumentados) e por hipoventilação (Carlson *et al.*, 1975; Schaeffer *et al.*, 1985).

Na circulação, o endotélio e o músculo liso vascular representam alvos importantes para a atuação de peçonhas. De fato, vários estudos já mostraram que as peçonhas exercem efeitos adversos sobre essas células, especialmente as endoteliais, levando à liberação de mediadores endógenos (vasoconstritores, vasodilatadores, moléculas pró-inflamatórias, etc.) (Lomonte *et al.*, 1994a,b,c; Moreira *et al.*, 1992, 1994; Borkow *et al.*, 1995; Lomonte *et al.*, 1999; Thamaree *et al.*, 2001; Kawano *et al.*, 2002; Cominetti *et al.*, 2004).

Há ampla evidência na literatura mostrando o uso de uma combinação de abordagens, técnicas e preparações *in vivo* e *in vitro* para entender os mecanismos cardiovasculares e as ações cardíacas de diversas peçonhas, sendo que nem sempre as preparações usadas para determinada peçonha envolveram a mesma espécie experimental.

Assim, por exemplo, os efeitos hemodinâmicos e cardiovasculares das peçonhas e das toxinas de várias espécies de cascavéis (*Crotalus* spp.) têm sido investigados em cães (Vick *et al.*, 1967; Bonilla e Rammel, 1976; Ruiz *et al.*, 1980; Schaeffer *et al.*, 1984;

de Souza-e-Silva *et al.*, 2003), carneiros (Margolis *et al.*, 1965; Halmagyi *et al.*, 1967), coelhos (Breithaupt, 1976), gatos (Russell *et al.*, 1967; Bonilla e Rammel, 1976) e ratos (Carlson *et al.*, 1975; Breithaupt, 1976; Schaeffer *et al.*, 1979; Mesquita *et al.*, 1991) enquanto a análise dos efeitos cardíacos diretos tem sido realizada usando tecidos e células de ratos e cobaias (Kempsford e Hawgood, 1987; Hamilton *et al.*, 1985; Santos *et al.*, 1992). Outro exemplo é a peçonha da víbora africana, *Bitis gabonica*, cujos efeitos cardiovasculares *in vivo* têm sido estudados em macacos (Whaler, 1975), cães (Adams *et al.*, 1981; Cevese *et al.*, 1983), coelhos (Cevese *et al.*, 1984; Hyslop e Marsh, 1991), e ratos (Zaki *et al.*, 1976; Gatullo *et al.*, 1986, 1991), mas com os efeitos cardíacos diretos tendo sido investigados em preparações isoladas de cobaias (Alloatti *et al.*, 1986; Busso *et al.*, 1988).

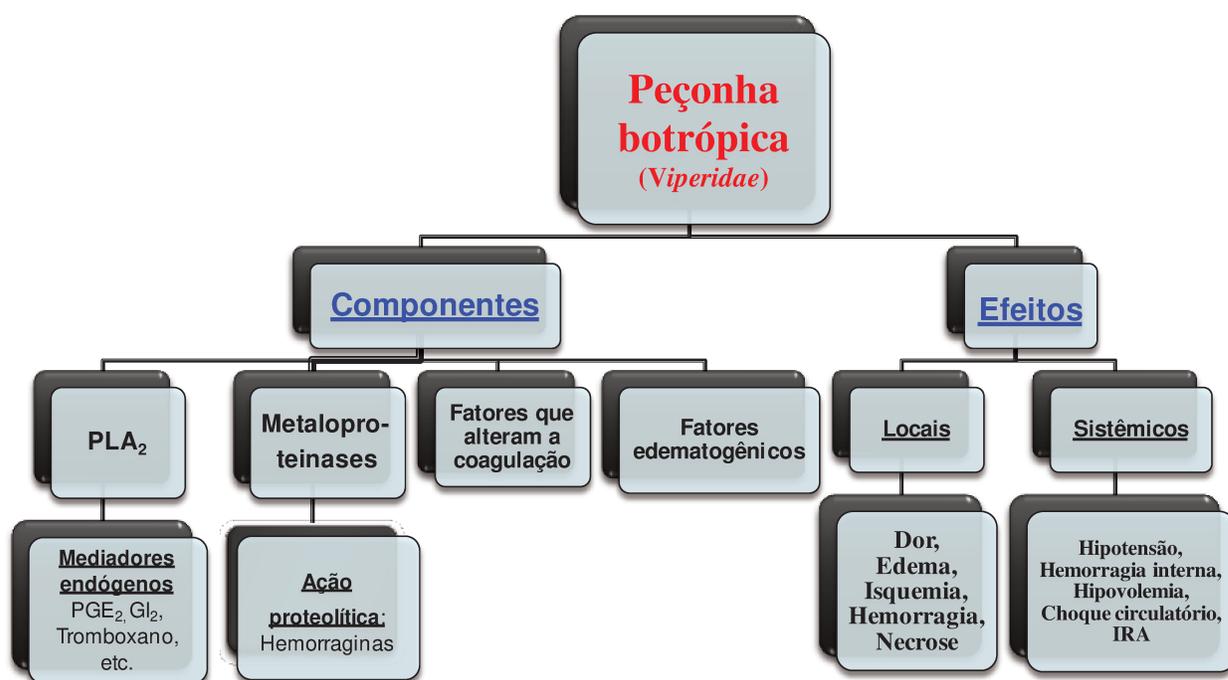
A injeção intramuscular da peçonha de *Bothrops asper* (Chaves *et al.*, 1989) e *B. alternatus* (Acosta de Pérez *et al.*, 1996) em camundongos causa pouca ou nenhuma alteração histológica em tecido cardíaco, ao contrário do que foi visto nos rins. De modo semelhante, a injeção de uma metaloproteinase hemorrágica (BaP1) (Escalante *et al.*, 2004) de *B. asper* também não causou dano histológico no coração.

## 1.2. O envenenamento botrópico

As serpentes peçonhentas do Brasil pertencem aos gêneros *Bothrops* (jararacas) *Crotalus* (cascavéis), *Lachesis* (surucucus) e *Micrurus* (corais), e são responsáveis por mais de 20.000 acidentes notificados anualmente ao Ministério da Saúde. A maioria dos acidentes é causada por serpentes do gênero *Bothrops* (90%), seguido pelo gênero *Crotalus* (~8%) e os demais gêneros (~2%) (Araújo *et al.*, 2003).

Os efeitos do envenenamento botrópico podem ser divididos em dois tipos principais: os locais e os sistêmicos. As ações locais incluem dor, edema (com formação de bolhas contendo líquido seroso), hemorragia e necrose, enquanto que as ações sistêmicas consistem principalmente em distúrbios de coagulação, hemorragia interna (leva à hipovolemia e choque) e IRA, com raras manifestações neurológicas (Rosenfeld, 1971; Watt, 1989; Jorge e Ribeiro, 1990; Fan e Cardoso, 1995; Ribeiro e Jorge, 1997; Russell *et al.*, 1997; França e Málaque, 2003).

Tanto os efeitos locais como os sistêmicos resultam da ação concomitante de fosfolipases A<sub>2</sub> (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003; Warrell, 2004), metaloproteases (Kamiguti *et al.*, 1998; Gutiérrez e Rucavado, 2000; Fox and Serrano, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005) e outras enzimas hidrolíticas presentes nessas peçonhas, as quais liberam uma variedade de mediadores endógenos (peptídeos como a bradicinina, aminas biogênicas como a histamina e serotonina, e metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (Rothschild e Rothschild, 1979; Hawgood, 1982) (Fig. 1)



**Figura 1** – Alguns componentes e efeitos das peçonhas botrópicas

No caso das peçonhas botrópicas, várias metaloproteínases hemorrágicas já foram isoladas e caracterizadas (Maruyama *et al.*, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1995; Gutiérrez e Rucavado, 2000; Mazzi *et al.*, 2004; Schattner *et al.*, 2005), inclusive de *B. alternatus* (Cominetti *et al.*, 2003; Gay *et al.*, 2005, 2009), sendo que a ação dessas enzimas sobre os componentes da matriz extracelular (Maruyama *et al.*, 1992; Moreira

*et al.*, 1994) e os vasos da microcirculação (Gutiérrez *et al.*, 1995; Kamiguti *et al.*, 1996, 1998) contribui para a hemorragia sistêmica (Kamiguti *et al.*, 1991, 1996).

Várias dessas metaloproteinases induzem hemorragia local, sem, porém, produzir hemorragia sistêmica, provavelmente devido à sua inativação por inibidores plasmáticos, tais como  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -macroglobulinas (Anai *et al.*, 1998; Kawano *et al.*, 2002; Escalante *et al.*, 2004), sendo uma exceção importante a esta observação a jararagina (Kamiguti *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 2003; Laing e Moura-da-Silva, 2005). Por outro lado, algumas metaloproteinases, como a neuwiedase de *B. neuwiedi* (Rodrigues *et al.*, 2000, 2001) não produzem hemorragia local mas podem causar hemorragia sistêmica.

A ação proteolítica, especialmente, por meio das metaloproteinases, é a principal responsável pelo rompimento da integridade das paredes vasculares, levando frequentemente à hemorragia local e sistêmica (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez e Lomonte, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2005). A ação proteolítica também é responsável pelos distúrbios de coagulação por intermédio de enzimas fibrino(geno)líticas, enzimas tipo-trombina e ativadoras de diversos fatores de coagulação, especialmente a protrombina e o fator X (Rosing e Tan, 1992; Fan e Cardoso, 1995; Yamada *et al.*, 1997; França e Málaque, 2003). A ação fosfolipásica parece estar associada mais à formação de edema (Gutiérrez e Lomonte, 2003; Lomonte *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003), em conjunto com as hemorragias.

Os efeitos sistêmicos dependem da severidade do acidente, sendo mais comuns em acidentes moderados e graves. Nesses casos, além dos distúrbios de coagulação, podem ocorrer hipotensão e choque devido às substâncias vasoativas liberadas ou ativadas pela peçonha, e também como consequência da hipovolemia resultante de hemorragia interna extensa. A IRA, evidenciada pela oligúria e anúria (entre outras manifestações), geralmente aparece horas após o envenenamento, sendo a causa mais frequente de morte. Nos casos graves de envenenamento, e concomitantes às manifestações descritas acima, podem ocorrer também vômitos, sudorese e hipotermia, entre outros efeitos (Rosenfeld, 1971; Jorge e Ribeiro, 1990; Fan e Cardoso, 1995; Ribeiro e Jorge, 1997; França e Málaque, 2003; Warrell, 2004).

Ao contrário das respostas imediatas, as principais ações de peçonhas que contribuem para as respostas hemodinâmicas tardias (horas a dias após o envenenamento) são distúrbios de coagulação (principalmente sangue incoagulável) (Kamiguti e Sano-Martins, 1995), hipovolemia decorrente de hemorragia sistêmica devido à ação de metaloproteinases (hemorraginas) (Kamiguti *et al.*, 1991; Bjarnason e Fox, 1994; Gutiérrez e Rucavado, 2000), levando ao choque hipovolêmico e à IRA, devido principalmente, à ação proteolítica das peçonhas (Lee e Lee, 1979; Rothschild e Rothschild, 1979). A presença de sangue incoagulável contribui para o choque hipovolêmico, por facilitar o extravasamento de sangue através das lesões causadas pela ação das hemorraginas.

### **1.2.1 - Principais mediadores da ação cardiovascular de peçonhas botrópicas**

#### *Peptídeos*

Os principais mediadores da hipotensão causada por peçonhas botrópicas incluem peptídeos e enzimas (proteases e PLA<sub>2</sub>). Entre os peptídeos, os mais relevantes são peptídeos natriuréticos atriais (CNPs) (Murayama *et al.*, 1997, 2000; Higuchi *et al.*, 1999; Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2002), que ativam os receptores contendo guanilato ciclase particulada, levando à formação de GMPc, e peptídeos potencializadores da bradicinina (BPPs) (Ferreira, 1965; Ferreira *et al.*, 1970, 1992; Bieber, 1979; Giglio, 1988; Cintra *et al.*, 1990; Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2002). Estudos da glândula venenífera de *B. jararaca* e de outras espécies mostraram que os genes para os BPPs estão intimamente associados aos dos CNPs, de modo que pode haver coexpressão desses dois grupos de peptídeos (Murayama *et al.*, 1997; Higuchi *et al.*, 1999; Cidade *et al.*, 2006). Essa organização sugere a existência de mecanismos distintos, mas somatórios na produção da hipotensão.

A ação principal dos BPPs é a inibição da enzima cininase II (enzima conversora de angiotensina ou ECA), responsável tanto pela formação de angiotensina II (vasoconstritor) a partir de angiotensina I, como pela degradação de bradicinina (vasodilatador) (Ferreira e Rocha e Silva, 1965; Green *et al.*, 1972), potencializando, assim, a hipotensão causada pela bradicinina liberada através da atividade de enzimas do tipo calicreína da peçonha (ver abaixo). Localmente, os BPPs acentuam o edema

local produzido por cininas (Fernandes *et al.*, 1991). Uma função adicional desses peptídeos é a inibição de metaloproteases de peçonha durante a estocagem na glândula venenífera (Robeva *et al.*, 1991; Francis e Kaiser, 1993; Huang *et al.*, 2002).

Rocha e Silva *et al.* (1949) foram os primeiros a mostrar que a atividade proteolítica da peçonha de *B. jararaca* é capaz de liberar a bradicinina de bradicininogênio circulante, através de uma atividade cininogenásica (tipo calicreína) (Gapanhuk e Henriques, 1970). Posterior ao estudo do Rocha e Silva *et al.* (1949), a capacidade de liberar bradicinina foi relatada para outras peçonhas (Rothschild e Rothschild, 1979), sendo que várias enzimas responsáveis por essa atividade já foram caracterizadas (ver Komori e Nikai, 1998; Nikai e Komori, 1998; Aird, 2002). No caso de peçonhas botrópicas, algumas dessas enzimas foram clonadas (Zaganelli *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1998). Essas proteínas, com massa molecular em torno de 30 kDa, são serina esterases cuja atividade pode ser inibida por PMSF.

A bradicinina liberada, por essas enzimas, em peçonhas botrópicas é um mediador importante da hipotensão imediata observada após o envenenamento (Rothschild e Rothschild, 1979), e poderia contribuir para a vasodilatação coronária (Antonio e Rocha e Silva, 1962). A atuação da bradicinina pode ser potencializada pelos BPPs presentes nessas peçonhas (ver acima).

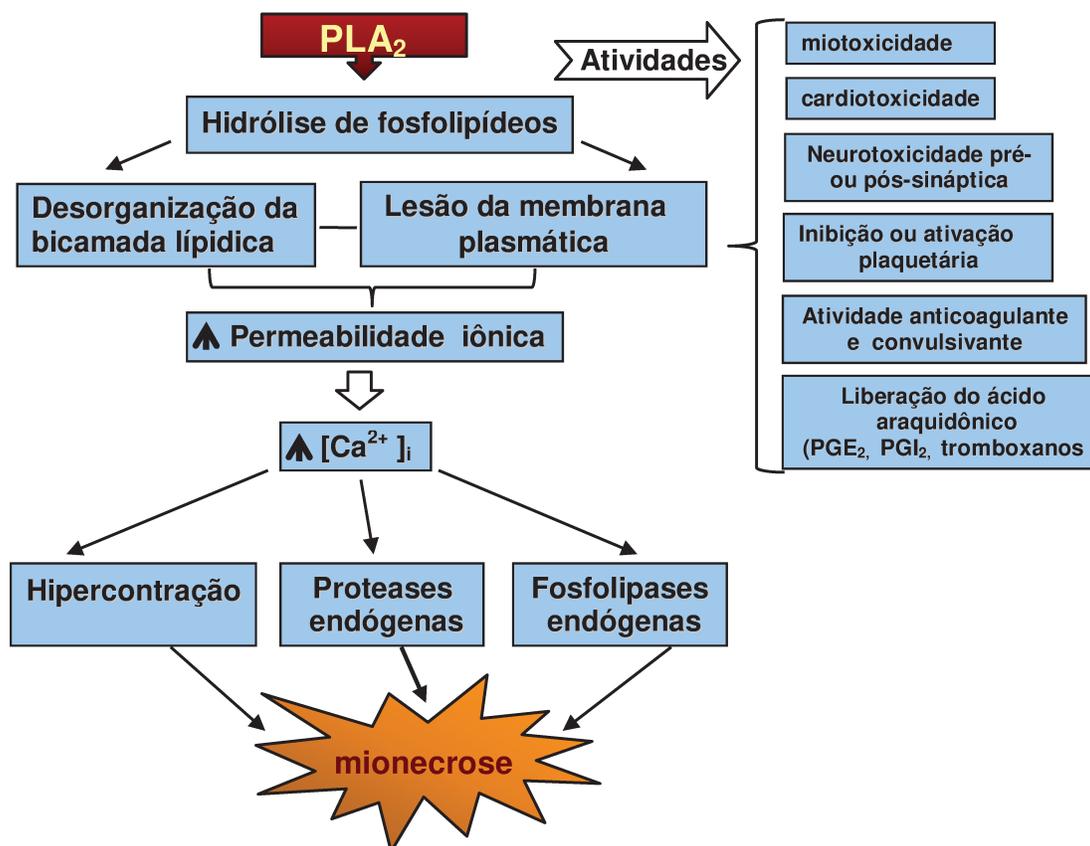
Algumas esterases são capazes de contrair músculo liso não vascular (ensaio *in vitro* usado para avaliar a formação de cininas) sem a liberação de cininas (Andrião-Escarso *et al.*, 1999). Semelhantemente, a trombocitina da peçonha de *B. atrox*, mas não a batroxobina (Glusa *et al.*, 1991), é capaz de relaxar vasos por um mecanismo dependente do endotélio, porém independente da formação de bradicinina. Esse efeito aparentemente envolve a formação de NO de maneira semelhante à trombina (Glusa *et al.*, 1996).

### *Fosfolipases A<sub>2</sub>*

A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) é uma enzima ubíqua em peçonhas ofídicas, exercendo importante contribuição na toxicidade e nos efeitos patológicos das mesmas, inclusive na miotoxicidade, cardiotoxicidade, hipotensão, e ação sobre o músculo liso não

vascular (Rosenberg, 1979, 1986; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Gutiérrez e Lomonte, 2003; Gutiérrez e Ownby, 2003; Harris, 2003; Lomonte *et al.*, 2003). A PLA<sub>2</sub> libera o ácido araquidônico de fosfolípidos da membrana celular, o qual, por sua vez, é convertido em prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub>.

As PLA<sub>2</sub>s de peçonhas ofídicas são bastante conhecidas por sua atividade sobre membranas celulares e por sua capacidade de causar dano celular (Fig. 2) (Rosenberg, 1986), especialmente em músculo esquelético (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Gutiérrez e Ownby, 2003; Harris, 2003; Lomonte *et al.*, 2003). Essas enzimas, especialmente as de peçonhas elapídicas, são bastante cardiotoxícas (Harvey, 1985; Rosenberg, 1986; Fletcher e Jiang, 1993). Essas toxinas causam uma perturbação inicial da membrana levando a um aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular e à degeneração da célula (Montecucco *et al.*, 2008).



**Figura 2** – Mecanismos de ação e principais atividades das PLA<sub>2</sub> ofídicas (modificado do Montecucco *et al.*, 2008).

Embora boa parte dessa cardiotoxicidade seja devido a ações celulares que não estejam associadas à miotoxicidade, há uma relação entre a presença de lesões e às alterações funcionais vistas em músculo incubado com algumas dessas enzimas elapídicas (Rosenberg, 1986; Fletcher e Jiang, 1993; Huang e Gopalakrishnakone, 1996).

As prostaglandinas, como a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), possuem ação vasodilatadora/hipotensora própria (Huang, 1984) pela da ativação da adenilato ciclase (via receptores acoplados as proteínas Gs) que leva à formação de AMPc. A formação de prostaglandinas, especialmente a PGI<sub>2</sub>, pelo endotélio, também pode ocorrer como resposta à estimulação por bradicinina pela ativação de PLA<sub>2</sub> intracelular (Hyslop e de Nucci, 1991), contribuindo, assim, para a vasodilatação subsequente. Em concordância com essas observações, Andrião-Escarso *et al.* (2002) demonstraram que a PLA<sub>2</sub> ácida da peçonha de *B. jararacussu* causa hipotensão; essa enzima já foi clonada e sua estrutura cristalográfica determinada (Magro *et al.*, 2004; Roberto *et al.*, 2004).

### *Proteinases*

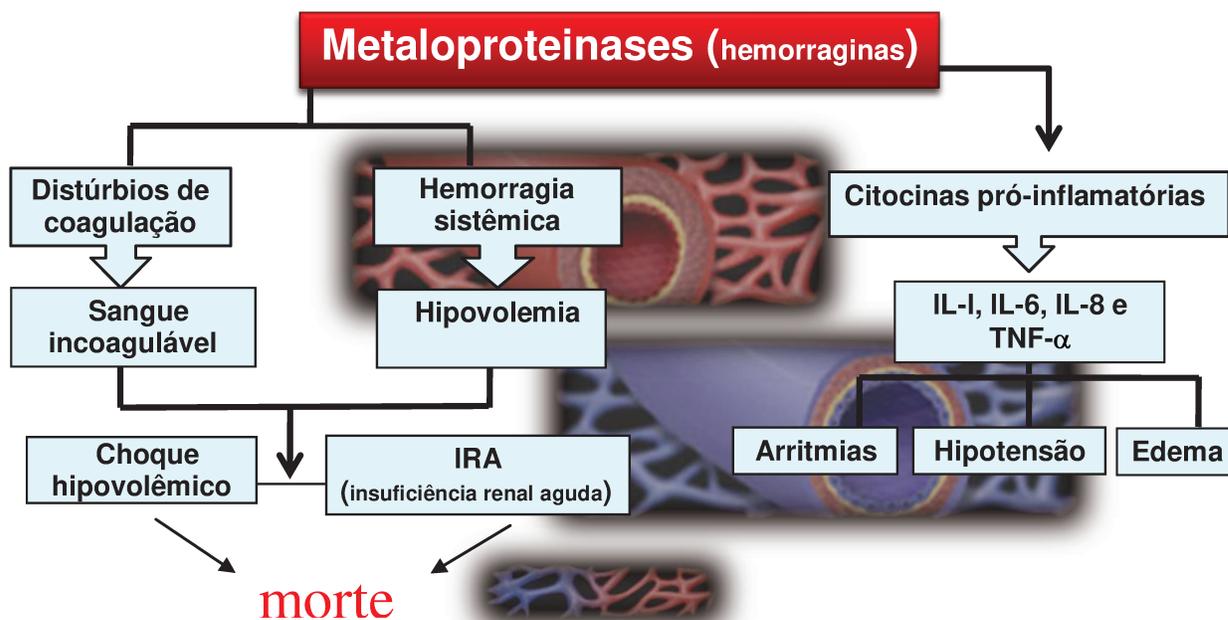
A contribuição do dano tecidual causado por proteinases presentes em algumas peçonhas tidas como “proteolíticas” (especialmente dos gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Trimeresurus* e *Vipera*) às alterações mecânicas (cronotropismo e inotropismo) e elétricas (arritmias, etc.) produzidas em tecido cardíaco tem sido pouco investigada. Alguns estudos mostraram que a injeção de peçonha ou toxina *in vivo* (Nikai *et al.*, 1984, 1985; Huang e Gopalakrishnakone, 1996; Anderson e Ownby, 1997; al-Shammary *et al.*, 1998) ou a perfusão de coração isolado com peçonha ou toxina purificada (Abel *et al.*, 1973; Unkovic-Cvetkovic *et al.*, 1983; Kempford e Hawgood, 1987; Santos *et al.*, 1992) resulta em dano morfológico cardíaco.

A ação de metaloproteinases hemorrágicas com potente efeito proteolítico sobre proteínas da matriz extracelular altera o equilíbrio hemostático por inibir a agregação plaquetária, levando a intensa hemorragia interna (Kamiguti *et al.*, 1996, 1998; Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005, 2009). De acordo com Gutiérrez *et*

*al.* (2009) as metaloproteínases ofídicas do tipo P-III podem causar disfunção endotelial quando distribuída sistemicamente pode induzir a disfunção endotelial sistemicamente, e dependendo da severidade dos efeitos pode causar hemorragias e consequências cardiovasculares complexas.

A hipovolemia causada pela ação conjunta de proteases sobre a cascata de coagulação e a parede dos vasos parece estar relacionada à liberaçáo de citocinas pró-inflamatórias de precursores endógenos pela ação de metaloproteínases das próprias peçonhas ou da ativação de proteases endógenas (Varonov *et al.*, 1999; Petricevich, 2004). Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , principalmente) têm sido detectados em animais experimentais e em humanos (IL-6, IL-8) envenenados por espécies de *Bothrops* (Lomonte *et al.*, 1993; Barraviera *et al.*, 1995; Petricevich *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 1998), e também em células inflamatórias *in vitro* (Clissa *et al.*, 2001) e *in vivo* (Zamunér *et al.*, 2001; Zamunér e Teixeira, 2002).

A ação proteolítica das peçonhas também leva à liberaçáo de citocinas, como TNF- $\alpha$  e interleucinas (Moura-da-Silva *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 2009). Essas citocinas podem contribuir para as alteraçóes hemodinâmicas e o choque cardiovascular (Gutiérrez *et al.*, 2009), conforme relatado para a peçonha de *Vipera berus* (Szold *et al.*, 2003) (Fig. 3).



**Figura 3** – Efeitos cardiovasculares tardios das peçonhas botrópicas.

Apesar de alguns estudos terem mostrado a capacidade de peçonhas botrópicas em causar hipotensão (Cheymol *et al.*, 1968; Campos e Delgado, 1981; Zapellini, 1991; Andrade, 1996; Pérez *et al.*, 1997a), e de terem identificados outros componentes destas peçonhas que podem contribuir para as alterações hemodinâmicas, tais como fosfolipases A<sub>2</sub> (Andrião-Escarso *et al.*, 2002), proteases cuja ação vascular independe da formação de bradicinina (Glusa *et al.*, 1991) e, possivelmente, peptídeos natriuréticos atriais (Murayama *et al.*, 1997), ainda não havia nenhum estudo sistemático das alterações hemodinâmicas e cardiovasculares causadas por essas peçonhas. Além disso, pouco se sabe dos mediadores endógenos, além da bradicinina, que possam estar envolvidos nessas respostas. Por esse motivo, nesse trabalho investigamos a ação cardiovascular da peçonha de *Bothrops alternatus* (urutu ou urutu cruzeiro).

### 1.3 - *Bothrops alternatus*

A *Bothrops alternatus* é encontrada no centro oeste, norte e nordeste da Argentina, no sul do Paraguai e nas regiões sul, sudeste e parte do centro oeste do Brasil (Fig. 4) (Campbell e Lamar, 1989). Trata-se de uma serpente com tamanho em torno de 1 m de comprimento, podendo atingir até 2 m. Por ter este porte elevado está caracterizada como uma das *Bothrops* brasileiras com rendimento máximo de peçonha acima de 200 mg (peso seco) por serpente (Rosenfeld, 1971, Furtado *et al.*, 1991; de Roodt *et al.*, 1998b).



**Figura 4.** *Bothrops alternatus* (urutu), mostrando a distribuição geográfica desta serpente no Brasil.

Em comum com outras espécies de *Bothrops*, a peçonha de *B. alternatus* contém uma variedade de proteínas e enzimas (Mebs, 1970; Nisenbom *et al.*, 1986a,b, 1988; Castro *et al.*, 1998; Smolka *et al.*, 1998; Tan e Ponnudurai, 1991; Gasparello-Clemente e Silveira, 2002; Valério *et al.*, 2002; Stabeli *et al.*, 2004), inclusive metaloproteinases/desintegrinas (Souza *et al.*, 2000; Mariano-Oliveira *et al.*, 2003; Cominetti *et al.*, 2003, 2004; Gay *et al.*, 2005) e miotoxinas (Ponce-Soto *et al.*, 2007) que podem contribuir para os efeitos sistêmicos do envenenamento. Consequentemente, a letalidade (Furtado *et al.*, 1991; Sanchez *et al.*, 1992), as atividades biológicas (Queiroz e Petta, 1984; Pérez *et al.*, 1997b, 1998; Marunak *et al.*, 1999; de Roodt *et al.*, 2000, 2003) e o quadro de envenenamento por *B. alternatus* (Bauab *et al.*, 1994) se assemelham aos de outras *Bothrops* (Fan e Cardoso, 1995; Russell *et al.*, 1997; França e Málaque, 2003; Warrell, 2004).

## ***OBJETIVOS***

## 2 – OBJETIVOS

Os objetivos dessa primeira parte do trabalho foram:

1. Investigar as alterações cardiovasculares causadas pela peçonha de *B. alternatus* em cães anestesiados.
2. Investigar as alterações gasométricas e metabólicas produzidas pela peçonha de *B. alternatus in vivo*.
3. Investigar os danos histológicos provocados pela peçonha de *B. alternatus* em tecidos cardíaco e renal.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Animais**

Cães (sem raça definida - SRD) machos, pesando entre 10 e 20 kg, foram obtidos do Centro de Zoonoses de Itapevi – SP e mantidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP onde permaneceram por um período de quarentena (21 dias), antes de serem usados. Nesse período, receberam tratamentos paras diversas zoonoses, carrapaticidas, etc. A alimentação foi à base de ração com 21% de proteína. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UNICAMP (protocolo nº 783-1), e realizados de acordo com as recomendações éticas gerais do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

#### **3.2 - Peçonha**

A peçonha de *B. alternatus* fornecida pelo Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP) foi obtida de exemplares adulta de ambos os sexos, liofilizada e estocada a -20° C até o uso. Soluções estoques foram preparadas diariamente em salina 0,9% e armazenadas em gelo até o momento de uso.

#### **3.3 – Experimentos em cães**

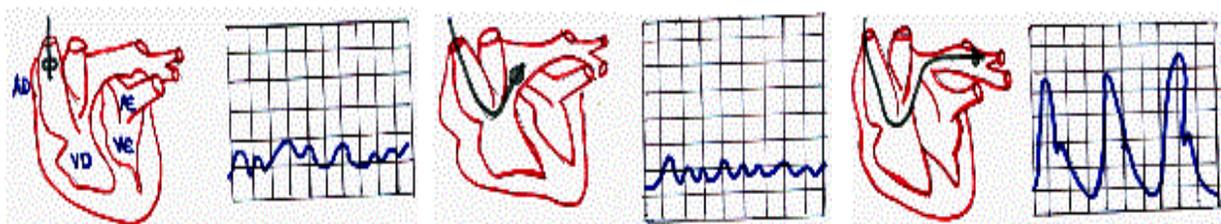
##### **3.3.1 - Procedimentos experimentais gerais**

###### **3.3.1.1 - Técnica cirúrgica**

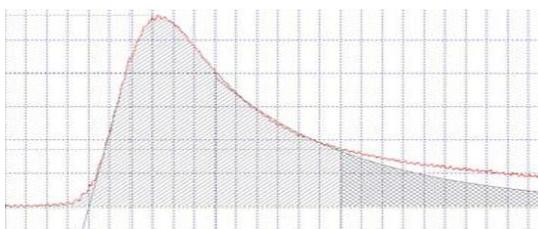
A indução anestésica dos cães foi feita com tiopental sódico (30 mg/kg, i.v.; Cristália Indústria Farmacêutica, Itapira, SP), injetada lentamente, em bolus, e em seguida os animais foram entubados pela traqueia para a administração do isoflurano (via inalatória), para a manutenção da anestesia (concentração de 2% em ar comprimido, com fluxo de 1 l/min) (Flecknall, 1996).

As artéria e veia femorais esquerdas foram dissecadas e expostas cirurgicamente, seguidas de canulação, com cânulas de polietileno, heparinizadas (10 UI/ml), para o registro da pressão arterial sistêmica e para a administração das

substâncias, respectivamente. A veia femoral direita também foi dissecada e exposta, onde foi então colocado um introdutor com uma cânula, heparinizada, e por este o cateter de termodiluição de Swan-Ganz 7F (AS-3 Datex-Engstrom, Helsinki, Finlândia). O cateter de Swan-Ganz foi introduzido até a artéria pulmonar e então conectado a dois outros transdutores apropriados, para o registro da pressão da artéria pulmonar média (PAPM) e da pressão do átrio direito média (PADM), bem como a pressão de capilar pulmonar média (PCPM). Esse cateter também permitiu a medida do débito cardíaco (DC) pelo lúmem proximal, pela técnica de termodiluição, que consistiu na injeção de 5 ml de soro fisiológico gelado. À medida que a coluna de soro foi se deslocando pelo sangue do cão, a mudança na temperatura permitiu o registro do débito cardíaco, em l/min, calculado a partir da média de três medidas consecutivas (Fig. 5,6) (Terzi e Araújo, 1992).

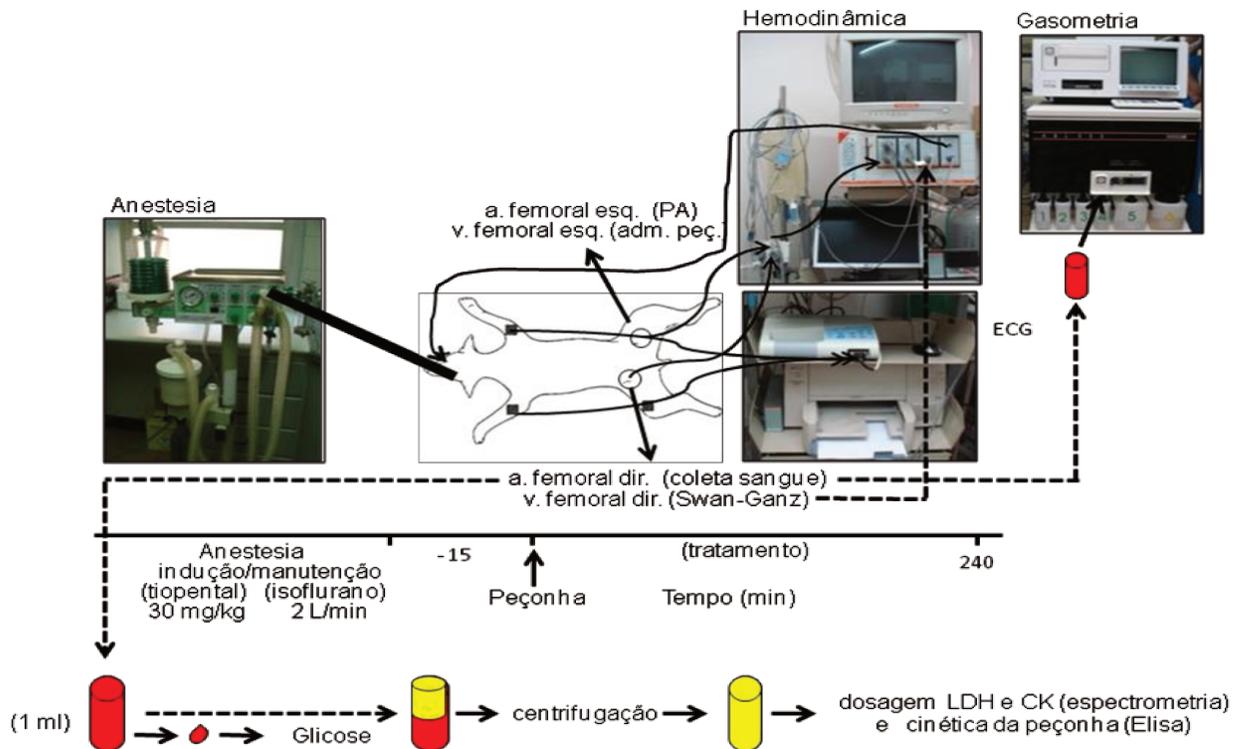


**Figura 5.** Posição do cateter de Swan-Ganz na entrada da artéria pulmonar. (AD – átrio direito, AE – átrio esquerdo, VD – ventrículo direito e VE – ventrículo esquerdo).



**Figura 6.** Curva do débito cardíaco (média de 3 medidas consecutivas com soro gelado (5 ml), (DC = frequência cardíaca x volume sistólico).

A artéria femoral direita foi canulada para a coleta de sangue arterial (1 ml) nos tempos zero (basal – antes da peçonha), e aos 2, 5, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos pós-peçonha para a gasometria, para a avaliação dos parâmetros metabólicos e para a quantificação da peçonha circulante por ELISA (Fig. 6).



**Figura 7.** Diagrama do protocolo *in vivo*, mostrando o posicionamento dos cateteres arteriais e venosos e dos eletrodos de superfície para o registro dos parâmetros eletrocardiográficos. Volume das amostras (arterial) coletadas para a análise gasométrica e metabólica, bem como para a análise da cinética da peçonha, durante o período de envenenamento (240 min).

### 3.3.1.2 - Registro dos parâmetros hemodinâmicos

Os parâmetros hemodinâmicos foram visualizados, continuamente, através da tela de um monitor multiparâmetro modular (DIXTAL), incluindo: 1) frequência cardíaca (FC), 2) pressão arterial média (PAM), monitorada através de um transdutor de pressão (AS-3 Datex-Engstrom, Helsinki, Finlândia), 3) pressão arterial pulmonar média (PAPM), 4) pressão de capilar pulmonar média (PCPM), 5) pressão do átrio direito média (PADM) e o 6) débito cardíaco (DC), através de um termistor localizado na ponta do cateter de Swan-Ganz.

A partir desses valores diretos, os valores de outras variáveis hemodinâmicas indiretas foram determinados como: volume sistólico (VS), trabalho sistólico do ventrículo esquerdo (TSVE), trabalho sistólico do ventrículo direito (TSVD), resistência

vascular sistêmica (RVS) e resistência vascular pulmonar (RVP), os quais foram obtidos por meio das fórmulas abaixo:

- Volume sistólico →  $VS = DC/FC \times 1000$
- Trabalho sistólico do ventrículo esquerdo →  $TSVE = 0,0144 \times VS \times PAM$
- Trabalho sistólico do ventrículo direito →  $TSVD = 0,0144 \times VS \times PAPM$
- Resistência vascular sistêmica →  $RVS = 80 \times (PAM - PADM)/DC$
- Resistência vascular pulmonar →  $RVP = 80 \times (PAPM - PCPM)/DC$
- Pressão de perfusão coronariana →  $PPC = PAM - PADM$

onde o fator 80 transforma a unidade de resistência (vascular) de mmHg/l/min para dinas.s/cm<sup>5</sup>.

Os resultados do DC, VS, TSVE, TSVD, RVS e RVP também foram expressos sob a forma de índice, corrigindo-se os valores em função da área de superfície corporal (ASC = relação entre a distância naso-anal e o peso dos cães). O DC foi expresso como índice cardíaco (IC), o VS como índice sistólico (IS), os trabalhos ventriculares esquerdo e direito como índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo (ITSVE) e índice de trabalho sistólico do ventrículo direito (ITSVD), respectivamente, e as resistências vasculares como índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) e índice de resistência vascular pulmonar (IRVP), respectivamente. As fórmulas utilizadas para estes cálculos foram as seguintes:

- Índice cardíaco →  $IC = DC/ASC$
- Índice sistólico →  $IS = VS/ASC$
- Índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo →  $ITSVE = TSVE/ASC$
- Índice de trabalho sistólico do ventrículo direito →  $ITSVD = TSVD/ASC$
- Índice de resistência vascular sistêmica →  $IRVS = RVS \times ASC$
- Índice de resistência vascular pulmonar →  $IRVP = RVP \times ASC$

### **3.3.1.3 - Administração da peçonha de *B. alternatus* e protocolos experimentais**

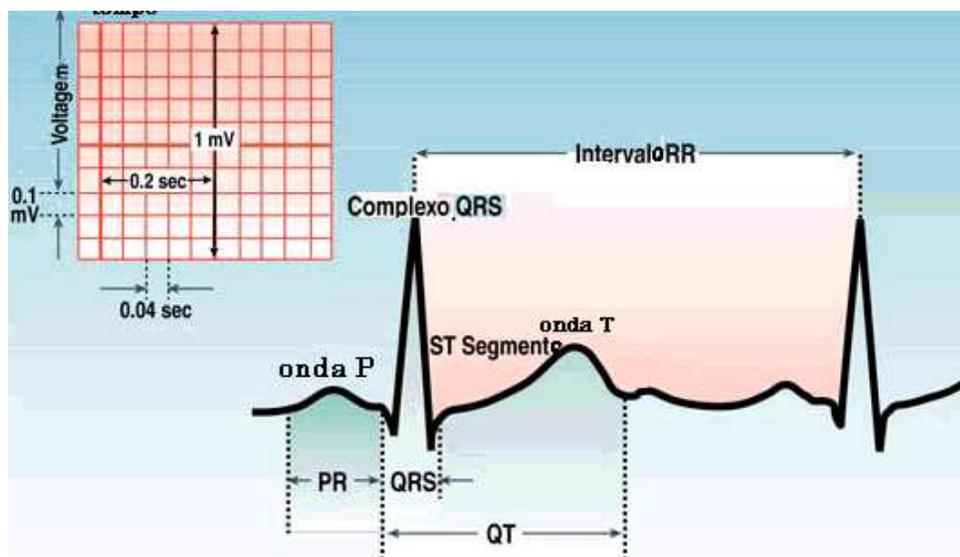
Foram estudados três grupos de cães: grupo1 - injetado com salina (controle, n=9), grupo 2 - injetado com 0,3 mg/kg (i.v., n=12) e grupo 3 - injetado com 1,0 mg/kg (i.v, n=9). As doses foram escolhidas baseadas em experimentos preliminares, iniciando com a dose de 10 µg/kg, seguido por doses maiores, em escala logarítmica. O

grupo 1 (controle) recebeu 1 ml de salina i.v., lentamente, o grupo 2 recebeu a peçonha botrópica, na dose de 0,3 mg/kg, diluída em 1 ml de salina 0,9%, por via endovenosa (bolus - lentamente). O grupo 3 recebeu a dose de 1,0 mg/kg, por via endovenosa (bolus – lentamente). Em seguida à administração da peçonha, em todos os grupos, foi feita a lavagem da cânula com 3 ml de salina.

Os animais do grupo controle receberam 1 ml de salina i.v. também injetada lentamente. Em seguida, foi feita a lavagem da cânula com 3 ml de salina.

### 3.3.1.4 - Eletrocardiografia

Eletrodos de superfície foram conectados aos pontos adequados do corpo do animal para o registro eletrocardiográfico. Os registros foram feitos na derivação DII e velocidade 50 mm/s, através de um eletrocardiógrafo (TEB – C10, Jundiaí, SP, Brasil) (Fig. 6). Foram analisados os seguintes parâmetros: ondas P, T e complexo QRS (tempo de duração - s) e os intervalos PR, QT (tempo de duração - s), e o segmento S-T (tempo de duração e infra ou supra desnivelamento), além da amplitude das ondas P, T e do complexo QRS (mV) (Fig.8).



**Figura 8.** Traçado eletrocardiográfico mostrando as ondas P e T, o complexo QRS, os intervalos PR e QT, e o segmento ST.

### **3.3.1.5 - Avaliação dos gases sanguíneos e do pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, hematócrito e lactato**

Amostras de sangue arterial (0,5 ml) foram coletadas em seringa heparinizada, tanto dos grupos tratados quanto do grupo controle para a leitura gasométrica, logo após a administração da peçonha, sendo essas coletas realizadas nos tempos 0 (basal – antes da peçonha) e 2, 5, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min pós-peçonha. A leitura gasométrica foi realizada imediatamente após as coletas, usando-se um gasômetro modelo ABL 555 da Radiometer (Copenhague, Dinamarca). Os parâmetros gasométricos analisados foram: pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>, SBEc e SBCe, com os parâmetros adicionais sendo o pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, hematócrito (Hct) e lactato.

### **3.3.1.6 - Alterações metabólicas**

Imediatamente após cada coleta para gasometria, foi coletado 1 ml de sangue arterial, com seringa comum, para a dosagem das enzimas lactato desidrogenase (LDH), creatinoquinase (CK) e glicose, e para a quantificação da peçonha circulante. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas (10000 g, 15 min) para obtenção do soro. A atividade das enzimas LDH e CK foi determinada usando kits comerciais (LDH-P e CK-NAC, respectivamente, ambos pelo método cinético UV - Laborlab, São Paulo, SP), seguindo-se as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em U/ml, e a leitura foi feita através de um espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 800). A quantificação da glicose foi feita através de um aparelho comercial de medição de glicose (MediSense Optium Xceed, Abbott Laboratories do Brasil Ltda), e a da lactato foi realizada pelo gasômetro; os resultados foram expressos em mg/dl e mmol/l, respectivamente.

### **3.3.1.7 - ELISA para a detecção de peçonha circulante**

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µl de F(ab)<sup>2</sup> antitoxinotrópico (20 µg/ml) em tampão de ligação pH 9,6 e incubadas *overnight* à 4°C. Após lavagem com 300 µl de solução de PBS, as placas foram bloqueadas com 100 µl de solução de caseína bovina 2% em PBS e incubadas à temperatura ambiente por 1 h. Após lavagem, foram adicionados os calibradores, os controles e as amostras, todos diluídos 1:1, em tampão de incubação contendo 0,02% de soro normal de cavalo. Após

incubação à temperatura ambiente por 1 h e lavagem, foi adicionado o conjugado diluído 1:2000 em tampão de incubação e novamente foi feita a incubação à temperatura ambiente por 1. Após lavagem, foram adicionados 100 µl de substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OPD 0,02% em tampão citrato pH 5,0). Após incubação à temperatura ambiente por 15 min, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5%. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de placa (Multiskan Titertek, LabSystems, Helsinki, Finlândia) a 492 nm, e a concentração foi expressa em ng/ml.

### **3.3.1.8 – Histologia**

Amostras de coração e rim foram coletadas imediatamente após a eutanásia do animal, limpas e fixadas em formol tamponado (10%) durante 18h. Em seguida foram lavadas 3 vezes por 15 min. Para a desidratação dos tecidos foram utilizados gradientes crescentes de alcoóis (etanol), seguido de diafanização em x4lol, embebição e inclusão em parafina. (Histosec-Merck). Secções de 5 µm de espessura foram obtidas usando um micrótomo (Leica RM 2245, Alemanha), e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise das alterações histológicas (Boer-Lima *et al*, 1999,2002). As lâminas foram examinadas em microscópio Leica DM 5000B e as imagens foram captadas, processadas e analisadas usando uma câmara CCD LEICA CTR 5000 e softwares de processamento e análises de imagem LEICA Q Win Plus v.3.2.0.

### **3.3.1.9 - Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média ± EPM, e as análises estatísticas foram feitas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguidas pelo teste de Tukey-Kramer e teste *t* Student. Valores de  $p < 0,05$  foram significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Prisma versão 4 (Graphpad, Inc., San Diego, CA).

## ***RESULTADOS***

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 - Efeitos cardiovasculares da peçonha de *B. alternatus* in vivo

A Fig. 9 mostra o registro fisiográfico da pressão arterial em cães anestesiados, na presença de salina apenas (A) e na presença de peçonha de *B. alternatus* nas doses de 0,3 e 1,0 mg/kg (B e C, respectivamente). Em ambos os grupos injetados com peçonha, houve uma redução acentuada da pressão arterial aos 5 min, com uma recuperação lenta e gradativa próximo aos valores basais, na dose de 0,3 mg/kg e uma redução persistente até a morte na dose de 1,0 mg/kg, i.v., ~30 min após o envenenamento (Fig 9C).

Nos animais injetados com salina (controle; 1,0 ml, i.v.) não houve nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados (Fig. 9-13). As Tabela 1 e 2 mostram os valores basais dos parâmetros hemodinâmicos diretos e indiretos de todos os grupos; não houve diferença significativa nos valores de nenhum dos parâmetros entre os grupos estudados.

A administração (bolus) da peçonha (0,3 mg/kg, i.v.) resultou em queda imediata na pressão arterial que atingiu seu ápice aproximadamente 5 min após a injeção, o que não foi visto no grupo controle (1 ml de salina i.v.) (Fig. 10A-D). Esta fase hipotensora (0,3 mg/kg, i.v.) se manteve durante vários minutos, seguida de recuperação gradativa, de modo que os valores pressóricos de 180 a 240 min pós-injeção, não foram significativamente diferentes dos valores basais (antes da peçonha), nem em relação ao grupo controle. A Fig. 10E, mostra uma redução acentuada e significativa da pressão de perfusão coronariana nos primeiros 5 min, mantendo-se significativamente abaixo dos valores basais e dos valores do grupo controle até os 120 min e retornando aos valores basais ao final do experimento.

A hipotensão marcante mostrada na Fig. 10A-D foi acompanhada de uma queda significativa e persistente (sem recuperação) no débito cardíaco (DC) (Fig. 11B) sendo essa significância em relação aos valores basais em todos os tempos e em relação ao grupo controle somente nos primeiros 30 min. No entanto, a significância ocorreu em todos os tempos registrados, no que se refere aos valores basais e ao grupo controle

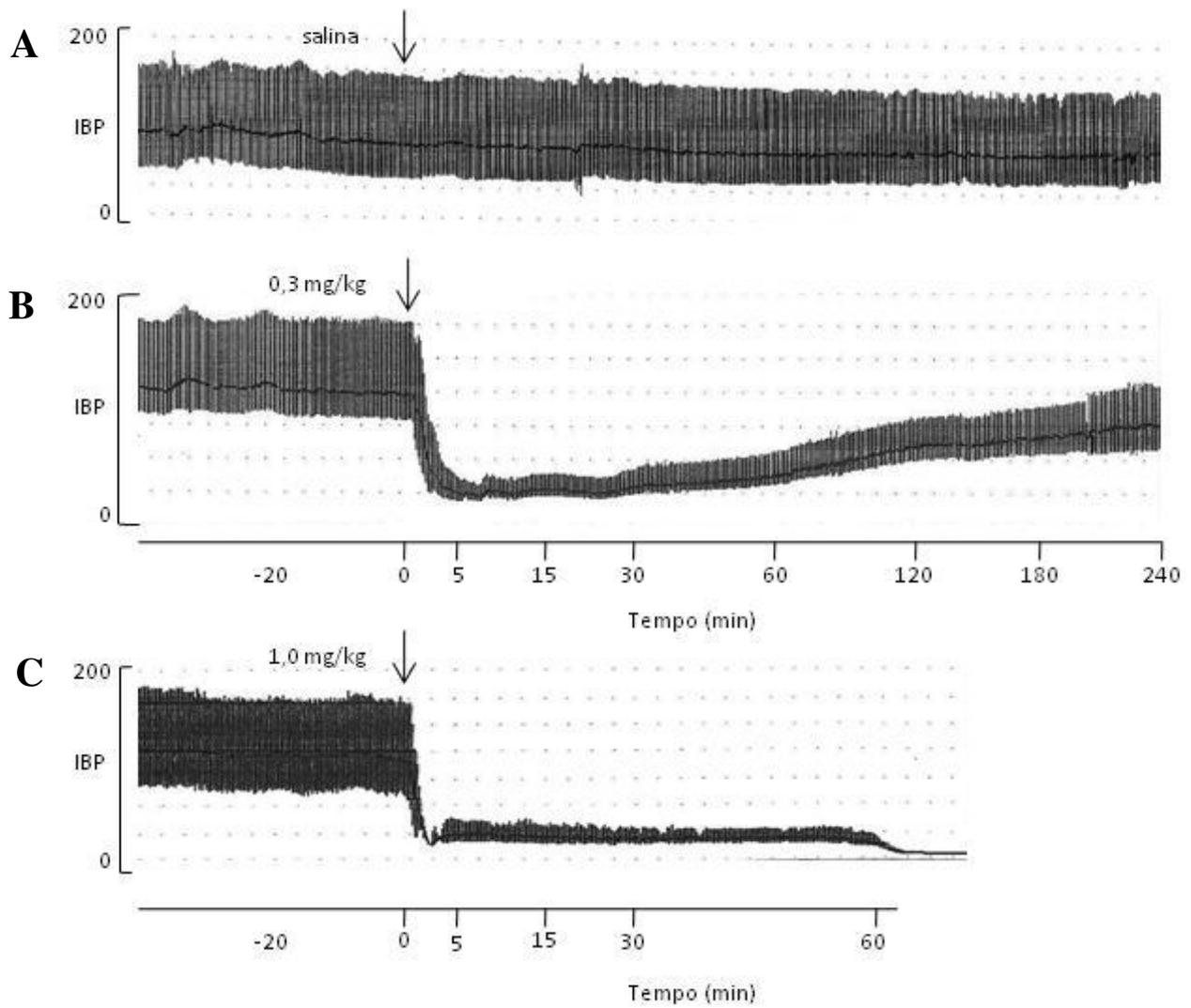
para o índice cardíaco (IC) (Fig. 11C). Entretanto, a frequência cardíaca (FC) mostrou um discreto aumento não significativo aos 30 min e assim se manteve praticamente até o final do experimento (Fig. 11A).

A resistência vascular sistêmica (RVS) (Fig. 12A) e o índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) (Fig. 12B) mostraram um perfil semelhante ao da pressão arterial, com discreta redução nos primeiros 15 min seguida por uma recuperação e aumento, nos valores acima dos níveis basais na fase final do experimento (60 min em diante), apresentando aumento significativo nos tempos de 180 e 240 min (RVS) e no tempo de 240 min (IRVS).

Não houve alterações significativas na pressão da artéria pulmonar média (PAPM) (Fig. 13A), na pressão capilar pulmonar média (PCPM) (Fig. 13B) e pressão atrial direita média (PADM) (Fig. 13C) após administração da peçonha. De modo semelhante, também não ocorreram mudanças significativas nos valores da resistência vascular pulmonar (RVP) (Fig. 13D) e do índice de resistência vascular periférica (IRVP) (Fig. 13E), no grupo tratado com 0,3 mg/kg, apesar de estes mostrarem aumento persistente ao longo do experimento.

A Fig. 14A-B mostra que houve acentuada e persistente redução significativa no trabalho e índice sistólicos dos ventrículos esquerdo (TSVE e ITSVE) e direito (TSVD e ITSVD) (Fig. 14C,D), bem como no volume sistólico (VS) (Fig. 15A) índice sistólico (IS) (Fig. 15B) após injeção da peçonha, tanto em relação aos valores basais quanto em relação ao grupo controle.

Nos animais injetados com a dose de 1,0 mg/kg as alterações nos parâmetros analisados foram semelhantes àquelas vistas com a dose de 0,3 mg/kg, sendo que a queda foi brusca e acentuada, exceto para a RVP e IRVP. Não houve recuperação de nenhum dos parâmetros hemodinâmicos avaliados. Os cães foram a óbito 15 a 30 min após a administração da peçonha. Houve aumento significativo da RVP e do IRVP aos 5 min, tanto em relação aos valores basais, quanto em relação ao grupo controle (Fig. 13D-E) seguida por uma acentuada e persistente redução a partir dos 15 min até o óbito dos animais.



**Figura 9.** Registro fisiográfico da pressão arterial de cão anetesiado. Os painéis A, B e C representam os grupos controle (salina = 1 ml) e 0,3 e 1,0 mg/kg, i.v. (bolus) de peçonha de *B. alternatus*, respectivamente.

**Tabela 1.** Valores basais dos parâmetros hemodinâmicos diretos registrados nos três grupos experimentais estudados.

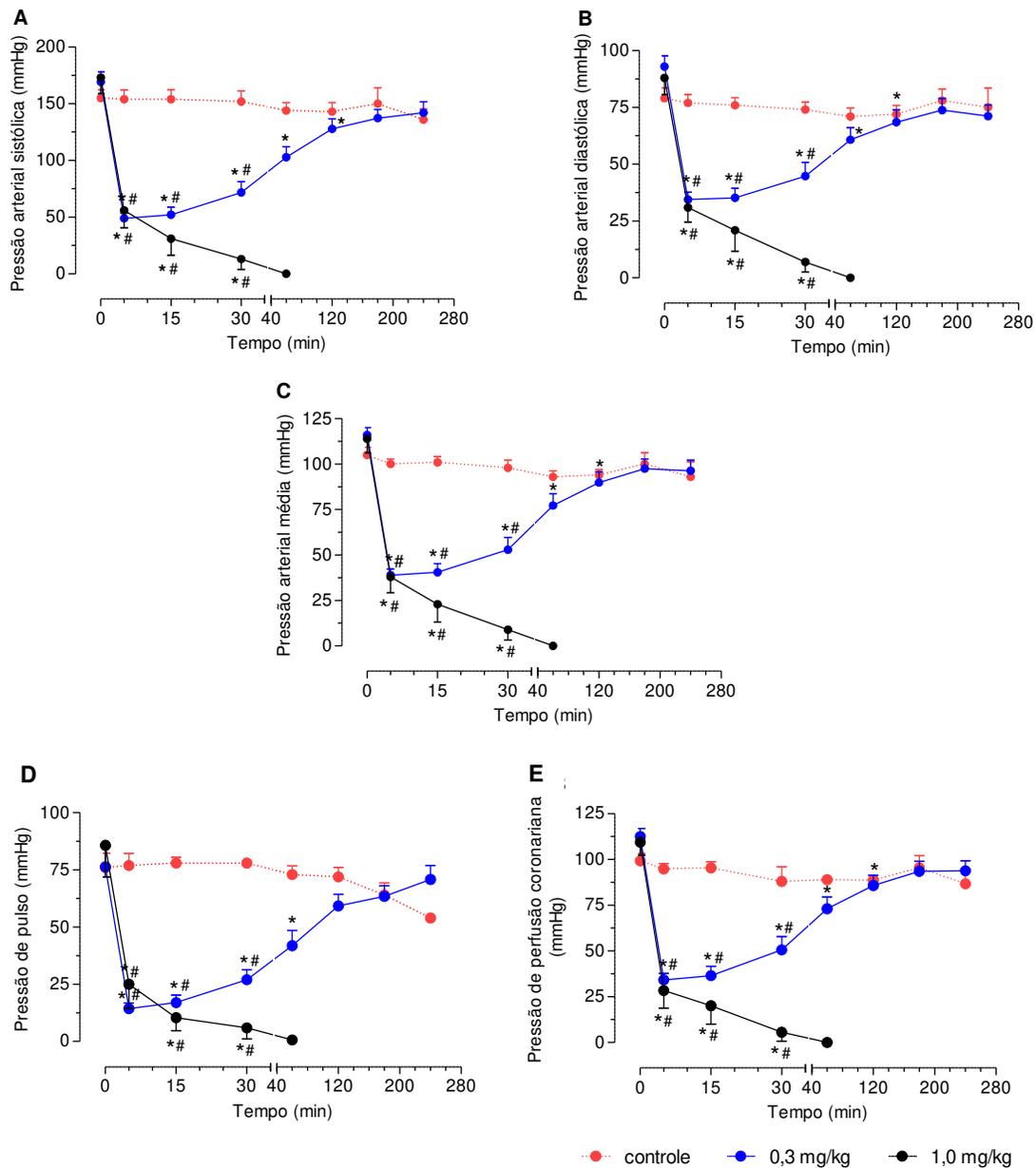
<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Salina (controle)</b>	<b>Peçonha 0,3 mg/kg</b>	<b>Peçonha 1,0 mg/kg</b>
<b>FC</b>	124 ± 7	132 ± 8	146 ± 9
<b>DC</b>	4 ± 0	5 ± 0	4 ± 0
<b>PAS</b>	155 ± 7	169 ± 9	173 ± 14
<b>PAD</b>	79 ± 5	93 ± 5	88 ± 7
<b>PAM</b>	105 ± 4	116 ± 4	114 ± 8
<b>PAPM</b>	17 ± 1	17 ± 2	17 ± 2
<b>PCPM</b>	6 ± 1	5 ± 1	6 ± 2
<b>PADM</b>	6 ± 1	4 ± 1	5 ± 1

Os valores são a média ± EPM de 9-12 cães por grupo. FC – Frequência cardíaca, DC – débito cardíaco, PAD – pressão arterial diastólica, PADM – pressão de átrio direito média, PAM – pressão arterial média, PAPM - pressão arterial pulmonar média, PAS – pressão arterial sistólica, e PCPM – pressão de capilar pulmonar média.

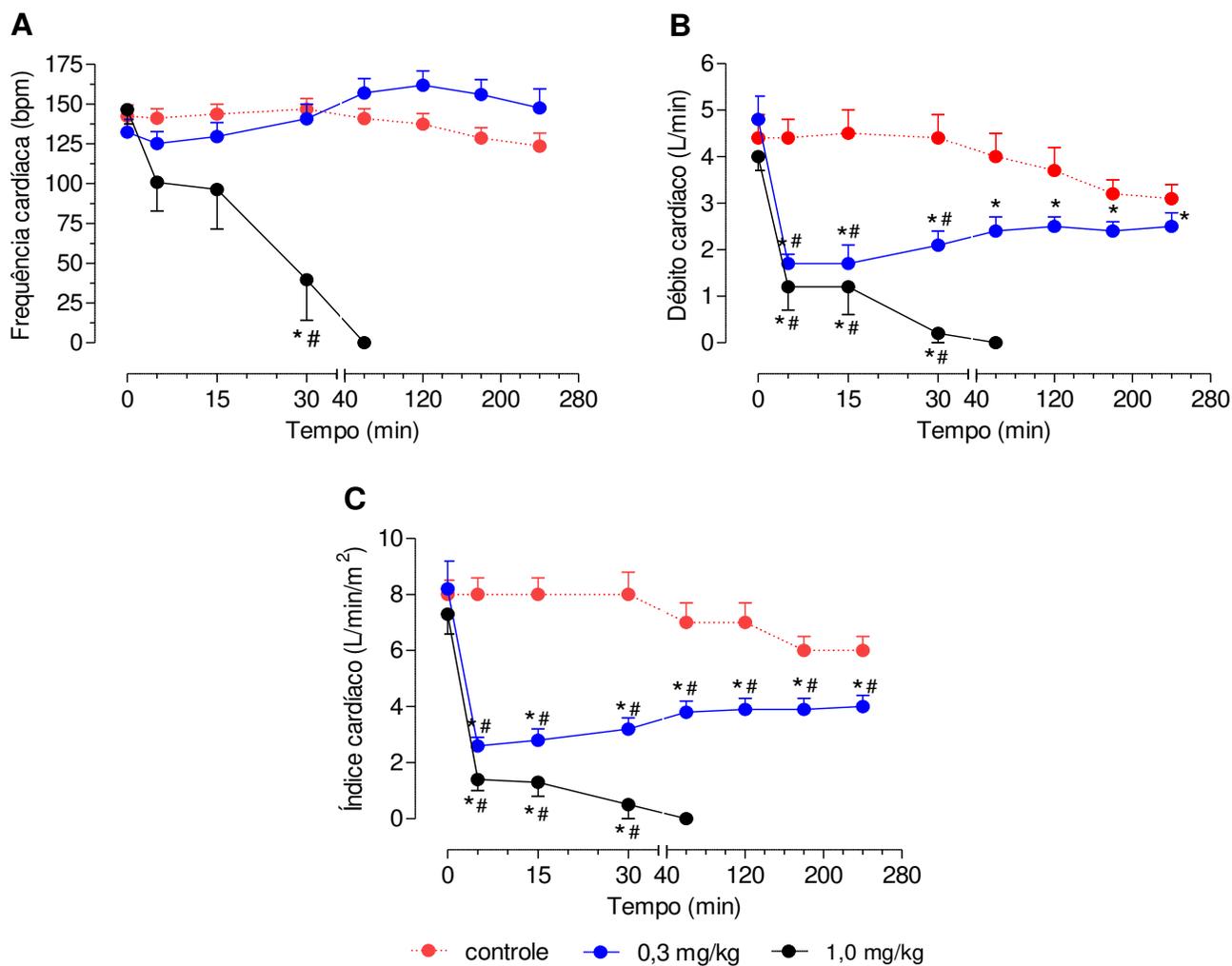
**Tabela 2.** Valores basais dos parâmetros hemodinâmicos indiretos calculados a partir dos valores diretos nos três grupos experimentais estudados.

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Salina (controle)</b>	<b>Peçonha 0,3 mg/kg</b>	<b>Peçonha 1,0 mg/kg</b>
<b>PP</b>	76 ± 10	76 ± 9	86 ± 14
<b>PPC</b>	99 ± 4	112 ± 4	109 ± 7
<b>IC</b>	8 ± 0	8 ± 1	7 ± 1
<b>VS</b>	31 ± 4	39 ± 5	27 ± 2
<b>IS</b>	57 ± 5	63 ± 8	50 ± 4
<b>RVS</b>	1953 ± 185	2075 ± 256	2428 ± 247
<b>IRVS</b>	1027 ± 75	1264 ± 147	1354 ± 118
<b>RVP</b>	217 ± 22	226 ± 44	236 ± 25
<b>IRVP</b>	115 ± 10	139 ± 26	123 ± 13
<b>TSVE</b>	49 ± 6	67 ± 10	45 ± 4
<b>ITSVE</b>	86 ± 7	108 ± 15	73 ± 13
<b>TSVD</b>	8 ± 1	10 ± 2	7 ± 1
<b>ITSVD</b>	14 ± 1	16 ± 3	13 ± 2

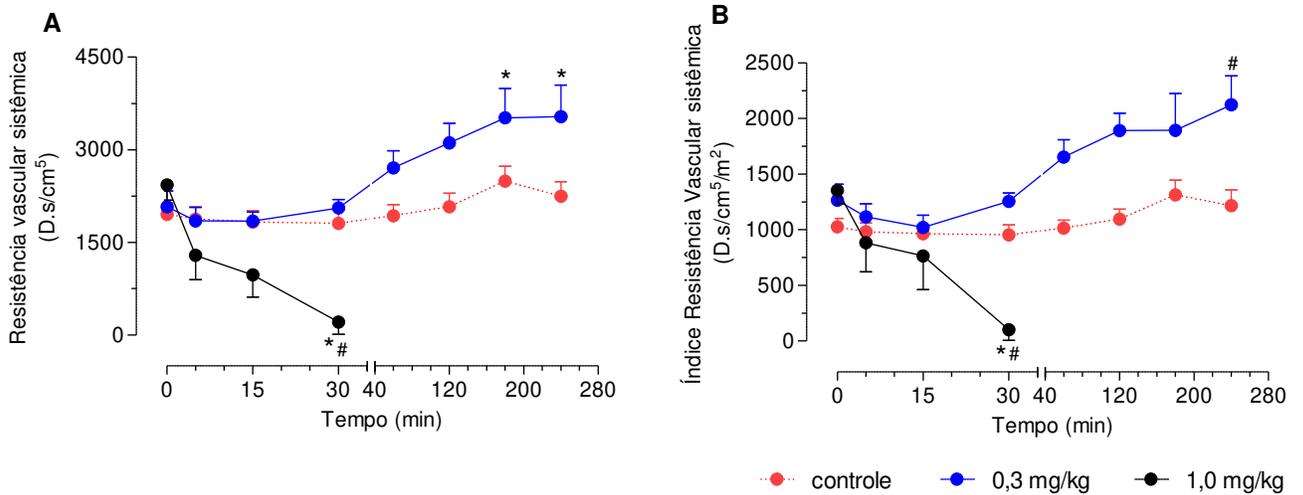
Os valores são a média ± EPM de 9-12 cães por grupo. IC – índice cardíaco, IRVP – índice de resistência vascular pulmonar, IRVS – índice de resistência vascular sistêmica, IS – índice sistólico, ITSVD – índice do trabalho ventrículo direito, ITSVE – índice do trabalho ventrículo esquerdo, PP – pressão de pulso, PPC – pressão perfusão coronariana, RVP – resistência vascular pulmonar, RVS – resistência vascular sistêmica, TSVD – trabalho ventrículo direito, TSVE – trabalho sistólico ventrículo esquerdo e VS – volume sistólico.



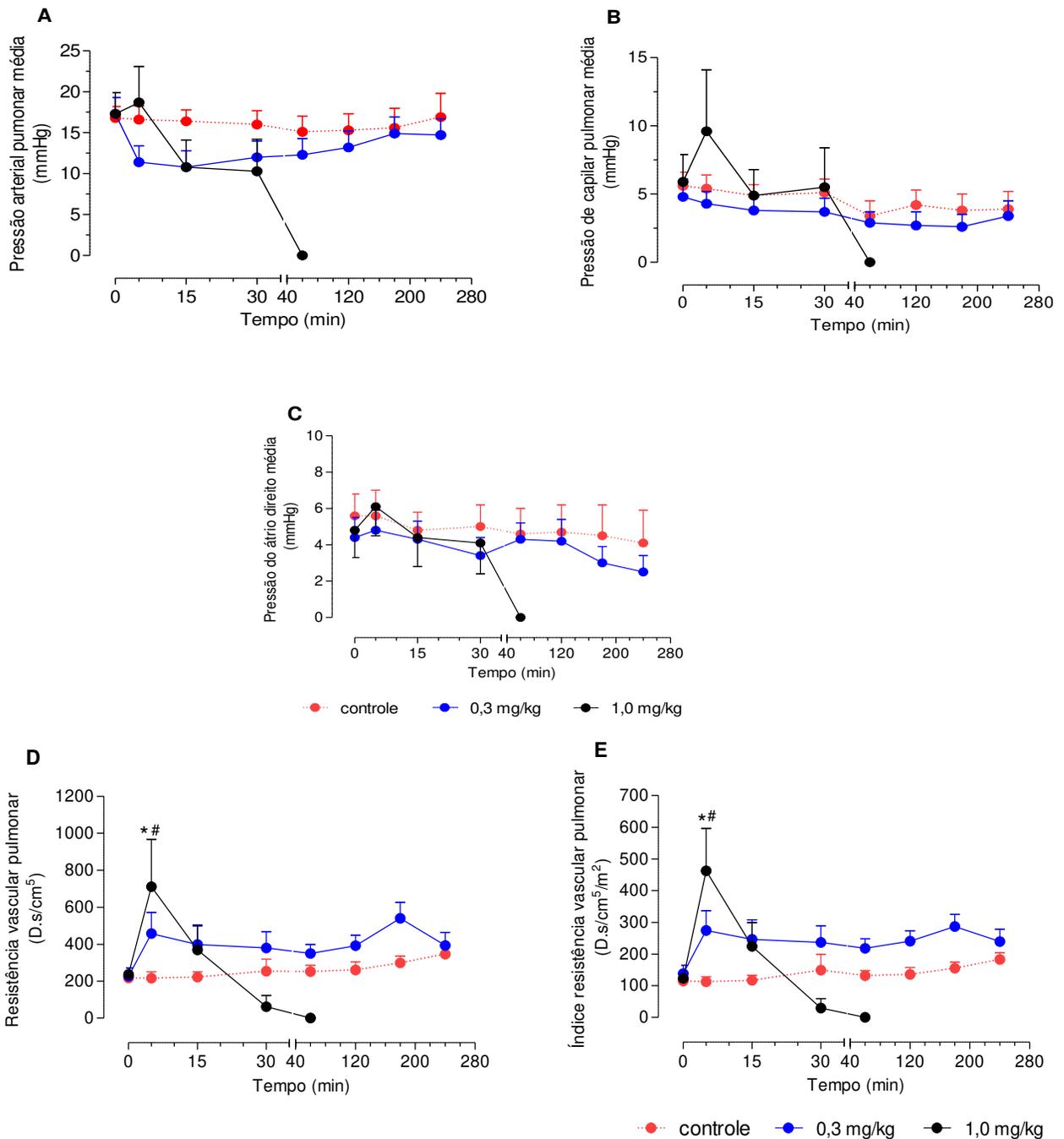
**Figura 10.** Ação da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg i.v., bolus) e salina sobre a pressão arterial sistólica (PAS) **(A)**, pressão arterial média (PAM) **(B)**, pressão arterial diastólica (PAD) **(C)**, pressão de pulso (PP) **(D)** e pressão de perfusão coronariana (PPC) **(E)** em cães anestesiados. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=9/12). \*,#p<0,05 comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).



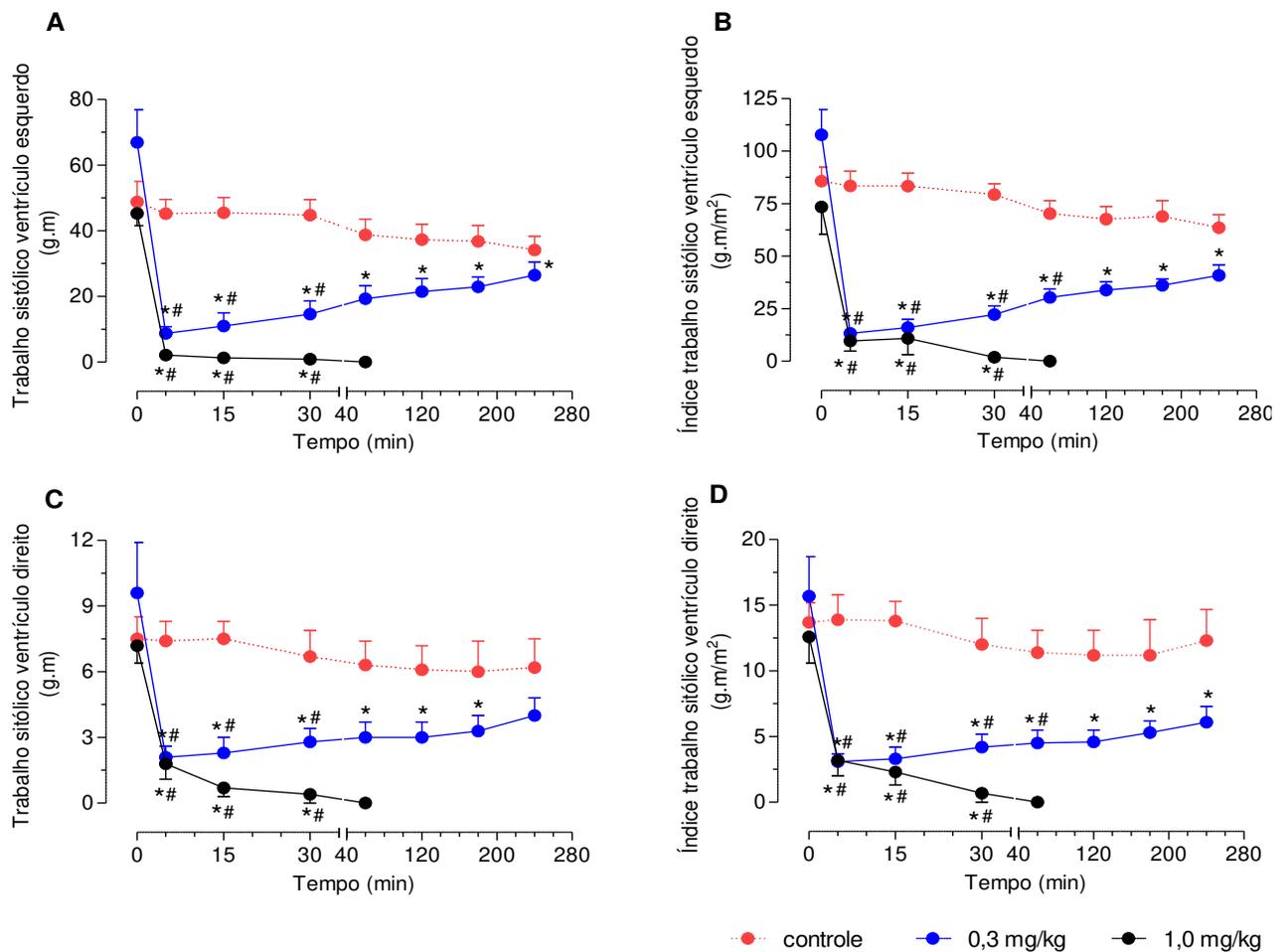
**Figura 11.** Ação da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg i.v., bolus), e salina sobre a frequência cardíaca (FC) **(A)**, o débito cardíaco (DC) **(B)** e o índice cardíaco (IC) **(C)** em cães anestesiados. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n= 9/12). \*,# $p < 0,05$  comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente. (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).



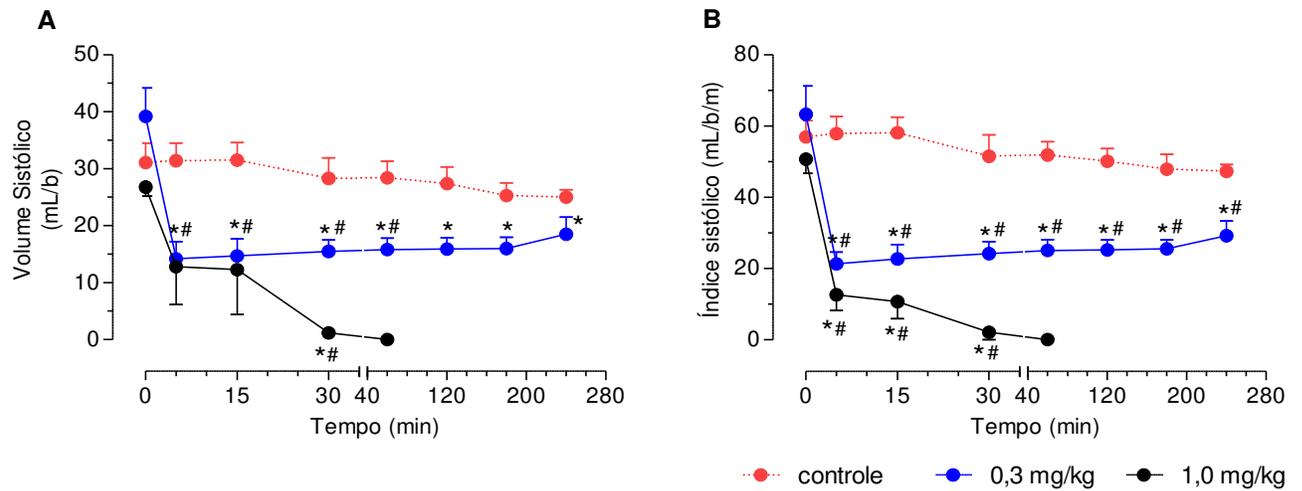
**Figura 12.** Ação da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg i.v., bolus) e salina sobre a resistência vascular sistêmica (RVS) **(A)** e o índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) **(B)** em cães anestesiados. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=9/12). \*,#p<0,05 comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente, (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).



**Figura 13.** Ação da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg i.v., bolus) e salina sobre a pressão arterial pulmonar média (PAPM) **(A)**, pressão capilar pulmonar média (PCPM) **(B)**, pressão atrial direita média (PADM) **(C)**, resistência vascular pulmonar (RVP) **(D)** e índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) **(E)** em cães anestesiados. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=9/12). \*:#p<0,05 comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).



**Figura 14.** Ação da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg i.v., bolus) e salina sobre o trabalho sistólico do ventrículo esquerdo (TSVE) **(A)**, o índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo (ITSVE) **(B)**, o trabalho sistólico do ventrículo direito (TSVD) **(C)** e o índice de trabalho sistólico do ventrículo direito (ITSVD) **(D)** em cães anestesiados. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=9/12). \*,#p<0,05 comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).



**Figura 15.** Ação da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg i.v., bolus) e salina sobre o volume sistólico (VS) **(A)** e índice sistólico (IS) **(B)** em cães anestesiados. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=9/12). \*#p<0,05 comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).

#### **4.2 - Efeitos gasométricos e metabólicos da peçonha de *B. alternatus* in vivo**

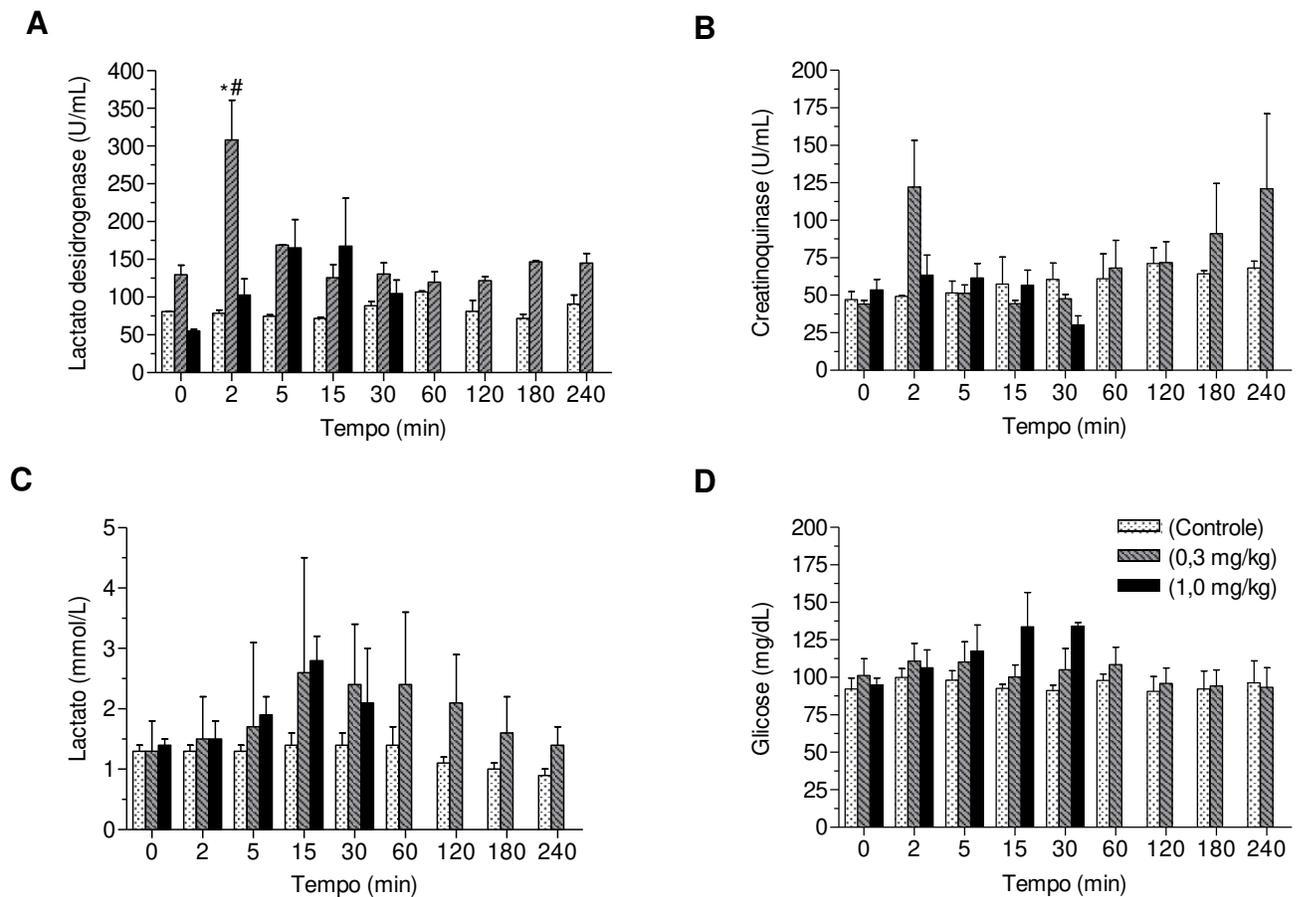
A administração da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg) não alterou significativamente os níveis de  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $HCO_{3c}$ ,  $SBC_e$  e  $SBE_c$  (indicadores do estado ácido-base), bem como o pH ao longo do experimento. Também não ocorreu alteração significativa no hematócrito (Hct) ou nos níveis de  $Na^+$  e  $K^+$  sanguíneos (Tabela 3). A temperatura dos animais não sofreu nenhuma alteração significativa em nenhum dos grupos analisados, entretanto houve aumento significativo da frequência respiratória aos 180 e 240 min (0,3 mg/kg), tanto em relação aos valores basais quanto em relação ao grupo controle. O grupo tratado com a dose de 1,0 mg/kg mostrou perfil semelhante, onde não foi visto nenhuma alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados, embora com alguns parâmetros houvesse tendência para alteração, como no caso da  $pO_2$ , que mostrou redução aos 15 min após o envenenamento (Tabela 3).

Houve um aumento significativo nos níveis da LDH somente aos 2 min aos 2 min, mas não houve aumento significativo nos níveis de CK, lactato e glicose ao longo do experimento (Fig. 16A-D).

**Tabela 3.** Parâmetros gasométricos, pH, íons (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>) e hematócrito (Hct) em cães anestesiados injetados com salina (controle, n=9), e com peçonha nas doses de 0,3 e 1,0 mg/kg (n=12/9). \*,° p<0,05 comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente, (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer). Os resultados são a média ± EPM.

Parâmetros Gasométricos e metabólicos											
Tempo/dose (mg/kg)	pH	pO <sub>2</sub> (mmHg)	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	SBCe (mmol/L)	SBEC (mmol/L)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)	Hct (%)	FR (ins/min)	Temp (°C)
<b>0 min/sal</b>	7,3 ± 0	78,7 ± 8	42,1 ± 2	20,3 ± 1	21,1 ± 0,7	-4,7 ± 1,6	146 ± 0,6	3,3 ± 0,2	39,6 ± 2,4	13 ± 1,6	37,6 ± 0,3
<b>0 min/0,3</b>	7,3 ± 0	70,5 ± 4	40,3 ± 2	20,1 ± 0	20,1 ± 0,4	-5,4 ± 0,6	146 ± 0,6	3,5 ± 0,1	36,6 ± 2,5	12 ± 0,0	36,6 ± 0,3
<b>0 min/1,0</b>	7,3 ± 0	82,7 ± 6	41,6 ± 4	20,8 ± 1	21,0 ± 0,8	-4,2 ± 1,1	146 ± 1,0	3,3 ± 0,2	43,0 ± 5,4	14 ± 2,8	37,1 ± 0,5
<b>5 min/sal</b>	7,3 ± 0	74,3 ± 7	42,5 ± 4	20,3 ± 1	20,4 ± 0,6	-4,7 ± 1,0	146 ± 0,6	3,2 ± 0,1	40,9 ± 2,4	12 ± 1,8	37,0 ± 0,3
<b>5 min/0,3</b>	7,3 ± 0	80,2 ± 6	33,8 ± 2	17,1 ± 1	15,7 ± 0,7	-7,0 ± 1,6	145 ± 0,8	3,4 ± 0,2	39,9 ± 2,9	13 ± 1,8	36,3 ± 0,3
<b>5 min/1,0</b>	7,2 ± 0	75,3 ± 10	41,79 ± 6	18,6 ± 1	19,0 ± 1,3	-3,4 ± 0,9	146 ± 1,2	3,5 ± 0,4	36,8 ± 6,5	18 ± 3,8	36,8 ± 0,4
<b>15 min/sal</b>	7,3 ± 0	80,9 ± 8	38,5 ± 2	19,2 ± 1	20,2 ± 0,6	-5,7 ± 1,1	147 ± 0,5	3,1 ± 0,1	39,1 ± 1,8	12 ± 1,8	37,0 ± 0,3
<b>15 min/0,3</b>	7,3 ± 0	77,3 ± 5	34,4 ± 2	15,7 ± 1	16,8 ± 0,6	-10,8 ± 1,2	144 ± 0,6	3,2 ± 0,1	40,4 ± 2,1	19 ± 2,4	35,7 ± 0,3
<b>15 min/1,0</b>	7,2 ± 0	55,8 ± 11	47,5 ± 7	18,2 ± 1	17,9 ± 1,0	-8,1 ± 0,8	145 ± 1,4	3,7 ± 0,2	33,0 ± 2,1	15 ± 2,3	36,9 ± 0,4
<b>180 min/sal</b>	7,3 ± 0	85,0 ± 8	39,3 ± 2	19,2 ± 1	20,2 ± 0,4	-5,7 ± 0,8	147 ± 0,4	3,4 ± 0,1	39,6 ± 1,5	14 ± 2,5	35,8 ± 0,3
<b>180 min/0,3</b>	7,3 ± 0	68,3 ± 4	34,3 ± 2	16,6 ± 1	18,3 ± 0,6	-9,7 ± 1,3	145 ± 0,6	3,8 ± 0,3	44,8 ± 2,0	51 ± 2,4*°	35,7 ± 1,0
<b>240 min/sal</b>	7,3 ± 0	83,6 ± 9	39,9 ± 3	20,5 ± 0	20,8 ± 0,3	-4,8 ± 0,6	147 ± 0,4	3,4 ± 0,1	40,3 ± 1,4	11 ± 2,4	35,7 ± 0,4
<b>240 min/0,3</b>	7,3 ± 0	67,9 ± 6	33,7 ± 3	19,6 ± 2	18,4 ± 0,8	-5,9 ± 2,7	146 ± 0,6	3,3 ± 0,2	44,2 ± 3,3	57 ± 4,7*°	35,5 ± 1,0

pO<sub>2</sub> = pressão parcial de oxigênio, pCO<sub>2</sub> = pressão parcial de CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub> = bicarbonato, SBCe = deficiência de base, SBEC = excesso de base, Na<sup>+</sup> = sódio, K<sup>+</sup> = potássio, Hct = hematócrito, FR = frequência respiratória (ins/min = inspiração por minuto) e Temp = temperatura.



**Figura 16.** Efeito da peçonha de *B. alternatus* (0,3 e 1,0 mg/kg, i.v., em bolus) e de salina (controle, 1 mL) sobre a atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) (**A**) e creatinoquinase (CK) (**B**) e os níveis de lactato (**C**) e glicose (**D**), em cães anestesiados. As colunas expressam a média  $\pm$  EPM (n=9/12). \*,#p<0,05 comparados aos valores basais e ao controle, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).

### **4.3 - Eletrocardiografia de cães injetados com peçonha de *B. alternatus***

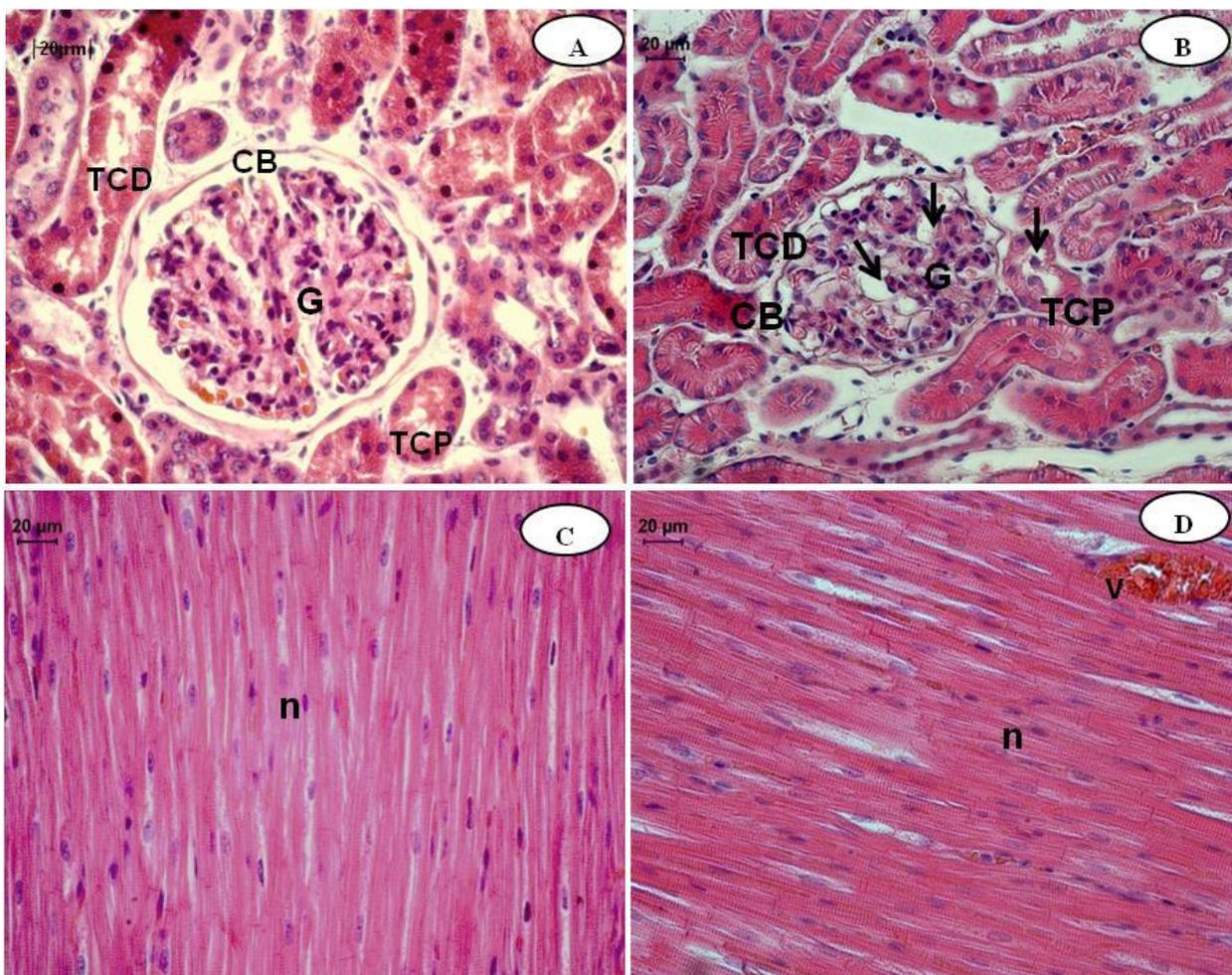
A Tabela 4 mostra que nenhuma das doses de peçonha alterou significativamente os parâmetros eletrocardiográficos em cães, embora alguns parâmetros mostrassem tendência para aumentar, como no caso do intervalo PR e amplitude da onda T, ou diminuir, como no caso da amplitude da onda P, aos 15 min com a dose de 1,0 mg/kg.

**Tabela 4.** Parâmetros eletrocardiográficos (ondas P, T e complexo QRS; intervalos PR, QT e QTc) em cães anestesiados injetados com salina (controle), e peçonha nas doses 0,3 e 1,0 mg/kg (i.v.). Os resultados são a média ± EPM (n=5). Os cálculos foram obtidos através de software do eletrocardiógrafo.

Parâmetros Eletrocardiográficos								
Tempo/dose (mg/kg)	P (onda - s)	P (mV)	QRS (complexo - s)	QRS (mV)	QT (intervalo - s)	QTc (s)	PR (intervalo - s)	T (onda - mV)
0 min/sal	0,06 ± 0,004	0,30 ± 0,03	0,07 ± 0,003	1,1 ± 0,17	0,19 ± 0,02	0,41 ± 0,04	0,10 ± 0,002	0,11 ± 0,02
0 min/0,3	0,04 ± 0,007	0,30 ± 0,03	0,07 ± 0,005	1,8 ± 0,30	0,21 ± 0,03	0,49 ± 0,04	0,08 ± 0,005	0,25 ± 0,08
0 min/1,0	0,06 ± 0,005	0,22 ± 0,05	0,08 ± 0,005	1,1 ± 0,25	0,21 ± 0,02	0,44 ± 0,05	0,09 ± 0,012	0,07 ± 0,07
5 min/sal	0,06 ± 0,001	0,26 ± 0,02	0,07 ± 0,001	1,1 ± 0,13	0,24 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,10 ± 0,003	0,12 ± 0,02
5 min/0,3	0,04 ± 0,011	0,26 ± 0,02	0,07 ± 0,005	1,6 ± 0,30	0,22 ± 0,03	0,52 ± 0,01	0,08 ± 0,007	0,29 ± 0,06
5 min/1,0	0,06 ± 0,006	0,20 ± 0,02	0,06 ± 0,013	1,0 ± 0,12	0,24 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,13 ± 0,04
15 min/sal	0,06 ± 0,002	0,26 ± 0,03	0,07 ± 0,001	1,1 ± 0,19	0,22 ± 0,00	0,49 ± 0,01	0,10 ± 0,001	0,13 ± 0,02
15 min/0,3	0,05 ± 0,008	0,26 ± 0,03	0,06 ± 0,007	1,6 ± 0,30	0,22 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,09 ± 0,003	0,24 ± 0,06
15 min/1,0	0,06 ± 0,010	0,12 ± 0,04	0,06 ± 0,050	1,8 ± 0,46	0,29 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,14 ± 0,080	0,25 ± 0,11
180 min/sal	0,06 ± 0,003	0,28 ± 0,04	0,07 ± 0,001	1,1 ± 0,13	0,23 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,10 ± 0,007	0,12 ± 0,02
180 min/0,3	0,04 ± 0,008	0,28 ± 0,04	0,06 ± 0,006	1,7 ± 0,20	0,23 ± 0,02	0,58 ± 0,01	0,08 ± 0,002	0,31 ± 0,10
240 min/sal	0,06 ± 0,005	0,29 ± 0,04	0,07 ± 0,003	1,1 ± 0,12	0,27 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,10 ± 0,007	0,17 ± 0,04
240 min/0,3	0,05 ± 0,012	0,29 ± 0,04	0,08 ± 0,010	2,0 ± 0,30	0,25 ± 0,04	0,54 ± 0,00	0,09 ± 0,010	0,31 ± 0,08

#### **4.4 - Histologia dos tecidos cardíaco (ventrículo esquerdo) e renal de cães tratados com peçonha de *B. alternatus***

A análise histológica do tecido renal, após o tratamento com a peçonha de *B. alternatus* (0,3 mg/kg) mostrou discretas alterações em algumas estruturas do néfron, com descamação da parede luminal de túbulo proximal e micro aneurismas localizados no glomérulo (Fig. 17B), o que não foi visto com os tecidos controle (Fig. 17A). Não foi observada nenhuma alteração (neste aumento) no tecido ventricular esquerdo dos cães tratados com essa dose (Fig.17D), semelhante ao tecido do grupo controle (Fig.17C). Não foi feita a análise histológica no grupo tratado com 1,0 mg/kg.

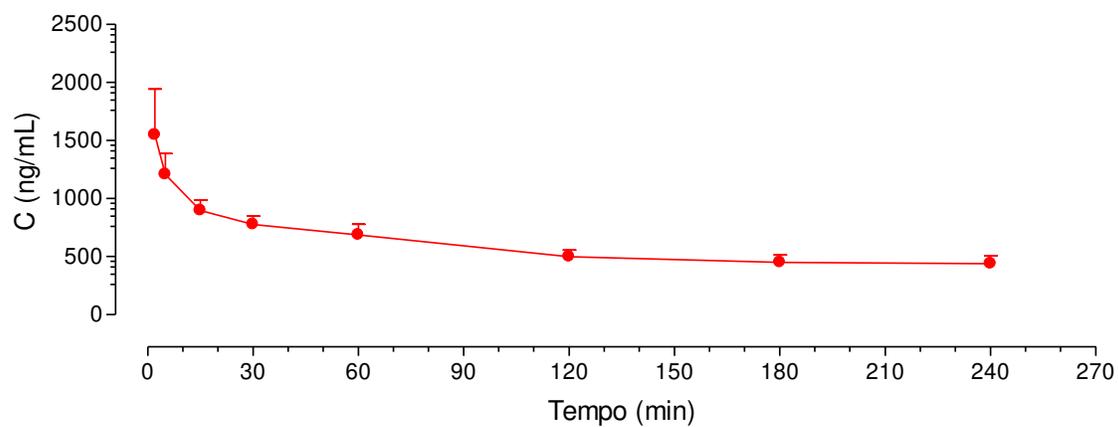


**Figura 17.** Análise histopatológica de tecido renal e ventrículo esquerdo (**A, C** grupo controle, respectivamente, e **B, D** grupo tratado, respectivamente) de cães tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,3 mg/kg). O grupo controle recebeu 1,0 ml de salina. **CB** - cápsula de Bowman, **G** - glomérulo, **n** - núcleo, **TCP** - túbulo contornado proximal, **TCD** - túbulo contornado distal e **v** - vaso. As setas indicam alterações em túbulos renais (descamação) e nos glomérulos (microaneurismas). Coloração HE. Barra de escala: 20 μm.

#### 4.5 - Cinética da peçonha de *B. alternatus*

A Fig. 18 mostra a cinética da peçonha de *B. alternatus* em cães anestesiados. O perfil obtido foi característico de uma administração endovenosa, com queda inicial rápida (fase de distribuição: <5 min), seguida por uma queda gradual e essencialmente linear (fase de eliminação: ≥30 min). Ao final do experimento, 240 min após a

administração, a concentração circulante de peçonha ainda estava elevada (~500 ng/ml comparada com ~1.500 ng/ml na primeira quantificação aos 2 min).



**Figura 18.** Cinética da peçonha de *B. alternatus* (0,3 mg/kg), após administração i.v. (bolus) em plasma de cães anestesiados. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n = 12). C = concentração de peçonha.

## ***DISCUSSÃO***

## 5 – DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a administração endovenosa da peçonha de *B. alternatus* produz hipotensão arterial, que atinge o máximo após aproximadamente 3-5 minutos e é seguida por uma recuperação gradativa aos níveis basais. Respostas semelhantes a esta têm sido relatadas para as peçonhas de *Bothrops erythromelas* (Zapellini, 1991), *Bothrops insularis* (Campos e Delgado, 1981), e *Bothrops moojeni* (Santos *et al.*, 2000; Rabelo *et al.*, 2005), e também para cascavéis norte-americanos do gênero *Crotalus* (Russell *et al.*, 1962; Halmagyi *et al.*, 1965; Whitham *et al.*, 1953; Russell *et al.*, 1962; Carlson *et al.*, 1975; Schaeffer *et al.*, 1979, 1984), e serpentes africanas (*Bitis* spp. – Osman e Guma, 1974; Adams *et al.*, 1981; Cevese *et al.*, 1983; Schaeffer *et al.*, 1985; Hyslop e Marsh, 1991; *Cerastes* spp. – Abdalla *et al.*, 1992), asiáticas (*Trimeresurus* spp. - Lee e Lee, 1979) e australianas (*Pseudonaja* spp. - Tibballs *et al.*, 1989). Concomitante com a queda abrupta na pressão arterial houve também uma redução marcante do débito cardíaco, sem recuperação significativa durante o restante do experimento. Contudo, não houve alteração significativa na frequência cardíaca.

A ação hipotensora da peçonha na dose de 0,3 mg/kg, provavelmente, resultou de uma combinação de vasodilatação, por ação direta de componentes da peçonha ou indiretamente, pela liberação de autacóides (Rothschild e Rothschild, 1979), e de uma ação direta da peçonha sobre o coração. A importância do tônus vascular no controle da pressão arterial é refletida no aumento visto na resistência vascular sistêmica e no índice de resistência vascular sistêmica, mesmo com a redução persistente no débito cardíaco e nos parâmetros de trabalho ventricular. O aumento persistente, até o final do experimento, da resistência vascular sistêmica sugere uma tentativa de aumentar o débito cardíaco para manter uma perfusão tecidual adequada. Já uma ação depressora direta sobre o tecido cardíaco é sugerida pelas reduções marcantes e persistentes (sem recuperação) vistas no débito cardíaco e nos trabalhos e índices de trabalho dos ventrículos esquerdo e direito, bem como no volume e índice sistólicos, as quais apontam para uma diminuição no inotropismo (contratilidade) do músculo miocárdico por mecanismos ainda desconhecidos (Terzi e Araújo, 1992).

Apesar da queda marcante na pressão arterial e no débito cardíaco, não houve alteração significativa na frequência cardíaca. Resposta semelhante também tem sido observada com a peçonha de *B. moojeni* (Santos *et al.*, 2000), *B. gabonica* (Adams *et al.*, 1981; Cevese *et al.*, 1983), *Cerastes cerastes* (Abdalla *et al.*, 1992) e *C. v. helleri* (Carlson *et al.*, 1975); em vários destes e outros casos (Russell *et al.*, 1962) não houve variação, ou a variação não mostrou relação com alterações na pressão arterial ou com a dose de peçonha. Santos *et al.* (2000) sugeriram que para a peçonha de *B. moojeni*, a inalterância da frequência cardíaca era devida a um efeito parassimpático persistente ou uma ação direta da peçonha nos barorreceptores. É possível que uma ação reflexa, simpática, em função da hipotensão, tenha ocorrido como meio de re-equilibrar os valores pressóricos e permitir, portanto, uma melhor perfusão tecidual. O eletrocardiograma mostrou ausência de efeitos relevantes na condutividade elétrica do tecido cardíaco, o que corrobora com a frequência cardíaca inalterada.

Vários estudos demonstraram que as peçonhas de cascavéis norte-americanas possuem peptídeos e proteínas básicos com alta atividade cardiodepressora (Lee e Lee, 1979; Schaeffer *et al.*, 1979) capazes de deprimir a contratilidade cardíaca, produzir hipotensão, aumentar lactato e CK circulantes, e causar hemoconcentração (aumento no hematócrito) e acidose. A existência de tais peptídeos em peçonhas botrópicas ainda não foi investigada de forma sistemática. Entretanto, a ausência de alterações significativas nos níveis de lactato e CK, nas doses testadas neste trabalho, sugere que tais peptídeos não sejam responsáveis pela a ação cardiodepressora dessa peçonha.

A ausência de alterações marcantes no pH, nos gases sangüíneos, na CK, LDH e na lactato também indicam que a acidose, a lactacidemia e as lesões teciduais, principalmente cardíacas, não são fatores importantes nas respostas pressóricas e cardiodepressoras observadas, pelo menos com a dose de 0,3 mg/kg. Estes achados sugerem, portanto, que as respostas hemodinâmicas a esta peçonha são primariamente de origem cardíaca, sem envolver fatores metabólicos ou lesões teciduais. A ausência de acidose, lactacidemia e mudanças gasosas contrastam com relatos que descrevem tais alterações para várias peçonhas não-botrópicas, e.g., *B. arietans* (Schaeffer *et al.*, 1985), *B. gabonica* (Hyslop e Marsh, 1991) e *C. v. helleri*

(Carlson *et al.*, 1975; Schaeffer *et al.*, 1979, 1984). Por outro lado, a elevação nos valores da RVP e do IRVP aos 5 min de envenenamento nos cães que receberam a dose de 1,0 mg/kg (quando houve redução acentuada e abrupta em praticamente todos os outros parâmetros analisados), juntamente com a redução na frequência cardíaca, aponta para um quadro hipóxico, com moderada acidose metabólica, possivelmente como consequência de uma redução da oferta de O<sub>2</sub> (houve redução de ~33% na pO<sub>2</sub> destes animais aos 15 min após o envenenamento).

Vários trabalhos têm mostrado que as peçonhas ofídicas são capazes de aumentar os níveis circulantes de glicose (Mohamed *et al.*, 1972; Osman e Gumaa, 1974; Gatullo *et al.*, 1988; Hyslop e Marsh, 1991) devido principalmente, a uma ação em nível hepático, ou citotoxicidade direta ou, ainda, por interferir nos mecanismos regulatórios de metabolização de glicose. Conforme demonstrado neste trabalho, não houve alterações significativas na concentração circulante de glicose, o que indica que essa peçonha não possui uma ação hiperglicemiante importante, ao contrário de outras peçonhas.

As peçonhas botrópicas são ricas em metaloproteinases hemorrágicas (hemorraginas) que são responsáveis pela extensa hemorragia local e sistêmica vista após o envenenamento (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005), tanto em animais experimentais como em humanos (Kamiguti *et al.*, 1991a,b, 1992, 1996; Gutiérrez e Lomonte, 2003). A peçonha de *B. alternatus* também contém hemorraginas (Gay *et al.*, 2005, 2009), que podem contribuir para a hemorragia vista em casos clínicos (Bauab *et al.*, 1994). Além das metaloproteinases hemorrágicas, as peçonhas botrópicas também possuem uma variedade de PLA<sub>2</sub> envolvidas nos efeitos locais e sistêmicos, inclusive a hemólise indireta (Gutiérrez e Ownby, 2003). Uma PLA<sub>2</sub> já foi caracterizada da peçonha de *B. alternatus* (Nisenbom *et al.*, 1986a,b, 1988), sendo responsável por dispnéia, taquicardia, arritmias, choque cardiovascular, hemorragias e dano tecidual (pulmão, coração, fígado e rim) em camundongos (Nisenbom *et al.*, 1986a).

Conforme mostrado na Tabela 3, não houve mudança significativa no hematócrito ao longo dos experimentos, o que indica a ausência de hipovolemia (devido à perda sanguínea através de lesões hemorrágicas) que levaria à hemoconcentração.

Esse achado indica que a hipovolemia não seria, pelo menos em cães, um fator central no choque cardiovascular produzido por essa peçonha. Essa situação contrasta com observações para certas peçonhas e espécies, em que a hipovolemia contribui para a hipotensão observada (Halmagyi *et al.*, 1965; Cevese *et al.*, 1983); já em outros casos, a hemoconcentração parece ser transitória e menos importante no choque cardiovascular (Carlson *et al.*, 1975; Schaeffer *et al.*, 1985).

As peçonhas botrópicas não exercem ação hemolítica direta, mas podem causar hemólise indireta em suspensões de hemácias lavadas *in vitro*. *In vivo*, a hemólise é pouco comum tanto experimental como na clinicamente (França e Málaque, 2003). Em acordo com isso, observamos apenas pequena hemólise transitória nos primeiros intervalos (até 15 min) de coleta de sangue, com desaparecimento desse fenômeno em seguida; tal efeito também tem sido relatado para a peçonha de *B. arietans* em ratos (Schaeffer *et al.*, 1985). Os dados para o K<sup>+</sup> sanguíneo (Tabela 1) apóiam a ausência de hemólise generalizada uma vez que não houve alteração significativa nos níveis deste íon durante o experimento. Já foi demonstrado que a hemólise severa ou maciça (causado, no caso, por PLA<sub>1</sub> de peçonha de vespa) resulta em alto nível plasmático de K<sup>+</sup> capaz de causar morte por parada cardíaca (Ho e Ko, 1988).

É possível que exista considerável variação entre espécies de animais nas respostas cardiovasculares e metabólicas a determinada peçonha. Assim, por exemplo, enquanto a hipovolemia é fator importante no choque causado pela peçonha de *B. gabonica* em cães (Cevese *et al.*, 1983), o fenômeno não ocorre em coelhos (Hyslop e Marsh, 1991). De modo semelhante, com a peçonha de *C. v. helleri*, doses pequenas (<100 µg/kg) produzem efeitos marcantes em cães (Ruiz *et al.*, 1980; Schaeffer *et al.*, 1984) enquanto doses consideravelmente maiores (1,25 a 2 mg/kg) são necessárias em ratos (Carlson *et al.*, 1975; Schaeffer *et al.*, 1979). Em ratos, a peçonha de *B. alternatus* produz hipotensão em doses <100 µg/kg (Melo, 2002), enquanto que, em cães, o efeito observado com doses abaixo de 100 µg/kg, é mínimo (dados não mostrados aqui). Além da variação interespecie nas respostas cardiovasculares, é possível que ocorram também variações na potência de peçonhas botrópicas em induzir efeitos cardiovasculares. Assim, por exemplo, em cães, as peçonhas de *B. alternatus* (presente estudo) e *B. moojeni* (Santos *et al.*, 2000; Rabelo *et al.*, 2005)

causam hipotensão marcante em doses >100 µg/kg enquanto a de *B. erythromelas* causa hipotensão profunda com doses menores (25-50 µg/kg) (Zapellini, 1991).

Não foram observadas, neste trabalho, com o protocolo *in vivo*, alterações histológicas nas fibras cardíacas ventriculares, mostrando que não houve lesão cardíaca por essa peçonha. Por outro lado, no tecido renal, foram vistas algumas alterações como descamação da parede luminal tubular proximal, bem como microaneurismas glomerulares, possivelmente em função da ação nefrotóxica dessa peçonha, o que corrobora com trabalhos experimentais (Rezende *et al.*, 1989; Burdmann *et al.*, 1993; Boer-Lima *et al.*, 1999, 2002) e clínicos (Amaral *et al.*, 1985, 1986) que relatam a IRA causada por peçonhas botrópicas, devido ao reduzido fluxo sanguíneo renal, visto que o envenenamento aconteceu por pelo menos 4 horas.

A análise da cinética da peçonha administrada por via i.v. mostrou queda rápida (fase de distribuição) nas concentrações circulantes durante os primeiros 30 min, seguida por uma queda mais lenta e bastante constante (fase de eliminação) nos intervalos posteriores. Esse perfil se assemelha muito àquele visto com as peçonhas de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi*, administradas i.v. em ratos e coelhos (dados não publicados do nosso laboratório), e componentes dessas peçonhas, tais como uma miotoxina de *B. asper* (Moreno e Gutiérrez, 1988), a batroxobina de *B. atrox* (Sugai *et al.*, 1986; Meier *et al.*, 1988) e a jararafibrase-I de *B. jararaca* (Tanigawa *et al.*, 1994), bem como peçonhas não botrópicas, e.g., *Naja* spp. (Ismail *et al.*, 1996), *Vipera berus* (Audebert *et al.*, 1994) e *Walterinnesia aegyptia* (Ismail *et al.*, 1998). Interessantemente, os níveis circulantes de peçonha ainda eram bastante elevados após 4hs (1/3 da concentração observada após 2 min), em um intervalo onde a pressão arterial já há havia retornado ao nível basal. Este achado mostra que a persistência de peçonha na circulação não implica, necessariamente, na manutenção da crise hipotensora, talvez devido ao esgotamento dos mediadores envolvidos ou algum tipo de dessensibilização; situação contrária foi vista com o débito cardíaco e os indicadores de trabalho do coração, que permaneceram deprimidos durante todo o experimento.

## ***CONCLUSÕES***

## 6 – CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

1. A peçonha de *B. alternatus* causa hipotensão e disfunção cardíaca em cães anestesiados, sem alterações eletrocardiográficas e metabólicas relevantes.
2. A depressão persistente do músculo cardíaco leva ao baixo débito cardíaco e choque circulatório, possivelmente devido à ação conjunta de (metalo) proteases, PLA<sub>2</sub> e/ou peptídeos da peçonha.

## **CAPÍTULO II**

## ***INTRODUÇÃO***

# 1 – INTRODUÇÃO

A atuação de componentes de peçonhas sobre a vasculatura e o coração produz efeitos imediatos, principalmente hipotensão e distúrbios cardíacos, além de efeitos tardios, tais como hemorragia sistêmica, choque hipovolêmico e IRA.

## 1.1- Ações cardíacas diretas de peçonhas ofídicas

As alterações hemodinâmicas causadas por peçonhas e toxinas ofídicas podem originar de uma ação direta no coração e/ou vasculatura, ou de uma ação indireta na qual a peçonha estimula a liberação ou formação de mediadores endógenos que então atuam sobre o coração e/ou vasculatura para produzir os efeitos observados. De modo geral, os efeitos refletem uma combinação ou mistura de ações diretas e indiretas das peçonhas (Lee e Lee, 1979).

Estudos *in vivo* têm demonstrado que a injeção em animais, de peçonha bruta de diversas espécies de serpentes, produz uma série de mudanças na frequência de batimentos (alterações cronotrópicas), na contratilidade (alterações inotrópicas) e na condutibilidade elétrica (arritmias) do músculo cardíaco, as quais variam em grau e frequência, de acordo com a peçonha, a dose, a via e o animal teste usado (Russell *et al.*, 1962; Halmagyi *et al.*, 1967; Weiss e McIsaac, 1971; Ramsey *et al.*, 1972; Schaeffer *et al.*, 1973; Carlson *et al.*, 1975; Weiser *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1986; Tibballs *et al.*, 1989; Alloatti *et al.*, 1991a; Hyslop e Marsh, 1991; Abdalla *et al.*, 1992; Omran e Abdel-Nabi, 1997; Tibballs, 1998).

Em consonância com isso, vários estudos têm demonstrado uma ação cardíaca direta, usando tanto a peçonha bruta (Ramsey *et al.*, 1971; Raina *et al.*, 1978; Lee e Lee, 1979; Posner *et al.*, 1981; Kempford e Hawgood, 1987; Alloatti *et al.*, 1991b,c; Abdalla *et al.*, 1992; Alzahaby *et al.*, 1995; al-Shammary *et al.*, 1998), componentes purificados (Abel *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 1977; Fletcher *et al.*, 1982; Barrington *et al.*, 1986; Santos *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2001; El-Saadani e El-Sayed, 2003), bem como em vasos coronários isolados (Glusa *et al.*, 1991) e cardiomiócitos em cultura (Mbugua *et al.*, 1988a,b; van Aswegen *et al.*, 1996).

## 1.2 - Componentes de peçonhas ofídicas com atuação direta em tecido cardíaco

Apesar da grande variedade de enzimas e toxinas presentes em peçonhas ofídicas, as investigações sobre suas ações cardíacas (funcionais e/ou morfológicas) têm sido limitadas a um número relativamente pequeno de toxinas purificadas, sendo estas principalmente as cardiotoxinas (comuns nas peçonhas da família Elapidae) (ver revisão em Harvey, 1985; Sun e Walker, 1986; Ménez *et al.*, 1990; Fletcher e Jiang, 1993; Kumar *et al.*, 1997) e PLA<sub>2</sub> (principalmente de elapídeos) (Fletcher *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1993; Huang e Gopalakrishnakone, 1996), mas há também uma variedade de outras toxinas como a Mojave toxina de *Crotalus scutulatus scutulatus* (Bieber *et al.*, 1975), a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* (Santos *et al.*, 1990), a toxina CM55 de *Ophiophagus hannah* (Gomes *et al.*, 2001), a toxina básica de *C. adamanteus* (Abel *et al.*, 1973), atroxina, um agonista de canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem-dependentes da peçonha de *Crotalus atrox* (Hamilton *et al.*, 1985), taicatoxina, uma toxina isolada da peçonha de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* e que existe em forma de um complexo contendo um peptídeo tipo  $\alpha$ -neurotoxina, uma PLA<sub>2</sub> neurotóxica e um inibidor de serina proteinase (na proporção de 1:1:4, este complexo bloqueia canais de Ca<sup>2+</sup> cardíacos de alto limiar; Possani *et al.*, 1992; Fantini *et al.*, 1996), e peptídeos potencializadores de bradicinina (El-Saadani e El-Sayed, 2003). Por outro lado, há poucos estudos sobre as ações cardíacas diretas de proteinases (hemorrágicas ou não) de peçonhas de serpentes usando preparações cardíacas (Glusa *et al.*, 1991).

## 1.3 - Mecanismos de ação cardiotoxica de peçonhas ofídicas

A perfusão de coração isolado ou incubação de átrios ou músculo ventricular com peçonha geralmente resulta em uma diminuição na força/amplitude de contração (efeito inotrópico negativo), com ou sem alterações na frequência de contração/batimentos (efeito cronotrópico), embora possa ocorrer um aumento nesses parâmetros nos momentos iniciais do tratamento (Petkovic *et al.*, 1979; Posner *et al.*, 1981; Alloatti *et al.*, 1986; Sun e Walker, 1986; Kempford e Hawgood, 1987; Abdalla *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1993; Alzahaby *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 2001; Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004). Estudos com peçonhas de *Dendroaspis* spp., em cardiomiócitos de rato indicaram a presença de várias toxinas capazes de

abolir gradativamente os batimentos espontâneos das células, com atividades aditivas e sinérgicas entre elas (Mbugua *et al.*, 1988a,b).

Os efeitos sobre o cronotropismo e o inotropismo podem ter diversas origens. Alloatti *et al.* (1986) sugeriram que a liberação de mediadores adrenérgicos e colinérgicos contribuía para o efeito cardiotoxico da peçonha de *B. gabonica* em coração isolado de cobaia. Por outro lado, Alzahaby *et al.* (1995) chegaram à conclusão contrária em relação à ação da peçonha de *C. vipera* em átrios isolados de ratos, i.e., não havia participação desses dois sistemas, mas havia envolvimento de canais de Na<sup>+</sup>. Fatehi-Hassanabad e Fatehi (2004) demonstraram que a ação cronotrópica e inotrópica positivas da peçonha de *V. lebetina* era devida à ativação de receptores β-adrenérgicos, enquanto as negativas envolviam a ação de PLA<sub>2</sub>; um papel para a atividade PLA<sub>2</sub> também foi sugerido para a ação inotrópica negativa da crotoxina da peçonha de *C. d. terrificus* (Santos *et al.*, 1990).

Fletcher *et al.* (1982) observaram que a PLA<sub>2</sub> básica de *N. nigricollis* diminuiu a contratilidade de átrios isolados por reduzir a amplitude e o tempo de repolarização do potencial de ação e prolongar a latência para o início do mesmo, sem envolvimento de canais rápidos de sódio ou da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase do tecido. No que diz respeito à ação cardíaca de PLA<sub>2</sub>, não há necessariamente uma correlação entre sua cardiotoxicidade e a atividade enzimática (Barrington *et al.*, 1986; Rosenberg, 1986; Dhillon *et al.*, 1987). Huang *et al.* (1993) relataram que a cardiotoxicidade da PLA<sub>2</sub> ácida de *Ophiophagus hannah* não envolveu a síntese de prostaglandinas, nem os sistemas adrenérgico, colinérgico e histaminérgico, nem os canais lentos de Ca<sup>2+</sup> e os rápidos de Na<sup>+</sup>.

A diminuição na força contrátil é frequentemente acompanhada de contratatura geral da musculatura (vista como uma subida na linha de base das contrações), seja em coração isolado ou em átrio isolado (Raina *et al.*, 1978; Harvey, 1985; Sun e Walker, 1986; Alloatti *et al.*, 1991b; Huang *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2001); esse fenômeno é geralmente considerado como indicativo de distúrbios na entrada ou no movimento intracelular de cálcio. Assim, Fantini *et al.* (1996) sugeriram que a diminuição na contratilidade de cardiomiócitos vista com taicatoxina, uma toxina bloqueadora de canais de Ca<sup>2+</sup> dependente de voltagem, era devido à redução da amplitude e duração do potencial de ação. Outros estudos também têm atribuído a diminuição na

contratilidade e eventual citotoxicidade em cardiomiócitos às alterações no fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula (Fletcher *et al.*, 1982; Alloatti *et al.*, 1986; Busso *et al.*, 1988; Tzeng e Chen, 1988; Huang *et al.*, 1993; El-Saadani e El-Sayed, 2003), e que este efeito pode ser amenizado na presença de altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (Petkovic *et al.*, 1983; Sun e Walker, 1986; Kempford e Hawgood, 1987).

#### **1.4 - Papel de autacóides na ação cardíaca de peçonhas**

Conforme indicado na seção anterior, as peçonhas ofídicas podem ter efeitos marcantes sobre o cronotropismo e inotropismo mediados por catecolaminas e/ou acetilcolina (Alloatti *et al.*, 1986; Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004), embora isso nem sempre seja o caso (Alzahaby *et al.*, 1995). Além disso, há evidências de que a  $\text{PLA}_2$  também contribui para a ação inotrópica negativa de peçonhas em tecido cardíaco (Santos *et al.*, 1990; Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004). Tendo em vista que as peçonhas botrópicas estimulam a liberação de autacóides, é interessante avaliar o possível envolvimento de alguns destes mediadores na ação cardíaca de peçonha botrópica.

O músculo cardíaco é inervado por fibras simpáticas (adrenérgicas), cujo mediador é noradrenalina, e por fibras parassimpáticas (colinérgicas), cujo mediador é acetilcolina (Araujo, 1997; Rang e Dale, 2006; Guyton e Hall, 2006). A liberação da noradrenalina das terminações adrenérgicas e subsequente ativação dos receptores adrenérgicos (principalmente dos subtipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) (Fraser e Venter, 1980; Moura, 2002) aumenta a excitabilidade e velocidade de condução, a frequência cardíaca, e a força de contração do músculo cardíaco em consequência de uma elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Araújo, 1997; Guyton e Hall, 2006).

A estimulação dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  cardíacos ativa a enzima adenilil ciclase (AC), cujo efeito é elevar a concentração do segundo mensageiro intracelular, monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), a partir de ATP (Balligand, 1999; Moura, 2002). O acoplamento dos adrenoceptores  $\beta$  à AC é mediado por uma proteína estimulatória ( $G_s$ ) (Onaram *et al.*, 1993; Johnson, 1998; Moura, 2002), e a formação de AMPc promove uma elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que aumenta o inotropismo, cronotropismo e a velocidade de condução nas fibras cardíacas (Kuschel *et al.*, 1999;

Moura, 2002). Em determinadas situações, o adrenoceptor  $\beta_2$  pode se acoplar também à proteína  $G_i$ , que inibe a adenilil ciclase e, portanto, a formação de AMPc (Xiao et al., 1999; Priviero, 2006). Os antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos propranolol (não-seletivo para  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) e atenolol (seletivo  $\beta_1$ ) podem inibir os efeitos inotrópicos e cronotrópicos da estimulação adrenérgica em músculo cardíaco.

A estimulação parassimpática libera a acetilcolina pelas terminações vagais e leve à redução na frequência cardíaca e interferência na atividade elétrica através da ativação de receptores muscarínicos do subtipo  $M_2$ , podendo até interromper ou bloquear a excitação do nodo sinusal ou mesmo bloquear a transmissão do impulso dos átrios para os ventrículos através do nodo atrioventricular (Guyton e Hall, 2006). A ação da acetilcolina é bloqueada pela atropina, um antagonista muscarínico não-seletivo.

O óxido nítrico, um co-produto da metabolização da L-arginina em L-citrulina através da enzima NO sintase (NOS), é um mediador importante no sistema cardiovascular, onde contribui para a regulação da pressão arterial. A ação fisiológica do NO é mediada principalmente, mas não exclusivamente, pela ativação da guanilato solúvel, enzima responsável pela conversão de GTP em GMPc, que por sua vez ativa uma proteína cinase dependente de GMPc (PKG) e desencadeia uma cascata de fosforilações intracelulares que, entre outras coisas, regula o influxo de  $Ca^{2+}$  para dentro dos miócitos, levando ao relaxamento do músculo vascular e cardíaco (Mery *et al.*, 1991; Dias, 2007) e diminuindo a sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$  (Yasuda e Lew, 1997; Dias, 2007). O L-NAME, um inibidor não-seletivo da NOS, diminui a produção do NO, podendo levar à hipertensão e alterações na função cardíaca.

Além dos mediadores mencionados acima, é conhecido da literatura que há também no músculo cardíaco receptores  $H_2$  histaminérgicos, cuja ativação pela histamina leva ao aumento da frequência e do débito cardíacos (Rang e Dale, 2006).

Por fim, a ativação dos receptores adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos, entre outros, pode levar à estimulação de  $PLA_2$  intracelulares e formação de ácido araquidônico, precursor de mediadores lipídicos como as prostaglandinas e tromboxano, através da ação da ciclooxigenase, que é inibida pela indometacina. A

formação destes mediadores também pode ser desencadeada por PLA<sub>2</sub> presente na própria peçonha.

## ***OBJETIVOS***

## 2 – OBJETIVOS

Considerando que há poucos estudos sobre a ação cardíaca direta de peçonhas botrópicas, investigamos em átrio direito isolado de rato:

- 1 - O efeito da peçonha de *B. alternatus* sobre o cronotropismo e o inotropismo do átrio, bem como as atividades de CK e CK-MB.
- 2 - As alterações histológicas provocadas pela peçonha de *B. alternatus*.
- 3 - Os mediadores envolvidos nos efeitos cronotrópicos e inotrópicos do átrio, mediante ação da peçonha de *B. alternatus*.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 - Animais**

Ratos Wistar, pesando 300-400 g, foram obtidos do CEMIB e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, sob ciclo de luz/escuro de 12 h a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , com livre acesso à comida e água, até o momento do experimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UNICAMP (protocolo nº 783-1), e realizados de acordo com as recomendações éticas gerais do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

### **3.2 - Peçonha**

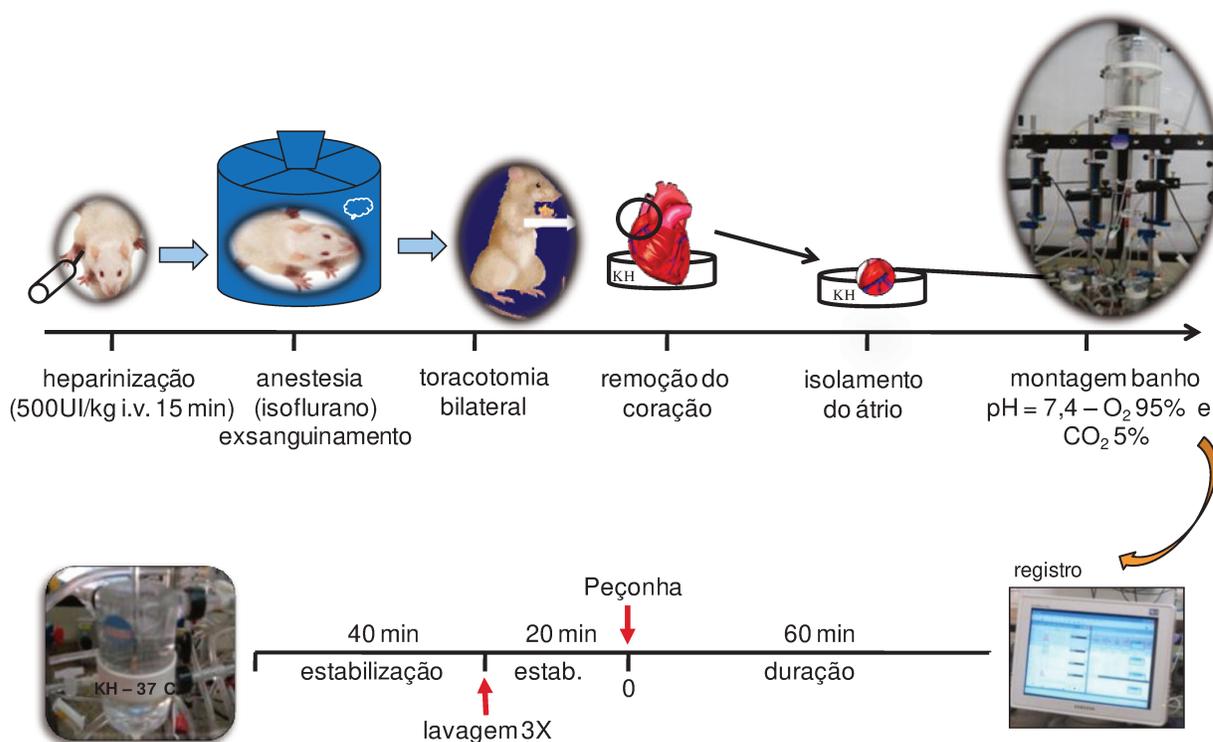
A peçonha de *B. alternatus* fornecida pelo Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP) foi obtida de exemplares adulta de ambos os sexos, liofilizada e estocada a  $-20^\circ \text{C}$  até o uso. A peçonha foi diluída, no momento da incubação, em solução de Krebs-Henseleit (200  $\mu\text{l}$ ).

### **3.3 - Experimento em ratos**

#### **3.3.1 - Átrio direito isolado incubado com peçonha de *B. alternatus***

Os ratos foram anestesiados com isoflurano e em seguida foram exsanguinados por secção dos vasos cervicais. Em seguida, foi realizada a torcotomia bilateral e os corações foram rapidamente removidos e mergulhados em solução gelada de Krebs-Henseleit (composição, em mM: NaCl 118; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2$  2,5;  $\text{MgSO}_4$  0,45;  $\text{NaHCO}_3$  25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,03; D-glicose 11,1; ácido ascórbico 0,14). Em seguida, o átrio direito foi isolado do músculo cardíaco e limpo antes de ser montado sob tensão de 1 g em um banho de órgão contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit mantida a  $37^\circ \text{C}$  e continuamente gaseificada com 5%  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$  e a um pH de 7,5 (Gasparetti *et al.*, 2002; Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004). A frequência e a força contrátil foram registradas continuamente através de um transdutor isométrico acoplado a um pré-amplificador e computador (ADInstruments, Castle Hill, Austrália), e os registros foram feitos com Software Chart 6 (PowerLab).

Após 40 min de estabilização, os átrios foram lavados três vezes com a solução de Krebs-Henseleit e, após adição de nova solução, foram incubados por mais 20 min para permitir recuperação de eventuais efeitos das lavagens. Em seguida, foram incubados com solução de Krebs-Henseleit. O grupo tratado foi incubado com peçonha nas doses (0,25; 0,5; 1,0 ou 2 mg/ml, diluída em 200  $\mu$ l da solução Krebs-Henseleit); nos controles, foram adicionados 200  $\mu$ l de Krebs-Henseleit. A frequência cardíaca atrial e a força de contração foram monitoradas durante 60 min (Fig. 1). As concentrações de peçonha foram escolhidas baseadas em experimentos preliminares usando a concentração 0,05 mg/ml e posteriormente foram testadas concentrações maiores, seguindo uma escala linear.



**Figura 1.** Esquema dos protocolos, realizados com átrio direito isolado de rato

### 3.3.2 - Peçonha dialisada e não dialisada

A peçonha de *B.alternatus* foi dialisada contra solução de NaCl a 0,9% por 24 h em geladeira (colunas de até 2000 kDa). Os átrios, previamente isolados, foram

incubados, após o período de estabilização (descrito no item 3.3.1) com a peçonha dialisada por 60 min, para a análise do envolvimento de substâncias de baixa massa molecular ( $\leq 2000$  kDa), diluída em KH no momento do uso (200  $\mu$ l). Foram feitas coletas da solução de Krebs nos tempos basais e finais para a avaliação dos níveis de CK e CK-MB liberadas no banho (200  $\mu$ l). Foram, ainda, feitos experimentos com a peçonha sem o processo de diálise, diluída no mesmo tempo da peçonha dialisada (geladeira por 24 h) para comparação do efeito entre os protocolos.

### **3.3.3 - Peçonha aquecida**

A peçonha de *B.alternatus* foi aquecida por 20 min a 100°C. Os átrios, previamente isolados foram incubados, após o período de estabilização (descrito no item 3.3.1) com a peçonha aquecida (diluída no momento do uso em 200  $\mu$ l de KH), para a análise do envolvimento de substâncias proteolíticas e enzimáticas. Foram feitas coletas da solução de Krebs nos tempos basais e finais para a avaliação dos níveis de CK e CK-MB liberadas no banho (200  $\mu$ l).

### **3.3.4 - Alterações metabólicas**

Imediatamente após a estabilização e o final do experimento, foi coletado do banho um volume de 200  $\mu$ l (cada) para a dosagem das enzimas creatinoquinase (CK) e creatinoquinase-MB (CK-MB) para a quantificação dessas enzimas no banho. A atividade das enzimas CK e CK-MB foi determinada usando kits comerciais (CK-NAC e CK-MB, respectivamente, ambos pelo método cinético UV; Laborlab, São Paulo, SP), seguindo-se as instruções do fabricante, através de um espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 800) e os resultados foram expressos em U/ml.

### **3.3.5 - Histologia**

Os átrios após o término da incubação foram fixados em formol tamponado (10%) durante 18 h. Em seguida foram lavados 3 vezes por 15 min. Para a desidratação dos tecidos foram utilizados gradientes crescentes de alcoóis (etanol), seguido de diafanização em xilol, embebição e inclusão em parafina (Histosec-Merck). Secções de 5  $\mu$ m de espessura foram obtidas usando um micrótomo (Leica RM 2245, Alemanha), e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para posterior

análise das alterações histológicas (Boer-Lima *et al.*, 1999, 2002). As lâminas foram examinadas em microscópio Leica DM 5000B e as imagens foram captadas, processadas e analisadas usando uma câmara CCD LEICA DFC 300 FX e softwares de processamento e análises de imagem LEICA Q Win Plus v.3.2.0.

### **3.3.6 - Incubação de átrios com antagonistas e peçonha**

Além dos experimentos descritos acima foram realizados experimentos com antagonistas e uma concentração fixa da peçonha (1,0 mg/ml) escolhida baseada na curva dose resposta obtida no item 3.3.1. Nestes experimentos, os átrios foram pré-incubados com os seguintes antagonistas antes da adição de peçonha:

1. Propranolol (5  $\mu$ M) – antagonista não seletivo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Santos *et al.*, 1990; Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004).
2. Atenolol (10  $\mu$ M) – antagonista  $\beta_1$ -adrenérgico seletivo (Santos *et al.*, 1990; Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004).
3. Atropina (5,6  $\mu$ M) – antagonista colinérgico não seletivo dos receptores muscarínicos (Zapellini, 1991).
4. Cimetidina (10  $\mu$ M) – antagonista seletivo dos receptores  $H_2$ -histaminérgico (Alzahaby, 1995).
5. Indometacina (10  $\mu$ M) – inibidor da ciclooxigenase (Santos *et al.*, 1990).
6. L-NAME (300  $\mu$ M) – inibidor da enzima óxido nítrico sintase (Fatehi-Hassanabad e Fatehi, 2004).

Com exceção da indometacina que ficou em contato com os átrios por 20 min, para todos os outros antagonistas foi feito uma pré-incubação por 10 min, antes da adição da peçonha seguida por incubação por 60 min.

As concentrações dos antagonistas foram escolhidas baseadas em experimentos com os respectivos agonistas para verificar a eficácia da inibição. Esses resultados serviram como controle positivo para os referidos antagonistas versus peçonha (e em todos os casos a inibição da resposta ao agonista foi >95% (dados não mostrados).

## ***RESULTADOS***

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Efeitos da peçonha de *B. alternatus* sobre o átrio direito isolado de rato

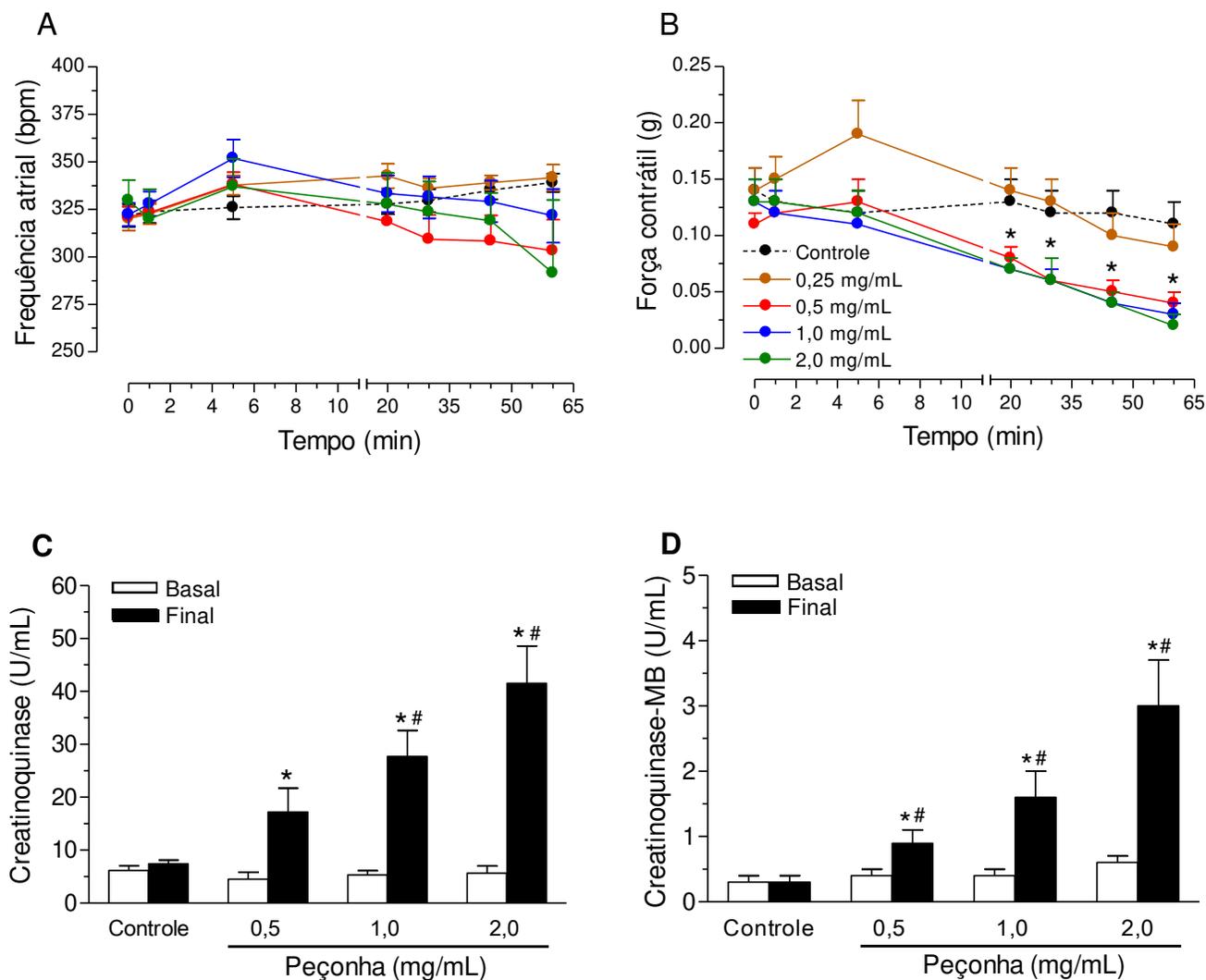
A incubação dos átrios com peçonha de *B. alternatus* (0,25-2,0 mg/ml) causou variações não significativas na frequência atrial durante o experimento (Fig. 2A). Por outro lado, a força contrátil sofreu uma redução significativa (25-41%) a partir dos 20 min de incubação, que continuou progressivamente até o final do experimento (67-79%) com as três maiores concentrações de peçonha. Não houve redução significativa na força contrátil com a concentração de 0,25 mg/ml, mas ocorreu aumento não significativo, na frequência atrial aos 5 min (Fig. 2B).

A diálise da peçonha (1,0 mg/ml) contra salina por 24 h (para remover substâncias de baixa massa molecular como peptídeos e aminas biogênicas contidas na peçonha) não afetou a frequência atrial e teve pouco efeito sobre a queda progressiva na força contrátil (houve apenas pequeno retardamento no início da queda quando comparada com a peçonha não dialisada); a resposta à peçonha não dialisada, mas estocada nas mesmas condições que a dialisada (em solução salina a 4 °C durante 24 h), foi semelhante à da peçonha preparada e testada no dia (Fig. 3A,B). Por outro lado, o aquecimento da peçonha (100°C, 20 min) reduziu a queda na força contrátil causada por peçonha não aquecida significativamente aos 20, 30, 45 e 60 min; não houve alteração na frequência cardíaca (Fig. 3C,D).

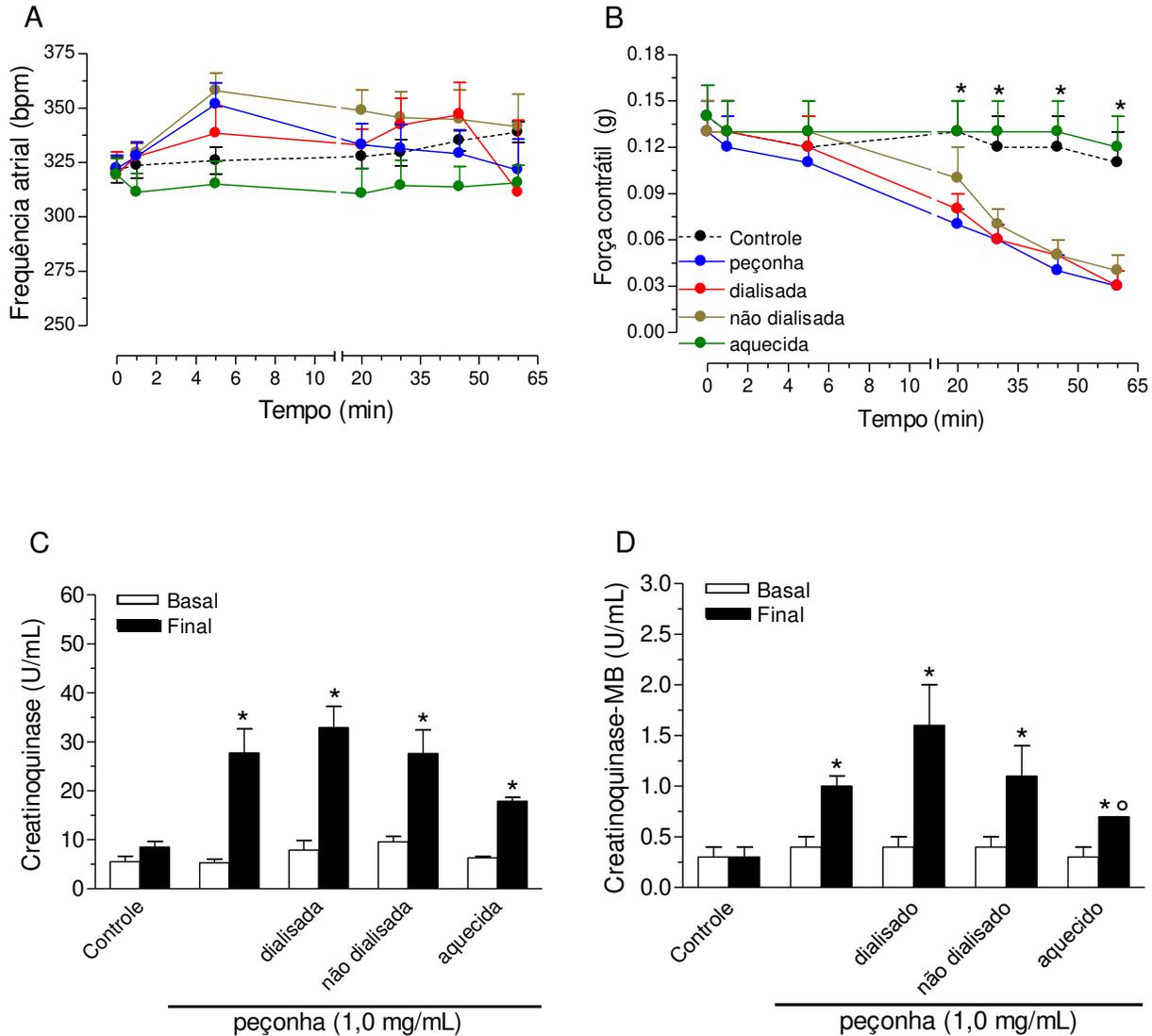
### 4.2 - Liberação de enzimas pela peçonha de *B. alternatus*

A Fig. 2C mostra um aumento significativo na liberação de CK em todas as concentrações de peçonha. De modo semelhante, a Fig. 2D mostra um aumento significativo na liberação da CK-MB, específica para tecido cardíaco, com as três concentrações de peçonha.

A peçonha dialisada e a não dialisada aumentou significativamente a liberação tanto da CK quanto da CK-MB (Fig. 3CD). Já o aquecimento (100°C, 20 min) da peçonha atenuou a liberação dessas duas enzimas em relação à peçonha não aquecida, não dialisada e dialisada (Fig. 3D).



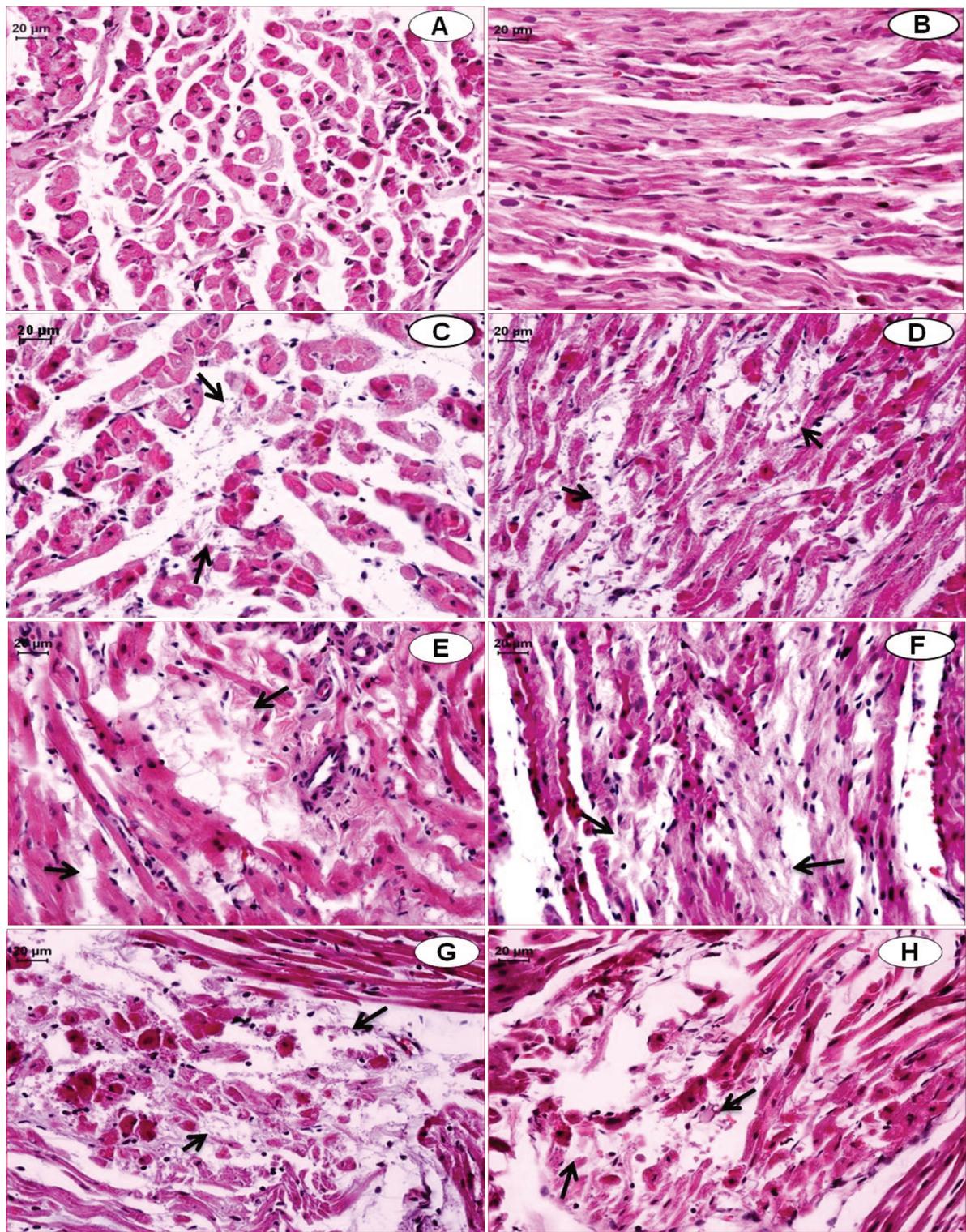
**Figura 2.** Ação da peçonha de *B. alternatus* (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml; n=6 cada) e solução de Krebs (controle, n=6) sobre a frequência atrial (**A**), a força contrátil (**B**), e a liberação de creatinoquinase (CK) (**C**) e creatinoquinase – MB (CK-MB) (**D**), em átrio direito isolado de rato. O grupo controle foi incubado com solução de Krebs (200  $\mu$ l) sem peçonha no banho. As colunas pretas correspondem à atividade no término do experimento, após 60 min de incubação com peçonha. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM. \*,#p<0,05 comparado aos valores basais (\*) e ao grupo controle (Krebs) (#). (teste *t* de Student ou ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).



**Figura 3.** Efeito da diálise e do aquecimento da peçonha de *B. alternatus*, sobre a frequência (**A**), força contrátil (**B**) e liberação de CK (**C**) e CK-MB (**D**), de átrio direito isolado de rato. A diálise foi feita durante 24 h contra solução de NaCl 0,9% a 4 °C. A peçonha não dialisada foi mantida a 4 °C pelo mesmo período de tempo. O aquecimento da peçonha foi feito a 100 °C por 20 min. As colunas pretas correspondem à atividade no término do experimento, após 60 min de incubação com peçonha. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=7-9). \*, °p<0,05 comparado aos valores basais (\*) e com a peçonha somente (°) (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).

### **4.3 - Análise histológica de átrio direito incubado com peçonha de *B. alternatus***

A análise histológica mostrou extensas lesões (mionecrose), caracterizada por rompimento da membrana celular e desorganização das fibras musculares, nos átrios após 60 min de incubação com as três maiores concentrações da peçonha (Fig. 4). Houve discreta diferença no perfil e extensão do dano causado pelas três concentrações investigadas.



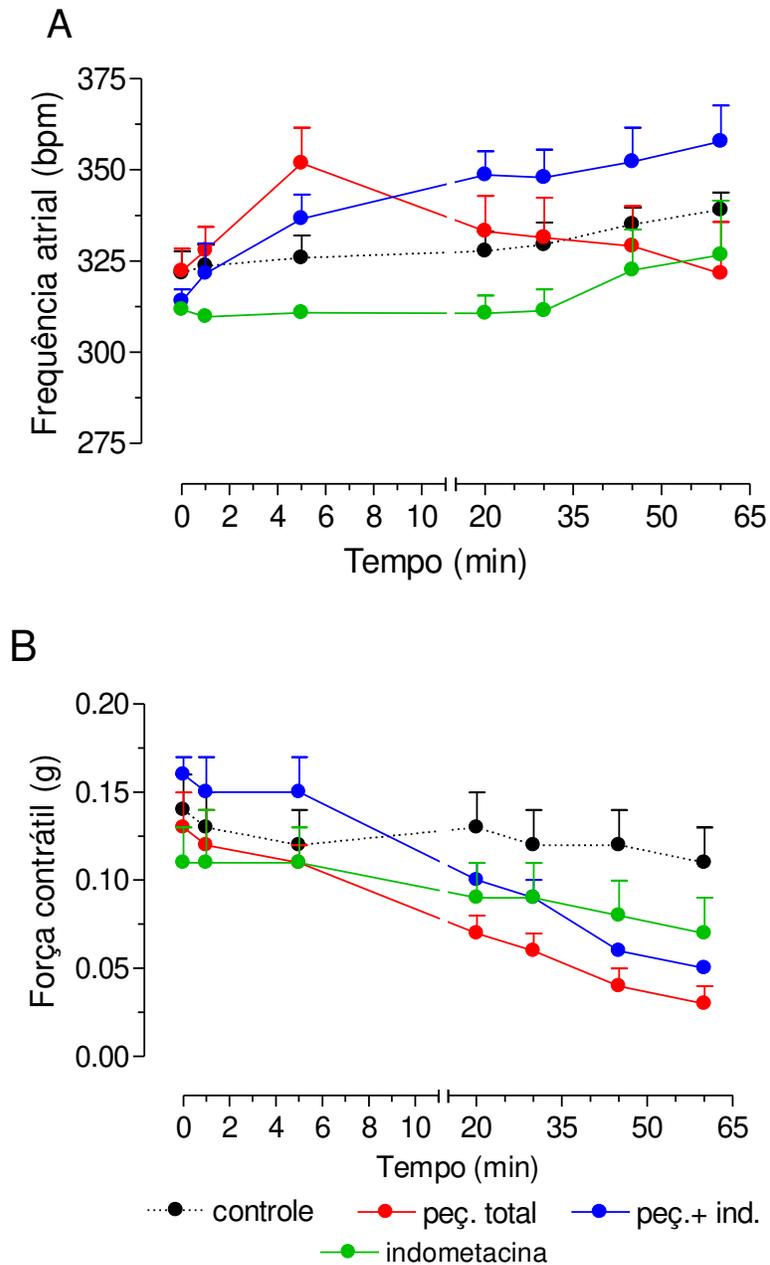
**Figura 4.** Lesão tecidual em átrio direito de rato incubado com peçonha de *B. alternatus* durante 60 min. **A e B** - controle (60 min de incubação sem peçonha), **C e D** - 0,5 mg/ml, **E e F** - 1,0 mg/ml e **G e H** - 2,0 mg/ml de peçonha de *B. alternatus*. As setas indicam dano à membrana celular de cardiomiócitos e desorganização das fibras musculares. Cortes transversal (**A, C, E e G**) e longitudinal (**B, D, F e H**). Coloração com HE. Barras de escala: 20 μm.

#### **4.4 - Efeito de diferentes antagonistas sobre as alterações causadas pela peçonha de *B. alternatus* em átrio direito isolado de ratos**

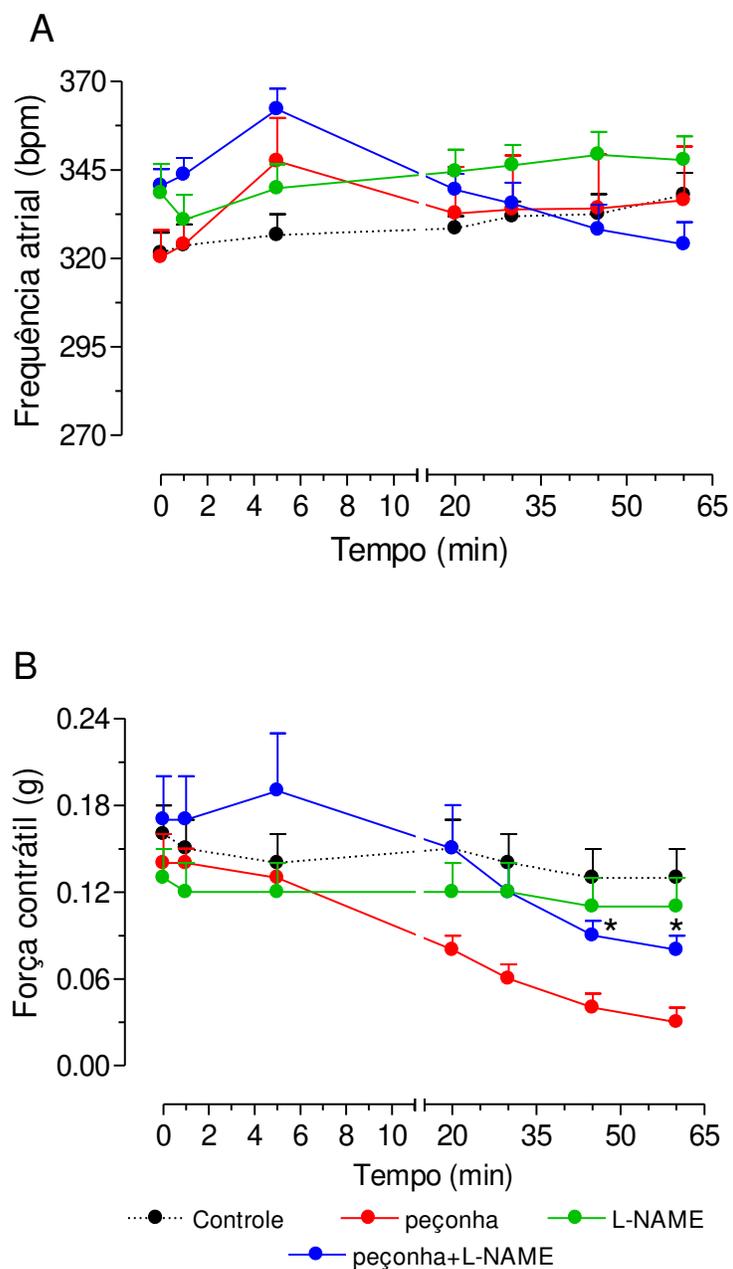
A Figura 5A mostra que a pré-incubação com indometacina (10  $\mu$ M) não alterou significativamente a freqüência atrial e não produziu alterações significativas na resposta à peçonha de *B. alternatus* (1,0 mg/ml), embora houvesse um aumento gradativo neste parâmetro até o final do experimento. A queda na força contrátil causada pela peçonha também não sofreu alteração significativa na presença da indometacina (Fig. 5B).

Na presença do L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima NOS, não houve nenhuma alteração significativa na frequência atrial (Fig. 6A), mas houve atenuação significativa da queda na força contrátil, normalmente provocada pela peçonha, especialmente de 30 min em diante (Fig. 6B).

Dos outros antagonistas testados (propranolol, atenolol, e atropina), nenhum deles inibiu ou potencializou os efeitos da peçonha de *B. alternatus* sobre o cronotropismo e inotropismo do átrio direito isolado (resultados não mostrados).



**Figura 5.** Ausência de efeito da indometacina (10  $\mu$ M) na ação da peçonha de *B. alternatus* (1,0 mg/ml) sobre a frequência atrial (**A**) e a força contrátil (**B**) em átrio direito isolado de rato. **A** - frequência atrial e **B** - força contrátil. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de 6 átrios por grupo.



**Figura 6.** Efeito do L-NAME (300  $\mu$ M) na ação da peçonha de *B. alternatus* (1,0 mg/ml) sobre a frequência atrial (**A**) e a força contrátil (**B**) em átrio direito isolado de rato. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de 6 átrios por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo incubado com a peçonha total (ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer).

## ***DISCUSSÃO***

## 5 - DISCUSSÃO

A incubação de átrio direito isolado de rato com a peçonha de *B. alternatus* (0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml) resultou em redução progressiva da força contrátil (inotropismo negativo) a partir dos 20 min de experimentação. A redução somente do inotropismo sugere um efeito mediado por mecanismos independentes do sistema colinérgico, isso porque não foi vista alteração na frequência cardíaca, que se manteve estável até o final do experimento. O efeito inotrópico negativo da peçonha talvez esteja relacionado a uma ação sobre a membrana celular dos cardiomiócitos atriais, interferindo no mecanismo contrátil normal. Essa conclusão corrobora com a de Santos *et al.* (1990) sobre a ação inotrópica negativa da crotoxina (PLA<sub>2</sub> básica) da peçonha da cascavel *Crotalus durissus terrificus*. Fletcher *et al.* (1982) observaram que a PLA<sub>2</sub> básica de *Naja nigricollis* diminuiu a contratilidade de átrios isolados por reduzir a amplitude e o tempo de repolarização do potencial de ação e por prolongar a latência para o início do mesmo, sem envolvimento de canais rápidos de sódio ou da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase do tecido. Mais recentemente, Fatehi-Hassanabad e Fatehi (2004) demonstraram que as ações cronotrópicas e inotrópicas positivas da peçonha de *Vipera lebetina* eram devidas à ativação de receptores β-adrenérgicos, enquanto os efeitos negativos envolviam a ação de PLA<sub>2</sub>. Por outro lado, Alzahaby *et al.* (1995) relataram que a ação cardíaca da peçonha de *Cerastes vipera* em átrios isolados de ratos não envolvia a participação desses dois sistemas, mas havia envolvimento de canais de Na<sup>+</sup>.

A diminuição na força contrátil é frequentemente acompanhada de contratura geral da musculatura (vista como uma subida na linha de base das contrações), seja em coração isolado ou em átrio isolado exposto a peçonhas ou toxinas (Raina *et al.*, 1978; Harvey, 1985; Sun e Walker, 1986; Alloatti *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2001), e é geralmente considerada como indicativo de distúrbios na entrada ou movimento intracelular de cálcio. Assim, Fantini *et al.* (1996) sugeriram que a diminuição na contratilidade de cardiomiócitos incubados com taicatoxina, uma toxina bloqueadora de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem, era devida à redução da amplitude e duração do potencial de ação. Outros estudos também têm atribuído a diminuição na contratilidade e eventual citotoxicidade em cardiomiócitos e alterações no fluxo de Ca<sup>2+</sup> para dentro da célula (Fletcher *et al.*, 1982; Alloatti *et al.*, 1986; Huang *et*

*al.*, 1993; El-Saadani e El-Sayed, 2003), sendo que esse efeito pode ser amenizado na presença de altas concentrações de  $Ca^{2+}$  (Petkovic *et al.*, 1983; Sun e Walker, 1986; Kempford e Hawgood, 1987). Entretanto, tal alteração (contratura geral da musculatura) não foi observada aqui com a peçonha de *B. alternatus*.

Por outro lado, o aumento na liberação da CK e CK-MB observado no final dos experimentos apontou para lesão dos cardiomiócitos atriais, o que poderia contribuir para a redução progressiva da força contrátil durante o experimento. Essa conclusão foi corroborada pela análise histológica que mostrou extensa mionecrose após incubação com a peçonha. Esses resultados divergem do dano cardíaco limitado observado após a administração intramuscular da peçonha de *Bothrops asper* (Chaves *et al.*, 1989) e sua metaloproteinase hemorrágica (BaP<sub>1</sub>) (Escalante *et al.*, 2004) e da peçonha de *B. alternatus* (Acosta de Pérez *et al.*, 1996) em camundongos; essa divergência provavelmente, reflita diferenças nos modelos (*in vivo* versus *in vitro*) e nas vias de administração (injeção i.m. versus incubação da preparação diretamente com a peçonha). Por outro lado, as alterações histológicas vistas aqui estão de acordo com estudos que mostram que a injeção de outras peçonhas ou toxinas *in vivo* (Nikai *et al.*, 1984, 1985; Huang e Gopalakrishnakone, 1996; Anderson e Ownby, 1997; al-Shammary *et al.*, 1998) ou a perfusão de coração isolado com peçonha ou toxina purificada (Abel *et al.*, 1973; Unkovic-Cvetkovic *et al.*, 1983; Kempford e Hawgood, 1987; Santos *et al.*, 1990) também resulta em dano morfológico cardíaco.

A mionecrose observada aqui provavelmente foi mediada pela PLA<sub>2</sub> da peçonha (Nisenbom *et al.*, 1986a,b, 1988; Ponce-Soto *et al.*, 2007), conforme também relatada para a PLA<sub>2</sub> da crotoxina (Santos *et al.*, 1990) e a PLA<sub>2</sub> da peçonha de *Crotalus atrox* (Hamilton *et al.*, 1985). O fato de a diálise da peçonha ter tido pouco efeito sobre a queda na força contrátil sugere que os componentes da peçonha responsáveis por essa ação não são de baixa massa molecular (peptídeos diversos e aminas biogênicas) que seriam removidas pela diálise. Já a resposta atenuada vista após aquecimento da peçonha (100°C, 20 min), indica que os componentes envolvidos são sensíveis à alta temperatura, sendo provavelmente enzimas: os candidatos mais plausíveis são a PLA<sub>2</sub> e/ou metaloproteinases e, de fato, a peçonha de *B. alternatus* contém PLA<sub>2</sub> (Nisenbom

*et al.*, 1986a,b, 1988; Ponce-Soto *et al.*, 2007) e metaloproteinases (Cominetti *et al.*, 2003, 2004; Gay *et al.*, 2005, 2009) que poderiam contribuir para o dano observado.

A capacidade do L-NAME em atenuar a queda da força contrátil na fase terminal das incubações com peçonha sugere uma possível ação do NO nos cardiomiócitos no sentido de relaxar o músculo cardíaco pela ativação da via guanilato ciclase solúvel/GMPc. Esta conclusão está de acordo com estudos mostrando que outras peçonhas botrópicas, no caso *Bothrops asper*, aumentam a formação de NO em músculo esquelético (Chaves *et al.*, 2006). Por outro lado, a proteção vista com L-NAME pode também apontar para um efeito deletério do NO, ou seja, que este mediador de alguma forma contribui para o cronotropismo negativo, possivelmente através da formação de peroxinitrito devido à sua interação com espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido, frequentemente produzido em altas concentrações em situações onde há aumento no estresse oxidativo. Neste contexto, é interessante notar que o estresse oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio têm sido implicados no dano renal causado por peçonhas botrópicas (de Castro *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2007) e na ativação da função microbicida de leucócitos periféricos (Zamunér *et al.*, 2001), bem com na citotoxicidade de enzimas ofídicas como a L-aminoácido oxidase (Stábeli *et al.*, 2007; de Vieira Santos *et al.*, 2008) e PLA<sub>2</sub> (Zuliani *et al.*, 2005).

A ausência de efeito da indometacina sugere que a ação da PLA<sub>2</sub> da peçonha não seja devido à liberação do ácido araquidônico e a formação de seus metabólitos (prostaglandinas e tromboxanos), neste caso, a PLA<sub>2</sub> provavelmente produz seus efeitos através de uma lesão direta na membrana celular, levando à mionecrose mencionada acima (Gutiérrez e Ownby, 2003; Montecucco *et al.*, 2008). Já a ausência de efeito dos outros antagonistas (atropina, atenolol, cimetidina e propranolol) sobre as respostas atriais à peçonha indica que os sistemas adrenérgico, colinérgico e histaminérgico não estão envolvidos nessa ação da peçonha. Esses achados são semelhantes aos de Huang *et al.* (1993), que relataram que a cardiotoxicidade da PLA<sub>2</sub> ácida de *Ophiophagus hannah* não envolveu a síntese de prostaglandinas, nem os sistemas adrenérgico, colinérgico e histaminérgico, e nem os canais lentos de Ca<sup>2+</sup> e os rápidos de Na<sup>+</sup>. Outros estudos têm atribuído a diminuição na contratilidade e eventual

citotoxicidade em cardiomiócitos a alterações no fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula (Fletcher *et al.*, 1982; Alloatti *et al.*, 1986; Busso *et al.*, 1988; Tzeng e Chen, 1988; Huang *et al.*, 1993; El-Saadani e El-Sayed, 2003), e este efeito pode ser amenizado na presença de altas concentrações deste íon (Petkovic *et al.*, 1983; Sun e Walker, 1986; Kempford e Hawgood, 1987).

## ***CONCLUSÕES***

## 6 - CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo *in vitro* mostram que:

1. A peçonha de *B. alternatus* exerce efeito deletério direto em átrio direito isolado de rato, causando inotropismo negativo sem alterar significativamente o cronotropismo da preparação.
2. A peçonha também causa dano muscular cardíaco (mionecrose), com liberação das enzimas marcadoras CK e CK-MB.
3. É provável que o inotropismo negativo seja resultado da ação de componentes de massa molecular elevada (proteases e/ou PLA<sub>2</sub>) da peçonha, uma vez que foi abolido pelo aquecimento, mas não pela diálise.
4. O NO pode contribuir para o dano causado pela peçonha, uma vez que o L-NAME (inibidor da NOS) foi o único dos antagonistas testados que ofereceu alguma proteção contra a redução do inotropismo.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

Abdalla S, Bilto Y, Disi. A Effects of sand viper (*Cerastes cerastes*) venom on isolated smooth muscle and heart and on haematological and cardiovascular parameters in the guinea-pig. *Toxicon* 1992; 30, 1247-1255.

Abel Jr. JH, Nelson AW, Bonilla CA. *Crotalus adamanteus* basic protein toxin: electron microscopic evaluation of myocardial damage. *Toxicon* 1973; 11: 59-63.

Acosta de Pérez O, Koscinczuk P, Negrette MS, Teibler P, Ruíz R. Efectos del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina sobre músculo y distintos organos de ratones. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1996; 46: 97-102.

Adams Z'S, Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Vacca G, Whaler BC. The effect of *Bitis gabonica* (gaboon viper) snake venom on blood pressure, stroke volume and coronary circulation in the dog. *Toxicon* 1981; 19: 263-270.

Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* 2002; 40: 335-393.

Alloatti G, Camino E, Cedrini L, Losano G, Marsh NA, Whaler BC. The effects of gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig myocardium. *Toxicon* 1986; 24: 7-61.

Alloatti G, Gattullo G, Losano G, Marsh NA, Pagliaro P, Vono P. The mechanical effects of rhinoceros horned viper (*Bitis nasicornis*) venom on the isolated perfused guinea-pig heart. *Exp Physiol* 1991; 76: 611-614.

Alloatti G, Gattullo D, Dalla Valle R, Marsh NA, Pagliaro P, Vono P. The haemodynamic effect of *Bitis nasicornis* (rhinoceros horned viper) venom. *Gen Pharmacol* 1991a; 22: 203-206.

Alloatti G, Gattullo G, Losano G, Marsh NA, Pagliaro P, Vono P. The mechanical effects of rhinoceros horned viper (*Bitis nasicornis*) venom on the isolated perfused guinea-pig heart. *Exp Physiol* 1991b; 76: 611-614.

Alloatti G, Gattullo G, Marsh NA, Pagliaro P, Vono PM. The mechanical and electrical effects of rhinoceros viper (*Bitis nasicornis*) venom on the isolated perfused guinea pig heart and atrial preparations. *Life Sci* 1991c; 49: 1539-1548.

al-Shammary FJ, al-Saleh SS, el-Shewemi SE. Ultrastructural variations of rat myocardium due to *Walterinnesia aegyptia* snake envenomation. *J Electron Microsc* (Tokyo) 1998; 47: 637-643.

Alzahaby M, Rowam EG, Young LC, al-Zahaby AS, Abu-Sinna G, Harvey AL. Some pharmacological studies on the effects of *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) snake venom. *Toxicon* 1995; 33: 1299-1311.

Amaral CFS, Da Silva OA, Godoy P, Miranda D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake venom bite. *Toxicon* 1985; 23: 877-885.

Amaral CFS, Rezende NA, Silva OA, Ribeiro MMF, Magalhães RA, Reis RJ, Carneiro JG, Castro JRS. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Ver Inst Med Trop.*, São Paulo, 1986; 28: 220-227.

Anai K, Sugiki M, Yoshida E, Maruyama M. Inhibition of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase by human and rat alpha-macroglobulins. *Toxicon* 1998; 36: 1127-1139.

Anderson SG, Ownby CL. Systemic hemorrhage induced by proteinase H from *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake) venom. *Toxicon* 1997; 35: 1301-1313.

Andrade ALF. Estudo farmacológico da peçonha de *Bothrops moojeni*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 1996; 34p.

Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Mancin AC, Reis ML, Ballejo G, Giglio JR. Isolation and characterization of an arginine ester hydrolase from *Bothrops jararacussu* venom which induces contractions of the isolated rat uterus. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47: 699-706.

Andrião-Escarso SH, Soares AM, Fontes MR, Fuly AL, Correa FM, Rosa JC, Greene LJ, Giglio JR. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 723-732.

Antonio A, Rocha e Silva M. Coronary vasodilation produced by bradykinin on isolated mammalian heart. *Circ Res* 1962; 11: 910-915.

Araújo FAA, Santalúcia M, Cabral RF. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr) 2003; pp. 6-12. Ed. Sarvier, São Paulo.

Araujo IEM. Regulação autonômica central na parada cardiorrespiratória Estudo experimental. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1997; Campinas. 171p.

Audebert F, Urtizberea M, Sabouraud A, Scherrmann JM, Bon C. Pharmacokinetics of *Vipera aspis* venom after experimental envenomation in rabbits. *J Pharmacol. Exp Ther* 1994; 268: 1512-1517.

Balligand PJ. Regulation of  $\beta$ -adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovas Res* 1999; 43: 607-620.

Barraviera B, Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LÅ, Meira DA. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins* 1995; 1: 11-22.

Barrington PL, Soons KR, Rosenberg P. Cardiotoxicity of *Naja nigricollis* phospholipase A<sub>2</sub> is not due to alterations in prostaglandin synthesis. *Toxicon* 1986; 24: 1107-1116.

Barros SF, Friedlanskaia I, Petricevich VL, Kipnis TL. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators Inflamm* 1998; 7: 339-346.

Bauab BA, Junqueira GR, Corradini MC, Silveira PV, Nishioka SA. Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. *Trop Med Parasitol* 1994; 45: 243-245.

Bieber AL, Tu T, Tu AT. Studies of an acidic cardiotoxin isolated from the venom of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*). *Biochim Biophys Acta* 1975; 400: 178-188.

Bieber AL. Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In Sanke Venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52 Lee CY, ed) Springer-Verlag, Berlin 1979; pp. 295-306.

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. *Pharmacol Ther* 1994; 62: 325-372.

Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Hofling MA. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 698-706.

Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Hofling MA. *Bothrops moojeni* snake venom-induced glomeruli changes in rat. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67: 217-222.

Bonilla CA, Rammel OJ. Comparative biochemistry and pharmacology of salivary gland secretions. III. Chromatographic isolation of a myocardial depressor preprotein (MDP) from the venom of *Crotalus atrox*. *J Chromatogr* 1976; 124: 303-314.

Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon* 1995; 33: 1387-1391.

Breithaupt H. Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus* phospholipase and its complex with crotapotin. *Neunyn Schmiedeger's Arch Pharmacol* 1976; 292: 271-278.

Burdmann EA, Woronik V, Prado EB, Abdulkader RC, Saldanha IB, Barreto OC, Marcondes M. Snake bite-induced acute renal failure in an experimental model. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 82-88.

Busso C, Camino E, Cedrini L, Lovisollo D. The effects of gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom on voltage-clamped single heart cells. *Toxicon* 1988; 26: 559-570.

Campbell JA, Lamar WW. *The Venomous Reptiles of Latin America*. Comstock Publishing Associates, Cornell University 1989; Press, Ithaca.

Campos JS, Delgado JAC. Ação do veneno do *Bothrops insularis* sobre a tensão arterial. *Folha Méd.* 1981; 82: 9-13.

Carlson RW, Schaeffer Jr. RC, Whigham H, Michaels S, Russell FE, Weil MH. Rattlesnake venom shock in the rat: development of a method. *Am J Physiol* 1975; 229: 1668-1674.

Castro HC, Dutra DL, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 1998; 36: 1903-1912.

Cevese A, Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Vacca G, Whaler BC. The effect of *Bitis gabonica* (gaboon viper) snake venom on external iliac and mesenteric arterial circulation in the dog. *Toxicon* 1983; 21: 67-74.

Cevese A, Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Vacca G, Whaler BC. The effect of gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom on cardiac stroke work in the anaesthetized rabbit. *Life Sci.* 1984; 34: 1389-1393.

Chaves F, Gutiérrez JM, Lomonte B, Cerdas L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. *Toxicon* 1989; 27: 1085-1093.

Chaves F, Teixeira CF, Gutiérrez JM. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. *Inflamm Res* 2006; 55: 245-253.

Cheymol J, Mille R., Bourillet F, Suga T, Labourdette B. Sur varieux propriétés pharmacodynamiques e biologiques de venin des serpents du genre *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. atrox*, *B. lanceolatus* et *B. caribeaus*). *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1968; 61: 673-689.

Cidade DA, Simão TA, Davila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Bon C, Zingali RB, Albano RM. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* 2006; 48: 437-461.

Cintra AC, Vieira CA, Giglio JR. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. *J Protein Chem* 1990; 9: 221-227.

Clissa PB, Laing GD, Theakston RD, Mota I, Taylor MJ, Moura-da-Silva AM. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon* 2001; 39: 1567-1573.

Cominetti MR, Ribeiro JU, Fox JW, Selistre-de-Araújo HS. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with  $\alpha_5\beta_1$  integrin. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416: 171-179.

Cominetti MR, Terrugi CH, Ramos OH, Fox JW, Mariano-Oliveira A, de Freitas MS, Figueiredo CC, Morandi V, Selistre-de-Araújo HS. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *J Biol Chem* 2004; 279: 18247-18255.

de Castro I, Burdmann EA, Seguro AC, Yu L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon* 2004; 43: 833-939.

de Roodt AR, Dolab JA, Galarge PP, Litwin S, Gould E, Dokmetjian JC. Segre L, Vidal JC. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon* 1998b; 36: 1949-1957.

de Roodt AR, Dolab JA, Dokmetjian JC, Litwin S, Segre L, Vidal JC. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. *Toxicon* 2000; 38: 865-873.

de Roodt AR, Litwin S, Vidal JC. Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. *Toxicon* 2003; 41: 949-958.

de Sousa-e-Silva MC, Tomy SC, Tavares FL, Navajas L, Larsson MH, Lucas SR, Kogika MM, Sano-Martins IS. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22: 491-500.

de Vieira Santos MM, Sant'Ana CD, Giglio JR, da Silva RJ, Sampaio SV, Soares AM, Fecchio D. Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102: 533-542.

Dhillon DS, Condrea E, Maraganore JM, Heinrichson RL, Benjamin S, Rosenberg P. Comparison of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 phospholipases  $A_2$  from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 1723-1730.

Dias FAL. Papel da enzima óxido nítrico sintase induzível no desenvolvimento da hipertrofia e disfunção cardíaca. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2007; Campinas. 146p.

El-Saadani MAM, El-Sayed MF. A bradykinin potentiating peptide from Egyptian cobra venom strongly affects rat atrium contractile force and cellular calcium regulation. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 2003; 136: 387-395.

Escalante T, Núñez J, Moura-da-Silva AM, Rucavado A, Theakston RD, Gutiérrez JM. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 193: 17-28.

Escalante T, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston RD, Gutiérrez JM. *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by  $\alpha_2$ -macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. *Toxicon* 2004; 43: 213-217.

Fan HW, Cardoso JLC. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: *Handbook of Clinical Toxicology of Animals Venoms and Poisons*. (Meier J, White J, eds.) 1995; pp. 667-688, CRC Press, Boca Raton.

Fantini E, Athias P, Tirosh R, Pinson A. Effect of taicatoxin (TCX) on the electrophysiological, mechanical and biochemical characteristics of spontaneously beating ventricular cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 1996; 160-161, 61-66.

Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M (2004) Characterisation of some pharmacological effects of the venom of *Vipera lebetina*. *Toxicon* 2004; 43: 385-391.

Fernandes PD, Guimarães JA, Assreuy J. Comparative effects of two potentiating peptides (KPP and BPP<sub>9a</sub>) on kinin-induced rat paw edema. *Agents Actions* 1991; 32: 182-187.

Ferreira LA, Henriques OB, Lebrun I, Batista MB, Prezoto BC, Andreoni AS, Zelnik R, Habermehl G (1992) A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacussu tapete, urutu dourado). *Toxicon* 1992; 30: 33-40.

Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol* 1965; 24: 163-169.

Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 1970; 9: 2583-2593.

Ferreira SH, Rocha e Silva M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia* 1965; 21: 347-349.

Flecknell (Laboratory Animal Anaesthesia. 2<sup>nd</sup> ed.) 1996; Academic Press, London.

Fletcher JE, Jiang MS. Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. *Toxicon* 1993; 31: 669-695.

Fletcher JE, Yang C-C, Rosenberg P. Basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja nigricollis* snake venom: phospholipid hydrolysis and effects on electrical and contractile activity of the rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 66: 39-54.

Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 2005; 45: 969-985.

França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, eds.) 2003; pp. 72-86, Sarvier/FAPESP, São Paulo.

Francis B, Williams ES, Seebart C, Kaiser II. Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. *Toxicon* 1993; 31: 447-458.

Fraser CM, Venter JC. The synthesis of beta-adrenergic receptors in cultured human being cells induced by glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 94: 390-397.

Furtado MFD, Maruyama M, Kamiguti AS, Antonio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon* 1991; 29: 219-226.

Gapanhuk E, Henriques OB. Kinins released from horse heat-acid-denatured plasma by plasmin, plasma kallikrein, trypsin and *Bothrops* kininogenase. *Biochem Pharmacol* 1970; 19: 2091-2096.

Gasparello-Clemente E, Silveira PF. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. *Toxicon* 2002; 40: 1617-1626.

Gasparett AL, Hyslop S, Costa SKP, Priviero FBM, De Nucci G, Antunes E, Zanesco A. Chronotropic reponse of  $\beta$ -adrenergic-, muscarinic-, and calcitonin gene-related peptide receptor agonists in right atria from neonatal capsaicin-treated rats. *Neuroscience Letters* 2002; 325: 147-150.

Gattullo D, Hyslop S, Marsh NA, Pagliaro P, Vono P. Acidotic effect of gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom in the urethane-anaesthetized rat. *Gen Pharmacol* 1991; 22: 199-202.

Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Pagliaro P, Vaca G, Vono P. Artificial respiration and survival time in anaesthetized rat after injection of gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom. *Boll Soc Ital. Biol Sper* 1986; 62: 143-149.

Gay CC, Leiva LC, Marunak S, Teibler P, Acosta de Perez O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 2005; 46: 546-554.

Gay CC, Leiva LC, Pérez Acosta OC, Marunak SL, Teibler P, Ruiz R. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. *Toxicon* 2009; 53: 53-59.

Giglio JR. Active components from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. In: Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Protéicas. Vol. I. Academia de Ciências do Estado de São Paulo. 1988; pp. 58-61. Academia de Ciências do Estado de São Paulo (ACIESP), São Paulo.

Glusa E, Brauns H, Stocker K. Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* snake venom, on isolated pig coronary arteries. *Toxicon* 1991; 29: 725-732.

Glusa E, Paintz M, Bretschneider E. Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to thrombin and thrombin receptor activating peptides. *Sem. Thromb. Hemost.* 1996; 22: 261-265.

Gomes A, De P, Dasgupta SC. Occurrence of a unique protein toxin from the Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon* 2001; 39: 363-370.

Granados-Zuniga J, Aragón-Ortiz F. Cardiovascular alterations induced by the venom of *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) and its fibrinogenolytic enzyme. *Rev Biol Trop* 1998; 46: 1149-1157.

Green LJ, Camargo AC, Krieger EM, Stewart JM, Ferreira SH. Inhibition of the conversion of angiotensin I to II and potentiation of bradykinin by small peptides present in *Bothrops jararaca* venom. *Circ Res* 1972; 31: (Suppl. 2) 62-71.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995; 33: 1405-1424.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, eds) 2003; pp. 310-323. Sarvier/FAPESP, São Paulo.

Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003; 42: 915-931.

Gutiérrez JM, Romero M, Diaz C, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1995; 33: 19-29.

Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000; 82: 841-850.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Diaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 2005; 45: 997-1011.

Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009; (in press) 1-12.

Guyton AC e Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica, 2006; pp. 103-156. Ed.Elsevier, Rio de Janeiro.

Halmagyi DFJ, Starzecki B, Horner GJ. Mechanism and pharmacology of shock due to rattlesnake venom in sheep. *J Appl Physiol* 1967; 20: 709-718.

Hamilton SL, Yatani A, Hawkes MJ, Redding K, Brown AM. Atrotoxin: a specific agonist for calcium currents in heart. *Science* 1985; 229: 182-184.

Harris JB. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 2003; 42: 933-945.

Harvey AL. Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanisms of action. *J Toxicol - Toxin Rev.* 1985; 4: 41-69.

Hawgood BJ. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment. (Tu AT, ed.) 1982; pp. 121-162. Marcel Dekker, New York.

Higuchi S, Murayama N, Saguchi K, Ohi H, Fujita Y, Camargo AC, Ogawa T, Deshimaru M, Ohno M. Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venoms. *Immunopharmacology* 1999; 44: 129-135.

Ho CL, Ko JL. Purification and characterization of a lethal protein with phospholipase A<sub>1</sub> activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom. *Biochim Biophys Acta* 1988; 963: 414-422.

Huang HC, Lee CY. Isolation and pharmacological properties of phospholipases A<sub>2</sub> from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. *Toxicon* 1984; 22: 207-217.

Huang KF, Ciou SH, Ko TP, Wang AHJ. Determinants of the inhibition of a *Taiwan habu* venom metalloproteinase by its endogenous inhibitors revealed by X-ray crystallography and synthetic inhibitor analogues. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3047-3056.

Huang MZ, Gopalakrishnakone P. Pathological changes induced by an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Ophiophagus hannah* venom on heart and skeletal muscle of mice after systemic injection. *Toxicon* 1996; 34: 201-211.

Huang MZ, Wang QC, Liu GF. Effects of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. *Toxicon* 1993; 31: 627-635.

Hyslop S, de Nucci G. The mechanisms and the significance of the coupled release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) from endothelial cells. *Wien Klin Wochenschr* 1991; 103: 422-434.

Hyslop S, Marsh NA. Comparison of the physiological effects in anaesthetised rabbits of *Bitis gabonica* venoms from different sources. *Toxicon* 1991; 29: 1235-1250.

Ismail M, Abd-Elsalam MA, Al-Ahaidib MS. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenins: flash absorption and

distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, F(ab')<sub>2</sub> and F(ab) of the antivenin. *Toxicon* 1998; 36: 93-114.

Ismail M, Aly MHM, Abd-Elsalam MA, Morad MA. A three-compartment open pharmacokinetic model can explain variable toxicities of cobra venoms and their alpha toxins. *Toxicon* 1996; 34: 1011-1026.

Jorge MT, Ribeiro LAR. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev Ass Med Bras* 1990; 36: 66-77.

Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 2002; 299: 279-291.

Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, Warrell DA, Hay CR. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991; 29: 961-972.

Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 1996; 34: 627-642.

Kamiguti AS, Rugman FP, Theakston RD, França FO, Ishii H, Hay CR. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* evenoming. Butantan Institute Antivenom Study Group. *Thomb Haemost* 1992; 67: 484-488.

Kamiguti AS, Sano-Martins I. South American snake venoms affecting haemostasis. *J Toxinol – Toxin Rev* 1995; 14: 359-374.

Kamiguti AS, Theakston RD, Desmond H, Hutton RA. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 1991; 29: 1097-1105.

Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RD. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 853-862.

Karlsson E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology (Lee CY, ed.). 1979; 52: pp. 159-212. Springer Verlag, Berlin.

Kawano J, Anai K, Sugiki M, Yoshida E, Maruyama M. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom: no-significance of hemorrhagic metalloproteinase. *Toxicon* 2002; 40: 1553-1562.

Kempsford R, Hawgood BJ. Characteristics of the action of *Crotalus horridus horridus* (timber rattlesnake) venom on the isolated, perfused rat heart. *Toxicon* 1987; 25: 1311-1319.

Kinjo N, Noguchi K, Hirayama K, Sakanashi M. Characteristics of cardiovascular effects of the venom of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) in rats. *Jpn J Pharmacol* 1990; 54: 151-161.

Komori Y, Nikai T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzymes from snake venoms. *J Toxicol - Toxin Rev* 1998; 17: 261-277.

Kumar TK, Jayaraman G, Lee CS, Arunkumar AI, Sivaraman T, Samuel D, Yu C. Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding. *J Biomol Struct Dyn* 1997; 15: 431-463.

Kuschel M, Zhou YY, Cheng H, Zhang SJ, Chen Y, Lakata EG, Xiao RP. G<sub>i</sub> protein-mediated functional compartmentalization of cardiac  $\beta_2$ -adrenergic signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 22048-22052.

Laing GD, Moura-da-Silva AM. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon* 2005; 42: 987-996.

Lee CY, Ho CL, Eaker D. Cardiotoxin-like action of a basic phospholipase A isolated from *Naja nigricollis* venom. *Toxicon* 1977; 15: 355-357.

Lee CY, Lee SY. Cardiovascular effects of snake venoms. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, (Lee CY, ed.), 1979; 52: pp. 547-590. Springer-Verlag, Berlin.

Lee SY, Lee CY, Chen YM, Kochva E. Coronary vasospasm as the primary cause of death due to the venom of the burrowing asp, *Atractaspis engaddensis*. *Toxicon* 1986; 24: 285-291.

Lee CY, Lin W, Chen YM, Lee SY. Is direct cardiotoxicity the primary cause of death following i.v. injection of the basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja nigricollis* venom? *Acta Physiol Pharmacol Latinoa*. 1989; 39: 383-391.

Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 2003; 42: 885-901.

Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, Daniele JJ, Geoghegan P, Gutiérrez JM. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon* 1999; 37: 145-158.

Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson LA. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon* 1994a; 32: 505-510.

Lomonte B, Lundgren J, Johansson B, Bagge U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopy study. *Toxicon* 1994b; 32: 42-55.

Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 1993; 17: 93-105.

Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 1994c; 32: 1359-1369.

Magro AJ, Murakami MT, Marcussi S, Soares AM, Arni RK, Fontes MR. Crystal structure of an acidis platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 24-31.

Margolis J, Bruce S, Starzecki B, Horner GJ, Malmagyi DFJ (1965) Release of bradykinin-like substance (BKLS) in sheep by venom of *Crotalus atrox*. Aust J Exp Biol Med Sci 1965; 43: 237-244.

Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Terruggi CH, Selistre-de-Araújo HS, Barja-Fidalgo C, de Freitas MS. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. Eur J Biochem 2003; 270: 4799-4808.

Marunak SL, Acosta de Perez O, Ruiz de Torrent RM, Teibler GP, Koscinczuk P, Sanchez Negrette M. Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (vibora de La Cruz). Acta Physiol. Pharmacol Ther Latinoam 1999; 49: 149-154.

Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. Toxicon 1992; 30: 1387-1397.

Mazzi MV, Marcussi S, Carlos GB, Stabeli RG, Franco JJ, Tigli FK, Cintra AC, Franca SC, Soares AM, Sampaio SV. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. Toxicon 2004; 44: 215-223.

Mbugua PM, Welder AA, Acosta D. Cardiotoxicity of Jamesoni's mamba (*Dendroaspis jamesoni*) venom and its fractionated components in primary cultures of rat myocardial cells. In Vitro Cell Dev Biol 1988a; 24: 743-752.

Mbugua PM, Welder AA, Acosta D. Cardiotoxicity of Kenyan green mamba (*Dendroaspis antusticeps*) venom and its fractionated components in primary cultures of rat myocardial cells. Toxicology 1988b; 52: 187-207.

Mebis D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. Int J Biochem 1970; 1: 335-342.

Mebis D. Pharmacology of reptilian venoms. In: Biology of the Reptilia. Physiology B. (Gans C, Gans KA, eds.) 1978; 8: pp. 437-560. Academic Press, New York.

Meier J, Adler C, Weiss N. Determination of batroxobin levels in the plasma of guinea pigs after epicutaneous and intravenous application. *Toxicon* 1988; 26: 964-966.

Melo SESFC. Caracterização da ação hipotensora do veneno de *Bothrops alternatus* em ratos anestesiados. 2002; Dissertação de Mestrado, Farmacologia-FCM, UNICAMP.

Ménez A, Gatineau E, Roumestand C, Harvey AL, Mouawad L, Gilquin B, Toma F. Do cardiotoxins possess a functional site? Structural and chemical modification studies reveal the functional site of the cardiotoxin from *Naja nigricollis*. *Biochimie* 1990; 72: 575-588.

Mery PF, *et al.*  $Ca^{+2}$  current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1197-1201.

Mesquita LC, Selistre HS, Giglio JR. The hypotensive activity of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) venom: identification of its origin. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 345-353.

Mohamed AH, Mervat AB, Nabil A el-D. Effects of cobra (*Naja haje*) venom on blood glucose, blood phosphate and plasma insulin-like activity in dogs. *Toxicon* 1972;10: 385-391.

Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase  $A_2$  myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2897-2912.

Moura AL. Sensibilidade a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos em átrio esquerdo isolado de ratos submetidos a estresse. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2002; Campinas. 69p.

Moreira L, Borkow G, Ovadia M, Gutiérrez JM. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* 1994; 32: 976-987.

Moreira L, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M. Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Exp Mol Pathol* 1992; 57: 124-133.

Moreno E, Gutiérrez JM. Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. *Toxicon* 1988; 26: 403-409.

Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJI, Dennison JMTJ, Politi V, Crampton JM, Theakston RDG. Processing of tumor-necrosis factor- $\alpha$  by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2000-2005.

Murayama N, Hayashi MAF, Ohi H, Ferreira LAF, Hermann VV, Saito H, Fujita Y, Higuchi S, Fernandes BL, Yamane T, de Camargo ACM. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1189-1193.

Murayama N, Michel GH, Yanoshita R, Samejima Y, Saguchi K, Ohi H, Fujita Y, Higuchi S. cDNA cloning of a bradykinin-potentiating peptides-C-type natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu-3-blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffi*. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4075-4080.

Nascimento JM, Franchi GC Jr, Nowill AE, Collares-Buzato CB, Hyslop S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 591-605.

Nikai T, Komori Y. Kinin-releasing and kinin-degrading enzymes. In: *Enzymes from Snake Venom*. (Bailey GS, ed.) 1998; pp. 287-316. Alaken Inc.; Fort Collins.

Nikai T, Mori N, Kishida M, Sugihara H, Tu AT. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Arch Biochem Biophys* 1984; 231: 309-319.

Nikai T, Mori N, Kishida M, Tsuboi M, Sugihara H. Isolation and characterization of hemorrhagic toxin g from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 1167-1172.

Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC. Contribution of phospholipase A<sub>2</sub> to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de La Cruz) venom. *Toxicon* 1986b; 24: 807-817.

Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC. Effect of chemical modification with p-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* (vibora de La Cruz) venom. *Toxicon* 1988; 26: 1137-1144.

Nisenbom HE, Seki C, Vidal JC. Phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* (vibora de La Cruz) venom. Purification and some characteristic properties. *Toxicon* 1986a; 24: 259-272.

Ogay AY, Rzhnevsky DI, Murashev AN, Tsetlin VI, Utkin YN. Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting on acetylcholine receptors. *Toxicon* 2005; 45: 93-99.

Omran MA, Abdel-Nabi IM. Changes in the arterial blood pressure, heart rate and normal ECG parameters of rat after envenomation with Egyptian cobra (*Naja haje*) venom. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 327-333.

Osman H, Gumaa KA. Pharmacological studies of snake (*Bitis arietans*) venom. *Toxicon* 1974; 12: 569-575.

Pérez AO, Koscinczuk P, Flinta SM, Maidana HR, Negrette MS. *Bothrops alternatus* envenoming in young dogs. *J. Venom. Anim. Toxins* 1997a; 3: 43-47.

Pérez OA, Marunak S, Ruíz R, Koscinczuk P, Teibler P. (1997b) Hemorrhage induced by snake venoms in Argentina. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoa* 1997b; 47: 221-224.

Pérez OA, Marunak S, Ruíz R, Koscinczuk P, Teibler P. Hemorrhage induced by snake venoms in Argentina. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1997; 47: 221-224.

Pérez OA, Koscinczuk P, Teibler P, Negrette MS, Ruíz R, Marunak S, Bogarin G. Hemorrhagic and edema-forming activity and histologic changes in the mouse footpad induced by venoms from argentinian *Bothrops* and *Crotalus* genera. *Toxicon* 1998; 36: 1165-1172.

Petkovic D, Jovanovic T, Micevic D, Unkovic-Cvetkovic N, Cvetkovic M. Action of *Vipera ammodytes* venom and its fractions on the isolated rat heart. *Toxicon* 1979; 17: 639-644.

Petkovic D, Pavlovic M, Matejevic D, Unkovic-Cvetkovic N, Jovanovic T, Aleksic N, Cvetkovic M, Colovic J, Stamenovic B. Influence of calcium on the action of *Vipera ammodytes ammodytes* snake venom on the myocardium. *Toxicon* 1983; 21: 887-892.

Petricevich VL. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3: 325-332.

Petricevich VL, Teixeira CF, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 2000; 38: 1253-1266.

Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770: 585-593.

Posner P, MacIntosh BR, Gerencser GA. Effects of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom on heart muscle. *Toxicon* 1981; 19: 330-333.

Possani LD, Martin MB, Yatani A, Mocha-Morales J, Zamudio FZ, Gurrola GB, Brown AM. Isolation and physiological characterization of taicatoxin, a complex toxin with specific effects on calcium channels. *Toxicon* 1992; 30: 1343-1364.

Priviero FBM. Mecanismo de ação de antaagonistas de adrenoceptores  $\beta$  na reatividade vascular em ratos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2006; Campinas. 164p.

Queiroz LS, Petta CA. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. Rev Inst Med Trop São Paulo 1984; 26: 247-253.

Rabelo RC, Melo MM, Silva-Júnior PG, Lúcia M. Avaliação das pressões venosa e arterial em cães submetidos a diferentes tipos de hipotensão. Arq Bras Med Vet Zootec 2005; 57: 741-748.

Raina RK, Ng'ang'a JN, Telang BV. Neuromuscular, cardiac and smooth muscle effects of whole venom of *Naja mossambica pallida*. Agressologie 1978; 19: 23-27.

Raina RK, Ng'ang'a JN, Njoroge DK, Telang BV. Further studies on the mechanism of vasodepressor response in cats after intravenous administration of venom from the snake *Dendroaspis jamesoni* (Jameson's mamba). Toxicon 1977a; 15: 561-570.

Raina RK, Njoroge D, Ng'ang'a JN, Telang BV. A centrally induced vasodepressor response after intravenous administration of whole venom of *Naja mossambica pallida* in cats. Experientia 1977b; 33: 1499-1500.

Ramsey HW, Snyder GK, Taylor WJ. The effect of *Micrurus f. fulvius* (coral) venom on myocardial contractility of the isolated perfused rat heart. Clin Res 1971; 19: 66.

Ramsey HW, Taylor WJ, Boruchow IB, Snyder GK. Mechanism of shock produced by an elapid snake (*Micrurus f. fulvius*) venom in dogs. Am J Physiol 1972; 222: 782-786.

Rang HP e Dale MM. Farmacologia, 2006; pp 213-273, Ed. Elsevier, Rio de Janeiro.

Rezende NA, Amaral CF, Bambina EA, Lachatt JJ, Coimbra TM. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. Braz Med Biol Res 1989; 22: 407-416.

Ribeiro LA, Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30: 475-480.

Roberto PG, Kashima S, Soares AM, Chioato L, Faca VM, Fuly AL, Astolfi-Filho S, Pereira JO, Franca SC. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation

inhibitor phospholipase A<sub>2</sub> cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. *Protein Expr Purif* 2004; 37: 102-108.

Robeva A, Politi V, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50: 769-773.

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 1949; 156: 261-273.

Rodrigues VM, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Franceschi AM, Rucavado A, Gutiérrez JM, Giglio JR. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 2001; 83: 471-479.

Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, Giglio JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a non-hemorrhagic fibrin (ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch Biochem Biophys* 2000; 381: 213-224.

Rosenberg P. Pharmacology of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. 1979; 52: (Lee CY, ed.). Springer Verlag, Berlin.

Rosenberg P. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: *Natural Toxins. Animal, Plant and Microbial* (Harris JB, ed) 1986; pp. 129-174. Clarendon Press: Oxford.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and their Venoms* (Bücherl W, Buckley EE, eds.) 1971; 2: pp. 345-384. Academic Press, New York.

Rosing J, Tans G. Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. *Toxicon* 1992; 30: 1515-1527.

Rothschild AM, Rothschild Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. vol. 52. (Lee CY, ed.). 1979; pp. 591-628, Springer Verlag, Berlin.

Ruiz CE, Schaeffer Jr. RC, Weil MH, Carlson RW. Hemostatic changes following rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*) venom in the dog. J Pharmacol Exp Ther 1980; 213: 414-417.

Russell FE, Buess FW, Strassberg J. Cardiovascular response to *Crotalus* venom. Toxicon 1962; 1: 5-18.

Russell FE, Walter FG, Bey TA, Fernandez MC. Snakes and snakebite in Central America. Toxicon 1997; 35: 1469-1522.

Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Cotta G, Diniz CR. Biological activities of venoms from South American snakes. Toxicon 1992; 30: 95-103.

Santos EP, Resende ES, Portella da Silveira PV, Fagundes DJ. Efeitos do soro antibotrópico nas alterações hemodinâmicas induzidas em cães pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Acta Cir Bras 2000; 15: Disponível em: <http://www.scielo.br>.

Santos PEB, Souza L, Freire-Maia L, Almeida P. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. Toxicon 1990; 28: 215-224.

Schaeffer Jr. RC, Briston C, Chilton SM, Carlson RW. Hypotensive and hemostatic properties of rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*) venom and venom fractions in dogs. J Pharmacol Exp Ther 1984; 230: 393-398.

Schaeffer Jr. RC, Carlson RA, Whigham H, Weil MH, Russell FE ( ) Some hemodynamic effects of rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*, venom. Proc West Pharmacol Soc 1973; 16: 58-62.

Schaeffer Jr. RC, Chilton SM, Carlson RW. Puff adder venom shock: a model of increased vascular permeability. J Pharmacol Exp Ther 1985; 233: 312-317.

Schaeffer Jr. RC, Pattabhiraman TR, Carlson RW, Russell FE, Weil MH. Cardiovascular failure produced by a peptide from the venom of the southern Pacific rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon* 1979; 17: 447-453.

Schattner M, Fritzen M, Ventura JS, Modesto JCA, Pozner RG, Moura-da-Silva AM, Chudzinski-Tavassi AM. The snake venom metalloproteinases berythrin and jararhagin activate endothelial cells. *Biol Chem* 2005; 386: 369-374.

Serrano SM, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CA, Camargo AC, Fink E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur J Biochem* 1998; 251: 845-853.

Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 1998; 36: 1059-1063

Souza DH, Iemma MR, Ferreira LL, Faria JP, Oliva ML, Zingali RB, Niewiarowski S, Selistre-de-Araujo HS. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits  $\alpha_2\beta_1$  integrin-mediated cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* 2000; 382: 341-350.

Stábeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Peitro RC, Selistre-de-Araújo HS, Giglio JR, Oliveira EB, Soares AM. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 2881-2886.

Stábeli RG, Sant'Ana CD, Ribeiro PH, Costa TR, Tícli FK, Pires MG, Nomizo A, Albuquerque S, Malta-Neto NR, Marins M, Sampaio SV, Soares AM. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *Int J Biol Macromol* 2007; 41: 132-140.

Sugai K, Imamura Y, Mihashi S, Ohba M, Kunikane K, Mori N, Baba S. Plasma levels and urinary excretion of batroxobin and its defibrinogenating effects in various animal species. *J Toxicol Sci* 1986; 11: 135.

Sun JJ e Walker MJA. Actions of cardiotoxins from the southern Chinese cobra (*Naja naja atra*) on rat cardiac tissue. *Toxicon* 1986; 24: 233-245.

Szold O, Ben-Abraham R, Weinbroum AA, Englender TE, Ovadia D, Sorkine M, Bon C, Flaisson R, Sorkine P. Antagonization of TNF attenuates systemic hemodynamic manifestations of envenomation in a rat model of *Vipera aspis* snake bite. *Intensive Care Med* 2001; 27: 884-888.

Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). *Comp Biochem Physiol B* 1991; 100: 361-365.

Tan NH, Saiffudin MN, Yong WY. The edema inducing activity of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Biochem Int* 1991; 23: 175-181.

Tanigawa M, Maruyama M, Sugiki M, Shimaya K, Anai K, Mihara H. Clearance and distribution of a haemorrhagic factor purified from *Bothrops jararaca* venom in mice. *Toxicon* 1994; 32: 583-593.

Teixeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 2003; 42: 947-962.

Telang BV, Lutunya RJM, Njoroge D, Galzigna L. Studies on the central vasomotor reflexes in cats after intraventricular administration of whole venom of *Dendroaspis jamesoni*. *Toxicon* 1976; 14: 133-138.

Terzi RGG, Araújo S. Técnicas Básicas em U.T.I.. 1992; 2<sup>a</sup>. ed. Manole, São Paulo.

Thamaree S, Sitprijia V, Punyavoravuth V, Akarasereenont P, Puckmanee N, Khaw O, Thaworn N. Effects of *Russell's viper* venom on mediator production in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Med. Assoc. Thai.*, 2001; 84: (suppl. 1), S197-S207.

Tibballs J. The cardiovascular, coagulation and haematological effects of tiger snake (*Notechis scutatus*) venom. *Anaesth Intens Care* 1998; 26: 529-535.

Tibballs J. The cardiovascular, coagulation and haematological effects of tiger snake (*Notechis scutatus*) venom. *Anaesth Intens Care* 1998a; 26: 529-535.

Tibballs J. The cardiovascular, coagulation and haematological effects of tiger snake (*Notechis scutatus*) prothrombin activator and investigation of the release of vasoactive substances. *Anaesth Intens Care* 1998b; 26: 536-547.

Tibballs J, Sutherland SK, Kerr S. Studies on Australian snake venoms, Part I: the haemodynamic effects of brown snake (*Pseudonaja*) species in the dog. *Anaesth Intens Care* 1989; 17: 466-469.

Tibballs J, Sutherland SK, Kerr S. Studies on Australian snake venoms, Part II: the hematological effects of brown snake (*Pseudonaja*) species in the dog. *Anaesth Intens Care* 1991; 19: 338-342.

Tzeng WE, Chen YH. Suppression of snake-venom coardiotoxin-induced cardiomyocyte degeneration of blockage of  $Ca^{2+}$  influx or inhibition of non-lysosomal proteinases. *Biochem J* 1988; 256: 89-95.

Unkovic-Cvetkovic N, Cvetkovic M, Petkovic D, Jovanovic T, Unkovic S. Histopathological changes in rat myocardium caused by *Vipera ammodytes ammodytes* (*European viper*) snake venom. *Toxicon* 1983; 21: 429-432.

Valério AA, Corradini AC, Panunto PC, Mello SM, Hyslop S. Purification and characterization of a phosphodiesterase from venom of the snake *Bothrops alternatus*. *J Protein Chem* 2002; 21: 495-503.

van Aswegen G, van Rooyen JM, Fourie C, Oberholzer G. Putative cardiotoxicity of the venoms of three mamba species. *Wilderness Environ. Med.*, 1996; 7: 115-121.

Varonov E, Apte RN, Sofer S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J Venom Anim Toxins* 1999; 5: 5-33.

Vick JA, Ciuchta HP, Manthei JH. Pathophysiological studies of ten snake venoms. In: *Animal Toxins* (Russell FE, Saunders P, eds.). 1967; pp. 269-282. Pergamon: New York.

Vital Brazil O, Farina R, Yoshida L, de Oliveira VA. Pharmacology of crystalline crotoxin. 3. Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and *Crotalus durissus terrificus* venom. Mem Inst Butantan 1966; 33: 993-1000.

Warrell DA. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. (Campbell JA, Lamar WW, eds.). 2004; 2: pp. 709-761, Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca.

Watt G Snakebite treatment and first aid. In: The Venomous Reptiles of Latin America. (Campbell JA, Lamar WW, eds.). 1989; pp. 6-13. Comstock Publishing Associates - Cornell University Press, Ithaca, NY.

Weiser E, Wollberg Z, Kochva E, Lee SY. Cardiotoxic effects of the venom of the burrowing asp, *Atractaspis engaddensis* (Atractaspididae, Ophidia). Toxicon 1984; 22: 767-774.

Weiss R, Mclsaac RJ. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. Toxicon 1971; 9: 219-228.

Whaler BC. Cardiovascular and respiratory effects of *gaboon viper* venom. Gen Pharmacol 1975; 6: 35-41.

Witham AC, Remington JW, Lombard EA. Cardiovascular responses to rattlesnake venom. Am J Physiol 1953; 173: 535-541.

Yamada D, Sekiya F, Morita T. Prothrombin and Factor X activator activities in the venoms of *Viperidae* snakes. Toxicon 1997; 35: 1581-1589.

Yasuda S, e Lew WY. Lipopolysaccharidae depress cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to  $Ca^{2+}$  in cardiac myocytes. Circ Res 1997; 81: 1011-1020.

Xiao RP, Ji X, Lakata EG. Functional coupling of the  $\beta_2$ -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. Mol Pharmacol 1995; 47: 322-329.

Zaganelli GL, Zaganelli MG, Magalhães A, Diniz CR, de Lima ME. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacussu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon* 1996; 34: 807-19.

Zaki OA, Hana MM, Beskharoun MA, Kajubi S, Petkovit D. Circulatory effect of *Bitis gabonica* venom. *Ain Shams Med J* 1976; 27: 135-139.

Zamunér SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CFP. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon* 2001; 39: 1505-1513.

Zamunér SR, Teixeira CFP. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators Inflamm* 2002; 11: 351-357.

Zapellini A. Estudos bioquímico e farmacológico da peçonha de *Bothrops erythromelas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 1991; Campinas. 57p.

Zuliani JP, Gutiérrez JM, Casais e Silva LL, Coccuzzo Sampaio S, Lomonte B, Teixeira CFP. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 2005; 46: 523-532.

***ANEXO***



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 783-1, sobre "ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES CAUSADAS PELA PEÇONHA DE BOTHROPS ALTERNATUS: ESTUDO IN VIVO E IN VITRO" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Stephen Hyslop/ Lourdes Dias está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 783-1, entitled "CARDIOVASCULAR ALTERATIONS INDUCED BY BOTHROPS ALTERNATUS SNAKE VENOM: STUDY IN VIVO AND IN VITRO", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP