

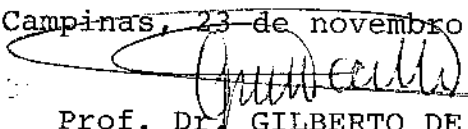
ROSSANA ANDERSON MARANGONI

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR
INDUZIDO PELO VENENO DE *PHONEUTRIA*
NIGRIVENTER EM PELE DE RATO E COELHO**

Tese Apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia.

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentado à **Faculdade de Ciências Médica** para obtenção do título de Mestre em Farmacologia pela farmacêutica, ROSSANA ARNDESON MARANGONI.

Campinas, 23 de novembro de 1992.


Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI
- Orientador -

Campinas

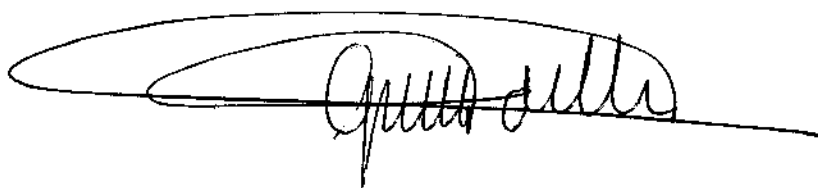
1992

M325c

18707/BC

ROSSANA ANDERSON MARANGONI

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR
INDUZIDO PELO VENENO DE *PHONEUTRIA*
NIGRIVENTER EM PELE DE RATO E COELHO**



Tese Apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia.

Orientador da Tese: Gilberto de Nucci X

Campinas

1992

1992

Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistadas do que pareciam impossível.

Charlie Chaplin

Aos meus pais pela confiança em mim depositada

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, orientador deste trabalho, pela oportunidade e crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela inestimável colaboração e amizade.

Ao Prof Dr Carlos Alberto Flores, pela colaboração e entusiasmo científico.

Aos amigos Mônica Pereira Cardoso, Normandis Cardoso e Marta Valéria Medeiros, pelo companheirismo durante esta etapa.

Ao Dr Stephen Hyslop e Aldete Zappellini, pela colaboração na dissertação desta tese.

Aos amigos Moacir Serralvo Faria, Joaquim Francisco de Prado e Heloísa Helena Araújo Ferreira, pelo otimismo sempre presentes.

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

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia, pela contribuição proporcionada

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	6
LISTA DE MATERIAIS	8
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	11
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ABSTRACT	63

LISTA DE ABREVIações

5-HT	Serotonina
6-oxo-PGF _{1α}	6-oxo-prostaglandina F _{1α}
AA	Ácido araquidônico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Anti-B ₂	Antagonista de bradicinina
Anti-BK ₂	Antagonista de bradicina
BK	Bradicinina
BPF	Fator potenciador da bradicinina
BWA4C	Inibidor de lipoxigenase
Capt	Captopril
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DAG	Diacylglicerol
FMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GPI	Íleo de cobaio
HIST	Histamina
IP ₃	Inositol trifosfato
KALL	Caliceína
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGG ₂	Prostaglandina G ₂

PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PNVd	Veneno de <i>Phoneutria nigiventer</i> dialisado
RbJV	Veia jugular de coelho
SP	Substância P
SRS-A	Substância de reação lenta da anafilaxia
SBTI ou ST1	Inibidor de tripsina de soja
TNF	Fator de necrose tumoral
Tras	Trasilol
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
U46619	11 α -9 α epoximetano prostaglandina H ₂
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
WEB	Antagonista de PAF
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
SNC	Sistema nervoso central
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
PNV	Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Ácido araquidônico	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Albumina	Pharmacia (Uppsala, Suécia)
Anti B ₂	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Atropina	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Azul de Evans	Merck (Rio de Janeiro, BR)
Bradicinina	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
BWA4C	Wellcome Research Laboratories (Beckenham, GB)
Calicreína pancreática	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Captopril	Squibb Laboratories (USA)
Carbonato de sódio	Merck (Alemanha)
CGRP	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Cloreto de cálcio bi-hidratado	Merck (Alemanha)
Cloreto de potássio	Merck (Alemanha)
Cloreto de sódio	Merck (Alemanha)
Composto 48/80	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Fenoxibenzamina	Smith, Kline & French (Stevenage, GB)
Fosfato de potássio	Merck (Alemanha)
Histamina	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
¹²⁵ I-albumina	Amersham (Bucks, EUA)
Iloprost	Schering (Alemanha)
Indometacina	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Inibidor de Tripsina de Soja	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Maleato de mepiramina	May & Baker (Esses, GB)
Maleato de metisergida	Sandoz Ltd (Basileia, Suíça)
Membrana de diálise	Philip Harris Scientific (Londres, GB)

PAF	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Propranolol	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Prostaglandin E ₁	Upjohn Co. (Kalamazoo, EUA)
Sagatal	May & Baker (Essex, GB)
Sais para tampão	Merck (RJ, Brasil)
Serotonina	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Tampão Tris	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
Trasilol	Sigma (St.Louis, Mo, EUA)
U 46619	Upjohn Co. (Kalamazoo, EUA)
Veneno de <i>P. nigriventer</i>	Instituto Butantan (São Paulo, Brasil)
WEB 2086	Boehringer-Ingelheim (Alemanha)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Edema local induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de rato 33
- Figura 2 - Efeito da prostaglandina E₁ na resposta edematogênica induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* 34
- Figura 3 - Efeito da prostaglandina E₁ sobre a resposta edematogênica induzida pelo veneno dialisado de *Phoneutria nigriventer* em pele de rato 35
- Figura 4 - Edema induzido pelo veneno bruto e dialisado de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho 36
- Figura 5 - Efeito do WEB 2086 na permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) 37
- Figura 6 - Efeito do BW A4C no edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho 38
- Figura 7 - Efeito do trasilol na permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho 39
- Figura 8 - Efeito do antagonista de receptor B₂ de bradicinina na permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho 40
- Figura 9 - Captopril potencia o edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho 41
- Figura 10 - Efeito do soybean trypsin inhibitor (ST-I) no edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho 42
- Figura 11 - Efeito da incubação de tripsina e veneno de *Phoneutria nigriventer* com plasma de coelho 43
- Figura 12 - Efeito do anti-BK₂ sobre atividade contrátil do veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em veia jugular (RbJV) 44

RESUMO

Esta tese descreve a atividade do veneno de *Phoneutria nigriventer* na permeabilidade vascular em pele de rato e coelhos. Os animais foram anestesiados e, em seguida, injetados com uma mistura de azul de Evans (0.5 ml/kg, 2.5 %) e albumina marcada (1.5 μ Ci/Kg 125 I-albumina). As substâncias a serem testadas foram injetadas intradermicamente no dorso dos animais em doses repetidas (6 sítios por dose). Após 30 minutos, foi coletado o sangue (punção cardíaca) e o mesmo foi sacrificado injetando-se sobredose de anestésico. Em seguida, a pele dorsal foi removida e os sítios foram cortados para contagem de radioatividade acumulada. O veneno bruto e dialisado de *Phoneutria nigriventer* (1-30 μ g) aumentaram a permeabilidade vascular em pele de ratos e coelhos. Em pele de ratos, mepiramina e metisergida aboliram o edema induzido pelo veneno bruto, entretanto, o mesmo não foi observado com o veneno dialisado na presença de um vasodilatador. Em pele de coelhos, o efeito do veneno de *Phoneutria nigriventer* dialisado (30 μ g/sítio) na presença de PGE₁, foi inibido significativamente pelo trasilol (inibidor inespecífico da caliceína plasmática), antagonista de receptor B₂ e o mesmo foi potenciado na pele de captopril. O inibidor específico de caliceína plasmática, "soybean trypsin inhibitor" não afetou significativamente o edema induzido pelo veneno. Entretanto, a formação de bradicinina *in vitro* pela incubação de plasma de coelho com tripsina foi abolida quando o plasma foi pré-incubado com (SBTI). O antagonista de receptores de PAF (WEB 2086), e o inibidor específico de lipoxigenase (BWA4C) não alteraram significativamente o edema induzido pela co-injeção de PNV e PGE₁. Estes resultados indicam que o edema induzido pelo PNV é decorrente da ativação da caliceína tecidual.

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é definido como uma reação local, que ocorre em resposta a lesão tecidual. A nível macroscópico, o processo inflamatório é acompanhado pelos seguintes sinais: calor, eritema, edema e dor. O calor e o eritema estão relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo na região inflamada, o edema reflete o aumento da permeabilidade vascular e a dor é devida à estimulação de vias nociceptivas aferentes. As alterações de fluxo, permeabilidade e nociceptividade são moduladas pela liberação de vários mediadores (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, agentes quimiotáticos, e outros produzidos tanto por células residentes (macrófagos, mastócitos,) como células da circulação que migram para o sítio lesado (neutrófilos, linfócitos, e outros).

Na pele, quando há inflamação, ocorre dilatação das arteríolas e abertura dos esfíncteres pré-capilares e, conseqüentemente, maior fluxo sanguíneo e extravazamento de plasma e componentes sanguíneos (Horton, 1963; Williams & Morley, 1973; Williams & Peck, 1977; Williams, 1979).

A presença de inúmeros receptores hormonais e mediadores em cultura de células sugerem que o endotélio é um potente regulador da circulação (Buonassi & Colburn, 1980). O endotélio apresenta receptores para estrógeno, noradrenalina (α e β), bradicinina, ADP, ATP, adenosina, acetilcolina, serotonina, histamina e angiotensina (Simionescu *et al.*, 1982). Além disso, o endotélio é capaz de sintetizar dois potentes vasodilatadores e inibidores da função plaquetária, a prostaciclina (PGI_2 ; Moncada *et al.*, 1976) e o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF; Furchgott & Zawadzki, 1980). A PGI_2 é um dos produtos da ciclo-oxigenação do ácido araquidônico (Gryglewski *et al.*, 1976) enquanto o EDRF é tido como o óxido nítrico (Palmer *et al.*, 1987) ou um composto nitrosilado (Myers *et al.*, 1990). Ambos são liberados

simultaneamente do endotélio de forma acoplada em resposta a um mesmo estímulo (de Nucci *et al.*, 1988; D'Orleans-Juste *et al.*, 1989).

Doses baixas de histamina, serotonina (5-HT), bradicinina (BK), PAF e substância P (SP), induzem aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de plasma quando injetados intradermicamente em pele de coelho. Este efeito é significativamente aumentado por vasodilatadores como prostaglandina E₁ (PGE₁), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Williams & Peck, 1977; Williams, 1982; Brain & Williams, 1985; Rampart & Williams, 1986). Tais mediadores aumentam a permeabilidade vascular por via direta, isto é, interagem diretamente com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como é o caso da BK, PAF, taquicininas, 5-HT, SP e histamina. Algumas substâncias aumentam a permeabilidade vascular de modo indireto, pois dependem da presença de leucócitos polimorfonucleares no sítio inflamado como, por exemplo, leucotrieno B₄ (LTB₄), o tripeptídeo n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), o fator de necrose tumoral (TNF) e fragmentos do complemento C5a des-arg (Bray *et al.*, 1981; Wedmore & Williams, 1981; Rampart *et al.*, 1989).

Em relação à via direta, após acoplamento do agonista ao receptor, ocorre ativação do ciclo do fosfatidil inositol (transdução intracelular), com liberação de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ é responsável pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio e o DAG, por sua vez, pela ativação de uma proteína quinase C, que através de fosforilações proteicas em seqüência, ativa o aparato contrátil celular (Berridge, 1987; Edelman & Blumenthal, 1987). Em consequência da contração do endotélio venular induzida pelos mediadores inflamatórios direto e/ou indiretamente, ocorre a formação de poros por onde extravasam fluido e proteínas plasmáticas. Abaixo,

revisamos as características fundamentais dos principais moduladores da permeabilidade vascular.

Histamina

A histamina foi primeiramente sintetizada e posteriormente isolada de tecidos de mamíferos. As primeiras hipóteses a respeito da possível função fisiológica da histamina tecidual basearam-se nas semelhanças entre as ações da histamina e os sintomas de choque anafilático e da lesão tecidual (Dale & Laidlaw, 1910; Lewis, 1927; Dale, 1929).

A histamina é formada por descarboxilação do aminoácido L-histidina em tecidos de mamíferos. Uma vez formada, a histamina é armazenada ou rapidamente inativada. Apesar da histamina ser encontrada na maioria dos tecidos, a sua distribuição é irregular. A maior parte da histamina tecidual ocorre na forma ligada com o polissacarídeo sulfatado heparina, e com uma proteína ácida, sendo encontrada em grânulos de mastócitos e basófilos (Graham *et al.*, 1952; Riley, 1953a,b; Mota *et al.*, 1953). A histamina é liberada quando estas células são danificadas, após complexo imunológico, pelo composto 48/80 e outros. O mastócito sofre um processo de degranulação por exocitose liberando histamina, processo esse que requer energia e cálcio.

A histamina exerce suas ações biológicas ao se combinar com receptores específicos localizados na membrana superficial. As ações dos antagonistas da histamina indicam que existem pelo menos três tipos de receptores distintos: H₁ (Ash & Schild, 1966), H₂ (Black *et al.*, 1972) e H₃ (Arrang *et al.*, 1983).

A injeção intradérmica de histamina produz uma resposta característica de edema, rubor e eritema. Estes sinais foram descritos primeiramente por Lewis (1927), denominado "resposta tríplice".

A histamina aumenta a permeabilidade vascular interagindo com receptores H_1 presentes no endotélio venular; este efeito pode ser antagonizado pelo uso de bloqueadores H_1 (Witiak & Lewis, 1978).

Serotonina

Em 1949, Rapport descreveu uma nova amina, denominada serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). Esta amina, presente no soro e sangue desfibrinado, é responsável por uma vasoconstrição, associada a uma moderada propriedade hipertensiva. Posteriormente, Rowley & Beneditt (1956) relataram, primeiramente em roedores, a importância da serotonina na microcirculação. A 5-HT é encontrada em altas concentrações em plaquetas, células enterocromafins (localizadas no trato gastro intestinal), em certas regiões do cérebro (Erspamer, 1954) e em mastócitos de roedores (Benditt *et al*, 1955 ; Furth *et al*, 1957).

A 5-HT está amplamente distribuída nos reinos vegetal e animal, incluindo venenos de abelhas, vespas, escorpiões, formigas e aranhas (Welsh & Batty, 1963).

A 5-HT é obtida no organismo a partir do triptofano da dieta que é hidroxilado na posição 5, dando origem ao 5-hidroxitriptofano. Este, por sua vez, é descarboxilado sob ação da 5-hidroxitriptofano descarboxilase, dando origem à serotonina. Os receptores da 5-HT, localizadas na superfície celular, foram agrupados em três grupos principais, a saber $5HT_1$ e $5HT_2$ (Wallis, 1981) e $5HT_3$ (Bradley *et al*, 1986; Frazer *et al*, 1990).

Fator Ativador de plaquetas

O Platelet-Activating factor (PAF) é um fosfolípídeo de membrana, isolado como componente solúvel liberado de leucócitos de coelhos sensibilizados com IgE, capaz de induzir potente agregação plaquetária (Benevise *et al.*, 1972).

Embora inicialmente apenas basófilos sensibilizados fossem definidos como células capazes de produzir PAF, atualmente sabe-se que, frente a estímulo específico, várias outras populações celulares possuem tal propriedade; entre elas: neutrófilos (Lynch *et al.*, 1979), plaquetas (Chignard *et al.*, 1979), mastócitos (Stimler *et al.*, 1981), monócitos (Larsen & Henson, 1983), células endoteliais (Handley *et al.*, 1984) e eosinófilos (Venge *et al.*, 1987).

Existem duas vias metabólicas descritas para síntese deste mediador; a via de remodelamento ("remodeling pathway") e a via conhecida como "de novo". A via de remodelamento consiste basicamente de duas etapas, ambas ativadas por fosforilação. A primeira é a ativação da fosfolipase A₂, levando a formação do precursor 1-O-alkil-sn-glicero-3-fosfocolina (liso-PAF) e um ácido graxo livre. A segunda, consiste na conversão do liso-PAF em PAF pela adição de um grupamento acetato. É importante notar que a fosfolipase A₂, que inicia a síntese do PAF, tem sua ativação regulada pela proteína quinase C e dá preferência, como substrato, a fosfolípidios que tem o ácido araquidônico na posição 2, liberando o substrato para as enzimas ciclo e lipo-oxigenase, e consequente, formação de prostanóides (Chilton *et al.*, 1984; Suga *et al.*, 1990). A via "de novo" envolve a síntese do liso-PAF que é convertido a PAF pela tranferase. Esta via não está presente em todas as células e parece estar envolvida na produção constitutiva de pequenas quantidade pelo rim, com possíveis efeitos tônicos na manutenção da pressão sanguínea (Woodard *et al.*, 1987). A degradação do PAF envolve sua transformação de volta a liso-PAF pela

ação de uma acetil-hidrolase. O liso-PAF pode ser então reacilado e reincorporado a membrana (Albert & Snyder, 1983). As enzimas responsáveis pela degradação do PAF são encontradas tanto no plasma quanto em diversas células e tecidos.

O PAF exerce seus efeitos biológicos através da ligação a sítios de receptores específicos presentes na membrana plasmática das células alvo. Receptores específicos para o PAF já foram detectados em plaquetas (Valone *et al.*, 1982), neutrófilos (Valone & Goetzi, 1983), linfócitos (Ng & Wong, 1988) e eosinófilos (Ukena *et al.*, 1989). O PAF induz aumento de permeabilidade vascular em pele de ratos, coelhos, cobaias; o edema (Bonnet *et al.*, 1981; Silva *et al.*, 1986) é decorrente da interação do PAF com receptores específicos presente no endotélio (Archer, 1984; Morley *et al.*, 1983) e/ou pela ativação de mastócito (Humphrey *et al.*, 1984). O PAF também é capaz de induzir pleurisia (Tarayre *et al.*, 1986; Martins *et al.*, 1989), dor (Vargaftig & Ferreira, 1981) e acúmulo de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos (Martins *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1991).

Ácidos-Graxos

Os fosfolipídios são, juntamente com as proteínas, componentes essenciais da membrana celular. Uma injúria ou um grande aumento da atividade de uma determinada célula (contração repetidas, fagocitose, secreção de hormônios ou estimulação por mediadores químicos) ativam uma enzima incorporada na membrana celular, a fosfolipase A₂, que passa a hidrolisar os ácidos graxos polinsaturados presentes no fosfolipídeos, liberando no citoplasma celular o ácido araquidônico.

O ácido araquidônico pode sofrer ação enzimática da ciclo-oxigenase originando as prostaglandinas (PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂), prostaciclina (PGI₂) e

tromboxano A_2 (TXA_2) e/ou pela 5-lipoxigenase, originando os leucotrienos (LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4).

Na microcirculação em pele de rato, coelho, cobaia e humano os derivados do ácido araquidônico mais importantes que interferem diretamente ou indiretamente na permeabilidade vascular são PGI_2 , PGE_1 , PGE_2 , LTB_4 , LTC_4 .

Prostaciclina

A PGI_2 foi inicialmente descrita como uma substância instável, vasoativa e anti-agregante derivada de microssomas preparados de tecidos vasculares (Moncada *et al.*, 1976). Posteriormente, foi reconhecida como eicosanóide do ácido araquidônico pela ciclo-oxigenase produzida pela célula endotelial (Johnson *et al.*, 1976).

A ciclo-oxigenase, enzima ligada à membrana celular, oxigena e cicliza o ácido araquidônico formando os endoperóxidos cíclicos, Prostaglandina G_2 (PGG_2) e Prostaglandina H_2 (PGH_2), que são quimicamente instáveis (meia vida de 5 min à 37 °C em pH 7.5). Os endoperóxidos podem ser convertidos para PGI_2 sob ação da Prostaciclina sintetase.

A PGI_2 possui uma meia vida de 2 a 3 min em pH fisiológico. Isto se deve essencialmente a sua rápida hidrólise para 6-oxo- $PGF_{1\alpha}$, um produto quimicamente estável e desprovido de atividade biológica (Johnson *et al.*, 1976).

A PGI_2 é um potente vasodilatador em pele de coelho (Williams, 1979). A atividade vasodilatadora da PGI_2 é devida a interação com receptores específicos ligados à adenil ciclase aumentando os níveis do segundo mensageiro, o AMPc (Gorman *et al.*, 1977; Tateson *et al.*, 1977; Ito *et al.*, 1980).

Devido ao aumento de fluxo induzida pela prostaciclina em pele humana observa-se a formação de eritema (Higgs *et al.*, 1979).

PGE₁ e PGE₂

As prostaglandinas do tipo E foram primeiramente isoladas por Bergstrom & Sjovall (1960 a,b). Os endoperóxidos podem ser metabolizados por isomerases formando PGE₂, PGF_{2α} e PGD₂.

A prostaglandina E₂ aumenta a formação de edema local em consequência de sua atividade vasodilatadora (Williams & Morley, 1973; Williams & Peck, 1977; Williams, 1979). As prostaglandinas do tipo E podem atuar indiretamente degranulando mastócitos em pele de rato (Crunkhorn & Willis, 1971) e de humanos (Sondergaard & Greaves, 1971).

PGI₂ e PGE₂ também são capazes de causar hiperalgesia, isto é induzir a sensibilização dos nociceptores (receptor da dor), potenciando a dor produzida por injeção intradérmica de bradicinina e histamina (Ferreira *et al.*, 1972).

Leucotrienos

Os leucotrienos foram descobertos pela primeira vez por Feldberg & Kellaway (1938) como um fator produzido pelo pulmão estimulado ou sensibilizado. Este fator foi inicialmente denominado "Slow Reacting Substance". Na década de 1950, com o advento dos primeiros anti-histamínicos, Brocklehurst demonstrou que a SRS não era antagonizada pelos anti-histamínicos, e denominou-a SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis). Em 1979, a SRS-A foi identificada como metabólitos do ácido araquidônico produzidos pela ativação da 5-lipoxigenase em leucócitos, denominados leucotrienos.

Os leucotrienos são sintetizados essencialmente pela via da enzima lipoxigenase (Samuelsson & Hamarstrom, 1980). Existem quatro leucotrienos oriundos do ácido araquidônico (LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄). Os leucotrienos estão envolvidos na inflamação em pele de humanos (psoríase), no pulmão (asma), articulação (artrite reumatóide) e em outros processos inflamatórios.

A formação de edema em pele (Ueno *et al.*, 1981) induzida pelo leucotrieno B₄, é decorrente de sua atividade quimiotática e quimiocinética para PMN e macrófagos demonstrado também *in vitro* e *in vivo* (Ford-Hutchinson *et al.*, 1978, 1980).

Bradicinina

Rocha e Silva e colaboradores (1949) relataram em experiências realizadas *in vitro*, que a adição de veneno de *Bothrops jararaca*, tripsina ou fermento proteolítico ao sangue desfibrinado era capaz de gerar, ao fim de meio minuto de incubação a 37°C, um princípio novo que era capaz de produzir contração da musculatura lisa do intestino isolado de cobaia, intestino isolado de coelho, útero de rata e de outras musculaturas lisas experimentadas. Este princípio novo foi designado bradicinina (brady = lento e kinesis = movimento).

Em seguida, Deutsh & Diniz (1955) demonstraram que as enzimas formadoras das cininas, as cininogenases, distribuem-se amplamente nos venenos crotálicos e viperídeos. Posteriormente, Ferreira (1965) relatou a presença no veneno de *Bothrops jararaca* de um fator potenciador da bradicinina (bradykinin potentiating factor, BPF) de natureza peptídica, o qual era capaz de aumentar a meia vida da bradicinina circulante (Ferreira & Vane, 1967). O conhecimento da estrutura desse peptídeo, em particular o sítio de ação do BPF5a na enzima conversora de angiotensina (Cushman *et al.*, 1977),

resultou no desenvolvimento de um novo grupo de antihipertensivos, os inibidores da enzima conversora de angiotensina ou cininase II.

As cininas são formadas a partir do cininogênio de alto e/ou de baixo peso molecular (PM). A ativação do cininogênio se faz por enzimas como as calicreínas plasmáticas (alto PM) e tecidual (baixo PM).

As calicreínas são um grupo de serino-proteases, encontradas em diferentes tecidos, células e fluidos biológicos (Bhoola *et al.*, 1979; Schachter 1980). Este grupo difere no peso molecular, pontos isoelétricos, substrato específico, características imunológicas e tipo de cinina liberada (Colman, 1974; Schachter, 1980; Kaplan & Silvenberg, 1987). A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e participa do sistema intrínseco da coagulação. A atividade enzimática da calicreína sobre o substrato cininogênio libera a Bk (Werle, 1960; Bhoola *et al.*, 1962; Muller-Esterl, 1989). A calicreína tecidual atua no cininogênio de baixo peso molecular e libera a lisil-BK (calidina), a qual é rapidamente convertida em Bk por uma arginina aminopeptidase (Guimarães *et al.*, 1973). As diferentes respostas produzidas pelas cininas dependem da interação com receptores específicos de Bk do tipo B₁, B₂ (Regoli *et al.*, 1977) e B₃ (Farmer *et al.*, 1989) estas respostas podem ser inibidas por antagonistas específicos. BK e lisil-BK são aproximadamente 100 vezes mais potentes que a histamina em aumentar a permeabilidade vascular (Garcia Leme, 1978). As cininas também estimulam fibras C causando dor e hiperalgesia (Longhurst *et al.*, 1984; Dray *et al.*, 1988; Taiwo & Levine, 1988; Haley *et al.*, 1989). As cininas são inativadas por cininases (I e II) presentes no sangue e tecidos (Erdos, 1979).

CGRP

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene related peptide*; CGRP), contém 37 aminoácidos e está localizado juntamente com a SP, na raiz dorsal de células ganglionares das terminações nervosa periféricas (Sundler *et al.*, 1985; Rosenfeld *et al.*, 1983; Fischer *et al.*, 1983). O CGRP, por sua prolongada atividade vasodilatadora é capaz de potenciar o edema induzido por histamina, Bk, PAF, C5a des-Arg, FMLP e LTB4 (Brain *et al.*, 1985). Em pele de humanos, o CGRP desencadeia uma reação clássica caracterizada por edema acompanhado de eritema (Piotrowski & Foreman, 1986). O CGRP é também capaz de potenciar a acumulação de neutrófilos em pele de coelho induzidas por FMLP, LTB4 e zymosan (Buckley *et al.*, 1991).

A região n-terminal do peptídeo CGRP é essencial para interação com o receptor específico, enquanto que a região c-terminal é importante para o estudo e desenvolvimento de diferentes agentes que estimula a vasodilatação via receptor de CGRP. Em pele de humano, a atividade deste peptídeo é antagonizada pelo análogo CGRPVal8Phe37 (Chiba *et al.*, 1989).

VIP

O peptídeo intestinal vasoativo (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) contém 28 aminoácidos e foi primeiramente isolado do intestino delgado de porco (Said & Mutt, 1970). Posteriormente, demonstrou-se que o VIP estava largamente distribuído no SNC e nervos periféricos.

O VIP apresenta uma potente atividade vasodilatadora quando comparado com PGE₂, e aumenta significativamente o edema induzido pela BK e C5a des-Arg. (Williams, 1982).

Taquicininas (Substância P, neurocinina A, neurocinina B).

Neurocininas são grupo de peptídeos que apresentam uma mesma sequência de aminoácidos na cadeia C-terminal (Phe-X-Gly-Leu-Met.NH₂). Estão incluídos substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB). A SP foi encontrada primeiramente no cérebro e intestino de cavalo (von Euler & Gaddum, 1931), enquanto que as NKA e NKB isoladas 52 anos mais tarde por Kimura *et al* (1983) de extrato da coluna espinhal de porco.

A SP, em órgãos periféricos, causa relaxamento dos vasos arteriais (D'Orleans-Juste *et al.*, 1985), e uma diminuição da resistência periférica *in vivo* (Couture & Regoli, 1982). A SP também é capaz de aumentar a permeabilidade vascular atuando diretamente (Chahl, 1977; Lembeck & Holzer, 1979) e/ou indiretamente ativando mastócitos (Foreman *et al.*, 1983). Ambos, NKA e NKB, causam edema em pele de rato (Gamse & Saria, 1985) e humano (Devillier *et al.*, 1986; Fuller *et al.*, 1987).

Veneno de *Phoneutria nigriventer*

No envenenamento provocado pelo veneno de aranha *Phoneutria nigriventer* são descritos o aparecimento de dor intensa, espasmos musculares, tremores, paralisia espástica, salivação, diarreia, sudorese, taquicardia, arritmias entre outros (Brazil & Vellard, 1926; Schenberg & Pereira Lima, 1966). Alguns desses efeitos são causados pela liberação de neurotransmissores pelas terminações nervosas autonômicas e motoras (Vital Brazil *et al.*, 1988). Recentemente, demonstramos que o veneno de *Phoneutria nigriventer* possui atividade espasmogênica em tecido vascular de coelho (Antunes *et al.*, 1990), devido à presença de polipeptídeos (Marangoni *et al.*, 1993). Devido ao exposto acima, procuramos investigar se o veneno desta

aranha causa aumento de permeabilidade vascular e caso afirmativo, qual mecanismo responsável por este aumento.

Objetivo

Verificar se o veneno de *Phoneutria nigriventer* causa aumento de permeabilidade vascular em pele de rato e coelho e qual mecanismo responsável por esta atividade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Permeabilidade vascular em pele de rato e coelho

Coelhos machos (2-3 kg) New Zealand foram anestesiados com tiopental sódico (30-40 mg/kg, via endovenosa). A seguir, foram injetados endovenosamente com uma mistura de solução de azul de Evans (0.5 ml/kg, 2.5%) e albumina marcada (1.5 μ Ci/Kg 125 I-albumina). As substâncias a serem testadas foram preparadas em salina e injetadas intradermicamente (0.1 ml) no dorso dos animais (previamente depilado) em doses repetidas (4-6 sítios por dose). Após 30 minutos, foram coletado 5 ml de sangue do coelho através de punção cardíaca, em presença de heparina e o mesmo foi sacrificado, injetando-se endovenosamente sobredose de tiopental sódico.

Experimentos similares foram feitos em ratos Wistar (180 a 220 g). Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (30-40 mg/kg, via intraperitoneal). 125I-alumina (10 μ Ci/kg) e solução de azul de Evans (1.5 ml/kg, 2.5% p/v) foram injetadas endovenosamente. As substâncias a serem testadas foram preparadas em solução modificada de Tyrode desprovida de cálcio injetadas intradermicamente (0.1 ml) no dorso dos animais (previamente depilados) em doses repetidas (2 sítios por dose). Após 15 min, foram coletados 5 ml de sangue de cada rato através de punção cardíaca, na presença de heparina e os mesmos foram sacrificados como descrito acima.

Em ambos, ratos e coelhos, a pele dorsal foi removida e os sítios injetados foram recortados (diâmetro de 12 e 15 mm, respectivamente) para contagem da radioatividade acumulada (125I), usando-se um contador gama. Os resultados foram expressos como o volume de plasma extravazado a partir dos valores encontrados em 1 ml de plasma (Williams, 1979; Brain & Williams, 1985).

A composição da solução de Tyrode (mM) foi a seguinte: NaCl 137, KCl 2.7, $MgCl_2$ 0.5, NaH_2PO_4 0.4, $NaHCO_3$ 1.2 e glicose 5.6

Superfusão de músculo liso vascular de coelho em cascata

Coelhos machos (2-3 kg), New Zealand foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/kg, e.v.) e exsanguinados pela artéria carótida. Após laparatomia, a veia jugular (VJC) foi removida e colocada em solução nutriente de Krebs-Ringer. O tecido endotelial de cada vaso foi removido inserindo-se um cateter de polietileno na luz do mesmo. Os vasos foram cortados em espiral, montados em cascata (Vane, 1964) e superfundidos com solução de Krebs aquecida 37°C e aerada (95% O_2 /5% CO_2), a um fluxo constante de 5 ml/min. Os tecidos foram ligados a alavancas auxotônicas para músculo liso (Paton, 1957) e as respostas registradas em um polígrafo Watanabe de 6 canais (Modelo WTR 381).

Cobaias machos (250-500 gs) foram sacrificados injetando-se intraperitonealmente sobredose de tiopental sódico. Após laparatomia, o íleo foi removido e colocado em solução nutriente de Krebs-Ringer contendo atropina (1 mg/ml). Segmentos de 3 cm foram amarrados nas duas extremidades e montados em cascata, conforme descrito acima.

O PNV e os agonistas foram injetados na forma de bolus. Os antagonistas foram infundidos (0.1 ml/min) sobre os tecidos. A composição da solução tampão Krebs-Ringer (mM) foi a seguinte NaCl 118, $NaHCO_3$ 25, Glucose 5.6, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.17 e $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.5.

Diálise do veneno de *Phoneutria nigriventer*

O veneno de *Phoneutria nigriventer* (3-4 ml de uma solução 0.1%) foi dialisado contra 2 litros de solução salina 0.9% por um período de 24 a 72 hs, a 4-6 °C. A solução de diálise foi trocada quatro vezes durante este período. Foi retirada uma alíquota da solução de veneno antes de iniciar a diálise para comparação subsequente com o material dialisado. A eficácia da diálise foi confirmada por bioensaio usando strips de veia cava e jugular de coelho. Tubos de diálise (MW cutoff 12000-14000) foram obtidos da Philip Harris Scientific (Londres, Inglaterra).

Formação de bradicinina em plasma de coelho

Alíquotas de 10 ml de sangue de coelho foram coletados na presença de heparina (20 U/ml) e em seguida centrifugadas (3000 rpm, 15 min). Alíquotas de 200 µl do plasma foram adicionadas a uma solução de ácido acético (0.2 %, 1.8 ml); a mistura foi aquecida a 100 °C durante 30 min e o pH do plasma foi reajustado para 7.4-7.8. A cada amostra de plasma desnaturado foi adicionado 0.5 ml de tampão Tris (0.2M, pH 7.8) e 0.1 ml de tripsina (200µg, dissolvida em salina) (Diniz & Carvalho, 1963). Experimentos similares foram realizados substituindo-se a tripsina por PNV (200 µg) ou salina. A presença de bradicinina nas amostras foi detectada em íleo isolado de cobaia. O tecido foi tratado durante o experimento com uma mistura de antagonistas α (fenoxibenzamina, 0.05 µM) e β (propanolol, 6.5 µM) adrenérgicos, histaminérgico (mepiramina, 0.35 µM), serotoninérgico (metisergida, 0.6 µM), muscarínico (atropina, 0.35 µM) e o inibidor de cicloxigenase indometacina (5.6 µM) (Gilmore *et al.*, 1968).

Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA) e teste t pareado e não pareado de Student foi utilizado para análise estatística dos resultados. $P < 0.05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Efeito do PNV na pele de rato

O veneno de *Phoneutria nigriventer* (0.1-1.0 $\mu\text{g/sítio}$) induziu a formação de edema local dependente da dose (figura 1). O edema foi potenciado ($p < 0.001$) pela co-injeção de vasodilatadores tais como o neuropeptídeo CGRP (10 pmol/sítio; figura 1) ou prostaglandina E_1 (30-300 pmol/sítio; figura 2). Na dose utilizada, CGRP ou PGE_1 não induziram formação de edema quando injetados individualmente.

Envolvimento de receptores de histamina e serotonina

O tratamento prévio (15 min) dos ratos com uma mistura de mepiramina (6 mg/kg, i.p.) e metisergida (6 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o edema induzido pelo PNV (figura 1). Entretanto, o edema foi ainda visualizado quando o veneno foi co-injetado com CGRP (figura 1) ou PGE_1 (figura 2), indicando a presença de um componente edematogênico diferente da serotonina ou histamina. Isto foi posteriormente confirmado usando-se veneno dialisado (MW cutoff de 12 a 14 KD) e, portanto, desprovido de histamina e serotonina. Nesta circunstância, doses maiores do veneno dialisado (1-30 $\mu\text{g/sítio}$) foram capazes de induzir uma resposta edematogênica, a qual foi igualmente potenciada por PGE_1 (Figura 3). O tratamento prévio dos animais com mepiramina e metisergida foi efetivo pois o mesmo aboliu o edema induzido pelo composto 48/80 (1 $\mu\text{g/sítio}$) e reduziu significativamente ($p < 0.001$) aquele induzido pela substância P (0.1 nmol/sítio), conforme mostrado na figura 1. O composto 48/80 e a substância P, são capazes de causar uma resposta edematogênica em pele de rato dependente da liberação local de histamina e serotonina, por ativação de mastócitos presentes no tecido cutâneo.

Em coelhos, espécie animal sabidamente pobre em mastócitos, tanto o veneno bruto como o dialisado (desprovido de substâncias de massa molecular abaixo de 12 kDa), em doses de 3.0 a 30.0 $\mu\text{g/sítio}$, causaram edema dependente da dose e de intensidade similar, sendo também potenciados pela PGE_1 (figura 4). O tratamento local com mepiramina (3.5 nmol/sítio) não modificou significativamente a resposta edematogênica induzida pela co-injeção de PNV (30 $\mu\text{g/sítio}$) e PGE_1 (90 pmol/sítio; $113 \pm 10\%$ e $87 \pm 15\%$ para controle e tratado, respectivamente; $n=6$). O tratamento com mepiramina foi eficiente pois inibiu em $80 \pm 3.6\%$ ($n=7$) o edema causado pela co-injeção de histamina (10 nmol/sítio) e PGE_1 (90 pmol/sítio). O efeito do antagonista de serotonina, metisergida, não foi investigado pois o coelho praticamente não responde a este autacóide como agente inflamatório.

Em função da resposta edematogênica em coelhos se mostrar completamente independente da histamina/serotonina contida no veneno, passamos a empregar somente esta espécie animal para os estudos posteriores. A partir das curvas dose-resposta até agora demonstradas, passamos a utilizar de rotina uma dose única de PNV (30 $\mu\text{g/sítio}$) e PGE_1 (0.1 nmol/sítio), administrados intradermicamente sempre sob a forma de co-injeção. Esta dose de PGE_1 também foi utilizada rotineiramente para potenciação do edema induzido por outros mediadores empregados neste trabalho como o PAF, histamina, Bk e calícreína.

Envolvimento do PAF e produtos da lipoxigenase

A participação do PAF como um possível mediador da resposta inflamatória induzida pelo PNV foi avaliada empregando-se o antagonista específico deste autacóide, o WEB 2086. Na dose de 100 nmol/sítio, este composto foi capaz de inibir em $44 \pm 8.7\%$ ($n=3$) o edema induzido pelo PAF

(3nmol/sítio). Entretanto, tal antagonista (mesma dose) não modificou significativamente a formação de edema induzido pelo veneno de PN dialisado (Figura 5). À semelhança do WEB 2086, o inibidor da enzima lipoxigenase, BWA 4C (10 nmol/sítio) não modificou a resposta edematogênica induzida pelo veneno dialisado (Figura 6). Curiosamente, o BWA4C reduziu em $42 \pm 9.4\%$ o edema induzido pela co-injeção de bradicinina (100 pmol/sítio) e ácido araquidônico (3 nmol/sítio; n=3, Figura 6). Nas doses empregadas acima, PGE1, WEB 2086 e BWA4C não induziram a formação de edema, quando injetados individualmente (figuras 5 e 6).

Envolvimento de cininas

A possibilidade de que o aumento de permeabilidade causado pelo PNV em pele fosse dependente da formação local de cininas (bradicinina e/ou calidina) foi investigada empregando-se tratamentos locais com o trasilol (inibidor inespecífico de calicreínas), soybean trypsin inhibitor (SBTI; inibidor de calicreína plasmática), antagonista específico de receptores B₂ de bradicinina e o captopril (inibidor da cininase II).

O trasilol (10 µg/sítio) inibiu significativamente o edema induzido tanto pelo PNV ($57 \pm 5\%$, n=6, p<0.05) como aquele induzido pela calicreína tecidual ($77 \pm 2.0\%$, n=6, p<0.05), mas não modificou a resposta edematogênica causada pela BK (Figura 7). Ao contrário do trasilol, o inibidor de calicreína plasmática, SBTI (10 µg/sítio), não interferiu significativamente com o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno de PNV (Figura 10). Conforme esperado, o SBTI também não interferiu com o edema induzido pela calicreína tecidual (n=3) e BK (n=3; Figura 10).

O antagonista de receptores B₂ de bradicinina D-Arg, (Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe⁷)-BK, na dose de 3 nmol/sítio, reduziu em $49 \pm 11\%$ (n=4, p<0.05) o edema

induzido pela co-injeção de PNV (figura 8). Nessa dose, o anti-B₂ causou uma marcante redução ($53 \pm 2\%$, $n=4$, $p<0.05$) do edema induzido pela bradicinina, mas não interferiu com aquele induzido pela histamina (Figura 8).

O inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (1 nmol/sítio) potenciou marcadamente ($239 \pm 29\%$) o edema induzido pela bradicinina (100 pmol/sítio) e também aquele induzido pelo PNV nas doses de 3 e 10 µg/sítio ($112 \pm 20\%$ e $253 \pm 34\%$, respectivamente). Na dose empregada, o captopril não alterou a formação de edema induzido pela histamina (10 nmol/sítio). Captopril não induziu a formação de edema *per se* (figura 9).

A formação de bradicinina obtida *in vitro* pela incubação de plasma de coelho com tripsina foi confirmada pelas contrações dose-dependente causadas em íleo de cobaia previamente tratado com uma fenoxibenzamina, propranolol, mepiramina, metisergida, atropina e indometacina (Figura 11). Estas contrações não foram visualizadas quando o plasma foi pré-incubado por 10 min com SBTI (100-500 µg) antes da adição de tripsina (resultado não mostrado). Ao contrário da tripsina, observamos que o PNV não foi capaz de estimular a formação plasmática de bradicinina (Figura 11).

Envolvimento de receptores de bradicinina in vitro

A figura 12 ilustra as contrações induzidas pela bradicinina (1-10 ng) pelo análogo de tromboxano, U46619 (30 ng) e PNV (3-30 µg) na veia jugular de coelho (VJC), antes e durante infusão do antagonista de bradicinina (0.5 µM). Na presença desse antagonista, houve inibição significativa das contrações induzidas pela bradicinina, sem afetar aquelas induzidas pelo PNV e U46619. Resultados similares foram obtidos em VJC ($n=3$).

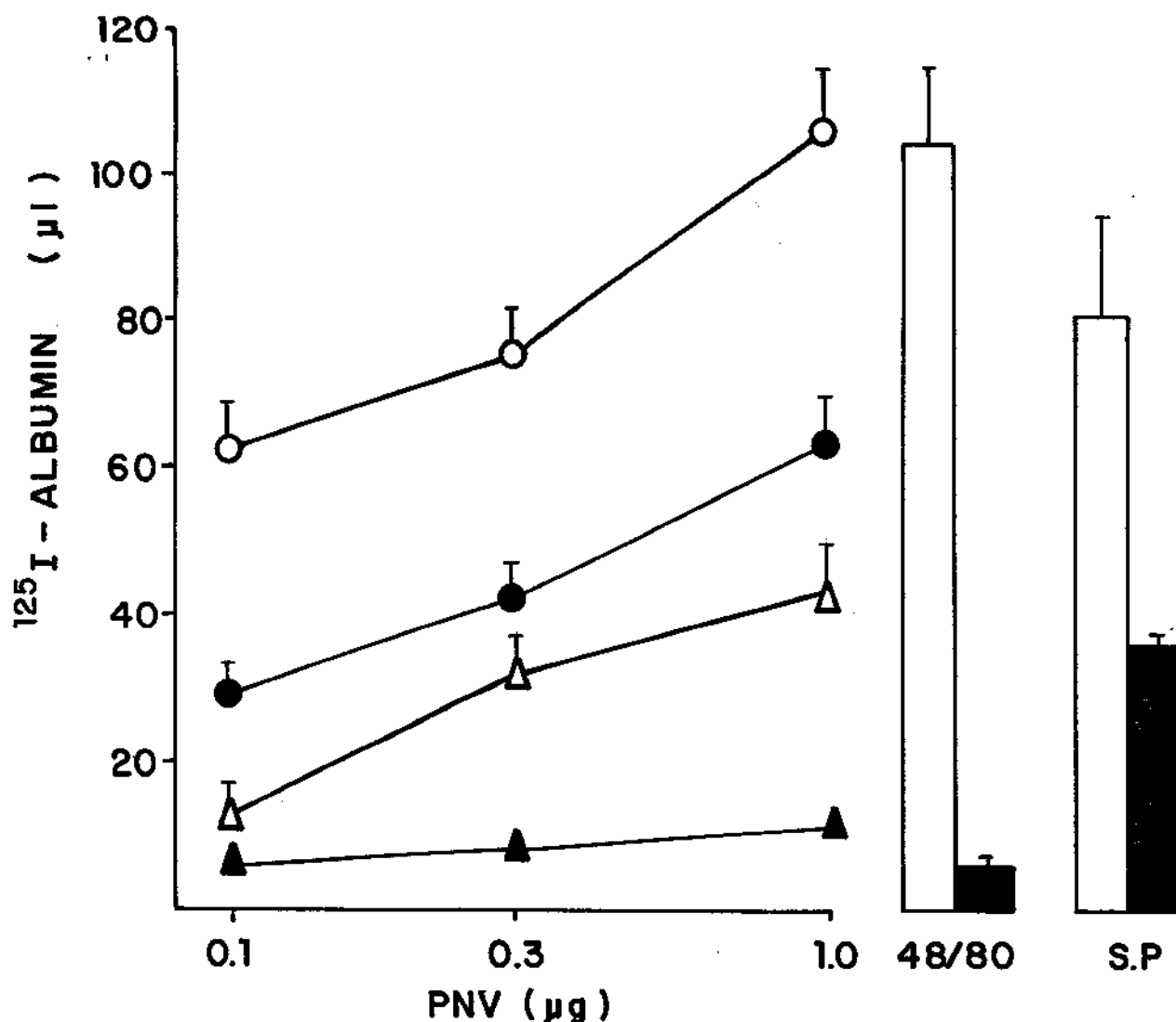


Figura 1 - Edema local induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de rato.

O veneno (0.1-1.0 µg/sítio) foi injetado em ratos controle na ausência (●) e (○) presença de CGRP (10 pmol/sítio), e ratos pré-tratados com mepiramina (6 mg/kg, i.p) e metisergida (6 mg/kg, i.p) na presença (Δ) e ausência (▲) de CGRP (10 pmol/sítio). A eficácia do pré tratamento com mepiramina e metisergida foi avaliada pela resposta do composto 48/80 (1 µg/sítio) em ratos controle (coluna vazia) e pré-tratados (coluna cheia). Mostramos ainda o edema induzido pela combinação da substância P (100 pmol/sítio) e CGRP (10 pmol/sítio) em ratos controles (coluna vazia) e pré-tratados (coluna cheia). A formação do exudato induzida pela injeção individual de tyrode foi de 16.1 ± 4.5 ml e 2.2 ± 0.3 ml em ratos controles e tratados, respectivamente. Os resultados foram expressos com valores médios (n=4) e as barras verticais representam o erro das médias.

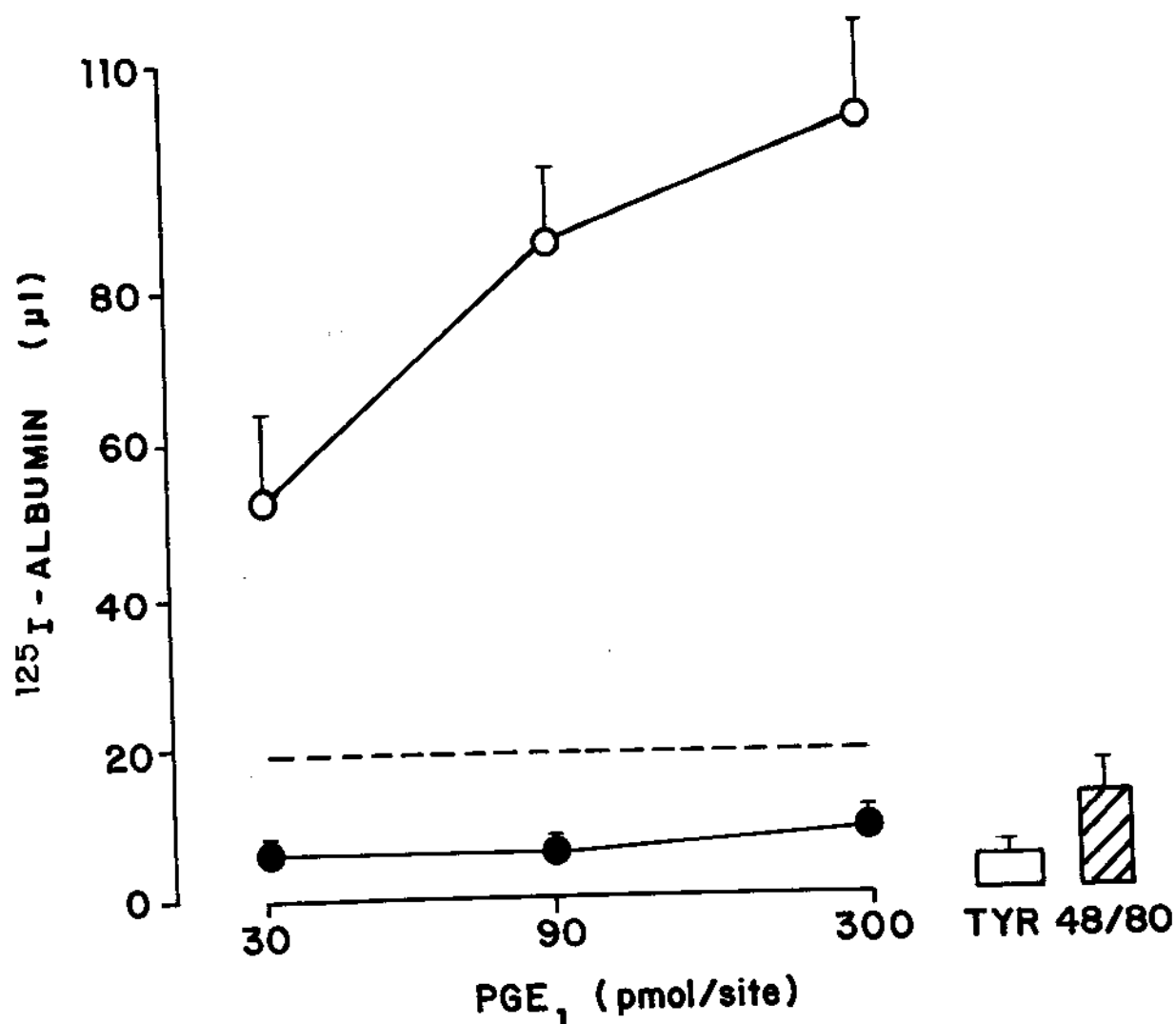


Figura 2 - Efeito da Prostaglandina E1 na resposta edematogênica induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*.

Os animais foram pré-tratados com mepiramina (6 mg/kg, i.p) e metisergida (6 mg/kg, i.p) 15 minutos antes da injeção intradérmica. Prostaglandina E1 (30-300 pmol/sítio) foi injetada individualmente (●) ou combinada com o veneno (1 μg/sítio), (○). A linha tracejada representa a resposta induzida pelo veneno individualmente. O edema induzido por Tyrode e composto 48/80 (1 μg/sítio) estão representados com colunas vazias e cheias, respectivamente. Os resultados foram expressos como médias (n=4) e as barras representam o erro padrão das médias.

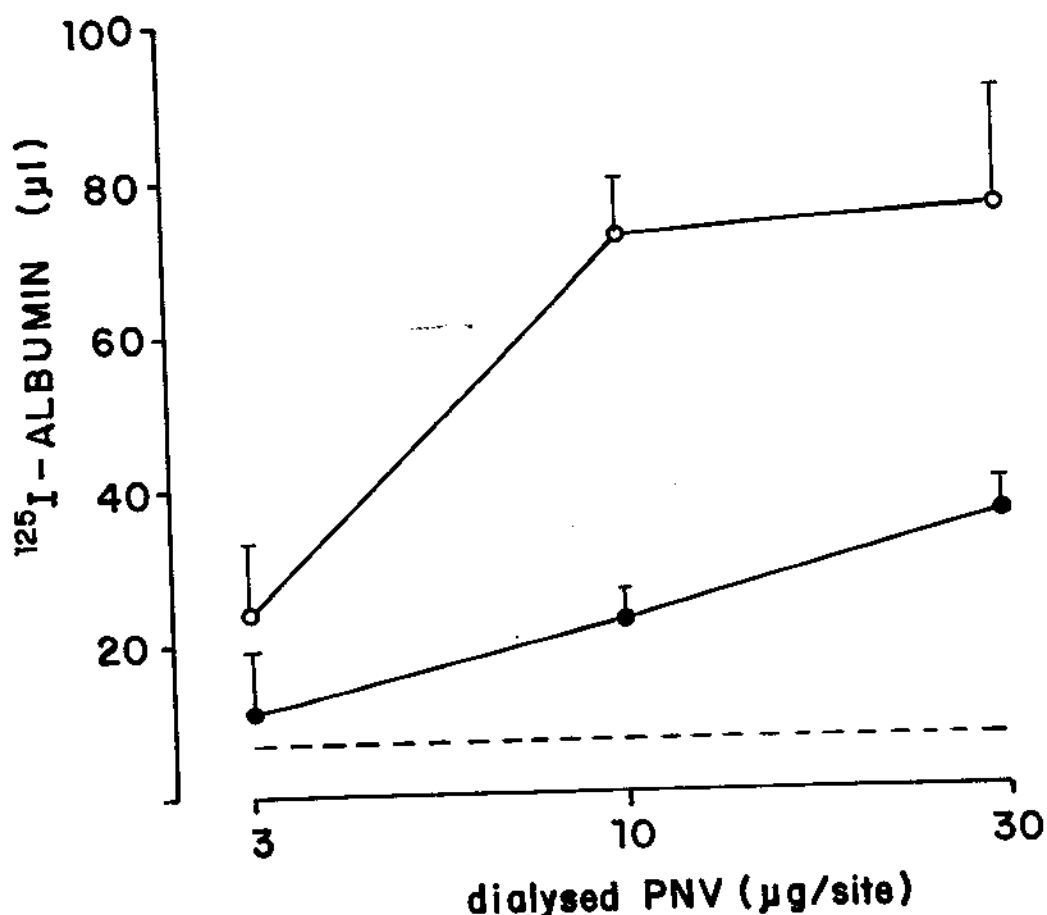


Figura 3 - Efeito da Prostaglandina E1 sobre a resposta edematogênica induzida pelo veneno dialisado de *Phoneutria nigriventer* em pele de rato.

Os animais foram pré-tratados com mepiramina e metisergida. A diálise do veneno foi processada conforme descrito acima em "métodos". O veneno dialisado (3-30 $\mu\text{g}/\text{sítio}$) foi injetado individualmente (●) ou combinado com PGE1 (90 pmol/sítio) (○). A linha tracejada representa a resposta produzida pela injeção de Tyrode. Os resultados foram expressados com os valores médios de 4 animais e as barras verticais representam o erro padrão da médias.

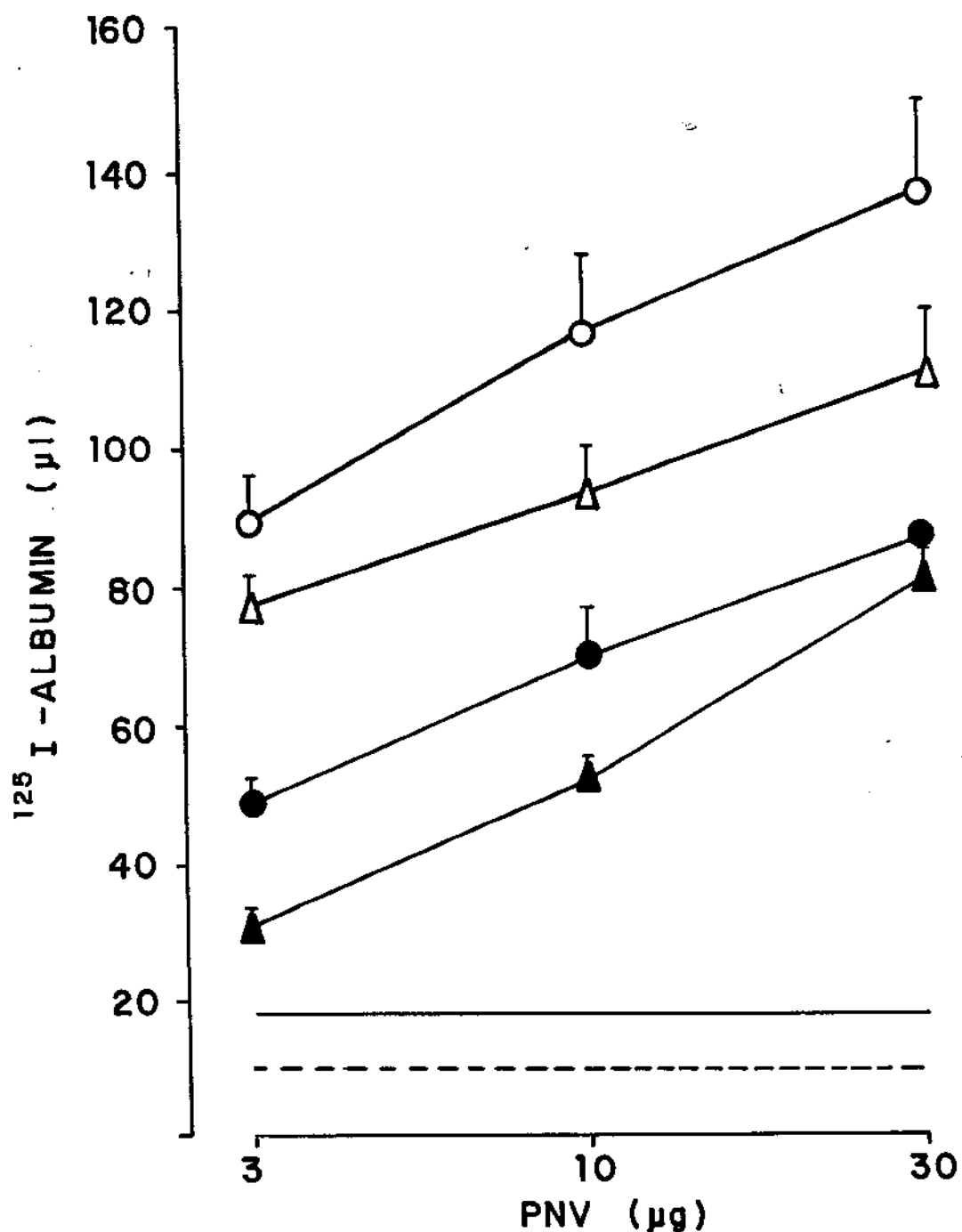


Figura 4 - Edema induzido pelo veneno bruto e dialisado de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho.

A diálise do veneno foi processada conforme descrito em "métodos". Veneno bruto (3-30 μg/sítio) e dialisado (3-30 μg/sítio) foram injetados individualmente (▲, ●) ou combinados com PGE₁ (90 pmol/sítio) (Δ, ○), respectivamente. As linhas cheia e tracejada indicam a resposta produzida pela PGE₁ e salina, respectivamente. Os resultados foram expressos com o valores médios de 4 animais e as barras verticais representam o erro padrão das médias.

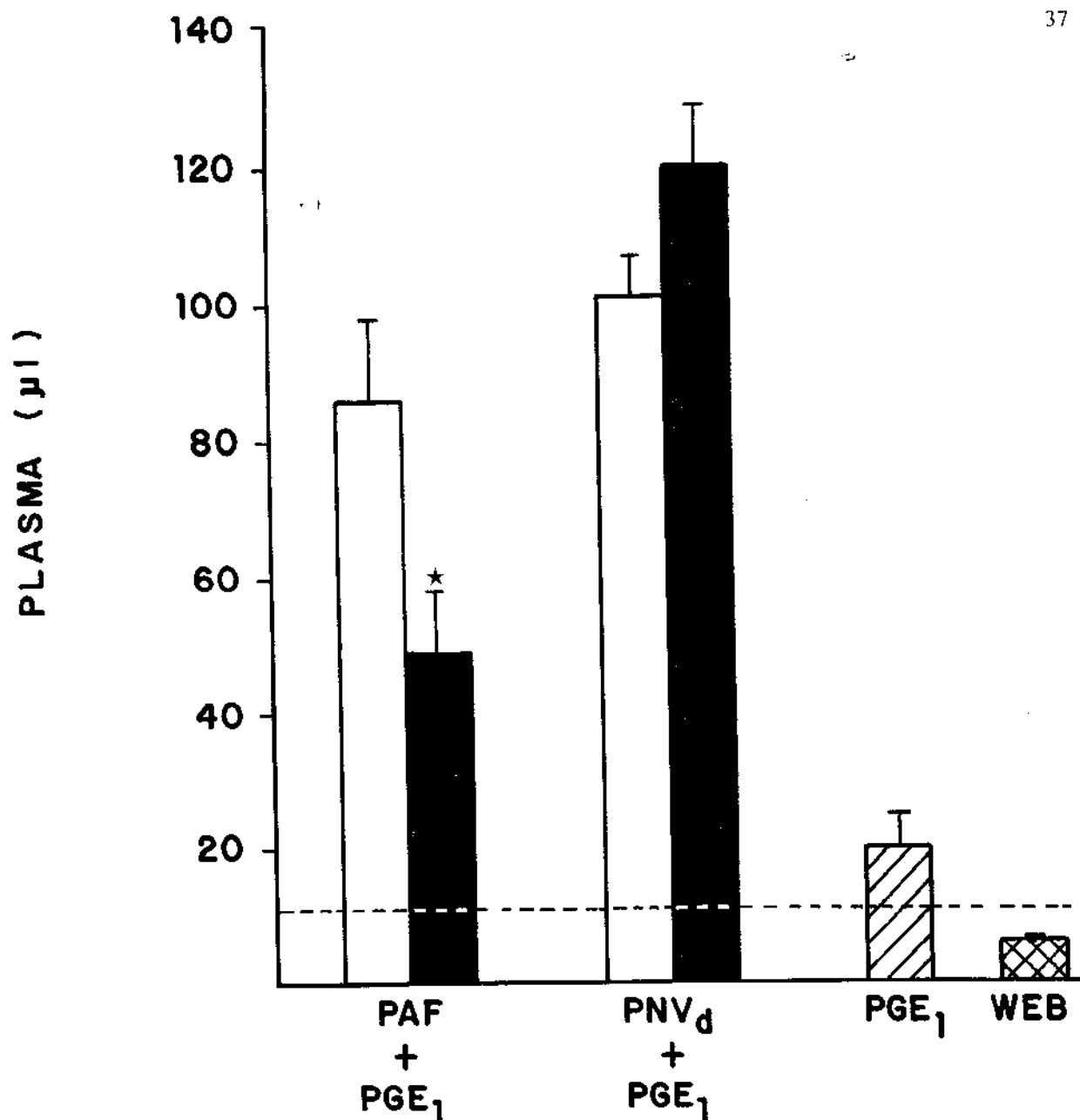


Figura 5 - Efeito do WEB 2086 na permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV).

PAF (3 nmol/sítio) e PNV (30 µg/sítio) foram co-injetados com prostaglandina E₁ (0.1 nmol/sítio; colunas vazias). Colunas cheias representam co-injeção de agentes inflamatórios (PAF, PNV) + PGE₁ + WEB 2086. As colunas hachureadas representam a resposta produzida pela injeção individual de WEB 2086 (100 nmol/sítio) ou PGE₁ (0.1 nmol/sítio). A linha tracejada representa a resposta produzida pela injeção de salina. Os resultados foram expressos como médias de 4 animais e as barras representam o erro padrão das médias. ★ $p < 0.05$ quando comparada aos valores controles.

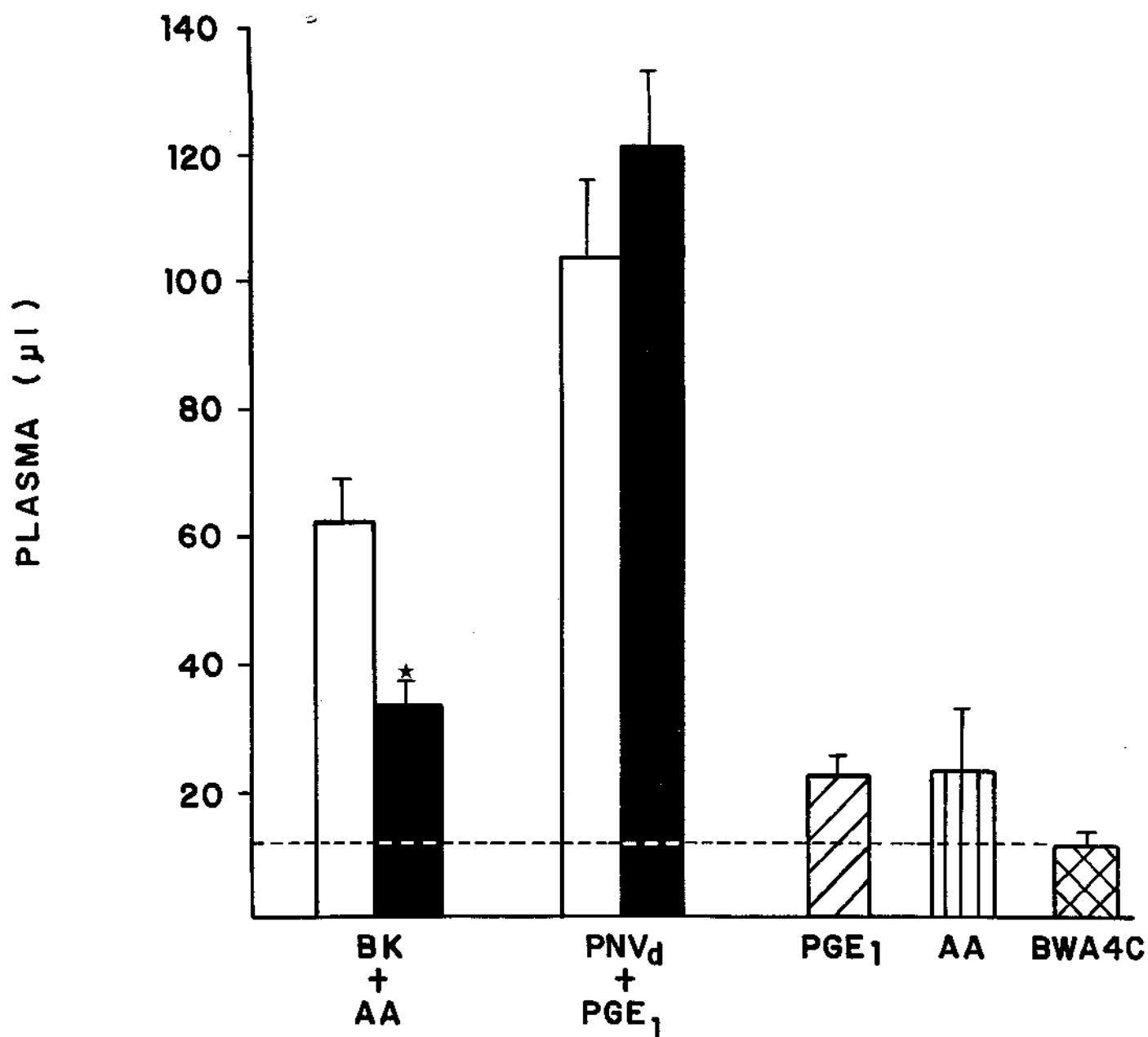


Figura - 6 Efeito do BW A4C no edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho.

Bradicinina (BK; 0.1 nmol/sítio) e PNV (30 μg/sítio) foram co-injetados com AA e PGE₁ (colunas vazias), respectivamente. Colunas cheia representam co-injeção (BK + AA) e (PNV + PGE₁) + inibidor específico de lipoxigenase, BW A4C. As colunas hachuradas representam a resposta produzida pela injeção individual de BW A4C (1nmol/sítio), PGE₁ (0.1 nmol/sítio) e ácido araquidônico (AA; 3 nmol/sítio). A linha tracejada representa o edema com salina. Os resultados foram expressos como médias de 3 animais e as barras representam o erro padrão das médias. ★ p< 0.05 quando comparado aos valores controles.

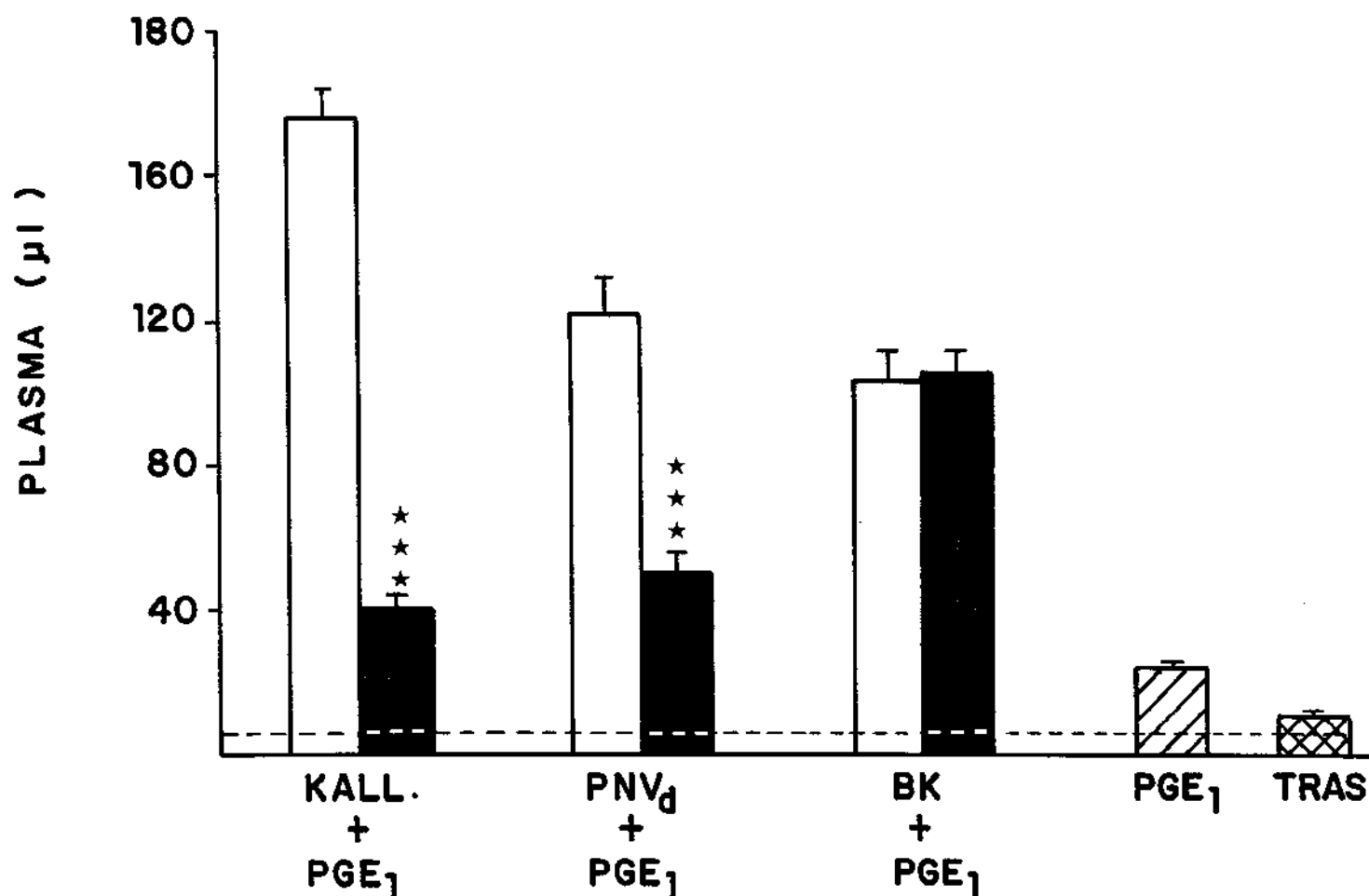


Figura 7 - Efeito do trasilol na permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho.

Calicreína (KALL; 5.7 mU/sítio), PNV (30 µg/sítio) e Bradicinina (BK, 0.1 nmol/sítio) foram co-injetados com prostaglandina E₁ (0.1 nmol/sítio; colunas vazias). As colunas cheias representam co-injeção de agentes inflamatórios (calicreína, PNV, bradicinina) + PGE₁ + trasilol (10 µg/sítio). As colunas hachuradas representam a resposta produzida pela injeção individual de trasilol (TRAS; 10 µg/sítio) e PGE₁ (0.1 nmol/sítio). A linha tracejada representa a resposta produzida pela injeção de salina. Os resultados foram expressos como médias de 6 animais as barras representam o erro padrão das médias.

***p < 0.001 quando comparada aos controles.

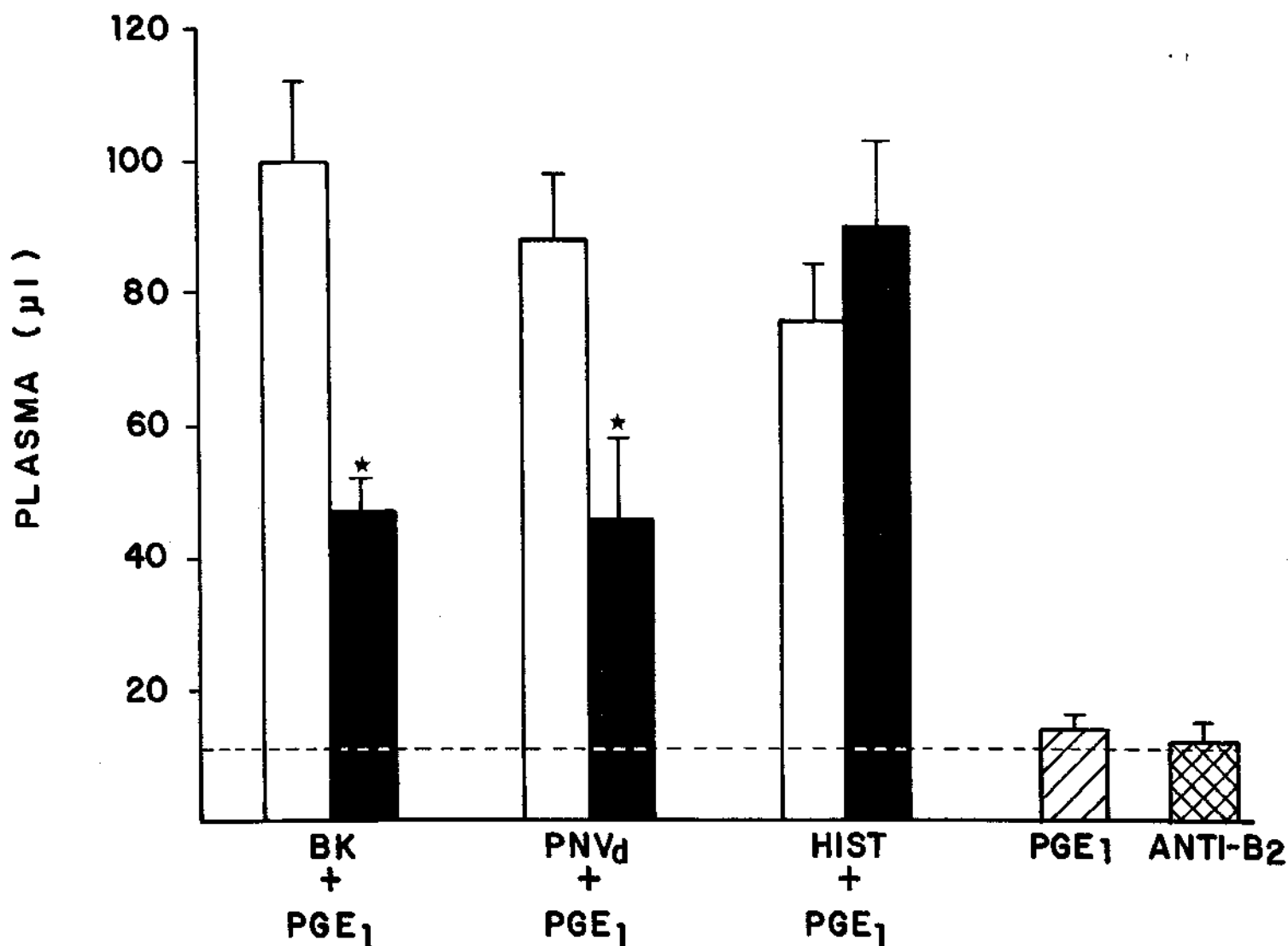


Figura - 8 Efeito do antagonista de receptor B₂ de bradicinina na permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho.

Bradicinina (BK, 0.1 nmol/sítio), PNV (30 μg/sítio) e histamina (HIST, 3 nmol/sítio) foram co-injetadas com PGE₁ (0.1 nmol/sítio) na ausência (colunas vazias) e presença (colunas cheias) do antagonista de receptor B₂ de bradicinina (D-Arg,[Hyp³,Thi^{5,8},D-Phe⁷]-BK (3 nmol/sítio). As colunas hachuradas representam a resposta produzida pela injeção de antagonista de receptor B₂ e PGE₁. A Linha tracejada representa a resposta produzida pela injeção de salina. Os resultados foram expressos como médias de 4 animais.

★ p < 0.05 quando comparados aos valores controles.

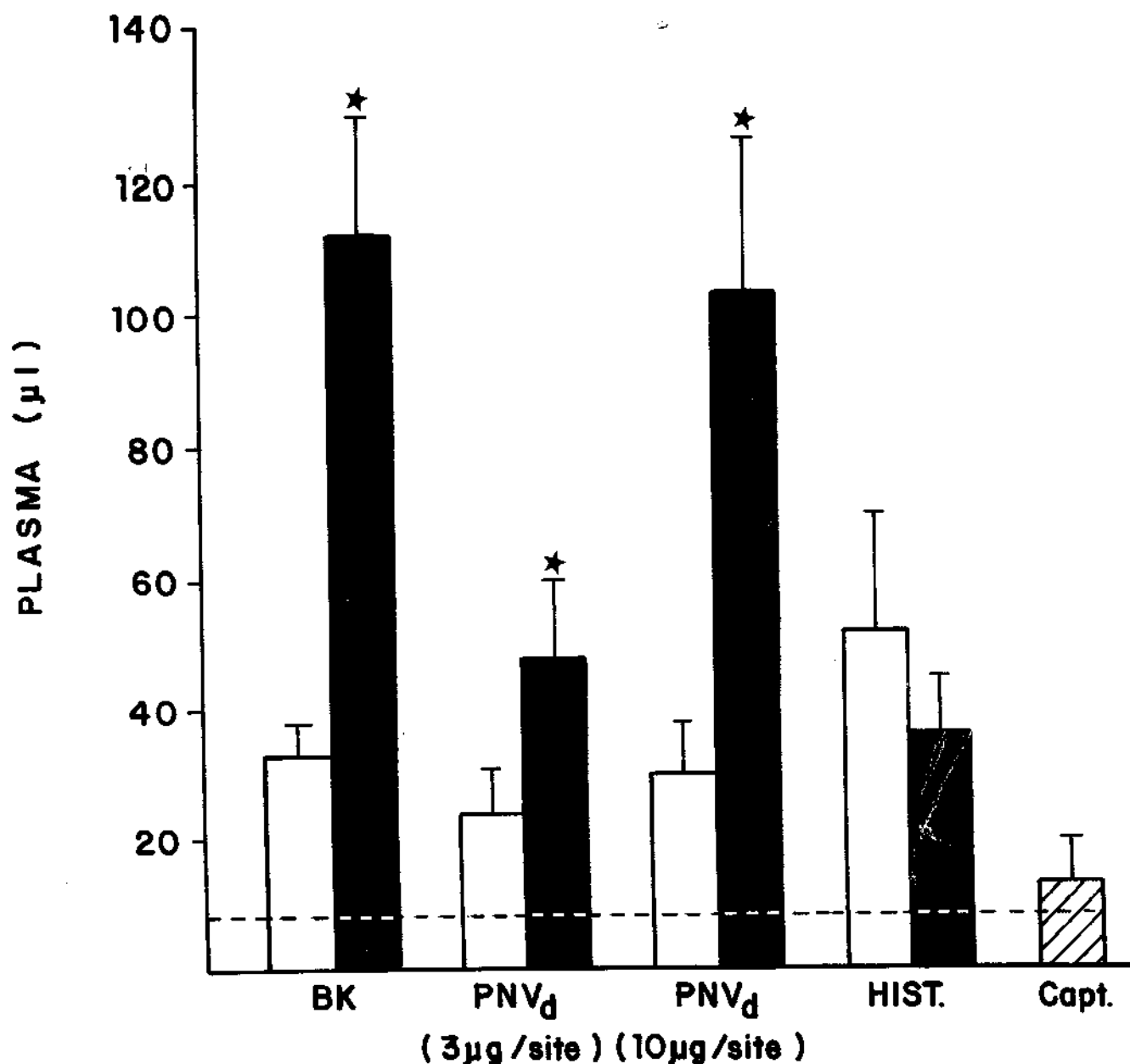


Figura 9 - Captopril potencia o edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho.

Bradicinina (0.1 nmol/sítio), PNV (3 e 10 μg/sítio) e histamina (10 nmol/sítio) foram injetados individualmente (colunas vazias) ou em combinação com captopril (1 nmol/sítio; colunas cheias). A coluna hachuriada representa a resposta produzida pela injeção individual de captopril. Linha tracejada representa a resposta produzida pela injeção de salina. Os resultados foram expressos como médias 4 animais e as barras representam o erro padrão das médias. ★ $p < 0.05$ quando comparado aos valores controles.

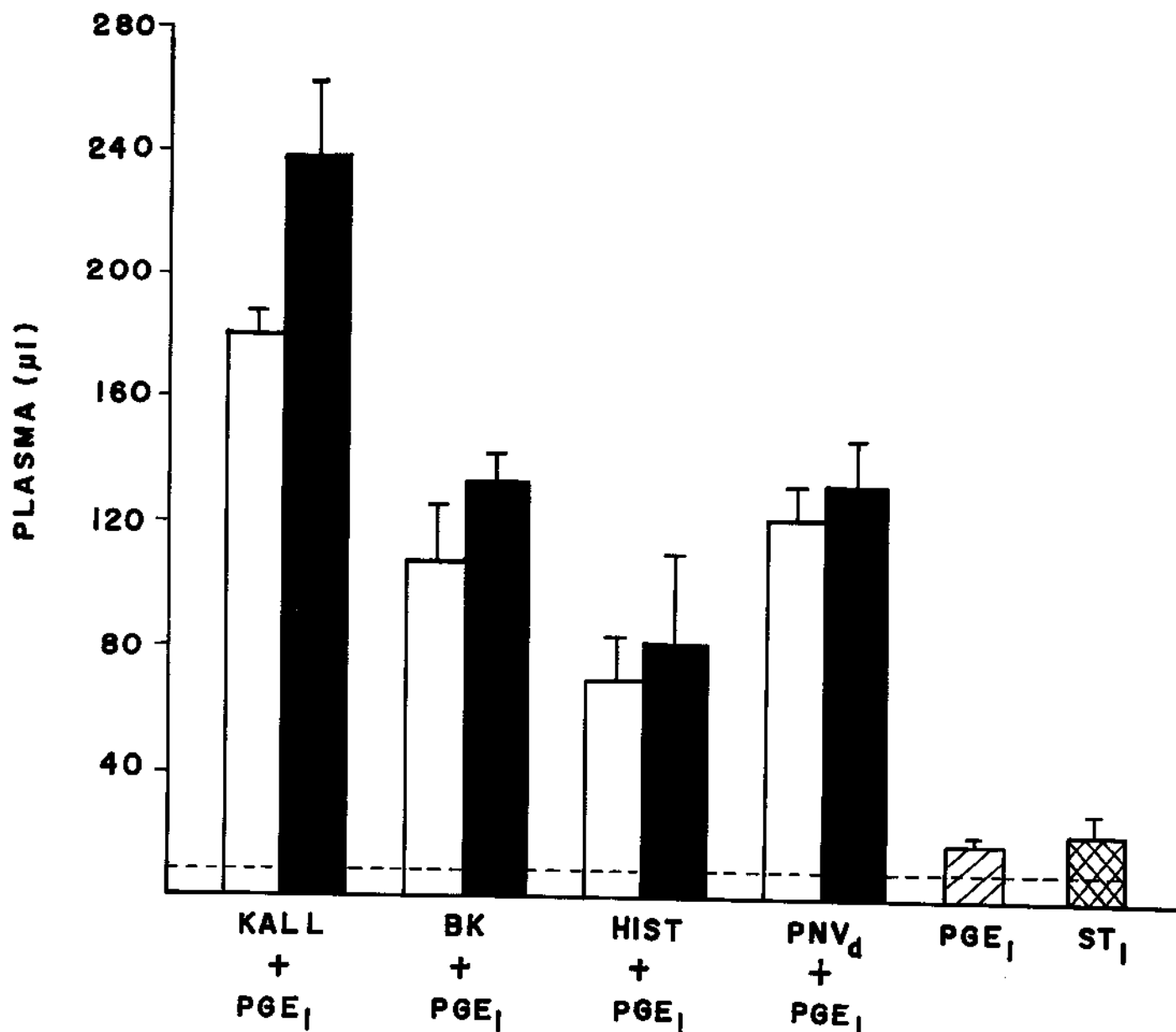


Figura 10 - Efeito do Soybean trypsin inhibitor (ST-I) no edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em pele de coelho

Caliceína (Kall; 5.7 mU/sítio), bradicinina (BK; 0.1 nmol/sítio), histamina (HIST, 3 nmol/sítio) e veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNVd; 30 μg/sítio) foram co-injetados com PGE₁ (0.1 nmol/sítio) na ausência (colunas vazias) e presença (colunas cheias) do inibidor específico de caliceína plasmática (ST-I; 10 μg/sítio). O edema induzido pela PGE₁ e soybean trypsin inhibitor (ST-I) estão representados em colunas hachuradas. Os resultados foram expressos como médias 3 animais e as barras representam o erro padrão das médias.

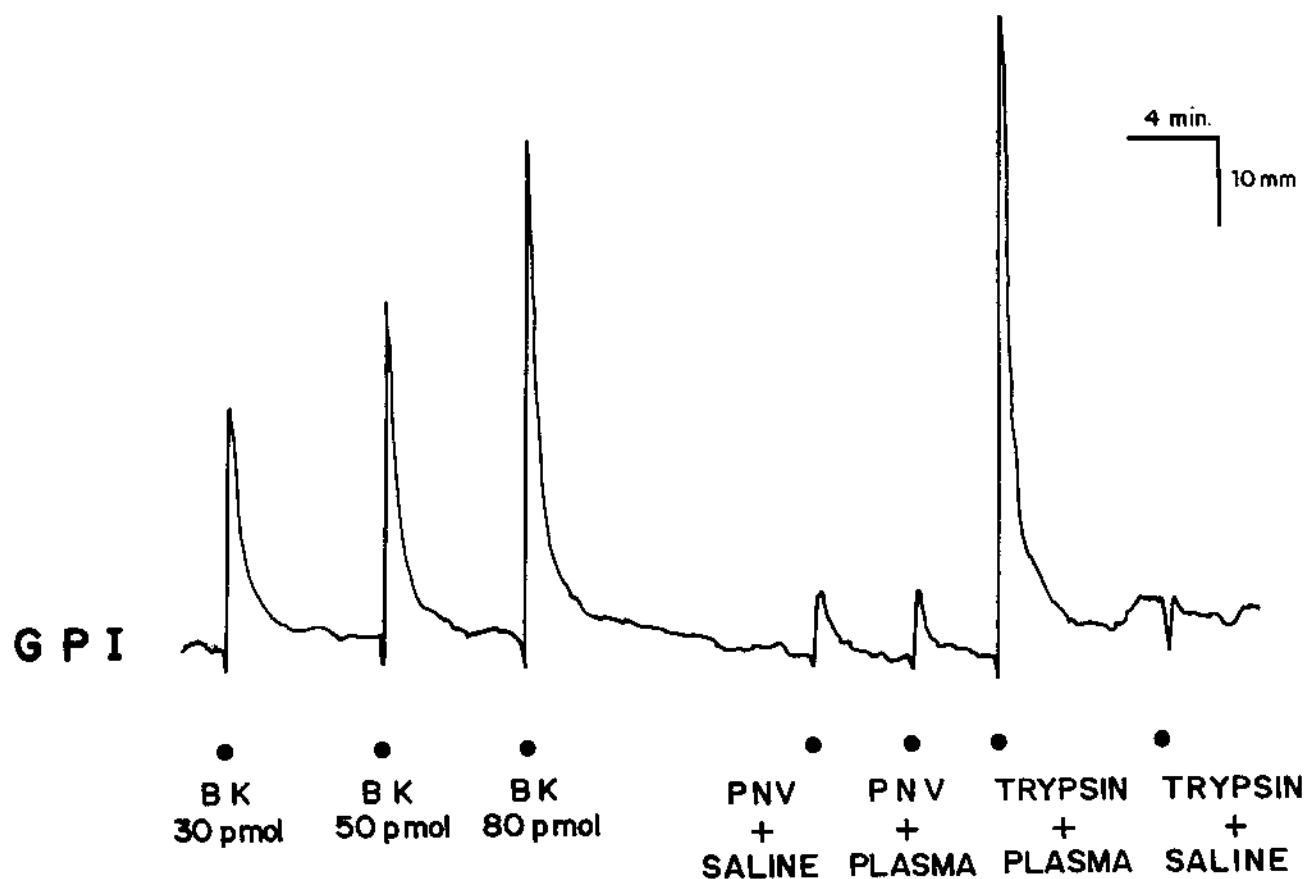


Figura 11 - Efeito da incubação de tripsina e veneno de *Phoneutria nigriventer* com plasma de coelho.

A formação de bradicinina foi detectada através da atividade contrátil em íleo de cobaia (GPI) previamente tratado com mepiramina, metisergida, fenoxibenzamina, propranolol, atropina e indometacina. O traçado acima é representativo de 4 experimentos realizados.

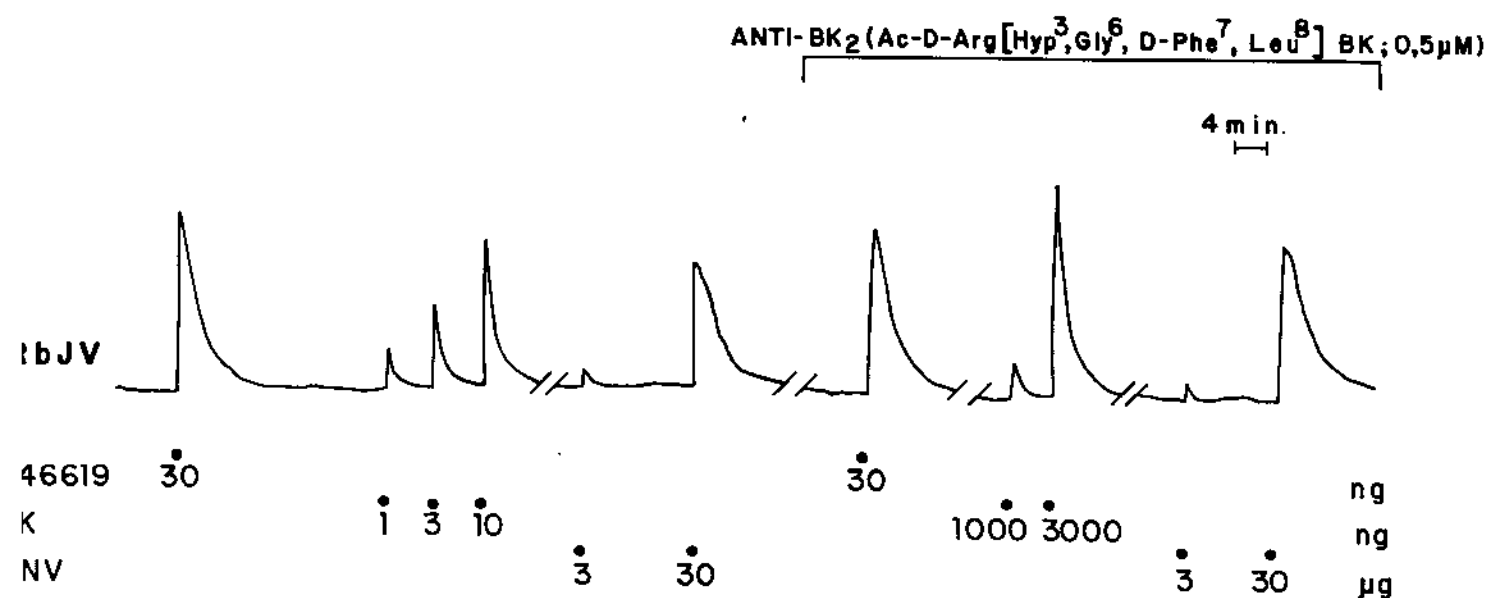


Figura 12 - Efeito do anti-BK₂ sobre atividade contrátil do veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em veia jugular (RbJV). Os tecidos desprovidos de endotélio foram cortados em segmentos espirais e superfundidos em cascata com solução de Krebs-Ringer (5 ml/min, 37°C). Análogo do tromboxano (U46619, 30 ng), bradicinina (BK, 1-10 ng) e PNV (3-30 μg) induziram contrações nos tecidos vasculares. O anti-BK₂ (0.5 μM) inibiu significativamente a resposta contrátil da bradicinina mas não as induzidas pelo U46619 e PNV. Resultados similares foram obtidos três experimentos.

Discussão

A aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* é responsável pelo maior número de acidentes de araneísmo no centro-oeste e sul do Brasil (Lucas, 1988). No envenenamento provocado pelo veneno de *Phoneutria nigriventer* são descritos o aparecimento de dor intensa, espasmos musculares, tremores, paralisia espástica, salivação, diarreia, sudorese, taquicardia, arritmias e outros (Brazil & Vellard, 1926; Schenberg & Pereira Lima, 1966). Muitos desses efeitos são causados pela liberação de neurotransmissores pelas terminações nervosas autonômicas e motoras (Vital Brazil *et al.*, 1988).

Em preparações neuromusculares de nervo frênico-diafragma de rato, o veneno de *Phoneutria nigriventer* causa despolarizações não uniformes das membranas musculares e aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura. Estes efeitos são abolidos na presença de tetrodotoxina ou com uma redução da concentração do sódio no meio nutritivo (Fontana & Vital Brazil, 1985). Em aurículas isoladas de cobaia, o veneno de *Phoneutria nigriventer* induz efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos seguidos de aumento na frequência e tensão das contrações espontâneas. A tetrodotoxina abole o cronotropismo e inotropismo sugerindo que tais efeitos são decorrentes da liberação de acetilcolina e noradrenalina das terminações nervosas autonômicas consequentes à ativação de canais de sódio nos terminais nervosos (Vital Brazil *et al.*, 1988).

Em preparações neuromusculares de fêmur de gafanhoto foi demonstrado a presença de um polipeptídeo (PM 5200) neste veneno capaz de provocar efeito estimulatório induzindo atividade excitatória neuronal (Entwistle *et al.*, 1982). Recentemente, três frações (PhTx1, PhTx2, PhTx3) neurotóxicas, e letais em camundongos, foram isoladas do veneno de aranha *Phoneutria*

nigriventer por gel filtração e cromatografia de fase reversa (Diniz *et al.*, 1990; Rezende Jr. *et al.*, 1991).

Nossos resultados demonstraram que o veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) contém substância(s) capaz(es) de aumentar a permeabilidade vascular em pele de rato e coelho. Estudos anteriores mostraram que a formação de edema em pele de ratos e coelhos é resultado de uma ação sinérgica entre vasodilatadores e mediadores que causam aumento de permeabilidade vascular (Williams & Peck, 1977; Brain & Williams, 1985 a,). Em nossos experimentos, tal sinergismo também foi observado quando co-injetamos o PNV com vasodilatadores como CGRP e PGE₁, indicando que a atividade edematogênica do veneno é devido principalmente a uma ação sobre a permeabilidade e não ao fluxo vascular.

O PNV contém quantidades variáveis de histamina (0.06-1.0%) e serotonina (0.03-0.25%; Schenberg & Pereira Lima, 1971). Estas aminas são capazes de induzir uma resposta edematogênica local quando injetadas intradermicamente em pele de rato Spector & Willoughby, 1968). O envolvimento da histamina e/ou serotonina no edema induzido pelo PNV foi investigado utilizando-se animais previamente tratados com mepiramina e metisergida ou empregando veneno dialisado. Em ratos, histamina e serotonina exerceram uma ação importante no aumento da permeabilidade visto que os procedimentos referidos acima reduziram significativamente (embora não tenham abolido) a resposta edematogênica do veneno. A capacidade "residual" do veneno em aumentar a permeabilidade em ratos pré-tratados (ou com veneno dialisado) foi observado com a co-injeção de vasodilatadores CGRP e PGE₁, indicando que este veneno contém outras substâncias edematogênicas (provavelmente polipeptídeos), além de histamina e serotonina. Isto foi confirmado em pele de coelho visto que, nesse modelo experimental, tanto o

veneno bruto quanto o dialisado, apresentaram respostas edematogênicas semelhantes. A possibilidade do edema ser decorrente da ativação de mastócitos presentes no tecido cutâneo desses animais foi descartada visto que o veneno dialisado mantém a capacidade de causar edema em ratos pré-tratados com mepiramina e metisergida e, em coelhos. O coelho é uma espécie animal virtualmente desprovida de mastócitos e praticamente não responde a agentes que atuam por ativação de tais células (S. Brain, comunicação pessoal). Além disso, o tratamento com o antagonista de receptores H_1 de histamina, mepiramina, não apresentou efeito significativo no edema induzido pelo PNV em pele de coelho.

Alguns peptídeos do PNV (peso molecular entre 5000 e 8500) são capazes de causar um efeito estimulatório induzindo atividade excitatória neuronal em preparações neuromusculares de fêmur de gafanhoto (Entwistle *et al.*, 1982) e neurotóxica e letais em camundongos (Rezende Jr *et al.*, 1991). Visto que em pele de rato e coelho, o componente que causa efeito edematogênico tem peso molecular acima de 12000 (resultados obtidos com o veneno dialisado), descartamos a possibilidade de se tratar dos mesmos componentes.

O PNV causa edema pulmonar em animais e humanos (Schenberg & Pereira Lima, 1971), mas o mecanismo de ação é pouco compreendido. Dos resultados apresentados aqui, é possível que uma parte da resposta edematogênica seja atenuada pelo pré-tratamento com antihistamínico H_1 em pele de rato.

O PAF aumenta a permeabilidade em pele de coelho (Wedmore & Williams, 1981), rato (Hwang *et al.*, 1985), cobaia (Morley *et al.*, 1983) e humanos (Mc Given & Basran, 1984). Entretanto, é improvável que o PAF participe do aumento de permeabilidade induzido pelo PNV pois o antagonista

específico deste autacóide, WEB 2086 (Casals-Stenzel *et al.*, 1986), não alterou a resposta edematogênica do veneno. Leucotrienos B₄, C₄ e D₄ induzem formação de edema em pele de ratos, cobaias e coelhos (Ueno *et al.*, 1981). Entretanto, o fato do inibidor de lipoxigenase, BW A4C (Higgs *et al.*, 1988), ser ineficaz sobre o edema induzido pelo de PNV descarta o envolvimento de tais substâncias.

As prostaglandinas E₂ e I₂ aumentam a formação de edema local em consequência de sua atividade vasodilatadora (Williams & Morley, 1973; Williams & Peck, 1977; Williams, 1979). Visto que a picada da aranha armadeira é caracterizada por uma intensa dor local (Schenberg & Pereira Lima, 1971) e que, PGE₂ e PGI₂, apresentam uma potente atividade hiperalgésica em terminações nervosas periféricas (Ferreira, 1972; Ferreira *et al.*, 1978), é possível que tais prostaglandinas possam estar envolvidas em ambos os fenômenos, ou seja, potenciando a formação de edema e sensibilizando a terminação nervosa. Entretanto, em nosso modelo não houve possibilidade de investigar a participação destas substâncias mais profundamente, devido a necessidade de se injetar um vasodilatador para melhor quantificar a resposta edematogênica. Entretanto devemos salientar que o veneno de *Phoneutria nigriventer* não causa liberação de prostaglandinas de pulmão isolado de cobaia (Antunes *et al.*, submitted).

A BK é um importante mediador modulador da permeabilidade vascular (Spector & Willoughby, 1968). De modo geral, as cininas são formadas pela ação das calicreínas no cininogênio de baixo e alto peso molecular, encontrados principalmente em tecidos e plasma, respectivamente. O inibidor inespecífico de calicreína, trasilol (Vogel, 1979) e o antagonista de receptor B₂ de bradicinina (Vavrek & Stewart, 1985) reduziram significativamente o edema induzido pelo PNV. Além disso, o captopril (inibidor de cininase II), potencializou

marcadamente o edema induzido pelo PNV, mas não pela histamina, indicando que esta potenciação não foi decorrente da atividade vasodilatadora deste composto. Estes resultados indicam que o edema induzido pelo de PNV em pele de coelho depende da ativação de calicreína e consequente formação local de bradicinina e/ou calidina. Visto que o PNV não induziu formação de bradicinina a partir de plasma de coelho *in vitro* e que o inibidor de calicreína plasmática, SBTI (Spector & Willoughby, 1968) não foi eficaz em bloquear a atividade edematogênica do veneno dialisado, sugerimos que o aumento de permeabilidade aqui observado é decorrente da ativação de calicreínas teciduais (e não plasmáticas). Presença de peptídeos com atividade semelhante à bradicinina pode ser descartada devido à diálise e aos estudos realizados *in vitro*, demonstrando ausência desta atividade em tecido vascular venoso de coelho. Entretanto, nossos resultados não permitem descartar a possibilidade da calicreína tecidual estar presente no veneno, visto que esta enzima é encontrada na glândula salivar e o veneno é obtido através de estímulo elétrico.

Calicreínas teciduais são glicoproteínas ácidas (29000 daltons) que atuam localmente, perto do seu sítio de origem e apresentam grandes diferenças em relação as calicreínas plasmáticas (Fukushima *et al.*, 1985; Evans *et al.*, Margolius, 1989). Um fragmento de 24 aminoácidos é removido desta proteína para formar a enzima ativa (Fukushima *et al.*, 1985), mas a protease endógena responsável por esta reação ainda não está identificada. As calicreínas teciduais atuam especificamente em cininogênio de baixo peso molecular, formando o decapeptídeo calidina (lis-bradicinina), o qual atua no receptor B₂ de bradicinina (de Nucci *et al.*, 1988; D'Orleans-Juste *et al.*, 1989; Regoli *et al.*, 1990). O papel fisiológico da calidina ainda não está bem estabelecido; entretanto, em traumas como picada de aracnídeos, é provável que cininas geradas extravascularmente (como a calidina) possam ser

moduladores mais importantes da permeabilidade vascular e dor do que cininas geradas intravascularmente (como a BK). Nesse sentido, seria interessante investigar o uso clínico do trasilol no alívio dos sintomas do envenenamento causado pela *Phoneutria nigriventer*.

É sabido que venenos de vespas e formigas contém cininas (Piek, 1991). Entretanto, nenhum ativador de calicreína tecidual foi descrito até agora em venenos. A identificação bioquímica do(s) peptídeo(s) responsável(is) por esta atividade o PNV poderá ser uma ferramenta útil na compreensão do papel do sistema cininogênio-calicreína-cinina tecidual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, D.H., Snyder, F. (1983). Biosynthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 258: 97-102.
- Antunes, E., Marangoni, R.A., Borges, N.C.C., Fontana, M.D., de Nucci, G. (1990). Pharmacological profile of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 101, 508P.
- Antunes, E., Marangoni, R.A., Borges, N.C.C., Hyslop, S., Fontana, M.D., de Nucci, G. (1992). Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, submitted.
- Archer, C.B., Frohlic, W., Page, C.P., Paul, W., Morley, J., McDonald, D.M. (1984). Synergistic interaction between prostaglandins and PAF-acether in experimental animals and man. *Prostaglandins* 27: 495.
- Arrang, J.M., Garbarg, M., Schwartz, J.C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptors. *Nature* 302: 832.
- Ash, A.S.F., Schild, H.O. (1966). Receptors mediating some actions of histamine. *Br. J. Pharmacol.* 27: 427-39.
- Benditt, E.P., Wong, R.L., Arase, M., Roeper, E. (1955). 5-Hydroxytryptamine in mast cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90: 303.
- Benveniste, J., Henson, P.M., Cochrane, C.G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 136: 1356-77.
- Bergstrom, S., Sjovall, J. (1960a). The isolation of prostaglandin E from sheep prostate glands. *Acta. Chem. Scand.* 14: 1693-1700.
- Bergstrom, S., Sjovall, J. (1960b). The isolation of prostaglandin E from sheep prostate glands. *Acta. Chem. Scand.* 14: 1701-7.
- Berridge, M.J (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 159-93.
- Bhoola, K.D., May May Yi, R., Morley, J., Schachter, M. (1962). Release of kinin by an enzyme in the accessory sex glands of the guinea-pig. *J. Physiol (London)*. 163: 269-80.
- Bhoola, K.D., Lemon, M.J.C., Matthews, R. (1979). Kallikrein in exocrine glands. In: *Bradykinin. Kallidin Handbook of Experimental Pharmacology*. vol. 25 (suppl). Ed. E.G. Erdos. New York: Springer Verlag pp. 484-523.

Black, J.W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R., Parsons, E.M. (1972). Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236: 385-90.

Bonnet, J., Loiseau, A.M., Orvoen, M., Bessin, P. (1981). Platelet-activating factor (PAF-acether) involvement in acute inflammatory and pain processes. *Agents Actions* 11: 559-652.

Bradley, P.B., Engel, G., Feniuk, W., Fozard, J.R., Humphrey, P.P. (1986). Proposals for the classification and nomenclature of function receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 25: 563-76.

Brain, S.D., Williams, T.J. (1985). Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 86: 855-60.

Bray, M.A., Cunningham, F.M., Ford-Hutchinson, A.W., Smith, M.J.H. (1981). Leukotriene B₄: A mediator of vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 72: 483-86.

Buckley, T.L., Brain, S.D., Rampart, M., Williams, T.J. (1991). Time-dependent synergistic interactions between the vasodilatory neuropeptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1515-19.

Buonassi, V., Colburn, P. (1980). Hormone and surface receptors in vascular endothelium. *Adv. Microcir.* 9: 76-96.

Casals-Stenzel, J.G., Muacevic, G., Weber, K.H. (1986). WEB 2086, a new and specific antagonist of platelet-activating factor (PAF) *in vitro* and *in vivo*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 334: R44.

Chahl, L.A. (1977). Interactions of substance P with putative mediators of inflammation and ATP. *Eur. J. Pharmacol.* 44: 45-9.

Chiba, T., Yanaguchi, A., Yamatani, T., Nakamura, A., Morishita, T., Inui, T., Fukase, M., Noda, T., Fujita, T. (1989). Calcitonin-gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am. J. Physiol.* 256: 331-35.

Chignard, M., Le Couedic, J.P., Tence, M., Vargaftig, B.B., Benveniste, J. (1979). Role of platelet activating factor in platelet aggregation. *Nature* 275: 799-800.

Chilton, F.H., Ellis, J.M., Olson, S.C., Wykle, R.L. (1984). 1-alkyl-2-arachidonyl-sn-glycero-phosphocholine. A common source of platelet-activating factor and arachidonate in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 259: 12014-19.

Colman, R.W. (1974). Formation of human plasma kinin. N. Eng. J. Med. 291: 509-15.

Couture, R., Regoli, D. (1982). Mini review: smooth muscle Pharmacology of substance P. Pharmacology 24: 1-25

Crunkhorn, P., Willis, A.L. (1971). Interactions between prostaglandins E and F given intradermally in the rat. Br. J. Pharmacol. 41: 507-12.

Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F., Ondetti, M.A. (1977). Designing of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. Biochemistry 16: 5484-91.

D' Orleans-Juste, P., de Nucci, G., Vane, J.R. (1989). Kinins act on B₁ or B₂ receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. Br. J. Pharmacol. 96: 920-26.

D' Orleans-Juste P., Dion, S., Mizrahi, J., Regoli, D. (1985). Effects of peptides and non-peptides on isolated arterial smooth muscle. Role of Endothelium. Eur. J. Pharmacol. 114: 9-21.

Dale, H.H., Laidlaw, P.P. (1910). The physiologic action of B imidazolyl-ethylamine. J. Physiol. 41: 318-44.

Dale, H.H. (1929). Some chemical factors in the control of some actions of histamine. Br. J. Pharmacol. 27: 427-39.

de Nucci, G., Gryglewski, R.G., Warner, T.D., Vane, J.R. (1988). The receptor-mediated release of EDRF and PGI₂ from bovine aortic endothelial cells is coupled. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2334-38.

Deutsh H.F., Diniz C.R. (1955). Some proteolytic activity of snake venoms. J. Biol. Chem. 216: 17-25.

Devillier, P., Regoli, D., Asseraf, A., Descours, B., Marsac, J., Renoux, M. (1986). Histamine release and local responses of rat and human skin to substance P and other mammalian tachykinins. Pharmacol. 32: 340-7.

Diniz, C.R., Carvalho, I.F. (1963). A micromethod for determination of bradykininogen under several conditions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 104: 77-89.

Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Junior, L.R., Kelly, P., Fischer, S., Reiman, F., Oliveira, E.B., Richardson, M. (1990). The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. FEBS Lett. 263: 251-3.

Dray, A., Bettaney, J., Forster, P., Perkins, M.N. (1988). Bradykinin-induced stimulation of afferent fibers is mediated through protein kinase C. Neurosci. Lett 91: 301-7.

Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs E.G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Ann.Rev. Biochem.* 56: 567-613.

Entwistle, I.D., Johnstone, R.A.W., Medzihradszky, D., May, T.E. (1982). Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider ***Phoneutria nigriventer*** and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. *Toxicon* 20: 1059-67.

Erdos, E.G. (1979). Kininases. In: Bradykinin, kallidin and kallikrein. *Handbook of Experimental Pharmacology* vol.25 (supp) Ed.E.G. Erdos New York: Springer-Verlag, pp 427-87.

Erspamer, V. (1954). Pharmacology of indolealkylamines. *Pharmacol. Rev.* 6: 425.

Evans, B.A. (1988). Structure and chromosomal localization of the renal kallikrein gene. *Biochemistry* 27: 3124-9.

Farmer, S.G., Burch, R.M., Meeker, S.A., Wilkins, D.E. (1989). Evidence for a pulmonary B₃ bradykinin receptor. *Mol. Pharmacol.* 36: 1-8.

Feldberg, W., Kellaway, C.H. (1938). Liberation of histamine and formation of lysolecithin-like substance by cobra venom. *J. Physiol.* 94: 299-308.

Ferreira, S.H., Vane, J.R. (1967). The detection and estimation of bradykinin in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 29: 367-377.

Ferreira, S.H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.* 24: 163-9

Ferreira, S.H. (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature* 240: 200-3.

Ferreira, S.H., Nakamura, M., Castro, M.S.A. (1978). The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. *Prostaglandins* 16: 31-9.

Fischer, L.A., Kikkawa, D.O., Rivier, J.E., Amara, S.G., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G., Vale, W.W., Brown, M.R. (1983). Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin-gene-related peptide. *Nature* 305: 534-6. .

Fontana, M.D., Vital-Brazil, O. (1985). Mode of action of ***Phoneutria nigriventer*** spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 18: 557-65.

Ford-Hutchinson, A.W., Walker, J.R., Davidson, E.M, Smith, M.J.H. (1978). PGI₂: a potential mediator of inflammation. *Prostaglandins* 16: 253-8.

Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V, Shipley, M.E., Smith, M.J.H. (1980). Leukotriene B: a potent chemokinetic and aggregation substance released from polymorphonuclear leucocytes. *Nature* 286: 264-5.

Foreman, J.C., Jordan, C.C., Oehme, P., Renner, H. (1983). Structure-activity relationships for some substance P-related peptides that cause wheal and flare reactions in human skin. *J. Physiol.* 335: 449-65.

Frazer, A., Maayani, S., Wolfe, B. (1990). Subtypes of receptors for serotonin. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 307-48.

Fukushima, D., Kitamura, N., Nakanishi, S. (1985). Nucleotide sequence of cloned cDNA from human pancreatic kallikrein. *Biochemistry* 24: 8037-43.

Fuller, R.W., Conradson, T.B., Dixon, C.M.S., Crossman, D.C., Barnes, P.J. (1987). Sensory neuropeptide effects in human skin. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 781-8.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 286: 373-6.

Furth, J., Hagen, P., Hirsch, E.I. (1957). Transplantable mastocytoma in the mouse containing histamine, heparin, 5-hydroxytryptamine. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 95: 824.

Gamse, R., Saria, A. (1985). Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 61-6.

Garcia-Leme, J. (1978). Bradykinin, kallidin and kallikrein. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol.25 (supp) Ed.E.G. Erdos New York: Springer-velag, pp. 427-87.

Gilmore, N., Vane, J.R., Wyllie, J.H. (1968). Prostaglandins released by the spleen. *Nature* 218: 1135-40.

Gorman, R.R., Bunting, S., Miller, O.V. (1977) Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX). *Prostaglandins* 13: 377-88.

Graham, H.T., Wheelwright, F., Parish, H.H., Marks, A.R., Lowry, O.H. (1952). Distribution of histamine among blood elements. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Bio.*, 11: 350.

Gryglewski, R.J., Bunting, S., Moncada, S., Flower, R.J., Vane, J.R. (1976). Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. *Prostaglandins* 12: 685-713.

Guimarães, J.A., Borges, D.R., Prado, E.S., Prado, J.L. (1973). Kinin-converting aminopeptidase from human serum. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3157-72.

Haley, J.E., Dickenson, A.H., Schachter, M. (1989). Electrophysiological evidence for a role of bradykinin in chemical nociception in the rat. *Neurosci. Lett.* 97: 198-202.

Handley, D.A., Arbeny, C.M., Lee, L.M., van Valen, R.J., Saunders, R.N. (1984). Effect of platelet-activating factor on endothelial permeability to plasma molecules. *Immunopharmacology* 8: 137-142.

Higgs E.A., O Grady J., Thrower P.A., Moncada S. (1979). Prostacyclin: inflammatory effects in human skin. Fourth International Prostaglandin Conference.p 48.

Higgs, G.A., Follenfant, R.L., Garland, L.G. (1988). Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: effects on acute inflammatory responses. *Br. J. Pharmacol.* 94: 547-51.

Horton, E.W. (1963). Action of prostaglandin E_1 on tissues which respond to bradykinin. *Nature* 200: 892-3.

Humphrey, D.M., Mc Manus, L.M., Hanahan, D.J., Pinckard, R.N. (1984). Morphologic basis of increased vascular permeability induced by acetyl-glycerol ether phosphorylcholine. *Lab. Invest.* 50: 16-25, 1984.

Hwang, S-B., Li, C-L., Lam, M.H., Shen, T-Y. (1985). Characterization of cutaneous vascular permeability induced by platelet-activating factor in guinea-pigs and rats and its inhibition by a platelet-activating factor receptor antagonist. *Lab. Invest.* 52: 617-30.

Ito, T.T., Ogawa, K., Enomoto, J., Hashimoto, H., Kai, J., Satake, T. (1980). Comparison of effects of PGI_2 and PGE_1 on coronary systemic haemodynamics and on coronary arterial cyclic nucleotide levels in dogs. *Adv. Prostaglandin Tromboxane Leukotriene Res.* 7: 641-6.

Johnson, R.A., Morton, D.R., Kinner, J.H., Gorman, R.R., Mc Guire, J.C., Sun, F.F., Whittaker, N., Bunting, S., Salmon, J., Moncada, S., Vane, J.R. (1976). The chemical structure of prostaglandin X prostacyclins. *Prostaglandins* 12: 915-28.

Kaplan, A.P., Silvenberg, M. (1987). The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood* 70: 1-15.

Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanzawa, I., Munekata, E. (1983). Novel neuropeptides, neurokinin A and B isolated from porcine spinal cord. *Proc. Jap. Acad. Ser. B* 59: 101-4.

Larsen, G.L., Henson, P.M. (1983). Mediators of inflammation. *An. Rev. Immunol.* 1: 335-59.

Lewis, T. (1927). The blood vessels of the human skin and their responses. Shaw, London. pp. 1-322.

Lembeck, F., Holzer, P. (1979). Substance P as neurogenic mediator of antidromic stimulation and neurogenic plasma extravasation. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310: 175-83.

Longhurst, J.C., Kaufran, M.P., Ordway, G.A., Musch, T.I. (1984). Effects of bradykinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs. Am. J. Physiol. 247: 552-59.

Lucas, S. (1988). Spiders in Brazil. Toxicon 26: 759-72.

Lynch, J.M., Lotner, G.Z., Betz, S.J., Henson, P.M. (1979). The release of platelet-activating factor by stimulated rabbit neutrophils. J. Immunol. 123: 1219-26.

Marangoni, S., Borges, N.C.C., Marangoni, R.A., Antunes, E., Vieira, C.A., Novello, J.C., Domont, B.G., Giglio, J.R., Oliveira, B. & de Nucci, G. (1993). Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. Toxicon, in press.

Margolius, H.S. (1989). Tissue kallikrein and kinins: regulation and roles in hypertensive and diabetic diseases. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 343-64.

Martins, M.A., Silva, P.M.R., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Dias, P.M.F.L., Lima, M.C.R., Cordeiro, R.S.B., Vargaftig, B.B. (1989). Pharmacological modulation of PAF-induced rat pleurisy and its role in inflammation by zymosan. Br. J. Pharmacol. 96: 363-71.

McGivern, D.V., Basran, G.S. (1984). Synergism between platelet-activating factor (PAF-acether) and prostaglandin E₂ in man. Eur. J. Pharmacol. 80: 503-9.

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 263: 663-5.

Morley, J., Page, C.P., Paul, W. (1983). Inflammatory actions of platelet activating factor (PAF-acether) in guinea-pig skin. Br. J. Pharmacol. 80: 503-9.

Mota, I., Beraldo, W.T., Junqueira, L.C.U. (1953). Protamine-like property of compound 48/80 and stilbamidine and their action on mast cells. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 83: 455.

Muller-Esterl W. (1989). Kininogens, kinins and kinships. *Thromb. Haemost.* 61: 2-6.

Myers, P.R., Minor Jr, R.L., Guerra Jr, R., Bates, J.N., Harrison, D.G. (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161-3.

Ng, D.S., Wong, K. (1988). Specific binding of platelet-activating factor (PAF) by human peripheral blood mononuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 311-16.

Palmer, R.M.J. , Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-6.

Paton, W.D.M. (1957). A pendulum auxotonic lever. *J.Physiol. (London)* 137: 35P.

Piek, T. (1991). Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon* 29: 139-49.

Piotrowski, W., Foreman, J.C. (1986). Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin on histamine release. *Br. J. Dermatol.* 114: 37-46.

Rapport, M.M. (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin). The presence of creatinine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.* 180: 961-9.

Rampart, M., Williams, T.J. (1986). Polymorphonuclear leukocyte-dependent plasma leakage in rabbit skin is enhanced or inhibited by prostacyclin, depending on the route of administration. *Am. J. Pathol.* 124: 66-73.

Rampart, M., Williams, T.J. (1988). Evidence that neutrophil accumulation induced by interleukin-1 requires both local protein biosynthesis and neutrophil CD 18 antigen expression *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 94: 1143-48.

Rampart, M., De Smet, W., Fiers, W., Herman, A.G. (1989). Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin *in vivo*. *J. Exp. Med.* 169: 2227-32.

Regoli, D., Barabe, J., Park, W.K. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 855-67.

Regoli, D., Rhaleb, N-E., Dion, S., Drapeau, G. (1990). New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B₂ receptor characterization. *Trends in Pharmacol. Sci.* 11: 156-61.

Regoli, D., Nantel, F. (1991). Pharmacology of neurokinin receptors. *Biopolymers* 31: 777-83.

Rezende Jr, L., Cordeiro, M.N., Oliveira, E.B., Diniz, C.R. (1991). Isolation of neurotoxic peptides from venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* 29: 1225-33.

Riley, J.F. (1953a). Histamine in tissue mast cells. *Science* 118: 332.???

Riley, J.F. (1953b). The relationship of the tissue mast cells to the blood vessels in the rat. *J. Pathol. Bacteriol* 65: 461-8.

Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G. (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-73.

Rosenfeld, M.G., Mermod, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., Evans, R.M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin-gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304: 129-35.

Rowley, D.A., Benditt, E.P. (1956). 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. *J. Exp. Med.* 103: 399-412.

Said, S.I., Mutt, V. (1970). Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169: 1217-18.

Samuelsson, B., Hamarstrom, S. (1980). Nomenclature for leukotrienes. *Prostaglandins* 5: 645-8.

Schachter, M. (1980). Kallikreins (kininogenases): a group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacol. Rev.* 31: 1-17.

Schenberg, S., Pereira Lima, F.A. (1966). Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer fera*. *Mem. Inst. Butantan* 33: 627-38.

Schenberg, S., Pereira-Lima, F.A. (1971). *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. In: *Venomous animals and their venoms*, vol.3, p.279-97 (Bucherl, W. and Buckley, E.E. Eds) New York: Academic Press.

Spector, W.G., Willoughby, D.A. (1968). Endogenous mediators of increased vascular permeability in inflammation. In: *The Pharmacology of inflammation*. The English Universities Press LTD. 22-54.

Silva, P.M.R., Cordeiro, R.S.B., Martins, M.A., Henriques, M.G.M.O., Vargaftig, B.B. (1986). Platelet involvement in rat paw oedema induced by 2-methoxy-PAF. *Inflammation* 10: 393-401.

Silva, P.M.R., Martins, M.A., Castro-Faria-Neto, H.C., Cordeiro, R.S.B., Vargaftig, B.B. (1991). Generation of an eosinophilotactic activity in the pleural cavity of platelet-activating factor-injected rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 1039-44.

Simionescu, N., Hatteanu, C., Antohe, F., Simionescu, M. (1982). Endothelial cell receptors for histamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 401: 132-49.

Sondergaard J., Greaves M.W. (1971). Prostaglandin E₁: effect on human cutaneous vasculature and skin histamine. *Br. J. Dermatol.* 84: 424-8.

Spector, W.G. & Willoughby, D.A. (1968). Endogenous mediators of increased vascular permeability in inflammation. In: *The Pharmacology of Inflammation*. The English Universities Press LTD., pp 22-54.

Suga, K., Kawasaki, T., Blank, M.L., Snyder, F. (1990). An arachidonoyl (polyenoic) specific phospholipase A₂ activity regulates the synthesis of platelet-activating factor in granulocyte HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 33: 1886-90.

Sundler, F., Brondin, E., Ekblad, R., Hakanson, Uddman, R. (1985). In tachykinin antagonist, eds. R. Hakanson and Sundler Elsevier, London, pp.3-14.

Stimler, N.P., Bloor, C.M., Hugli, T.E., Wykle, R.L., McCali, C.E., O'Flaherty, J.T. (1981). Anaphylactic actions of platelet-activating factor. *Am. J. Pathol.* 105: 64-79.

Taiwo, Y.O., Levine, D. (1988). Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating of bradykinin noradrenaline hyperalgesia. *Brain Res.* 458: 402-6.

Tarayre, J.P., Delhon, A., Bruniquel, F., Puech, L., Tisne-Versailles, J., Couzinier, J.P. (1986). Exudative, cellular and humoral reactions to platelet-activating-factor (PAF-acether) in the pleural cavity of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 124: 317-23.

Tateson, J.E., Moncada, S., Vane, J.R. (1977). Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins* 13: 389-97.

Ueno, A., Tanaka, K., Katori, M., Hayashi, M., Arai, Y. (1981). Species differences in increased vascular permeability by synthetic leukotrienes C₄ and D₄. *Prostaglandins* 21: 637-48.

Ukena, D., Kroegel, C., Dent, G., Yukawa, T., Sybrecht, G.W., Barnes, P.J. (1989). PAF receptors on eosinophils identification with a novel ligand ^3H WEB 2086. *Biochem.Pharmacol.* 38: 1702-4.

Valone, F.H., Goetzi, E.J. (1983). Specific binding by polymorphonuclear leucocytes of the immunological mediator 1-O-hexadecyl-octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *Immunology* 48: 141-9.

Valone, F.H., Coles, E., Reinhold, V.R., Goetzi, E.J. (1982). Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets. *J. Immunol.* 129: 1637-41.

Vane, J.R. (1964). The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.* 23: 360-73.

Vargaftig, B.B., Ferreira, S. (1981). Blockade of the inflammatory effects of platelet-activating factor by cyclo-oxygenase inhibitors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 14: 187-9.

Vavrek, R.J., Stewart, J.M. (1985). Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* 6: 161-4.

Vellard, J., Vital Brazil, O. (1926). Contribuição do estudo do veneno das aranhas II. *Mem. Inst. Butantã.* 2: 3-77.

Venge, P., Hakanson, L., Peterson, C.G.B. (1987). Eosinophil activating in allergic disease. *Archs. Allergy Appl. Immunol.* 82: 333-7.

Vital-Brazil, O., Leite, G.B., Fontana, M.D. (1988). Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência Cultura (Sao Paulo)* 40: 181-5.

Vogel, R. (1979). Kallikrein inhibitors. In *Bradykinin, kallidin and kallikrein. Handb. EXP. Pharmacol., Vol.XXV, Suppl.* pp. 163-225, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

von Euler, U.S., Gaddum, J.H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J.Physiol. (Lond).* 72: 74-87.

Wallis, D. (1981). Neuronal 5-hydroxytryptamine receptors outside the central nervous system. *Life Sci.* 29: 2345.

Wedmore, C.V. & Williams, T.J. (1981). Platelet-activating factor (PAF), a secretory product of polymorphonuclear leucocytes, increases vascular permeability in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.* 74: 916-7.

Welsh J.H., Batty C. S. (1963). 5-hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. *Toxicon* 1: 165-73.

Werle E. (1960). Kallikrein, kallidin and related substances. In: polypeptides which affect blood vessels and smooth muscles. Ed. M. Schachter Pergamon: Oxford. pp. 199-209.

Williams, T.J. (1979). Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. Br. J. Pharmacol. 65: 517-24.

Williams T.J. & Peck, M.J. (1977). Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. Nature 270: 530-32.

Williams, T.J & Morley, J. (1973). Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. Nature 246: 215-17.

Williams, T.J. (1982). Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E₂ as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. Br. J. Pharmacol. 77: 505-9.

Witiak, D.T., Lewis, N.J. (1978). Absorption, distribution, metabolism, and elimination of antihistamines. In: histamine H₁ and anti-histaminics: Chemistry, Metabolism and Physiological and Pharmacological Actions. (Rocha e Silva, M.,ed) Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Vol. 18,Pt,2. Springer-Verlag, Berlin, 513-60.

Woodward, D.S., Lee, T.C., Snyder, F. (1987). The final step in the "de novo" biosynthesis of platelet-activating factor. Properties of a unique CDP-choline: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-choline-phosphotransferase in microsomes from the renal inner medule of rats. J. Biol. Chem. 262: 2520-7.

Abstract

The effect of *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) injected intradermally on vascular permeability of both rat and rabbit skin have been investigated. Oedema formation was measured as the local extravascular accumulation at skin sites of intravenously injected ^{125}I -human serum albumin. In both rat and rabbit PNV induced dose-dependent oedema which was greatly potentiated by the vasodilators calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E_1 . In rats PNV-induced oedema was markedly reduced either by previous treatment of the animals with the histamine H_1 antagonist mepyramine and the serotonin antagonist methysergide or when venom was dialysed, indicating a major role for histamine and serotonin. In rabbits, dialysis of the venom to remove histamine and serotonin did not reduce PNV-induced oedema, indicating presence of oedematogenic component(s) which is (are) different from the amines histamine or serotonin.

Phoneutria nigriventer venom (10-30 $\mu\text{g}/\text{site}$) increased vascular permeability, which was inhibited by trasylol (10 $\mu\text{g}/\text{site}$) and the bradykinin B_2 receptor antagonist D-Arg,[Hyp³,Thi^{5,8},D-Phe⁷]-Bk (3 nmol/site). In addition, the oedema induced by the venom was potentiated by the kininase II inhibitor captopril (1 nmol/site). The lipoxygenase inhibitor BWA4C (10 nmol/site) and the PAF antagonist WEB (100 nmol/site) had no effect on the venom-induced increase in vascular permeability. Incubation of rabbit plasma with *Phoneutria nigriventer* venom *in vitro* did not cause bradykinin formation. Further the plasma kallikrein inhibitor soybean trypsin inhibitor (10 $\mu\text{g}/\text{site}$), had no effect on the venom-induced increase in vascular permeability in rabbit skin.

Our results indicate that the oedema produced by *Phoneutria nigriventer* venom is dependent on the activation of the tissue kallikrein-kinin system.