Priscila Hess Lopes

**Alterações locais induzidas pela secreção
tóxica de *Philodryas patagoniensis*
(Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae)**

**São Paulo
2008**

Foto: Del Nero.

Priscila Hess Lopes

Alterações locais induzidas pela secreção
tóxica de *Philodryas patagoniensis*
(Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae)

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador(a): Dra. Maria de
Fátima Domingues Furtado

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Lopes, Priscila Hess

L864a Alterações locais induzidas pela secreção tóxica de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae) / Priscila Hess Lopes. – São Paulo: P.H.L., 2008.
130 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, 2008.

1. Venenos de origem animal
2. Serpentes – Venenos.
 - I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II Título.

LC QP 941.S6

QL 666.o6

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

À Flávia Roberta Amend. Amiga, irmã, fonte de força e inspiração. A você, por mesmo longe estar sempre tão presente, por todo o apoio e incentivo incondicionais. “Somos como ramos de uma árvore, crescemos em direções diferentes, mas nossa raiz é uma só e assim a vida de cada uma sempre será uma parte essencial da vida da outra”.

À Adriano Dias de Oliveira. Pela companhia e apoio em todas as horas, por todo o aprendizado que temos um com o outro e por me fazer tão feliz. “Você surgiu na minha vida e juntos conseguimos ir mais longe, você dividiu comigo a sua história e me ajudou a construir a minha”.

À Dulce Eliza Hess e Luiz Henrique Hess Lopes. Vocês são minha força e persistência, meus olhos e coração, vocês são o que há de melhor em mim.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre iluminar os meus caminhos.

A meus pais, Dulce Eliza Hess e Luiz Antonio Schuartes Lopes, pelo incentivo e por sempre orientarem meus passos ao longo do caminho que escolhi seguir ... À vocês devo tudo!

A meu irmão, Luiz Henrique Hess Lopes, que é tudo de mais precioso na minha vida, por me fazer imensamente feliz e nunca deixar que a tristeza e a fraqueza me dominassem.

Ao Meu namorado, Adriano Dias Oliveira, pelo carinho, amizade, incentivo e aprendizado, companhia, risadas enfim, pelos nossos momentos, por você existir na minha vida e me fazer muito feliz.

A Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado, por ter sido muito mais que orientadora, uma amiga, uma mãe, pessoa que simplesmente não encontro palavras para descrever e pela qual alimento grande carinho. Agradeço pela oportunidade, amizade, confiança e por me auxiliar em mais um passo neste longo caminho.

Ao biólogo Wilson Fernandes, Diretor do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela possibilidade de desenvolver o trabalho nas instalações do laboratório.

A Dra. Marisa Rocha, companheira de bancada, de longas conversas, conselhos e como ela diz: troca de figurinhas. Agradeço pelas extrações de veneno, pela amizade, incentivo e por tudo que tem me ensinado.

Ao Dr. Luis R.C. Gonçalves e sua aluna Bianca Zychar, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, pela atenção e grande auxílio nos ensaios de edema e microscopia intravital.

A Dra. Mônica Lopes e sua aluna Fernanda Bruni, do Laboratório Especial de Imunofarmacologia – CAT, pelo auxílio nos experimentos de modulação farmacológica.

Ao Dr. Pedro Ismael da Silva Junior, pelo grande auxílio prestado nos ensaios de dosagem de histamina.

A Dra. Kathleen Grego pelo uso dos microscópios do ambulatório do Lab. de Herpetologia do Instituto Butantan.

A Dra. Beatriz Pacheco Jordão, Dr. José Carlos Freitas e Dra. Mônica Lopes pela composição da banca do meu exame de qualificação.

Ao biólogo e amigo Leonardo de Oliveira, pelas fotografias das lâminas histológicas e por mesmo atarefado, sempre estar disposto a ajudar.

Ao biólogo Henrique Braz, pela manutenção tão dedicada dos colubrídeos e pelo apoio fundamental nos primeiros meses de adaptação em São Paulo, jamais esquecerei!

Ao biólogo e amigo André Zelanis, sempre um grande incentivador e desde muito tempo um exemplo. Obrigada pela amizade, apoio e tudo que me ensinou.

Aos meus companheiros de República: Cláudia Ribas (Jones), Lilian Parpinelli, Maria Vianna e Leonardo de Oliveira, por toda a diversão, incentivo e amizade. Vocês compartilham muito mais que só a República, teria sido muito mais difícil sem vocês.

Aos queridos amigos que fiz no laboratório: Marília C. Barros, Jeanine Arruda, Daniel Stuginski, Jorge Nicareta, Alexandre Mendes e Sávio Santana, agradeço pela amizade, pela diversão (quanta risada na hora do almoço) e pela companhia dentro e fora do laboratório. Vocês foram fundamentais, pois fizeram com que os problemas encontrados, não passassem apenas de pequenas frustrações.

A minha grande amiga e incentivadora Flávia Amend, companheira em absolutamente tudo. Agradeço pela inspiração, força, amizade e por mesmo ausente fisicamente, estar ao meu lado em todos os instantes dos meus dias.

A minha mãe número dois Josianne Amend, pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos Professores da PUC-PR, Dr. Júlio César de Moura Leite, Dr. Luiz Fernando Pereira e Dra. Selene Elíbio-Esposito, por me ensinarem os primeiros passos na carreira acadêmica e por me incentivarem sempre a continuar.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de mestrado (processo n.º 06/52695-9).

“Quanto ao grupo das Opisthoglyphas brasileiras e seu veneno, não havia ainda o Instituto Butantan, categoricamente se pronunciado. Competia portanto, ás nossas fracas forças, ellucidar tão relevante assumpto. Estudar as nossas Opisthoglyphas, conhecer de perto as propriedades de seu veneno, mercê de experiencias rigorosamente praticadas obedecendo á um criterio scientifico, foi o fim que pretendemos collimar.”

Dr. Naur Martins, 1916.

These apresentada à Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Cadeira de História Natural, em 4 de novembro de 1916 e defendida em 18 de dezembro de 1916.

RESUMO

O veneno de *Philodryas patagoniensis* ocasiona lesões locais importantes e similares as que ocorrem nos acidentes botrópicos. Os mecanismos envolvidos nas ações locais deste veneno são pouco conhecidos. Este estudo tem como objetivo investigar as ações locais morfológicas e inflamatórias do veneno de *Philodryas patagoniensis* e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor e edema, por meio de modulação farmacológica. O teor protéico total do veneno foi de 70-75% de proteínas. A análise eletroforética (SDS-PAGE 7,5-17,5%) apresentou bandas protéicas com pesos moleculares entre 62 e 14 kDa, sendo quatro majoritárias em 62, 48, 35 e 30 kDa. O edema mensurado por pletismografia foi máximo 30 min após a inoculação ($53,33 \pm 1,43$ %), regredindo a partir da 6ª hora, mostrou-se dose-dependente sendo a dose mínima edematogênica de 0,82µg e inibido em 45% por EDTA. A atividade nociceptiva foi avaliada pelo tempo (em segundos) em que os animais lambiam ou mordiam a pata injetada, e os resultados mostraram que tal atividade é dose-dependente, sendo significativamente diferente do controle e independente de metaloproteinases, uma vez que não foi inibida pelo EDTA. Através da modulação farmacológica foi possível observar que a dor causada pelo veneno foi inibida pela Indometacina, Cyproheptadina e Tramal, indicando que a mediação é por opióides, prostaglandinas e serotonina. A ação foi potencializada pelo Captopril, sugerindo a possível participação de cininas, bem como pelo L-NAME (10mg/kg). Dexametasona, Prometazina, Arcoxia, Celebra e L-NAME (50mg/kg) não interferiram nesta atividade. O edema foi inibido pela Dexametasona e Indometacina e, portanto, mediado por prostaglandinas e leucotrienos. Captopril, Tramal, Prometazina, L-NAME, Arcoxia e Celebra não foram capazes de interferir significativamente no edema. A injeção intramuscular de 30µg do veneno produziu efeitos de desorganização das fibrilas musculares, hemorragia interfibrilar, edema, infiltrado inflamatório e mionecrose dos tipos coagulativa e miolítica, as quais foram inibidas na presença de PMSF e $^{1-10}$ Phenantrolina. Três, seis e 24 horas após a inoculação intra-muscular de 60µg de veneno, ocorreu um decréscimo gradativo de proteínas não-colágenas com leve redução em alguns componentes miofibrilares observados por SDS-PAGE. O infiltrado inflamatório induzido em

cavidade peritoneal foi máximo três horas após a injeção e a contagem celular diferencial apresentou predominantemente leucócitos polimorfonucleares. A técnica de microscopia intravital direta demonstrou que a administração tópica de 0,1µg de veneno induziu distúrbios marcantes em vênulas pós-capilares, caracterizados por vasodilatação, lesões hemorrágicas distribuídas em focos (microsangramentos) e alterações nas interações leucócito-endotélio, tais como redução do número de leucócitos em rolling, aumento da adesão e indução da migração de células através da parede do endotélio. A inoculação subcutânea do veneno na bolsa escrotal de camundongos induziu efeitos típicos de inflamação aguda, com leucócitos migrados vistos a partir de uma hora após a inoculação, regredindo em 48 horas. O veneno age sobre mastócitos *in vitro*, causando degranulação e conseqüente liberação de histamina concentração dependente. Os resultados obtidos indicam o potencial inflamatório deste veneno e a cinética dos eventos sugere uma complexa sinergia de diversos efeitos, contribuindo para a severidade do quadro local nos envenenamentos.

ABSTRACT

The venom of *Philodryas patagoniensis* causes important and similar local lesions the ones that happen in the botropic accidents. The mechanisms involved in the local actions of this venom are little known. This study has as objective investigates the morphologic and inflammatory local actions of the venom of *Philodryas patagoniensis* and the mechanisms involved in the development of the pain and edema, through pharmacological modulation. The protein content of the venom was of 70-75%. The eletrophoretic analysis (SDS-PAGE 7,5-17,5%) it presented bands of protein with molecular weights between 62 and 14 kDa, being four majority in 62, 48, 35 and 30 kDa. The edema measured by pletismography, it was maximum 30 min after the inoculation ($53,33 \pm 1,43\%$), regressing starting from at 6th hour, it was shown dose-dependent, the edematogenic minimum dose was of 0,82 μ g and it was inhibited in 45% by EDTA. The nociceptive activity was evaluated by the time (in seconds) in that the animals licked or they bit the injected paw, and the results showed that such activity is dose-dependent, being significantly different from the control and independent of metaloproteinases, once it was not inhibited by EDTA. Through the pharmacological modulation it was possible to observe that the pain caused by the venom was inhibited by Indometacin, Cyproheptadine and Tramal, being mediated by opioids, prostaglandins and serotonin. It was potentiated by Captopril, suggesting the possible participation of kinins, as well as for L-NAME (10mg/kg). Dexamethasone, Prometazine, Arcoxia, Celebra and L-NAME (50mg/kg) didn't interfere in this activity. The edema was inhibited by Dexamethasone and Indometacin and, therefore, mediated for prostaglandins and leukotrienos. Captopril, Tramal, Prometazine, L-NAME, Arcoxia and Celebra were not capable to interfere significantly in the edema. The intramuscular injection of 30 μ g of the venom produced effects as disorganization of the muscular fibrils, hemorrhage, edema, inflammatory infiltrated and mionecrosis of the coagulative and miolitic types, which were inhibited in the presence of PMSF and ¹⁻¹⁰Phenantrolina. Three, six and 24 hours after the intra-muscular inoculation of 60 μ g of venom, happened a gradual decrease of proteins no-collagen with light reduction in some miofibrilar

components observed by SDS-PAGE (17,5%). The inflammatory infiltrate induced in cavity peritoneal was maximum three hours after the injection and the differential cellular counting presented polymorphonuclear leukocytes predominantly. The technique of intravital microscopy direct demonstrated that the topical administration of venom 0,1µg induced outstanding disturbances in post-capillary venules, characterized by vasodilatation, hemorrhagic lesions distributed in focuses (microbleedings) and alterations in the interactions leukocyte-endothelium, such as reduction of the number of leukocytes in rolling, increase of the adhesion and induction of the migration of cells through the wall of the endothelium. The subcutaneous inoculation of the venom in the scrotal bag of mice induced typical effects of sharp inflammation, with migrated leukocytes seen starting from one hour after the inoculation, regressing in 48 hours. The venom acts on mast cells in vitro, causing degranulating and consequent liberation of histamine concentration-dependent. The results obtained indicate the inflammatory potential of this venom and the kinetics of the events suggests a complex synergy of several effects, contributing to the severity of the local picture in the envenomings.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Origem e diversidade das serpentes.....	01
1.2 Evolução dos sistemas de veneno.....	04
1.3 Venenos de serpentes: uma visão geral.....	06
1.3.1 Mecanismos de ação dos venenos.....	08
1.4 Acidentes por Colubrídeos e Epidemiologia.....	12
1.5 Venenos de Colubrídeos.....	17
1.6 O gênero <i>Philodryas</i>	20
1.6.1 <i>Philodryas patagoniensis</i>	21
1.6.2 O veneno de <i>Philodryas patagoniensis</i>	23
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Materiais.....	29
3.1.1a Animais experimentais.....	29
3.1.1b Serpentes.....	29
3.1.2 Obtenção das amostras de veneno.....	29
3.1.3 Reagentes e preparo de soluções.....	31
3.1.3.1 Caracterização bioquímica do veneno.....	31
3.1.3.2 Caracterização biológica do veneno.....	33
3.2 Métodos.....	36
3.2.1 Caracterização bioquímica do veneno.....	36
3.2.1.1 Dosagem protéica.....	36
3.2.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	36
3.2.2 Caracterização biológica do veneno.....	37
3.2.2.1 Atividade edematogênica.....	37
3.2.2.2 Atividade Nociceptiva.....	38
3.2.2.3 Modulação farmacológica para compreensão dos mecanismos envolvidos no edema e nocicepção.....	39
3.2.2.4 Atividade miotóxica avaliada por histologia.....	40
3.2.2.4a Investigação da participação de proteinases na atividade miotóxica.....	41

3.2.2.4b Dosagem de proteínas musculares não colágenas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas musculares.....	41
3.2.2.5 Estudo do infiltrado inflamatório.....	42
3.2.2.6 Alterações na microcirculação analisadas por microscopia intravital direta.....	42
3.2.2.7 Avaliação da liberação de histamina de mastócitos peritoneais de camundongos.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Caracterização bioquímica do veneno.....	46
4.1.1 Dosagem protéica.....	46
4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	46
4.2 Caracterização biológica do veneno.....	47
4.2.1 Atividade edematogênica.....	47
4.2.2 Atividade Nociceptiva.....	49
4.2.3 Modulação farmacológica para compreensão dos mecanismos envolvidos no edema e nocicepção.....	51
4.2.4 Atividade miotóxica avaliada por histologia.....	55
4.2.4a Investigação da participação de proteinases na atividade miotóxica.....	55
4.2.4b Dosagem de proteínas musculares não colágenas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas musculares.....	59
4.2.5 Estudo do infiltrado inflamatório.....	60
4.2.6 Alterações na microcirculação analisadas por microscopia intravital direta.....	62
4.2.7 Avaliação da liberação de histamina de mastócitos peritoneais de camundongos.....	68
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS.....	95

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 295/06, sobre o projeto intitulado "Alterações locais induzidas pela secreção tóxica de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae)", sob a responsabilidade de Maria de Fátima D. Furtado está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 09/05/2006.

São Paulo, 09 de maio de 2006.

Dra. Denise V. Tambourg
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

1. INTRODUÇÃO

1.1 Origem e diversidade das serpentes

Acredita-se que as serpentes possam ter surgido há mais de 135 milhões de anos atrás, talvez já no final do período Jurássico (RAGE, 1994), porém ainda não se chegou a um consenso sobre o fenótipo da serpente ancestral, sendo que, isto se deve provavelmente à escassez de fósseis e a falta de uma hipótese filogenética robusta entre as serpentes e os demais Squamata (RIEPPPEL, 1988a).

Atualmente há duas proposições sobre o provável habitat ocupado pela serpente ancestral: (1) As serpentes surgiram a partir de ancestrais mosassaurídeos, portanto eram aquáticas e ocupavam ambientes marinhos (LEE, 1997, 1998; LEE & CALDWELL, 1998; SCANLON *et al.*, 1999; LEE & SCANLON, 2002; SCANLON & LEE, 2002); (2) As serpentes ancestrais eram criptozóicas que caçavam em tocas, galerias do solo ou folhiços de chão ou mata (ZAHER, 1998; RIEPPEL & ZAHER, 2000; TCHERNOV *et al.*, 2000; RIEPPEL & ZAHER, 2001). A segunda hipótese é mais aceita, porém, hipóteses que defendem que as serpentes derivaram dos mosassaurídeos ou anfisbenídeos ainda não foram descartadas (ESTES *et al.*, 1988; RIEPPEL, 1988 b).

Embora existam ainda divergências no que diz respeito ao relacionamento das serpentes com os demais Squamata, a subordem Serpentes tornou-se muito diversificada e inclui cerca de 2.900 espécies no mundo (GREENE, 1997), distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, temos representantes de 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies, portanto, 10% do total de espécies (FRANCO, 2003).

As espécies existentes formam dois grandes clados: os Scolecophidia e os Alethinophidia (MACDOWELL, 1987; CADLE, 1988; HEISE *et al.*, 1995). Os Scolecophidia (famílias Leptotyphlopidae, Typhlopidae, Anomalepididae) são serpentes fossoriais com pequena abertura de boca, que se alimentam principalmente de formigas e térmitas (POUGH *et al.*, 1998). Nos Alethinophidia

estão representadas as serpentes “típicas”, que se caracterizam por movimentos independentes das mandíbulas e habilidade para ingerir presas de tamanho relativamente grande (RAGE, 1994). Dentro deste clado estão alocados os Anilioidea (Uropeltidae), formas fossoriais, e os Macrostromata, que incluem *Xenopeltis*, *Loxocemus*, *Xenophidion*, várias linhagens de “boídeos” e os Caenophidia (RIEPPEL, 1988; VIDAL, 2002).

Os Caenophidia, chamados “serpentes avançadas”, incluem a superfamília Colubroidea, onde estão classificadas todas as serpentes venenosas e que possui a maior diversidade, sendo composta por quatro famílias: Colubridae, Atractaspididae, Elapidae e Viperidae (GREENE, 1997), dentro das quais estão descritos cerca de 410 gêneros e 2430 espécies (RIEPPEL, 1988; VIDAL, 2002).

Na superfamília Colubroidea são reconhecidos tradicionalmente quatro séries de dentição dos maxilares: as séries áglifa, opistóglifa, proteróglifa e solenóglifa (SERIÉ, 1916; GANS, 1978; MÉIER & WHITE, 1995) e foi nesta superfamília que surgiu a capacidade extremamente variável de injetar peçonha (CADLE, 1983).

No que diz respeito às séries de dentações, existem diversas características que as diferenciam, porém podemos distingui-las, resumidamente como (KOCHVA, 1987; YOUNG & KARDONG, 1996):

- **Áglifa** (*a*: ausente - *glifo*: sulco, ranhura): Caracterizada pela presença de uma série de dentes maciços e pouco diferenciados. Não tem ligação alguma com glândulas orais modificadas, e a função dos dentes é auxiliar na projeção do alimento para o interior do tubo digestivo. (Boidae e Colubridae) (Figura 1A).
- **Opistóglifa** (*opisto*: posterior - *glifo*: sulco, ranhura): Presença de pequenas presas sulcadas na porção posterior do maxilar e ligadas a glândulas de veneno denominadas Glândulas de Duvernoy. O conjunto de glândula e dente tem como função a imobilização e lubrificação da presa (Atractaspididae e Colubridae) (Figura 1B).
- **Proteróglifa** (*protero*: anterior, dianteiro - *glifo*: sulco, ranhura): Caracterizada pela presença de presas reduzidas e fixas, localizadas na porção anterior do maxilar superior. As presas são sulcadas profundamente quase formando um canal, estando diretamente ligadas

às glândulas de veneno. O conjunto de glândula e dentes tem como função a imobilização, abate e lubrificação da presa a ser ingerida. (Elapidae) (Figura 1C).

- **Solenóglifa** (*soleno*: canal, tubo – *glifo*: sulco, ranhura): Presença de um maxilar reduzido e móvel com presas muito desenvolvidas situadas na região anterior, totalmente canaliculadas e ligadas através de ductos a glândulas de veneno. (Viperidae) (Figura 1D).

Figura 01: Aspecto morfológico do crânio de serpentes conforme as séries de dentição. **A)** Série Áglifa; **B)** Série Opistóglifa; **C)** Série Proteróglifa; **D)** Série Solenóglifa.

Dentro da superfamília Colubroidea, a família Colubridae, foi a que alcançou a maior diversidade, compreendendo mais de 65% de todas as serpentes existentes, com 226 gêneros e 1494 espécies, dos quais 60 gêneros e 239 espécies ocorrem no Brasil (FRANCO 2003). É formada por grupos filogeneticamente heterogêneos de espécies, composta por diferentes linhagens de serpentes, formando um grupo parafilético. KARDONG, (2002) propõe uma filogenia que relaciona a família Colubridae proximamente à família Elapidae, sendo essa proposta filogenética corroborada por estudos de DNA mitocondrial, RNA ribossomal e morfológicos (KNIGHT & MINDELL, 1994; JACKSON, 2003).

Durante o processo evolutivo das modificações osteológicas cranianas, os Colubroidea apresentaram o surgimento de complexos sistemas de glândulas secretoras, capazes de produzir e estocar substâncias biologicamente ativas,

ligadas aos dentes inoculadores, proporcionando assim uma melhor eficácia no processo alimentar (GANS, 1978; KOCHVA, 1978; THOMAS & POUGH, 1979; RUSSEL, 1980; MINTON & MINTON, 1980; KARDONG, 1982).

Alguns grupos de Colubridae apresentam glândulas tubulares complexas denominadas glândulas de Duvernoy (TAUB, 1966). São glândulas localizadas na região temporal, supra labial, atrás dos olhos, compostas principalmente de células serosas dispostas em lóbulos que se abrem em um ducto lobular. Esta estrutura mostra ampla gama de variações, com transições desde a ausência da glândula até a presença de somente células serosas em glândulas totalmente diferenciadas (TAUB, 1966).

De 30 a 40% dos colubrídeos possuem glândula de Duvernoy. Embora esta glândula seja homóloga às “verdadeiras glândulas” de veneno das proteróglifas e solenóglifas (KOCHVA, 1963; GYGAX, 1971; OVADIA, 1984), elas são anatômica e funcionalmente distintas, nas quais está ausente um lúmen interno para armazenar o veneno. Seu esvaziamento é um fluxo de baixa pressão e a secreção não é liberada pelo canal da presa, mas sim em aberturas próximas à base das presas, enquanto que as glândulas de veneno dos viperídeos possuem um amplo lúmen para estocagem do veneno, que é expelido por contração direta dos músculos estriados e injetado sob alta pressão, via canais das presas. Ambos os tipos de glândulas fazem parte do sistema alimentar das serpentes, estando envolvidos primariamente com o comportamento predatório (KARDONG, 2002). A função biológica das secreções orais em serpentes contribui decididamente para o sucesso da captura da presa (alimento), deglutição e digestão, sendo muitas vezes utilizadas em situações de defesa.

1.2 Evolução dos sistemas de veneno

Entre os répteis existentes são conhecidas duas linhagens possíveis de terem evoluído os sistemas de veneno: as serpentes avançadas e os lagartos helodermatídeos (KOCHVA, 1978).

Diversos autores defendem que a evolução dos sistemas de veneno esteja por trás da impressionante radiação das serpentes avançadas (VIDAL, 2002; VIDAL & HEDGES, 2002; FRY, 2003a e b). Em contraste, o sistema de veneno

de lagartos é restringido a duas espécies e pode ter evoluído independentemente dos sistemas de veneno das serpentes (KOCHVA, 1978).

No entanto, estudos mostram a presença de toxinas dentro de outras duas linhagens de lagartos (Lagartos Monitor e Iguania), e que todas as linhagens possuem uma forma de segregar toxinas a partir de glândulas orais, formando um clado e demonstrando uma única origem dos sistemas de veneno dentro de lagartos e serpentes (FRY *et al.*, 2005).

Nos estudos de Fry *et al.*, (2005), a construção de bibliotecas de cDNA de glândulas e análises filogenéticas revelaram que há nove tipos de toxinas sendo compartilhadas entre lagartos e serpentes, desta forma é considerado que a evolução da função venenosa foi uma inovação chave para a diversificação ecológica das serpentes avançadas (VIDAL, 2002; VIDAL & HEDGES, 2002; FRY, 2003a e b) e indicam que a origem única de veneno em répteis squamatas pode também ter sido um fator decisivo na radiação adaptável e subsequente sucesso ecológico de linhagens de lagartos como anguimorphas e iguanias. O clado que reúne anguimorphas/ iguania/ serpentes é bem sustentado, pois representa aproximadamente 4.600 das 7.900 espécies de squamatas existentes, ou seja, 58% da diversidade total de répteis squamata.

Também há evidências paleontológicas para a presença de sistemas de veneno em alguns anguimorphas e serpentes no Cretáceo superior (PREGILL *et al.*, 1986; KOCHVA, 1987; NOREL *et al.*, 1992). Estes dados fósseis indicam que o clado que contém anguimorphas, iguanias e serpentes data do Triássico e Jurássico recentes, portanto deduziu-se que a função venenosa surgiu uma única vez na evolução dos squamatas a cerca de 200 milhões de anos.

Em relação à função venenosa dentro das famílias de serpentes avançadas, diversos estudos têm mapeado a química dos venenos e dados morfológicos em novas filogenias (VIDAL, 2002; FRY *et al.*, 2003; JACKSON, 2003; FRY & WÜSTER, 2004). Todos alcançaram a conclusão que, contrário ao tradicional entendimento da evolução de serpentes venenosas, o ancestral dos Colubridae possuía pelo menos alguns componentes de um sistema de veneno. Então, muitos colubrídeos inofensivos são agora mostrados como descendentes de um ancestral venenoso (JACKSON, 2007).

Elapídeos, viperídeos, e atractaspidídeos possuem uma glândula pós-orbital grande na qual veneno é secretado e armazenado, no entanto, as glândulas diferem em tamanho e forma do lúmen no qual veneno é armazenado e na distribuição das células mucosas e serosas que compõem a glândula. Embora estas três morfologias mostrem evidência de terem derivado independentemente, há indicações que todas as glândulas de veneno são homólogas a glândula de Duvernoy dos colubrídeos. A posição pós-orbital semelhante das verdadeiras glândulas de veneno e a glândula de Duvernoy (KARDONG, 1982) e o fato que nenhuma serpente tem ambas as glândulas, apoia a homologia das mesmas, sugerindo que a glândula de Duvernoy tenha aparecido antes na evolução dos colubroidea e subsequente se especializado independentemente nas glândulas de veneno verdadeiras dos elapídeos, viperídeos e atractaspidídeos (JACKSON, 2007).

1.3 Venenos de serpentes: uma visão geral

Estudos com venenos de serpentes têm possibilitado a elucidação de diversos processos bioquímicos e fisiológicos manifestados durante o envenenamento, bem como contribuído sobremaneira na modelagem molecular de novos princípios ativos de drogas para os mais variados fins (MÉNEZ, 1998; GUTIÉRREZ, 2002).

Os venenos de serpentes em geral são misturas complexas contendo mais de 20% de componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que cerca de 90% são proteínas enzimáticas ou não enzimáticas, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (DEUTSCH & DINIZ, 1955; IWANAGA & SUZUKI, 1979; BJARNASON & FOX, 1988/89). Enquanto os componentes inorgânicos mais comuns são Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn, sendo que alguns exercem função de mantenedores de estabilidade estrutural de certas proteínas, como as metaloproteinases, que são fatores hemorrágicos, outros funcionam como catalisadores em funções enzimáticas específicas (FRIEDERICH & TU, 1971; BJARNASON & FOX, 1988/89).

Atualmente há um grande número de toxinas purificadas e caracterizadas a partir de venenos de serpentes, sobretudo de diversas espécies de *Bothrops* (THEAKSTON & KAMIGUTI, 2002). Dentre essas, o complexo enzimático das

fosfolipases A₂ (PLA₂) e enzimas proteolíticas que interferem em processos hemostáticos têm sido intensamente investigados (KINI,1997; ANDRIÃO-ESCRASO *et al.*, 1997; SMOLKA *et al.*,1998).

As fosfolipases são enzimas estereolíticas que hidrolisam fosfolipídeos e estão presentes tanto em secreções pancreáticas de mamíferos, quanto em venenos animais (KINI, 1997). São divididas em várias classes, denominadas A₁, A₂, B, C e D, dependendo do sítio de hidrólise. As fosfolipases do tipo A₂ (PLA₂) são ainda divididas em duas classes: citosólicas ou secretadas. As PLA₂ dos venenos de serpentes pertencem a esta última classe. Estas enzimas atuam hidrolisando fosfolipídios na posição sn-2 na cadeia carbônica dos fosfolipídios. A consequência desta hidrólise é a liberação de ácidos graxos e lisofosfolípides. Estes produtos formados são responsáveis pela manifestação de diversos efeitos farmacológicos, como formação de araquidonato, desestruturação de membrana, interferência em processos de agregação plaquetária, miotoxicidade e neurotoxicidade, entre outras ações (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

As enzimas proteolíticas são também componentes expressivos dos venenos de serpentes. A capacidade de interação destas enzimas com componentes do sistema hemostático denota sua importância em processos de envenenamento. Duas classes principais de enzimas proteolíticas presentes em venenos de serpente são descritas: as serino-proteases, que atuam como enzimas “tipo-trombina”, e as metalo-proteases, atuando na ativação da protrombina e do fator X (KAMIGUTI & SANO-MARTINS, 1995). Dentre as principais ações dos componentes dos venenos ofídicos sobre o sistema hemostático estão: (a) atividade pró-coagulante (ativação do fator V, X ou IX, ativação da protrombina e degradação do fibrinogênio) e (b) atividade anticoagulante (ativação da proteína C e inibição de trombina) (MARKLAND, 1998).

Além das moléculas acima citadas, outras como Disintegrinas, que são proteínas enzimáticas de baixa massa molecular com capacidade de interagir com integrinas plaquetárias como, por exemplo, o fibrinogênio, e assim são hábeis a inibir a agregação plaquetária (CALVETE *et al.*, 2005) e Lectinas tipo-C, que são proteínas que requerem íons para sua ligação a glicoconjugados e estão envolvidas principalmente na alteração de processos hemostáticos

decorrentes do envenenamento interagindo com receptores plaquetários e/ou fatores da cascata de coagulação (ZINGALI et al., 2001), também participam da composição de venenos de serpentes.

Em contraste com a vasta literatura existente sobre os venenos de serpentes proteróglifas e solenóglifas, observa-se pouca investigação quanto aos venenos de serpentes opistóglifas, portanto a composição das secreções orais tóxicas de colubrídeos é pouco conhecida, apesar da grande diversidade de espécies de serpentes onde as glândulas são descritas (TAUB, 1966; GANS, 1978; UNDERWOOD, 1997; MINTON, 1985,1990). Os fatores de que a grande maioria das espécies produz pouca quantidade de veneno e a ineficácia dos métodos de extração sustentam as dificuldades de pesquisa nesta área..

Várias enzimas têm sido detectadas em venenos de colubrídeos, as quais têm diversos mecanismos de ação convergindo em um papel biológico fundamental, uma vez que estas possivelmente atuam como secreções de digestão, contribuindo para a lubrificação e também para a apreensão e morte de suas presas (WEINSTEIN & KARDONG, 1994; HILL & MACKESSY, 2000). Algumas destas enzimas, típicas dos venenos de viperídeos e elapídeos, podem ou não estar presentes nos venenos de colubrídeos.

1.3.1 Mecanismos de ação dos venenos

Atividade proteolítica

Esta atividade é atribuída à complexa mistura de enzimas proteolíticas conhecidas por produzirem também os efeitos locais dos venenos. Os fatores do veneno responsáveis por esta atividade incluem fosfolipases, proteases, toxinas polipeptídicas que destroem membranas, etc. O modo de ação pode ser direto por destruição celular ou secundário pela ativação de mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos, prostaglandinas, e outras substâncias (VARGAFTIG *et al.*, 1974). Edema e necrose são os mais importantes sintomas locais observados em envenenamentos humanos. Além desses efeitos locais, venenos proteolíticos podem produzir efeitos sistêmicos importantes, tais como choque, alterações na cascata de coagulação sanguínea, agregação plaquetária e liberação de autacóides endógenos como histamina, serotonina e bradicinina (VITAL BRAZIL, 1982).

Atividade inflamatória Aguda

É o fenômeno resultante das ações de um conjunto de frações do veneno, heterogêneas, com especificidades diversas, responsáveis pelos fenômenos locais. São exemplos aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, pequenos peptídeos ou proteínas como fosfolipase A₂, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas (calicreínas, cininogenases) e lectinas.

As frações do veneno frequentemente possuem atividade indireta, induzindo ou liberando potentes substâncias autacóides, como a bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, que atuam de maneira complexa e inter-relacionada. Muitas vezes, uma única fração do veneno pode liberar várias substâncias com atividade inflamatória.

A inflamação é uma reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local podendo ser aguda ou crônica, dependendo do tipo e persistência do agente lesivo. Na resposta aguda é característico: 1) o aumento de fluxo sanguíneo com vasoconstrição transitória e vasodilatação das arteríolas; 2) aumento da permeabilidade vascular – com exsudação de proteínas plasmáticas para fora da circulação, o que resulta na formação do edema; 3) e o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão – leucócitos, principalmente neutrófilos, migram da circulação, passando entre as células endoteliais, para os tecidos extracelulares. Estes eventos ocorrem principalmente devido à liberação de mediadores inflamatórios no tecido devido à lesão local (SAADI *et al.*, 2002).

Vários são os mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo, dentre eles os metabólitos lipídicos derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas, os leucotrienos e as lipoxinas gerados a partir de fosfolípidios de membrana, aminas vasoativas, citocinas entre outros, que atuam como importantes moduladores da resposta inflamatória. Estes mediadores inflamatórios são produzidos, entre outras, por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos em resposta a uma variedade de estímulos que podem ser exógenos ou endógenos (CABRAL, 2005).

Os mediadores lipídicos são produzidos pela ação da enzima PLA₂ sobre os fosfolípidios de membrana. Principalmente o ácido araquidônico e seus

derivados, os eicosanóides, que são mediadores de diversas condições patológicas especialmente nos processos inflamatórios (CABRAL, 2005).

É necessário ressaltar que no desenvolvimento do quadro local agudo, pode haver a participação da atividade coagulante desencadeando a formação de trombos na microvasculatura, com conseqüente hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual; e que a atividade hemorrágica, determinada por toxinas hemorráginas, pode ampliar o quadro inflamatório, através da sua atividade sobre o fator de necrose tecidual (TNF) pré-formado, liberando a citocina ativa que tem potente atividade inflamatória (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1996).

Atividade sobre plaquetas e coagulação

O veneno de *Bothrops* possui a capacidade de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo frequentemente, incoagulabilidade sanguínea e podendo levar à fibrinogenemia (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989; KAMIGUTI & SANO-MARTINS, 1995). A maioria desses venenos possui isolada ou simultaneamente substâncias capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X. São também descritos fatores com atividade sobre a agregação e aglutinação plaquetária. Trombocitopenia pode ocorrer nas primeiras horas e, eventualmente durar por dias. Os fatores ativadores da cascata de coagulação presentes nos venenos das víboras sul americanas agem em três diferentes pontos: Fator I (atividade *thrombin-like*), protrombina e Fator X (atividade pró-coagulante) (NAHAS *et al.*, 1979).

Atividade hemorrágica

É atribuída principalmente á componentes específicos denominados hemorráginas, metaloproteinases que contem zinco. Estas moléculas podem romper a integridade do endotélio vascular. Degradam vários componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo IV, fibronectina e laminina. Além disso, são potentes inibidores da agregação plaquetária (LOMONTE, 1994). Têm como possíveis mecanismos de ação a digestão enzimática da lâmina basal da microvasculatura e a ruptura completa das células endoteliais ou

formação de *gaps*. As clivagens específicas em pontos chave desencadeariam mecanismos endógenos amplificadores, sendo que, atualmente, há clara evidência de ataque proteolítico à lâmina basal vascular (GOULD *et al.*, 1990; BJARNADSON & FOX, 1994; KAMIGUTI *et al.*, 1992 e 1994).

Atividade neurotóxica

Causada também por neurotoxinas pré-sinápticas que atuam em terminações nervosas motoras inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos. Essa inibição é a principal responsável pelo bloqueio neuromuscular e, portanto, pelas paralisias respiratórias e motoras observadas nos animais. No veneno de *Crotalus* foi identificada a crotoxina, como sendo uma neurotoxina de ação pré-sináptica, além de outras como a crotamina, giroxina e a convulxina, cujos efeitos caracterizados experimentalmente não são identificados nas manifestações do envenenamento humano (VITAL BRAZIL, 1972, 1980).

Neurotoxinas pós-sinápticas: o bloqueio do impulso nervoso é devido à ligação do veneno aos receptores colinérgicos na membrana pós-juncional da placa mioneural, o que causa uma síndrome semelhante à *myasthenia gravis*. Neurotoxinas pós-sinápticas são encontradas em venenos de *Micrurus frontalis* e *Micrurus lemniscatus* (VITAL BRAZIL, 1987).

Esse tipo de mecanismo de ação pode também ativar o sistema nervoso autônomo parassimpático e levar a diversos sintomas ditos neurológicos, como ocorre no envenenamento laquético.

Atividade miotóxica

A necrose muscular decorrente do envenenamento por *Crotalus* é atribuída à crotoxina, composta pela crotapotina (sem atividade enzimática) e fosfolipase A₂. A miotoxicidade em humanos envenenados por *Crotalus*, foi descrita pela primeira vez em 1985 (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985). Modificação por necrose degenerativa e sinais de regeneração em fibras dos tipos I e IIa de músculo estriado tem sido observados (CUPO *et al.*, 1992). Na mionecrose, as modificações morfológicas estão associadas a acréscimo nos níveis plasmáticos de creatino-kinase, uma enzima intra-muscular frequentemente utilizada como marcador de lesão muscular (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989).

Experimentalmente muitas espécies de *Micrurus* brasileiras e colombianas induzem miotoxicidade (GUTIÉRREZ *et al.*, 1992) e a correlação destes achados com o aspecto clínico dos envenenamentos ainda não está totalmente claro.

Atividade cardiovascular

Pode ser causada pela liberação de substâncias farmacologicamente ativas (bradicinina, histamina, 5-hidroxitriptamina e prostaglandinas) dos tecidos, pela ação dos venenos e estas podem contribuir para o choque circulatório produzido por venenos de viperídeos e crotalídeos. Em adição, alguns venenos contêm enzimas coagulantes ou pró-coagulantes, as quais podem produzir coagulação intravascular e contribuir para as modificações cardiovasculares observadas (LEE & LEE, 1979).

O mais conspícuo efeito hemodinâmico produzido por venenos que detém esta atividade em geral é uma imediata e profunda queda da pressão sanguínea sistêmica, seguida pelo choque secundário. Efeitos hipotensivos já foram descritos para alguns venenos de *Micrurus* (RAMSEY *et al.*, 1972; FRANCIS *et al.*, 1993).

Venenos de serpentes do gênero *Bothrops* produzem efeitos cardiovasculares tais como coagulopatias, sangramentos sistêmicos, hipotensão arterial e insuficiência renal. Os mecanismos envolvidos na hipotensão causada por venenos botrópicos não têm sido estudados sistematicamente, apesar do envolvimento da bradicinina ser conhecido há mais de 50 anos (ROCHA E SILVA, *et al.*, 1949).

1.4 Acidentes por Colubrídeos e Epidemiologia

No quadro clínico dos envenenamentos humanos causados por Colubrídeos, destacam-se a hemorragia local, desenvolvimento do processo inflamatório e/ou necrose, podendo apresentar ou não sintomas de ordem sistêmica (KUCH & MEBS, 2002; PUORTO & FRANÇA, 2003).

Os relatos de envenenamentos humanos graves por serpentes não peçonhentas têm sido descritos, principalmente para as serpentes colubrídeas africanas *Dispholidus*, *Thelotornis*, *Psammophylax* e *Rhabdophis*

(MACKINSTRY, 1983; MINTON, 1990; DATTA & TU, 1993; SAWAI *et al.*, 2002).

Dispholidus typus e *Thelotornis kirtlandii* causaram a morte dos herpetólogos Karl Patterson-Schmidt e Robert Mertens, respectivamente. Seus quadros clínicos mostraram principalmente hemorragia, desfibrinação, edema e insuficiência renal (DATTA & TU, 1993; MINTON, 1990; KUCH & MEBS, 2002).

Igualmente, acidentes graves foram relatados com *Rhabdophis subminiatus*, cujos sintomas foram a completa desfibrinação e sangramento prolongado (MATHER *et al.*, 1978; FERLAN *et al.*, 1983). Sintomas semelhantes foram causados por *Rhabdophis tigrinus*, incluindo hemorragia superficial, sérios distúrbios na coagulação, hemólise e alterações do sistema nervoso central e autônomo (MITTLEMAN & GORIS, 1974; SAWAI *et al.*, 2002).

Em inúmeras ocorrências foi citada como agente causador a serpente marrom *Boiga irregularis*, a qual surpreende suas vítimas, principalmente à noite, causando manifestações locais como dor, edema e equimose (MINTON, 1990; DATTA & TU, 1993). *Tachymenis peruviana* também tem causado acidentes com lesões locais, caracterizados por dor, edema, bolhas, hemorragia e equimose. Dos sintomas sistêmicos foram citados febre, mal estar geral, intranquilidade e angústia (SCHENOME & REYES, 1965). LEMA (1978b) cita um caso de óbito no Chile.

Outros relatos mostram que são diversas as espécies de colubrídeos capazes de causar acidentes humanos em várias partes do mundo, como por exemplo, *Pliocercus elapoides* (Estados Unidos) (SEIB, 1979), *Stenorrhina freminvillei* (México) (COOK, 1984), *Thamnophis s. sirtalis* (Estados Unidos) (HAYES & HAYES, 1985), *Ithycyphus miniatus* (Madagascar) (MORI & MIZUTA, 2006), *Malpolon monspessulanus* (França) (POMMIER & DE HARO, 2007), *Philodryas chamissonis* (Chile) (OTERO *et al.*, 2007), entre outros.

No Brasil levantamentos recentes demonstraram que os acidentes ofídicos causados por serpentes colubrídeas envolvem principalmente os gêneros *Helicops*, *Oxyrhopus*, *Thamnodynastes* e *Philodryas* (SANTOS-COSTA *et al.*, 2001; PUORTO & FRANÇA, 2003), este último com diversas espécies envolvidas: *P. aestivus* (FOWLER & SALOMÃO, 1994), *P. baroni* (KUCH & JESBERGER, 1993), *P. patagoniensis* (FOWLER & SALOMÃO, 1994;

NISHIOKA & SILVEIRA, 1994; ARAÚJO & DOS SANTOS, 1997) e *P. olfersii* (NICKERSON & HENDERSON, 1976; SILVA & BUONONATO, 1983/84; FOWLER & SALOMÃO, 1994).

Provavelmente LACERDA (1884) tenha sido o primeiro a relatar um acidente causado por uma espécie de colubrídeo, *Coluber bicarinatus neuwiedi* (= *Chironius bicarinatus*). Em nosso país, há registros de envenenamentos ocorridos também por *Erythrolamprus aesculapii* (MARTINS, 1916), *Elapomorphus bilineatus* (= *Phalotris bilineatus*) (LEMA, 1978 a,b), *Clelia clelia plumbea* (LEITE-PINTO *et al.*, 1991), *Boiruna maculata* (SANTOS-COSTA *et al.*, 2000), *Thamnodynastes cf. pallidus* (DIAZ *et al.*, 2004), entre outros (PRADO-FRANCESCHI & HYSLOP, 2002).

Embora a maioria dos registros não declararem sérias conseqüências nos acidentes causados por serpentes opistóglifas, vários relatos ressaltam a importância de suas toxinas. Registros de acidentes causados por colubrídeos Sul-americanos datam do início do século XIX.

Casos descrevendo a gravidade dos acidentes causados pelas xenodontíneas *Philodryas olfersii* e *P. patagoniensis* têm sido descritos (MARTINS, 1916; AMARAL, 1921; NICKERSON & HENDERSON, 1976; SILVA & BUONONATO, 1983/84; NISHIOKA & SILVEIRA, 1994; ARAÚJO & SANTOS, 1997; ROCHA *et al.*, 2003), assim como ocorrência de óbito em criança no Estado do Rio Grande do Sul, após ser mordida por um espécime de *P. olfersii* (SALOMÃO & DI BERNARDO, 1995).

Os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Philodryas* caracterizam-se por ação local intensa com dor, edema, hemorragia, sangramento passageiro e leve aumento de temperatura no local da picada, linfadenopatia regional, eritema, equimose com coagulação normal (RIBEIRO *et al.*, 1999), e em um caso foi registrado o quadro de fraqueza muscular nas pernas 14 dias após o envenenamento, quando todos os demais sinais já haviam desaparecido (SILVA & BUONONATO, 1983/84). A maioria das manifestações pode ser causada tanto pelo trauma mecânico da picada como pela atividade local das toxinas presentes no veneno (ACOSTA *et al.*, 2003a; ROCHA, 2005).

Um caso relatado de acidente humano com *Philodryas patagoniensis* mostra proeminentes efeitos locais, que não aparecem imediatamente, porém,

após 15 minutos o paciente queixou-se de uma constante sensação de prurido, provavelmente causada por uma reação alérgica ao veneno. Após poucos minutos, um inchaço local se desenvolveu e rapidamente espalhou-se por todo o membro acometido, alcançando mais tarde as axilas, este quadro perdurou por 15 dias, além disso, o paciente queixava-se de intensa dor e neste período perdeu parte dos movimentos (ARAÚJO & DOS SANTOS, 1997).

Os acidentes ofídicos constituem um dos maiores problemas de saúde na América Latina (CAMPBELL & LAMAR, 1989; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003; WARRELL, 2004), principalmente no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; ARAÚJO *et al.*, 2003) e as serpentes peçonhentas são consideradas os principais agentes etiológicos destes acidentes.

Ocorrem cerca de 24.000 casos de acidentes ofídicos ao ano, sendo a maioria deles registrados como acidentes causados por serpentes da família Viperidae (SINAN – Animais peçonhentos) (Tabela 01).

Tabela 01: Número de casos de acidentes com serpentes no Brasil de 1990-93 e 2001-06 classificados pelo tipo de acidente. Fonte: SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Animais peçonhentos. Acessível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>. Consultado em 18/03/2008.

Tipo de acidente	1990-93		2001-06	
	nº.	%	nº.	%
Botrópico	59.619	73,1	105.100	68,0
Crotálico	5.072	6,2	11.105	7,2
Laquétrico	939	1,2	3.663	2,4
Elapídico	281	0,3	813	0,5
Não-peçonhenta	2.361	2,9	4.011	2,6
Ignorados	13.339	16,3	29.877	19,3
Total	81.611	100	154.569	100

Neste levantamento foram incluídas, informações sobre serpentes não peçonhentas, apontadas como causadoras de aprox. 3% dos acidentes.

O Hospital Vital Brazil (HVB), criado em 1945, mantém no Laboratório de Herpetologia uma Coleção de Serpentes, à parte da Coleção Sistemática, cujos exemplares tombados são serpentes trazidas pelos acidentados tratados no Hospital. O número do tombo corresponde ao protocolo do paciente atendido, favorecendo assim, a análise cruzada dos dados. ALBOLEA *et al.* (2000), compilando os registros das serpentes desta coleção, catalogaram 1.584

acidentes causados por serpentes não peçonhentas, sendo a família Colubridae responsável por 98,2% destes. SALOMÃO et al. (2003) apresentam informações dos registros anuais do HVB e da Coleção, no período de 1959 a 1999, e encontram que a frequência dos acidentes por serpentes não peçonhentas varia de 23,5 a 40,5%, o que representa 1923 acidentes por colubrídeos em um total de 6445 acidentes ofídicos.

Levantamentos realizados em diversas outras partes do Brasil por SILVEIRA & NISHIOKA, (1992), CARVALHO & NOGUEIRA, (1998) e SANTOS-COSTA *et al.*, (2001) relataram dados de que os acidentes por serpentes não peçonhentas correspondem a 19% em Uberlândia-MG, 56% em Cuiabá-MT e 38% em Porto-Alegre-RS, o que demonstra que esses acidentes têm sido subdimensionados e os dados publicados no Manual de Prevenção e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos do Ministério da Saúde provavelmente não refletem a situação real do número destes acidentes. Em cerca de 20% desses acidentes por Colubrídeos, a serpente identificada como responsável pertencia ao gênero *Philodryas* (SALOMÃO *et al.*, 2003).

O mais frequente e importante acidente ofídico no Brasil é o botrópico (85%), o qual possui características peculiares como: lesão proeminente do tecido atingido, edema, mionecrose e distúrbios hemostáticos, renais e cardiovasculares (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989).

O veneno botrópico possui basicamente três ações principais: coagulante, necrosante e vasculotóxica (BARRAVIERA & PEREIRA, 1999). A ação coagulante é mediada, em sua maior parte, pelas enzimas “tipo-trombina”, que ao consumirem o fibrinogênio presente no plasma dos indivíduos atingidos, impossibilitam a ação da trombina fisiológica. Desta forma, o sangue torna-se incoagulável. Quando ocorre a ativação do fator X, há concomitantemente o consumo de fatores V, VII e plaquetas, levando a um quadro de coagulação intravascular disseminada, com formação e deposição de trombos na parede capilar dos vasos, que pode desencadear um quadro de insuficiência renal aguda.

A ação necrosante do veneno é resultado da atividade de enzimas proteolíticas e de outros componentes do veneno (como as PLA₂) sobre o tecido atingido, levando normalmente a formação de bolhas hemorrágicas, edema, rubor e necrose local. A ação vasculotóxica dos venenos é

representada pela intensa hemorragia, podendo ser local ou sistêmica, ocasionada por fatores hemorrágicos do veneno. Estes fatores atuam sobre a membrana basal de vasos capilares, causando a sua ruptura (BARRAVIERA & PEREIRA, 1999).

Segundo NISHIOKA & SILVEIRA, (1994) e ARAÚJO & DOS SANTOS, (1997), o quadro clínico local observado nos envenenamentos botrópicos, caracterizado por dor, edema, hemorragia e equimoses, é semelhante aos quadros presentes em acidentes com serpentes do gênero *Philodryas*.

1.5 Venenos de colubrídeos

Os principais componentes são polipeptídeos, os quais podem apresentar atividade enzimática ou não. As toxinas enzimáticas podem ser hidrolases como as proteinases, fosfodiesterases e fosfolipases que auxiliam a digestão do alimento das serpentes.

As proteinases podem atuar em substratos inespecíficos ou altamente especializados, tais como as serinoproteinases e metaloproteinases. Proteinases inespecíficas estão amplamente distribuídas entre os venenos de Colubrídeos (WEINSTEIN & SMITH, 1993; BROADERS & RYAN, 1997; HILL & MACKESSY, 2000; MACKESSY, 2002).

As serinoproteases são enzimas da família das quimiotripsinas envolvidas nos mecanismos da digestão e processos de degradação protéica, coagulação sangüínea e fibrinólise, e ativação do sistema complemento na resposta imune (LESK & FORDHAM, 1996). As ações tipo-trombina, tipo-caliceína e tipo-tripsina estão ausentes em 12 espécies de serpentes colubrídeas (HILL & MACKESSY, 2000).

As metaloproteases são toxinas responsáveis pelos quadros hemorrágicos, edema, dor e necrose nos envenenamentos ofídicos, causando desagregação dos componentes da matriz subendotelial e podem atuar inibindo a agregação plaquetária (BJARNASON & FOX, 1994; GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

As fosfolipases clivam as membranas plasmáticas celulares, direta ou indiretamente, que são compostas de fosfolípedes, e converte-os em subprodutos que causam a lise celular (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1997). *Dispholidus typus* e *Thelotornis capensis*, duas espécies de serpentes

africanas que causam envenenamentos extremamente graves em humanos, apresentam atividade fosfolipásica (CHRISTENSEN, 1968). Esta atividade também foi detectada em *Boiga dendrophila*, *Diadophis punctatus* e *Trimorphodon biscutatus* (HILL & MACKESSY, 2000), *Leptodeira annulata* (MEBS, 1968) e *Malpolon monspessulanus* (ROSENBERG *et al.*, 1985).

Toxinas com atividade hialuronidásica estão presentes amplamente nos venenos de serpentes. São enzimas que facilitam a dispersão dos componentes dos venenos pelos tecidos da presa, atuando nas cadeias do ácido hialurônico que compõe o cimento que mantém as células unidas entre si. Os venenos das espécies *Dispholidus typus* (ROBERTSON & DELPIERRE, 1969; WEINSTEIN & SMITH, 1993) e *Alsophis portoricensis* (HEGEMAN, 1961) apresentam esta ação.

Os polipeptídeos não enzimáticos encontrados nos venenos de serpentes incluem cardiotoxinas, também chamadas citotoxinas, e neurotoxinas, miotoxinas, inibidores de proteinases e acetilcolinesterases, apresentando diversas funções farmacológicas, incluindo hemólise, citotoxicidade e despolarização das células musculares (DUFTON & HIDER, 1991; WU, 1998). Estas toxinas são características dos venenos de serpentes da família Elapidae e também foram detectadas em Colubrídeos.

Estudos recentes apresentam isolamento e caracterização das ações de neurotoxinas de *Coelognathus radiatus* (sinonímia de *Elaphe radiata*) (FRY *et al.*, 2003), *Rhamphiophis oxyrhynchus* (LUMSDEN *et al.*, 2005a) e *Boiga dendrophila* (LUMSDEN *et al.*, 2005b).

Os venenos de *Dispholidus typus* e *Thelotornis kirtlandii* apresentam intensa atividade coagulante (FITZSIMONS & SMITH, 1958; POPE, 1958; BEIRAN & CURRIE, 1967; NAHAS *et al.*, 1976; MEBS *et al.*, 1978) e algumas serpentes como *Boiga blandingi* e *B. irregularis*, assim como *Heterodon platyrhinos*, *Conophis lineatus* e *Alsophis portoricensis* apresentam secreções tóxicas semelhantes às dos elapídeos, com componentes de ação pós-sináptica (DATTA & TU, 1993; WEINSTEIN & KARDONG, 1994; KUCH & MEBS, 2002).

Em nosso país, NAUN MARTINS (1916) foi o pioneiro em estudos sobre os venenos de colubrídeos, estudando em sua tese de doutoramento, os venenos de *Philodryas schotii* (= *P. patagoniensis*) e *Erythrolamprus aesculapii*.

Abordando as características sistemáticas, a anatomia do aparelho inoculador de veneno, estudo histológico da glândula de veneno, estudo do veneno, casos clínicos e tratamento; ele testou os venenos em diferentes vertebrados como pombos, coelhos, cobaias e rãs, concluindo que são fortemente proteolíticos, pouco hemolíticos e sem ação coagulante; são causadores de intensa ação local com edema e hemorragia. Relata, ainda, acidentes ocorridos com Vital Brazil, dois funcionários e o autor. Todos sentiram dores locais, desenvolvendo em seguida intenso edema, recuperando-se em alguns dias. Quanto à forma de tratamento experimental, foram utilizados neutralizantes químicos como permanganato de potássio, ácido acético e soro antiofídico, sendo que todos se mostraram ineficientes.

Em 1926, BRAZIL & VELLARD, testaram extratos glandulares de diversas espécies de Colubrídeos, avaliados quanto à toxicidade em pombos, coelhos, cobaias e anfíbios, e quanto às ações hemolítica, proteolítica e sobre a coagulação sangüínea; também foram avaliadas algumas propriedades antigênicas.

Sessenta e cinco anos depois, em 1991, LAPORTA-FERREIRA & SALOMÃO, demonstraram que a secreção da glândula de Duvernoy de *Sibynomorphus neuwiedi* é tóxica tanto para gastrópodes como para camundongos, e também relataram a possível existência de alguma(s) toxina(s) de ação neurotóxica.

ASSAKURA *et al.* (1992) determinaram para o veneno de *P. olfersii* as atividades hemorrágica, edematogênica e fibrinogenolítica, sendo este desprovido de enzimas do tipo-trombina, procoagulantes, fosfolipase A2 e de agregação plaquetária. Posteriormente, ASSAKURA *et al.*, (1994) isolaram cinco diferentes proteinases fibrin(ogen)olíticas deste mesmo veneno, sendo elas: PofibC1, C2, C3, H e S.

PRADO-FRANCESCHI *et al.* (1996), estudando os efeitos “*in vivo*” do veneno de *P. olfersii*, demonstraram ação miotóxica deste veneno, com aumento dos níveis séricos de Creatino Quinase (CK), e lise das células musculares em camundongos. Além disso, foram observados paralisia e bloqueio irreversível em preparações da junção neuromuscular de pintainhos. Também isolaram parcialmente a fração responsável pelos efeitos sobre a transmissão neuromuscular “*in vitro*”.

Mais tarde, PRADO-FRANCESCHI *et al.* (1998) isolaram e caracterizaram uma fração miotóxica com peso molecular de 20.0 kDa, sem ação fosfolipásica.

FONTANA *et al.* (1996) demonstraram que o veneno de *Dryadophis bifossatus* (= *Mastigodryas bifossatus*), um colubrídeo áglifo, age na junção neuromuscular.

RENNER (1999) realizou uma caracterização enzimática do veneno de *Clelia plumbea*, detectando componentes ligados à atividade proteolítica.

SOUZA FILHO *et al.* (2000) demonstraram que o veneno de *P. patagoniensis* tem atividade neuromuscular semelhante ao veneno de *Mastigodryas bifossatus*.

Mais recentemente ROCHA, (2005) em sua tese de doutoramento estabeleceu uma comparação entre os venenos de *P. olfersii*, *P. patagoniensis* e *Bothrops jararaca*, demonstrando que os mesmos são semelhantes ao veneno botrópico em alguns aspectos, sendo até mais ativos ou mais rápidos em determinadas ações.

1.6 O gênero *Philodryas*

O gênero *Philodryas* é composto por 17 espécies restritas à América do Sul e com ampla distribuição geográfica, sendo que 10 destas ocorrem no Brasil (SBH. 2007. **Brazilian reptiles – List of species**. Acessível em <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Consultado em 18/03/2008):

P. aestivus (Duméril, Bibron et Duméril, 1854);

P. arnaldoi (Amaral, 1932);

P. mato grossoensis (Koslowisky, 1898);

P. nattereri (Steindachner, 1870);

P. viridissimus (Linnaeus, 1758);

P. olfersii (Lichtenstein, 1823);

P. patagoniensis (Girard, 1857)

Philodryas livida (Amaral, 1923)

Philodryas oligolepis (Gomes in Amaral, 1921)

Philodryas psammophidea (Günther, 1872)

O caráter monofilético do grupo *Philodryas* ainda não está bem definido, podendo existir linhagens diferentes dentro do gênero (THOMAS, 1976; CADLE, 1988).

1.6.1 *Philodryas patagoniensis*

Philodryas patagoniensis (Figura 02) apresenta distribuição restrita a latitudes mais elevadas. São encontradas em diversos ambientes no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (PETERS & OREJAS-MIRANDA, 1970), havendo, portanto sobreposição de áreas de ocupação entre ambas as espécies.

No Brasil, esta espécie é encontrada em áreas das regiões Nordeste e Centro-Oeste e em toda a região Sudeste e Sul, estendendo-se até a Patagônia.

São serpentes com dentição opistóglifa e com a glândula de Duvernoy bem desenvolvida, conectada a um dente sulcado, especializado para a inoculação de toxinas. Possuem hábitos terrícolas e semi-arborícolas, com predominância terrícola (MARQUES *et al.*, 2001; SAZIMA & HADDAD, 1992; FOWLER & SALOMÃO, 1994; HARTMANN & MARQUES, 2005), ocupando ambientes abertos como campos e cerrados (LEMA, 1973; THOMAS, 1976).

Atingem de 0,5 a 1 metro de comprimento, pesando entre 100 e 250 g. Ovíparas, generalistas, pois alimentam-se de pequenos roedores e anfíbios quando adultas e, anfíbios e outros pequenos répteis como lagartixas, quando jovens. Também foram registrados casos de ofiofagia em *P. patagoniensis* (GLIESCH, 1925; AMARAL, 1933, 1978; LEMA, 1973; LEMA & AZEVEDO, 1983; ROCHA & VIRCIBRADIC, 1998; DI BERNARDO, 1999; CECHEIN, 1999; HARTMANN & MARQUES, 2005).

Além de se confundirem ao foliço do solo para a camuflagem, usam também de achatar o corpo dorso-lateralmente como estratégia de defesa, são normalmente de média agressividade, podendo desferir botes com mordidas, injeção de veneno e golpes com a cabeça (MARQUES *et al.* 2001).

Figura 02: Exemplar adulto de *Philodryas patagoniensis* (Foto: Antonio C.O.R. da Costa).

O crânio desta serpente mostra um maxilar com uma redução quanto ao comprimento, e um alongamento do osso quadrado na região superior e este está ligado ao osso esquamosal, que apresenta-se reduzido (BARBARINI, 1998).

Possui uma dentição pequena, muito semelhante à série áglifa, porém, possui dois dentes posteriores maiores localizados exatamente abaixo do ectopterigóide. Estes dentes maiores são sulcados na região anterior ou lateral. O osso maxilar inferior mostra-se mais largo, próximo à articulação (BARBARINI, 1998) (Figura 03 C, D).

A glândula de Duvernoy está localizada na região pós-orbital inferior. Aderida à musculatura de coloração rósea, essa glândula apresenta forma ovalada, com superfície granular e coloração esbranquiçada com consistência firme à compressão. É constituída por túbulos secretores e ductos excretores envolvidos por tecido conjuntivo denso, vasos sanguíneos e nervos. Os túbulos são caracterizados por apresentar células prismáticas, com citoplasma altamente acidófilo e núcleos cilíndricos de cromatina densa localizados em sua maioria na porção basal das células secretoras. Observa-se a presença de algumas células mucosas constituindo os túbulos secretores, nos quais a luz mostra muito pouco ou nenhum conteúdo. Os ductos excretores são

ramificados e caracterizam-se por exibir células colunares, citoplasma cromóforo e núcleos basais, células serosas também são encontradas nas paredes dos ductos, onde a luz é pequena com conteúdo variável (BARBARINI, 1998) (Figura 3A, B).

Figura 03: Aspectos gerais e específicos de *Philodryas patagoniensis*. **A)** Vista microscópica da Glândula de Duvernoy de *P. patagoniensis* - (CS)células serosas - (Cm)células mucosas; **B)** Vista macroscópica da glândula de Duvernoy; **C)** Crânio de *Philodryas patagoniensis* (Foto: Giuseppe Puerto); **D)** Fotomicrografia eletrônica de varredura, mostrando o dente opistóglifo com canal, aberto, como uma calha que percorre o dente longitudinalmente (CARDOSO et al., 2003).

1.6.2 O veneno de *Philodryas patagoniensis*

O veneno de *Philodryas patagoniensis* parece ser menos ativo que o de *P. olfersii*, se julgarmos pelos efeitos locais (SAZIMA & HADAD, 1992), no entanto, nos casos já relatados e experimentos executados *in vitro* e *in vivo*, os sinais locais e sintomas causados por *P. patagoniensis* apresentam efeitos locais como dermonecrose, mionecrose e atividade edematogênica, além de alta atividade hemorrágica contendo enzimas (metaloproteases hemorrágicas) que causam danos ao endotélio vascular pela perfuração da membrana basal das paredes dos vasos (PEICHOTO et al., 2005), atividade proteolítica, fibrinogenolítica e proeminente processo inflamatório. Demonstra também algumas alterações na hemostase, como a atividade de enzimas que hidrolizam componentes plasmáticos. Estas atividades hidrolizantes em

conjunto com aquelas que agem sobre a parede dos vasos sanguíneos, levam a uma alta atividade hemorrágica, e podem resultar em seqüelas permanentes ou até causar a morte de vítimas mordidas por esta serpente (PEICHOTO *et al.*, 2005).

Figura 04: Acidente humano por *Philodryas patagoniensis*. **A)** Edema na mão direita, iniciado aproximadamente 30 minutos após a mordida; **B)** Evolução do edema, extendendo-se por todo o membro. (Fotos: F. Del Nero).

No que diz respeito aos mecanismos de ação sistêmica do veneno de *Philodryas patagoniensis*, investigações realizadas por PEICHOTO *et al.*, (2006) em ratos, mostrou que o veneno foi capaz de induzir modificações histopatológicas em órgãos vitais de ratos, tais como: hemorragia multifocal em cerebelo, cérebro e secções de pulmão, congestão capilar peritubular severa em secções de rim e degeneração em secções de fígado, quando foi administrado o veneno por via intravenosa.

A injeção por via sub-cutânea mostrou resultados semelhantes ao prévio, com a exceção da hemorragia cerebelar. Por via intramuscular, não foram observadas hemorragia cerebral e nem cerebelar.

Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatino-kinase (CK) aumentaram seus níveis séricos, principalmente quando foi administrado o veneno por via intravenosa ou subcutânea. Tais mudanças induzidas são iniciadas em fases precoces do envenenamento e podem estar associadas com uma anormalidade de comportamento ou funcionalidade desses órgãos durante o envenenamento.

Dentre as alterações locais encontradas em envenenamentos por serpentes, as mais comuns são: dor, edema, hemorragia local e dermonecrose, podendo ocorrer também a degranulação de mastócitos, lesões musculares

decorrentes da ação direta ou indireta de toxinas presentes nos venenos, além de alterações microcirculatórias, promovendo o início da resposta inflamatória e conseqüente infiltrado leucocitário para o local da inflamação (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003).

O recrutamento de leucócitos para os locais de infecção é um processo que contém várias etapas, envolvendo a ligação dos leucócitos circulantes às células endoteliais e sua migração através do endotélio. Tal processo é regulado pela ligação de moléculas de adesão complementares no leucócito e na superfície das células endoteliais e pelos mediadores químicos (quimiocinas) (BRAIN, 1994).

Os eventos iniciais incluem a indução de moléculas de adesão nas células endoteliais por meio de vários mecanismos. O endotélio responde aos agentes nocivos pela secreção das citocinas TNF, IL-1 e quimiocinas. O TNF e a IL-1 atuam nas células endoteliais de vênulas pós-capilares adjacentes à infecção e induzem a expressão de várias moléculas de adesão. Após uma a duas horas o endotélio começa a expressar E-selectina e os leucócitos, devido à redução da velocidade do fluxo sanguíneo marginam a superfície endotelial e expressam carboidratos que se ligam a essas selectinas endoteliais, porém com uma baixa afinidade, sendo a ligação facilmente interrompida pelo fluxo sanguíneo. Consequentemente, os leucócitos ligados ao endotélio se soltam e se ligam novamente, rolando sobre a superfície endotelial, este é o movimento de *rolling* (BRAIN, 1994; EBNET & VESTWEBER, 1999; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O TNF e a IL-1 também induzem a expressão endotelial de ligantes para integrinas e os leucócitos normalmente expressam essas integrinas em um estado de baixa afinidade. Entretanto, as quimiocinas produzidas no local da lesão entram no vaso sanguíneo, ligam-se às células endoteliais e agem nos leucócitos ativando-os e convertendo suas integrinas para um estado de alta afinidade. Isto resulta numa firme ligação dos leucócitos ao endotélio, a *adesão* (BRAIN, 1994; EBNET & VESTWEBER, 1999; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O próximo passo no processo de migração dos leucócitos através do endotélio é a transmigração ou diapedese. As quimiocinas agem nos leucócitos aderidos e estimulam as células a migrar através dos espaços endoteliais na direção do gradiente quimiotático, ou seja, na direção do local da lesão ou

infecção (BRAIN, 1994; EBNET & VESTWEBER, 1999). Uma vez no tecido extravascular, os leucócitos se aderem à matriz extracelular e são retidos nos locais onde são necessários.

O reconhecimento da importância do dano tecidual local em envenenamentos por serpentes tem motivado um crescente número de estudos sobre sua patogênese, o que pode resultar em novas modalidades na terapêutica desses acidentes, assim como o conhecimento de mecanismos de injúria de células e tecidos que podem ser comuns a outras condições patológicas, além de proporcionar esforços para isolar toxinas específicas responsáveis por tal atividade, o que tem resultado na descoberta de inúmeras proteínas, algumas das quais, tem sido extensivamente caracterizadas em níveis estruturais e bioquímicos.

Como o quadro fisiopatológico local é muito semelhante ao apresentado por pacientes acometidos por picadas de serpentes do gênero *Bothrops*, o errôneo diagnóstico e/ou identificação incorreta do animal agressor, quando possível, poderia levar a um tratamento desnecessário com um antiveneno específico, podendo levar o paciente a um choque anafilático e posterior óbito (SILVEIRA & NISHIOKA, 1992).

Mesmo com diversos estudos mostrando que inúmeras proteínas de venenos de colubrídeos compartilham antígenos com as de venenos de viperídeos e elapídeos (BOQUET & SAINT GIRONS, 1972; SAKAI *et al.*, 1984; MINTON & WEINSTEN, 1987; WEINSTEN & SMITH, 1993; THEAKSTON *et al.*, 1979; ASSAKURA *et al.*, 1992; KAMIGUTI *et al.*, 2000; YAMAZAKI *et al.*, 2000), os antivenenos contra toxinas de serpentes peçonhentas não garantem “proteção” contra as secreções tóxicas de colubrídeos (THEAKSTON *et al.*, 1979). Ao contrário do tratamento de acidentes com *Dispholidus typus* e *Rabdophis tigrinus*, nenhum antiveneno é produzido para casos com colubrídeos da América do Sul, uma vez que os acidentes resultam em quadros predominantemente locais e o antiveneno, por sua vez, possui propriedades imunogênicas para reverter principalmente efeitos sistêmicos (SAWAY *et al.*, 2002; THEAKSTON & WARRELL, 1991; ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981; 1985; 1986; CARDOSO *et al.*, 1993).

Apesar de os efeitos locais manifestados nos acidentes com *Philodryas patagoniensis* serem relativamente bem conhecidos, não se sabe ao certo a

seqüência exata dos eventos que ocorrem imediatamente após o contato entre veneno e tecido, bem como os reais mecanismos de ação do veneno no desenvolvimento dos principais sintomas (dor e edema).

Vários fatores reforçam o interesse no veneno de *Philodryas patagoniensis*: (1) escassa informação sobre o veneno desta espécie, (2) desconhecimento do mecanismo das ações locais manifestadas (3) o aumento no registro de envenenamento por estas serpentes, sendo o Brasil o país da América do Sul recordista desses acidentes (NISHIOKA & SILVEIRA, 1994), além de (4) proporcionar aos médicos e outros profissionais da área de saúde, informações para o reconhecimento das serpentes peçonhentas e não peçonhentas, (5) dos sinais diagnósticos característicos de cada acidente e a importância da utilidade do exame do local da picada, o que poderia evitar o uso inadequado de antiveneno e seus potenciais efeitos adversos (NISHIOKA & SILVEIRA, 1994).

Procurando contribuir para o conhecimento do veneno da espécie *Philodryas patagoniensis*, este estudo investigou através de experimentos bioquímicos e fisiológicos, os mecanismos envolvidos na modulação farmacológica e estudos dos eventos microcirculatórios, pois o entendimento do mecanismo de ação local do veneno contribuirá para o correto diagnóstico e tratamento.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos gerais investigar as ações locais morfológicas e inflamatórias do veneno de *Philodryas patagoniensis* e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor e edema. Para tal, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar a atividade edematogênica;
- ✓ Caracterizar a atividade nociceptiva;
- ✓ Investigar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor e do edema através de modulação farmacológica;
- ✓ Investigar alterações na microcirculação, analisadas por microscopia intravital;
- ✓ Investigar alterações na musculatura, através da análise por histologia;
- ✓ Caracterizar o infiltrado inflamatório induzido pelo veneno;
- ✓ Avaliar a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 ANIMAIS

3.1.1a *Animais experimentais*

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 18 e 22g e somente para os ensaios de microscopia intravital foram utilizados animais pesando entre 23-27g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan.

Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a água e ração no biotério experimental do Lab. de Herpetologia do Instituto Butantan (Figura 5A).

Todos os experimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, sob protocolo nº. 295/06.

3.1.1b *Serpentes*

Foram utilizados indivíduos adultos de ambos os sexos de *Philodryas patagoniensis* de várias localidades, medindo entre 900 e 1200 mm, mantidas no Biotério de Manutenção de Colubrídeos do Lab. de Herpetologia do Instituto Butantan, em recintos individuais (Figuras 5B e C), com água a vontade e alimentação constituída de camundongos (aprox. 10% do peso do animal) quinzenalmente, intercalando com as extrações.

3.1.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE VENENO

Foram utilizados venenos extraídos de *Philodryas patagoniensis* no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, resultando num pool de 56,1 mg proveniente de 27 extrações. Foi ministrada uma injeção subcutânea de Pilocarpina (10mg/Kg) (ROSEMBERG et al., 1985), após 10 min as extrações foram realizadas através da introdução de suas presas em micropipetas de

100µl, seguindo o método descrito por FERLAN *et al.*,(1983), com algumas modificações (Figura 5D). O veneno bruto foi centrifugado a 4°C, e o sobrenadante limpo foi liofilizado e mantido a -20°C até o momento do uso. Quando requerido, o veneno foi diluído em diferentes soluções, de acordo com os ensaios realizados.

O veneno de *Bothrops jararaca* (Referência Nacional), preparado para utilização nas titulações dos antivenenos botrópicos produzidos no Brasil, à partir de 2.000 extrações individuais de espécimes procedentes de toda a área de distribuição geográfica da espécie, foi adotado como parâmetro de comparação em alguns ensaios.

Figura 05: A) Biotério experimental do laboratório de Herpetologia/venenos do Instituto Butantan; B e C) Biotério de manutenção dos colubrídeos do laboratório de Herpetologia/Venenos (Fotos: Henrique Braz); D) Procedimento de extração de veneno de um exemplar de *Philodryas patagoniensis* (Foto: Sílvia R. T. Cardoso).

3.1.3 REAGENTES E PREPARO DE SOLUÇÕES

3.1.3.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Dosagem de proteínas

CURVA DE CALIBRAÇÃO

BSA (Albumina Sérica Bovina) (Sigma-USA).....	2,0mg
Água destilada.....	2,0ml

SOLUÇÃO A

Carbonato de Sódio 2% (Nuclear-Brasil).....	20,0g
Hidróxido de Sódio 4% (Merck- Brasil).....	4,0g
Tartarato de Sódio 0,16% (Eoibra-Brasil).....	1,6g
Lauril sulfato de sódio – SDS 1% (Sigma-USA).....	10,0g
Água destilada q.s.p.....	1000ml

* Para a dosagem protéica pelo método de LOWRY e cols., (1951), utiliza-se a Solução A sem SDS e as demais soluções são todas iguais.

SOLUÇÃO B

Sulfato de Cobre 4% (Neon-Brasil).....	4,0g
Água destilada q.s.p.....	100ml

SOLUÇÃO C: 1 parte da solução B + 100 partes da solução A

SOLUÇÃO D: 1 parte do Reativo de Fenol – Follin Ciocalteau (Cell-Brasil) + 1 parte de água destilada.

Eletoforese SDS-PAGE

A) Tampão de concentração (pH 6,8 – 0,25M Tris)

Tris (hidroximetil) amino metano (Nuclear-Brasil).....	7,575g
Lauril sulfato de sódio SDS (Sigma-USA).....	0,5g
Água destilada q.s.p.....	250ml

* Ácido Clorídrico (HCl) (Nuclear-Brasil) para ajustar o pH.

B) Tampão de separação (pH 8,8 – 0,75M Tris)

Tris (hidroximetil) amino metano (Nuclear-Brasil).....	22,725g
Lauril sulfato de sódio SDS (Sigma-USA).....	0,5g
Água destilada q.s.p.....	250ml

* Ácido Clorídrico (HCl) (Nuclear-Brasil) para ajustar o pH.

C) Acrilamida / Bis-acrilamida (37,5:1)

Acrilamida (Sigma-USA).....	37,5g
Bis-acrilamida (Sigma-USA).....	1,0g
Glicerol (Nuclear-Brasil).....	25,0ml
Água destilada q.s.p.....	100ml

D) Outros reagentes

Persulfato de amônio 10% (APS) (LKD Bromma-Suécia).....	100mg
Água destilada.....	1,0ml
N,N, N',N' – tetrametil-1,2-diaminometano 0,005% (TEMED) (Sigma-USA).....	1,0ml

E) Tampão de corrida

Tris (hidroximetil) amino metano 0,025M (Nuclear-Brasil).....	18,2g
Glicina 0,192M (Nuclear-Brasil).....	86,4g
Lauril sulfato de sódio 0,1% SDS (Sigma-USA).....	6,0g
Água destilada q.s.p.....	6000ml

F) Tampão de amostra (0,0625M / Tris-HCl – pH 6,8)**SOLUÇÃO (5,0 ml)**

Lauril sulfato de sódio 10% SDS (Sigma-USA).....	4,0ml
Glicerol (Nuclear-Brasil).....	4,0ml
Azul de bromofenol (Inlab-Brasil).....	2,0ml
Água destilada q.s.p.....	19,0ml
β- mercaptoetanol (Merck-Brasil).....	50,0μl / 950μl

Coloração com Comassie Brilliant-Blue R-250**A) SOLUÇÃO ESTOQUE**

Metanol (Synth-Brasil)	120ml
Comassie Brilliant Blue R-250 (Merck-Brasil)	0,4g
Água destilada	80ml

B) SOLUÇÃO DE USO

Solução estoque.....	25ml
Ácido acético 20% (Nuclear-Brasil).....	25ml

C) SOLUÇÃO DESCORANTE

Metanol 30% (Synth-Brasil).....	60ml
Ácido acético 10% (Nuclear-Brasil).....	20ml

Água destilada q.s.p.....200ml

Tabela 02: Preparação dos géis de eletroforese em SDS-PAGE com relação às soluções e quantidades correspondentes a cada um para a preparação de gel de gradiente.

	Gel Concentração 5,0 ml	Gel Separação 30,0 ml	
	% poliacrilamida		
Reagentes	4%	7,5%	17,5%
Acrilamida/Bis acrilamida (37,5:1)	535µl	6,0 ml	14,0 ml
Tampão de concentração (0,25M) Tris-HCl 0,2% SDS pH 6,8	2,5 ml	X	X
Tampão de separação (0,75M) Tris-HCl 0,2% SDS pH 8,8	X	15 ml	15 ml
Persulfato de amônio 10%	25µl	150µl	150µl
Temed (0,005%)	2,5µl	15µl	15µl
Água Destilada	1,94 ml	8.84 ml	840µl

3.1.3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

Tampão PBS (phosphate-buffered-saline) pH 7,2 – Concentração 10x

Cloreto de Sódio (Nuclear-Brasil).....80,0g
 Cloreto de Potássio (Nuclear-Brasil).....2,0g
 Fosfato de Potássio (Nuclear-Brasil).....2,0g
 Fosfato de Sódio dibásico (Nuclear-Brasil).....11,6g
 Água destilada q.s.p.....1000ml

Formol 10%

Formol absoluto (Miyako-Brasil).....10ml
 Água destilada q.s.p.....100ml

Salina 0,9%

Cloreto de Sódio (Nuclear-Brasil).....9,0g
 Água destilada.....1000ml

EDTA 5mM

EDTA (Ácido etilenodiamino tetracético) (Sigma-USA).....0,093g
 Água destilada.....50ml

PMSF 5mM

PMSF (Fenil Metil Sulfonil Fluoreto) (Sigma-USA)	0,043g
DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma-USA)	50ml

Ortofenantrolina 5mM

Ophe (1-10 phenantrolina) (Sigma-USA)	0,049g
Água destilada	50ml

PBS contendo Triton X-100 (0,1%)

Triton X-100 (Sigma- USA).....	0,1ml
Tampão PBS q.s.p.....	100ml

NaOH 0,5M

NaOH (Nuclear-Brasil).....	2,0g
Água destilada q.s.p.....	100ml

Solução de Turk

Azul de metileno (Carlo Erba-Brasil).....	0,01g
Ácido acético (Nuclear-Brasil).....	4,0ml

Coloração com May-Grünwald

Corante em pó (Tennant química – Brasil).....	0,2g
Metanol (Synth-Brasil).....	100ml

Coloração com Giemsa

Corante em pó (Tennant química – Brasil).....	0,3g
Glicerina (Vetec-Brasil).....	25ml
Metanol (Synth-Brasil).....	25ml

Bicarbonato de Sódio 5%

Bicarbonato de Sódio (Nuclear-Brasil).....	5,0g
Água destilada q.s.p.	100ml

Tris-HCl (1mM, pH 8,0)

Tris (hidroxi metil amino metano) (Nuclear-Brasil)	0,012g
Água destilada q.s.p.	100ml

Fármacos

Cloridrato de Tramadol (Lab. Pfizer Ltda – Brasil)	50mg
Indometacina (Fluka Biochemika – Suíça).....	2,0mg
Arcoxia (Etoricoxibe – Merck & Co., Inc. – USA).....	60mg
Fosfato Dissódico de Dexametasona (Hypofarma – Brasil).....	4,0mg
Cloridrato de Cyproheptadina (Sigma –USA).....	5,0mg

Cloridrato de Prometazina (Laboratórios EMS – Brasil).....	10mg
Captopril (Medley S.A. Ind. Farm. – Brasil).....	5,0mg
N ω -nitro-L-arginina metiléster (Sigma – USA).....	5,0mg
Celebra (Celecoxibe – Lab. Pfizer Ltda. – Brasil)	100mg

Liberação de histamina

Solução Tyrode pH 7,2

Cloreto de Sódio (Nuclear-Brasil).....	8,0g
Fosfato de Sódio monobásico (Nuclear-Brasil).....	0,05g
Bicarbonato de Sódio (Nuclear-Brasil).....	1,0g
Cloreto de Cálcio (Inlab-Brasil).....	0,02g
Cloreto de Magnésio (Inlab-Brasil).....	0,1g
Cloreto de potássio (Nuclear-Brasil).....	0,2g
Glicose (Sigma – USA)	1,0g
Água destilada q.s.p.....	1000ml

* Para obtenção da solução Tyrode Ca⁺²-Free, basta apenas não incluir o cloreto de cálcio.

OPT (1% em metanol)

<i>O-phthaldialdehyde</i> (Sigma – USA)	5,0mg
Metanol (Synth-Brasil)	2,0ml

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

3.2.1.1 *Dosagem de Proteínas*

O teor protéico total do veneno de *Philodryas patagoniensis* foi dosado pelo método colorimétrico de LOWRY *et al.*, (1951), modificado por MARKWELL *et al.*, (1978), com base numa curva de calibração padrão de Albumina Sérica Bovina nas concentrações de 50, 100 e 200µg (BSA, SIGMA, St. Louis, MO, USA). Neste método as cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) reagem com o cobre em meio alcalino e este complexo reduz o reagente fosfomolibdato-fosfotungstato (Reagente Folin-ciocalteau) formando um cromóforo com absorção em 660 nm, modificado pela adição de SDS (Dodecil sulfato de sódio) no reagente álcali e um acréscimo na quantidade do reagente tartarato de sódio. Alterações que permitiram o uso com membrana e preparações lipoprotéicas sem prévia solubilização ou extração lipídica, e com amostras contendo 200 mM de sucrose ou 2,5 mM de EDTA.

Para este ensaio o veneno de *Bothrops jararaca* foi utilizado como parâmetro de comparação ao veneno de *Philodryas patagoniensis*. Ambos foram diluídos em salina 0,9% para a concentração de 100µg/ml em triplicatas e as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Micronal B-382).

3.2.1.2 *Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)*

A análise do perfil protéico do veneno de *P. patagoniensis* foi realizado de acordo com LAEMMLI (1970) em gel (10 x 8 cm x 10,5 x 0,75mm) em gradiente de concentração de poliacrilamida de 7,5 a 17,5 %.

As amostras foram aplicadas no gel na concentração de 100 µg/ 20µl, diluídas em tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol (Merck-Brasil) e após serem fervidas por 5 min. Para obtenção de um padrão de comparação geral foi aplicada uma amostra do veneno de *B. jararaca* (Referência Nacional) e para a estimativa da massa molecular das amostras aplicadas no gel, foi utilizada uma mistura de padrões de baixa massa molecular (LMW, Pharmacia

Biotech, USA), contendo: Fosforilase b (94.000 Da), Albumina (67.000 Da), Ovoalbumina (43.000 Da), Anidrase Carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e uma lisoenzima (14.400 Da). Foi utilizado equipamento Amersham Biosciences Mini VE Electrophoresis and Electransfer unit (cuba e placas) utilizando a fonte Pharmacia EPS 600, onde a corrida procedeu em voltagem constante de 110 volts, à temperatura ambiente. As bandas protéicas foram reveladas com Comassie Brilliant Blue R-250 (Merck).

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

3.2.2.1 Determinação da atividade edematogênica

Para a determinação da atividade edematogênica do veneno foi utilizado método de VAN ARMAN *et al.* (1965), onde estipula-se a dose mínima edematogênica, que é definida como a menor quantidade de veneno necessária para induzir 30% de aumento máximo do volume da pata “experimental”.

3.2.2.1a Determinação da cinética da atividade edematogênica

Camundongos (n=6) pesando entre 18-22g, foram injetados via sub-cutânea no coxim plantar da pata direita (experimental), com 50 µl da solução de veneno (1µg) diluída em salina estéril e a pata contralateral (controle) somente com salina. As medidas foram obtidas pela leitura em pleitsmógrafo (LSI-LETICA Digital plethysmometer LE-7500 - Lab. de Fisiopatologia – Instituto Butantan) nos tempos de 15min., 30min., 1h, 2h, 3h, 4h, 6h e 24h. O edema foi expresso de acordo com a seguinte fórmula:

$$E(\%) = \frac{(MF - MI)}{MI} \times 100$$

Onde:

MF: Medida final da pata;

MI: Medida inicial da pata (antes da injeção).

Após obter os valores para cada um dos tempos e para ambas as patas de cada animal, calcula-se o edema (%) propriamente dito, de acordo com o seguinte:

$$\Delta = PD - PE$$

Onde:

PD= Média das medidas da pata direita obtidas pela fórmula;

PE= Média das medidas da pata esquerda obtidas pela fórmula.

Com os valores obtidos, montou-se um gráfico da evolução do edema em função do tempo.

3.2.2.1b Determinação da dose mínima edematogênica (DME)

Com os resultados obtidos na avaliação da cinética, cinco grupos de animais (n=6) foram injetados como descrito acima com soluções de veneno (0,2 a 1,0µg) e as medidas obtidas também como descrito anteriormente, no tempo do efeito máximo do edema (30 min).

3.2.2.1c Efeito do EDTA sobre a atividade edematogênica

Para avaliar o efeito do EDTA sobre a atividade edematogênica, uma dose de veneno equivalente à uma DME (0,82µg) foi incubada com 5mM de EDTA por 30 minutos à temperatura ambiente (CHAVES *et al.*, 1995). Foram utilizados três grupos de 6 camundongos (n= 18), um grupo recebeu no coxim plantar da pata traseira direita (experimental) 50µl da solução do veneno incubada com EDTA, outro recebeu apenas a solução de EDTA e o último grupo, apenas a solução de veneno. Os animais de todos os grupos receberam injeções somente de salina estéril na pata contralateral (controle). A leitura foi realizada em pleismógrafo, após 30 minutos da injeção. Os resultados demonstram o potencial de inibição do edema induzido pelo veneno de *Philodryas patagoniensis*, pelo EDTA.

3.2.2.2 Determinação da atividade nociceptiva

Dois grupos de cinco camundongos (n=10) foram injetados no coxim plantar da pata traseira direita com 50µl de soluções de veneno (0,5; 1,0; 3,0 e 5,0µg) diluídas em salina estéril. Os animais do grupo controle foram injetados apenas com salina estéril. Após a injeção os animais foram transferidos para uma câmara de vidro localizada sobre uma superfície refletora para facilitar a observação do comportamento nociceptivo. O tempo de reatividade em que os animais executaram movimentos de morder ou lambem a pata injetada foi cronometrado em segundos durante um tempo total de 30 min de observação de acordo com o método de HUNSKAAR *et al.*, 1985.

3.2.2.2a Efeito do EDTA sobre a atividade nociceptiva

Para avaliar o efeito do EDTA sobre a atividade nociceptiva, a fim de verificar a interferência da hemorragia no desenvolvimento da dor, 2,0µg do veneno foram incubados com 5mM de EDTA por 30 minutos à temperatura ambiente (CHAVES *et al.*, 1995) e em seguida injetados no coxim plantar da pata traseira direita dos animais. O tempo de reatividade dos animais foi analisado como descrito acima.

3.2.2.3 Modulação farmacológica para avaliação dos mecanismos envolvidos no edema e nocicepção

Nestes experimentos foram utilizadas doses de 2µg de veneno para os ensaios de nocicepção e o equivalente a 2 DME (1,64µg) para os ensaios de edema com os animais pré-tratados com diferentes drogas. Como controle os animais foram injetados com o veneno na ausência dos antagonistas. Os resultados referentes aos tratamentos farmacológicos sobre as atividades nociceptiva e edematogênica foram avaliados como o tempo de reatividade dos animais cronometrado em segundos e como a diferença de peso entre a pata tratada e a pata controle, respectivamente.

Com suas doses determinadas a partir da literatura disponível, as drogas utilizadas neste experimento foram:

Droga	Classe	Via administração	Dose	Tempo (*)
Tramal	Analgésico opióide	Intra-peritoneal	5mg/kg	60 min
Indometacina	AINE ^(a)	Subcutânea	2mg/kg	30 min
Dexametasona	AIE ^(b)	Subcutânea	1mg/kg	60 min
Arcoxia	AINE seletivo COX ₂	Intra-peritoneal	2mg/kg	30 min
Celebra	AINE seletivo COX ₂	Intra-peritoneal	4mg/kg	30 min
Captopril	Inibidor da ECA ^(c)	Intra-peritoneal	10mg/kg	120 min
Cyproheptadina	Antagonista serotoninérgico e histamínico	Intra-peritoneal	2mg/kg	30 min
Prometazina	Antagonista histamínico	Intra-peritoneal	5mg/kg	15 min
L-NAME	Inibidor da NOS ^(d)	Intra-peritoneal	10 e 50mg/kg	30 min

(*): Tempo antes do tratamento com veneno; (a): Antiinflamatório não esteroide; (b): Antiinflamatório esteroide; (c): Enzima conversora de Angiotensina; (d): Óxido nítrico sintase.

Com exceção da Dexametasona (dissolvida em bicarbonato de sódio 5%), Indometacina, Celebra e a Arcoxia (dissolvidas em Tris-HCl 1mM pH 8,0) as demais drogas foram diluídas antes do uso em solução salina estéril (0,9%).

Figura 06: Formulação química dos fármacos utilizados nos ensaios de modulação farmacológica. **A)** Arcoxia; **B)** Tramal; **C)** Indometacina; **D)** Cyproheptadina; **E)** Dexametasona; **F)** Captopril; **G)** L-NAME; **H)** Prometazina; **I)** Celebra.

3.2.2.4 Atividade miotóxica avaliada por histologia

Seis grupos de 02 camundongos foram injetados via intra-muscular no gastrocnêmio direito com doses de 5 - 30µg de veneno em 0,1ml de PBS estéril (pH 7,2). Os animais do grupo controle foram injetados apenas com 0,1ml de PBS. Três horas após a injeção, os animais foram eutanasiados com CO₂ e os músculos experimentais e controles foram retirados e fixados em solução de formol 10% por 24h. As amostras foram então encaminhadas ao Lab. Histotech Lâminas Didáticas (H & E Lâminas Didáticas LTDA-ME) para preparação histológica de rotina. Secções de 10µm foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para observação histológica das alterações musculares. Escolhida a dose final de 30µg, avaliou-se a cinética dos efeitos do veneno sobre o tecido muscular nos intervalos de tempo (15 min; 30 min; 1h; 3h; 6h e 24h) após a inoculação. A confecção de lâminas permanentes foi realizada como descrito acima. As fotomicrografias foram obtidas a partir de um microscópio Olympus BX51, acoplado a uma câmera digital Q color 3

Olympus, utilizando o sistema fotográfico Image-Pro Express Olympus do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.2.2.4a *Investigação da participação de proteinases na atividade miotóxica*

Para avaliar o efeito de 5mM dos inibidores EDTA (Ácido etilenodiamino tetracético), Ophe (1-10 fenantrolina) e PMSF (Fenil Metil Sulfonil Fluoreto) sobre a miotoxicidade do veneno, os músculos foram injetados com 100µl da solução de veneno (30µg) incubados com os inibidores por 30 minutos à temperatura ambiente (CHAVES *et al.*, 1995) e no tempo de 3 horas após a injeção os músculos foram retirados e encaminhados para a confecção de lâminas permanentes como descrito acima. Os músculos do grupo controle receberam a injeção de 100µl da solução de veneno na ausência dos inibidores. Neste ensaio as fotomicrografias foram obtidas como descrito acima.

3.2.2.4b *Dosagem de proteínas musculares não colágenas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas musculares*

A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito por GUTIÉRREZ *et al.*, 1986 com algumas modificações. Grupos de quatro camundongos (♂ ; 18-22g) foram injetados via intra-muscular no gastrocnêmio direito com 60µg de veneno em 100µl de PBS estéril (pH 7,2), o grupo controle recebeu apenas a injeção de 100µl de PBS. Nos intervalos de tempo de 1h, 3h e 24h após a injeção, os animais foram eutanasiados por CO₂ e os músculos envenenados e o controle foram obtidos. Os músculos foram então picotados, homogeneizados em 5 ml de PBS (pH 7,2) contendo 0,1% de Triton X-100 e centrifugadas a 10.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspense em 2 ml de NaOH (0,5M) *overnight*. Após esse período as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas não colágenas pelo método de LOWRY e cols., 1951. O *pellet* foi ressuspense em 250µl de água destilada para preparação das amostras para análise por SDS-PAGE em gel de 12% de poliacrilamida, de acordo com o método de LAEMMLI, (1970). Para a estimativa da massa

molecular das amostras aplicadas no gel, foi utilizada uma mistura de padrões de baixa massa molecular (LMW, Pharmacia Biotech, USA), contendo: Fosforilase b (94.000 Da), Albumina (67.000 Da), Ovoalbumina (43.000 Da), Anidrase Carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e uma lisoenzima (14.400 Da). A corrida procedeu em voltagem constante de 120 volts, em temperatura ambiente. As bandas protéicas foram reveladas com Comassie Blue R-250 (Merck). Para este ensaio, realizado em condições não desnaturantes, as amostras foram preparadas em tampão sem o agente redutor e não foram fervidas.

3.2.2.5 Estudo do infiltrado inflamatório

Esta etapa seguiu a técnica utilizada por ZAMUNER *et al.* (2001) com algumas modificações. Grupos de cinco camundongos foram injetados via intra-peritoneal com 1,0 ml de solução de veneno (5,0 µg). Nos intervalos de tempo (30min, 1,3,6,24,48 e 72 horas) após a injeção, os camundongos foram mortos por CO₂ e o fluido peritonial foi sugado após lavagem da cavidade com 3,0 ml de PBS (pH 7,2). A suspensão foi mantida em gelo e centrifugada (1500 rpm, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1,0 ml de PBS. Após esse procedimento as células inflamatórias foram contadas em um hemocitômetro (Câmara de Neubauer) após diluição no líquido de Turk (azul de metileno 1% e ácido acético 0,4%), que lisa os eritrócitos, mantendo leucócitos e macrófagos intactos, para que possa ser feita a contagem apenas das células inflamatórias e não dos eritrócitos presentes no tecido devido à hemorragia. Então a suspensão foi centrifugada em uma citocentrífuga (Fanem[®] Mod. 248 – 1000 rpm, 5 min) e as lâminas foram preparadas e coradas com Giemsa-May-Grünwald para a contagem diferencial, que foi realizada contando-se 300 células e estas, foram classificadas quanto à sua morfologia como: Polimorfonucleares (PMN) e Mononucleares (MN).

3.2.2.6 Alterações na microcirculação analisadas por microscopia intravital direta

A dinâmica dos efeitos locais do veneno de *Philodryas patagoniensis* na rede microcirculatória do músculo cremaster de camundongos pesando entre 23 e 27g (n=5), foi analisada pelo método da microscopia intravital direta.

3.2.2.6a Aparelho utilizado para o estudo da microcirculação “*in situ*”

O estudo do sistema vascular “*in situ*” de um tecido trans-iluminado foi analisado em um microscópio (Zeiss Axioskop) com uma objetiva 10x + optovar 1,6x e acoplado a uma câmera para captação de imagens (JVC TK-C600). As imagens foram transmitidas a um aparelho de televisão ligado a um vídeo K-7, e a um computador provido de um programa de análise de imagens (KONTRON, KS 300). Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

3.2.2.6b Preparação do músculo cremaster

Os procedimentos empregados neste experimento, seguiram o método utilizado por LOMONTE *et al.*, (1994), descrito por BAEZ, (1973). Os animais foram anestesiados com uma injeção subcutânea de Ketamina-Xilasina 50mg/Kg (Vetaset®– Fort Dodge Saúde Animal Ltda) no dorso, e em seguida manipulação cirúrgica na bolsa escrotal para a exposição do músculo cremaster.

Os animais foram colocados sobre uma placa com temperatura controlada (37°C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. Tal placa foi montada sobre o “*charriot*” do microscópio óptico.

Este tipo de preparação oferece facilidades importantes para o estudo: o procedimento cirúrgico não exige intensa manipulação, evitando lesões teciduais relevantes; o tecido pode ser trans-iluminado, os movimentos respiratórios do animal não perturbam a observação, uma vez que o tecido pode ser fixado sem causar prejuízo da integridade da rede microcirculatória.

3.2.2.6c Ensaio

Uma vênula pós-capilar selecionada aleatoriamente (diâmetros entre 20 e 40 µm, e comprimento de, pelo menos, 100 µm) foi observada em cada animal. Foi avaliada a interação leucócito-endotélio (leucócitos em rolling, aderentes e migrados), bem como alterações no diâmetro das vênulas ao longo do tempo de experimento.

Os ensaios foram realizados com aplicação tópica de veneno nas doses de 0,1 e 0,5µg/10µl e contagens durante 1 minuto, nas quais os leucócitos em rolling e aderidos foram contados ao longo dos 100 µm do vaso, 5 min, 10 e 15min após a exposição da microcirculação ao veneno ou salina. O diâmetro das vênulas foi avaliado por medições a cada minuto, desde o momento imediatamente antes da aplicação de veneno ou salina até 15 min após a aplicação. Uma observação mais prolongada não foi possível em decorrência da hemorragia ocasionada pelo veneno em toda a área do tecido.

Para avaliação da cinética das atividades induzidas pelo veneno na microcirculação e para a contagem dos leucócitos emigrados, 100µl do veneno (0,1µg) foi injetado no subcutâneo da bolsa escrotal e o leito vascular do músculo cremaster foi preparado, conforme descrito acima, 1, 2, 24, 48 e 72 horas após. Foram contados os leucócitos em rolling e aderidos como descrito anteriormente e os leucócitos emigrados foram avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 µm de cada lado do mesmo segmento vascular de 100 µm.

3.2.2.7 Análise da liberação de histamina de mastócitos peritoneais

3.2.2.7a Isolamento dos mastócitos

Uma suspensão de mastócitos será obtida através de lavado peritoneal em camundongos (CHEN *et al.*, 1984). Os animais (n=5) serão injetados intraperitonealmente com 5ml de Solução Tyrode (NaCl 137,00 mM; KCl 2,70 mM; CaCl₂.2H₂O 1,36 mM; MgCl₂.6H₂O 0,50 mM; NaH₂PO₄.H₂O 0,36 mM; NaHCO₃ 11,90 mM; Glicose 5,50 mM. pH 7,2, 37°C), o abdômen será massageado por 2 min e os animais foram então eutanasiados com CO₂ e uma incisão média feita no abdômen para a aspiração do fluido peritoneal.

3.2.2.7b Ensaio fluorimétrico

A suspensão de mastócitos obtida através do lavado peritoneal de camundongos foi centrifugada (150g, 10min) e ressuspensa em 2ml de Solução Tyrode Ca⁺²-Free (NaCl 137,00 mM; KCl 2,70 mM; MgCl₂.6H₂O 0,50 mM; NaH₂PO₄.H₂O 0,36 mM; NaHCO₃ 11,90 mM; Glicose 5,50 mM) e incubadas por 2min à 37°C. O veneno (1,0; 5,0 e 10,0µg/ml) foi então

adicionado à suspensão celular. Cinco minutos depois a reação foi interrompida pela adição de 3ml da Solução Tyrode Ca^{+2} -Free gelada e as amostras novamente centrifugadas. A partir do sobrenadante foi obtida a concentração de histamina liberada. O pellet ressuspensso em 5ml de Solução Tyrode Ca^{+2} -Free e fervido por 10 minutos para a liberação da histamina residual de acordo com o procedimento de PAYNE (1978), modificado de SHORE *et al.*, (1959) por espectrofotofluorimetria, mas omitindo o procedimento de extração, uma vez que, a histamina é a única substância presente em amostras celulares, que fluoresce na presença de OPT (o phthaldialdehyde) (BERGENDORFF & UVNÄS, 1972). Para tal, foi então adicionado 0,1ml do substrato OPT (1% em Metanol) em cada amostra, a solução foi incubada por 4 minutos e a fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (excitação 360nm; emissão 450nm). A liberação de histamina é expressa como percentagem do conteúdo total de histamina da célula (liberada e residual) e todos os valores foram corrigidos pela liberação espontânea de histamina que ocorre na ausência de estímulo, de acordo com o método de cálculo proposto por COBERLY & PRICE, (2005).

3.2.2.8 Análises estatísticas

Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Todos os dados foram analisados quanto às premissas dos testes paramétricos: normalidade e homogeneidade de variâncias, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente.

Quando atendiam positivamente às exigências de normalidade e homogeneidade, as comparações de mais de dois grupos foram analisadas por Anova e as comparações múltiplas realizadas através do teste post-hoc de Tukey HSD. Quando comparados apenas dois grupos, foi utilizado o teste t de Student. Quando não atendidas as exigências, os dados foram analisados pelos equivalentes não paramétricos Kruskal-Wallis para comparação de mais de dois grupos e teste de Mann Withney para dois grupos.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

4.1.1 Dosagem protéica

Para a obtenção de um parâmetro de comparação, em relação ao teor protéico total do veneno de *Philodryas patagoniensis*, foi utilizado o veneno de *Bothrops jararaca* (Veneno Referência Nacional).

Os resultados mostraram que o veneno de *P. patagoniensis* possui uma composição protéica da ordem de aproximadamente 75%. Em comparação ao veneno de *Bothrops jararaca*, *P. patagoniensis* mostra-se menos protéico, uma vez que o veneno botrópico apresenta teor protéico de aproximadamente 100% (Tabela 03).

Tabela 03: Teor protéico total dos venenos de *Philodryas patagoniensis* e *Bothrops jararaca*. (*) Diferença significativa, analisado por Teste t Student ($p < 0,05$), utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Espécie	Proteínas	Conteúdo
	$\mu\text{g}/\text{mg de veneno}$	%
<i>Philodryas patagoniensis</i>	$743,8 \pm 0,02$	70-75
<i>Bothrops jararaca</i>	$1027,10 \pm 0,02$ * ($p: 0,049535$)	100

4.1.2 Perfil protéico do veneno bruto

O perfil protéico do veneno de *P. patagoniensis* analisado por SDS-PAGE (Figura 09) mostra claras diferenças em relação ao veneno de *B. jararaca*, o qual apresenta bandas mais densas nos pesos moleculares de 33, 25, 21 e entre 15 e 18 kDa, enquanto que o veneno de *P. patagoniensis* possui maior densidade nas bandas de 27 e 15 kDa.

Em condições não desnaturantes o veneno de *Bothrops jararaca* mostra concentração de bandas protéicas em três faixas de peso molecular (baixo, médio e alto pesos), enquanto que o veneno de *Philodryas patagoniensis* concentra poucas bandas principalmente nas regiões de baixo e médio peso molecular.

Quando o ensaio foi realizado sob condições desnaturantes, ambos os venenos mais uma vez se mostram diferentes, uma vez que o veneno de *B. jararaca* apresenta suas bandas bem distribuídas, mas bem menos densas que nas condições anteriores com bandas em 45, 40, 25, 21 e entre 10 e 16 kDa e o veneno de *P. patagoniensis* mostrou bandas mais densas concentradas quase que exclusivamente em faixas de médio peso molecular nas regiões entre 27 e 15 kDa.

Figura 09: SDS-PAGE dos venenos em gel de poliacrilamida (7,5-17,5%) de acordo com o método de LAEMMLI et al., 1970. Foram aplicados 15µl por poço. Gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue. Foram utilizados como marcadores de massa molecular: Phosphorylase b (94 kDa), albumina de soro bovina (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20.1 kDa) e lisozima (14.4 kDa). **1)** Padrão de peso molecular; **2)** Veneno de *Bothrops jararaca* (60 µg) não reduzido; **3)** Veneno de *Philodryas patagoniensis* (60 µg) não reduzido; **4)** Veneno de *Bothrops jararaca* (60 µg) reduzido; **5)** Veneno de *Philodryas patagoniensis* (60 µg) reduzido.

4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

4.2.1 Atividade edematogênica

O veneno de *P. patagoniensis* mostrou relevante atividade edematogênica. A análise da evolução do edema demonstrou uma ação rápida, induzindo um edema bem pronunciado já nos primeiros minutos após a inoculação, atingindo seu efeito máximo aos 30 minutos ($53,33 \pm 4,22 \%$) e regredindo gradativamente até 24 horas (Figura 10).

Para a determinação da dose mínima edematogênica (DME – concentração de veneno capaz de causar um aumento de 30% no volume da pata experimental em relação à pata controle) foi utilizado o tempo de avaliação de 30 min. Através da relação linear obtida ($R^2 = 0,951$) de cinco doses testadas (0,2 a 1,0 μg) (Figura 11), obteve-se que a DME para o veneno de *Philodryas patagoniensis* é de 0,82 μg .

Figura 10: Cinética do edema de pata induzido por *P. patagoniensis* (1,0 μg /50 μl). Os dados são expressos em porcentagem como a diferença do volume da pata experimental em relação à pata controle. Cada ponto representa média $\pm$ S.E.M de seis animais. (*) Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Figura 11: Curva dose resposta do edema de pata induzido por *P. patagoniensis*. Os dados são expressos em porcentagem como a diferença do volume da pata experimental em relação à pata controle. Cada ponto representa média $\pm$ S.E.M de seis animais. (*) Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

4.2.1.1 Efeito do EDTA sobre a atividade edematogênica

A incubação da dose equivalente a uma DME (0,82µg) de veneno com 5mM de EDTA, mostrou que o agente quelante foi capaz de reduzir em aproximadamente 44,5% o edema causado pelo veneno de *P. patagoniensis*, (Figura 12).

Figura 12: Inibição do edema induzido por 0,82µg/50µl de veneno de *Philodryas patagoniensis* incubado com 5mM de EDTA. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média de seis animais. (*) Significativamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

4.2.2 Atividade nociceptiva

A atividade nociceptiva do veneno de *Philodryas patagoniensis*, observada num período de 30 minutos, apresenta um padrão onde a maior reatividade dos animais se mostra aproximadamente entre 10 e 15 minutos após a injeção. Nos animais do grupo controle e nas doses de 0,5 e 1,0µg o pico de reatividade foi seguido por uma intensa agitação, enquanto que nas doses mais altas (3,0 e 5,0µg), os animais permaneciam praticamente imóveis até o final do período de observação. Foi possível observar nos grupos que receberam doses de veneno, que os animais caminhavam com a pata injetada elevada, evitando apoiá-la sobre a superfície, apresentavam respiração alterada, espasmos

musculares, além de demonstrarem sensações de inquietação intensa em alguns momentos.

A reatividade dos animais ao veneno, se mostrou de maneira dose-dependente, sendo que as doses 1,0; 3,0 e 5,0 μ g são estatisticamente diferentes do controle ($22,64 \pm 5,82$ s), porém as doses de 1,0, 3,0 não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 13).

Figura 13: Reatividade nociceptiva apresentada ao veneno de *P. patagoniensis*. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de nove animais. (*) Significativamente diferente do controle. ($p < 0,05$). Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

4.2.2.1 Efeito do EDTA sobre a atividade nociceptiva

A inibição da hemorragia pelo EDTA foi possível de ser observada macroscopicamente e retardou o pico de nocicepção, que era em 10 min após a inoculação para 15-20 minutos após, mas não foi capaz de interferir na atividade nociceptiva ($79,8 \pm 8,06$ s), uma vez que não apresentou diferença estatística do grupo que recebeu apenas a dose de veneno ($81,82 \pm 1,48$ s) (Figura 14).

Figura 14: Inibição da nocicepção induzida por 2,0µg/50µl de veneno de *Philodryas patagoniensis* incubado com 5mM de EDTA. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de nove animais. Analisado estatisticamente pelo Teste t Student utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

4.2.3 Modulação farmacológica da dor e edema

Os estudos de modulação farmacológica consistiram da avaliação dos efeitos do pré-tratamento dos animais com drogas usadas na clínica e bloqueadores de vias relacionadas à dor e edema. Foram analisadas a potenciação ou redução das atividades edematogênica e nociceptiva utilizando as doses de 1,64 e 2,0µg de veneno, respectivamente (Tabela 04).

O edema induzido pelo veneno de *P. patagoniensis* foi reduzido em animais pré-tratados com o antiinflamatório não-esteroidal Indometacina (14.38 ± 1.32 %) e pelo antiinflamatório esteroidal Dexametasona (24.50 ± 3.7 %) em relação ao grupo controle na ausência de qualquer tratamento (38.25 ± 5.45 %). Arcoxia (5mg/Kg), Celebra (4mg/kg), Captopril (10mg/kg), Tramal (5mg/kg), L-NAME (10 e 50mg/kg), Prometazina (5mg/kg) e Cyproheptadina (2mg/kg) não interferiram no desenvolvimento do edema induzido pelo veneno (Figura 15A-I).

Quanto à atividade nociceptiva, esta foi reduzida em aprox. 85% pelo pré-tratamento com Indometacina (13.3 ± 2.92 s), 7% pelo duplo antagonista serotoninérgico e histamínico (76.31 ± 1.95) e 53% pelo analgésico opióide Tramal (38.68 ± 3.77 s) em relação ao grupo que recebeu apenas a dose de veneno (81.8 ± 1.48 s). Para avaliarmos a participação do sistema cininogênio-

calicreína-cinina na nocicepção, os animais foram pré-tratados com o inibidor da enzima conversora de angiotensina, Captopril, o qual foi capaz de potencializar a nocicepção em cerca de 22%. A utilização de L-NAME (10mg/kg), droga ativa na inibição da NOS (óxido nítrico sintase) potencializou a nocicepção em aprox. 40%, enquanto que quando utilizada na dose de 50mg/kg, não foi capaz de interferir na atividade. Prometazina, Arcoxia, Celebra e Dexametasona não foram capazes de causar qualquer interferência na atividade nociceptiva induzida pelo veneno de *Philodryas patagoniensis* (Figura 16A-I).

Tabela 04: Caracterização farmacológica das atividades edematogênica e nociceptiva do veneno de *Philodryas patagoniensis*. (*) Diferença significativa do grupo tratado apenas com veneno ($p < 0,05$). Analisado estatisticamente pelos testes de Mann Withney para o edema e teste t Student para a nocicepção utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Tratamento	Dose	Edema (%)	Mann-Withney valor p	Nocicepção (s)	Student t valor p
Veneno	1,64 / 2,0 µg	38,25 ± 5,45	-	81,8 ± 1,48	-
Tramal	5mg/kg	36,61 ± 4,33	$p = 0,747059$	38,68 ± 3,77 *	$p = 0,00000001140$
Indometacina	2mg/kg	14,38 ± 1,82 *	$p = 0,003823$	13,3 ± 2,92 *	$p = 0,00000000000048$
Dexametasona	1mg/kg	24,50 ± 3,07 *	$p = 0,034738$	79,47 ± 3,71	$p = 0,564684$
Arcoxia	2mg/kg	26,33 ± 2,13	$p = 0,077649$	83,89 ± 3,75	$p = 0,613462$
Celebra	4mg/kg	40,42 ± 5,03	$p = 0,520378$	78,45 ± 3,24	$p = 0,358787$
Captopril	10mg/kg	36,97 ± 5,20	$p = 0,872559$	99,93 ± 4,13 *	$p = 0,000788$
Cyproheptadina	2mg/kg	38,58 ± 4,58	$p = 0,747921$	76,31 ± 1,95 *	$p = 0,038882$
Prometazina	5mg/kg	37,06 ± 5,86	$p = 0,630356$	80,5 ± 3,20	$p = 0,713295$
L-NAME	10mg/kg	37,90 ± 5,13	$p = 0,809527$	114,64 ± 10,15 *	$p = 0,005562$
	50mg/kg	32,06 ± 4,05	$p = 0,521110$	89,34 ± 5,42	$p = 0,199842$

Figura 15: Representação gráfica da modulação farmacológica do edema induzido por *P. patagoniensis*. Pp representa o grupo controle tratado somente com veneno. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de seis animais. **A)** Dexametasona; **B)** Indometacina; **C)** Cyproheptadina; **D)** Prometazina; **E)** L-NAME; **F)** Captopril; **G)** Tramal; **H)** Arcoxia; **I)** Celebra. (*) Diferença significativa do grupo controle ($p < 0,05$). Analisado estatisticamente pelo teste de Mann Withney utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Figura 16: Representação gráfica da modulação farmacológica da nocicepção induzida por *P. patagoniensis*. Pp representa o grupo controle tratado somente com veneno. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de nove animais. **A)** Dexametasona; **B)** Indometacina; **C)** Cyproheptadina; **D)** Prometazina; **E)** L-NAME; **F)** Captopril; **G)** Tramal; **H)** Arcoxia; **I)** Celebra. (*) Diferença significativa do grupo controle ($p < 0,05$). Analisado estatisticamente pelo teste t Student utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

4.2.4 Atividade miotóxica avaliada por histologia

A inoculação de músculos gastrocnêmio de camundongos com doses de veneno de 5 a 30 μ g (Figura 17A-F) produziu alterações como hemorragia interfibrilar, edema, infiltrado inflamatório, desorganização fibrilar e mionecrose. Tais lesões se tornaram mais intensas à medida que se aumentou a dose de veneno e foi possível observar que o aparecimento de mionecrose dos tipos coagulativa e miolítica se deu a partir da dose de 10 μ g.

O músculo gastrocnêmio de camundongo injetado com 0,1ml de PBS (pH 7,2) preserva as características normais de músculo estriado esquelético, com células cilíndricas multinucleadas, com núcleos periféricos e estriações transversais visíveis ao microscópio óptico (Figura 18A). A injeção intramuscular de 30 μ g do veneno de *P. patagoniensis* produziu efeitos como desorganização das fibrilas musculares, hemorragia interfibrilar, edema, proeminente infiltrado inflamatório (PMN) e mionecrose.

Após 15 min, já é possível observar desorganização fibrilar e hemorragia interfibrilar. Passados 30 min da injeção é possível observar início de mionecrose (Figura 18B). Após uma hora já foi possível observar a presença de necrose do tipo miolítica (Figura 18C) e em 3 horas, observa-se o aparecimento de um infiltrado inflamatório, além da hemorragia (Figura 18D).

Nos tempos subseqüentes as lesões de mionecrose vão progredindo e, partir da 6^ª hora iniciam uma regressão e uma leve regeneração das fibras (Figura 18E), mostrando em 24 horas fibras normais circundadas por infiltrado inflamatório, hemorragia e restos de mionecrose (Figura 18F).

4.2.4.1.1 Investigação da participação de proteases na miotoxicidade

Nos ensaios com o veneno incubado com inibidores de proteases, foi observado que o EDTA foi capaz de inibir somente a hemorragia, persistindo o infiltrado inflamatório, edema e mionecrose (Figura 19C), enquanto que a Ophe e o PMSF aboliram a mionecrose, hemorragia e infiltrado inflamatório, permanecendo somente reduzido edema e desorganização miofibrilar (Figuras 19D e E).

Figura 17: Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 5-30µg/100µl de veneno de *Philodryas patagoniensis*. Os cortes foram preparados três horas após a injeção e corados com hematoxylina e eosina. **A)** Músculo controle, injetado com 100µl de PBS; **B)** Músculo injetado com 5µg de veneno; **C)** Músculo injetado com 10µg de veneno; **D):** Músculo injetado com 15µg de veneno **E)** Músculo injetado com 20µg de veneno; **F)** Músculo injetado com 25µg de veneno; **G)** Músculo injetado com 30µg de veneno. **(Asterisco)** Hemorragia; **(quadrado preto)** Fibras normais; **(seta azul)** Desorganização miofibrilar; **(seta preta)** Edema; **(estrela)** Infiltrado inflamatório; **(ponta de seta preta)** Mionecrose do tipo coagulativa; **(ponta de seta vermelha)** Mionecrose do tipo miolítica.

Figura 18: Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 30µg/100µl de veneno de *Philodryas patagoniensis*. Os cortes foram corados com hematoxylina e eosina. **A)** Músculo controle, injetado com 100µl de PBS; **B)** Músculo 30 min depois da injeção de veneno; **C)** Músculo 01 hora depois de injeção de veneno; **D)** Músculo 03 horas depois de injeção de veneno. **E)** Músculo 06 horas depois de injeção de veneno; **F)** Músculo 24 horas depois de injeção de veneno. (**Asterisco**) Hemorragia; (**quadrado preto**) Fibras normais; (**seta azul**) Desorganização miofibrilar; (**seta preta**) Edema; (**estrela**) Infiltrado inflamatório; (**ponta de seta preta**) Mionecrose do tipo coagulativa; (**ponta de seta vermelha**) Mionecrose do tipo miolítica.

Figura 19: Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 30µg/100µl de veneno de *Philodryas patagoniensis* incubado com diferentes inibidores de proteases. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. **A)** Músculo utilizado como controle positivo, 03 horas após injeção de veneno na ausência dos inibidores; **B)** Músculo 03 horas após injeção de veneno incubado com 5mM de EDTA ; **C)** Músculo 03 horas após injeção de veneno incubado com 5mM de Ophe; **D)** Músculo 03 horas após injeção de veneno incubado com 5mM de PMSF. (**Asterisco**) Hemorragia; (**quadrado preto**) Fibras normais; (**seta azul**) Desorganização miofibrilar; (**seta preta**) Edema; (**estrela**) Infiltrado inflamatório; (**ponta de seta preta**) Mionecrose do tipo coagulativa; (**ponta de seta vermelha**) Mionecrose do tipo miolítica.

4.2.4.1.2 Dosagem de proteínas musculares não colágenas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas musculares

A degradação de proteínas miofibrilares foi quase imperceptível 3 horas após a inoculação. Neste mesmo tempo as proteínas não-colágenas decresceram para $96,9 \pm 1,4\%$ quando comparado ao músculo controle. A análise por SDS-PAGE (Figura 20) mostrou que nenhum dos principais componentes miofibrilares foi extensivamente degradado. Seis e 24 horas após a injeção de veneno, há uma evidencia de degradação protéica no músculo. Nestas amostras as proteínas não colágenas decrescem para $71,9 \pm 2,4$ e $57,9 \pm 4,0\%$, respectivamente (Tabela 05). Além disso, houve também uma leve redução na intensidade das bandas mostradas em SDS-PAGE. Tais observações evidenciam que o veneno é capaz de causar degradação de proteínas musculares.

Tabela 05: Dosagem de proteínas não colágenas e totais dos músculos inoculados com 60 μ g de veneno de *P. patagoniensis*. (*)Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Analisado por Teste t Student utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Amostras	% proteínas	Proteínas
	não colágenas	totais (μ g/ml)
Controle	$100,0 \pm 1,4$	$1.636 \pm 4,7$
Pp 3h	$96,9 \pm 0,4$	$848 \pm 1,2$ *
Pp 6h	$71,9 \pm 2,4$ *	$624 \pm 1,1$ *
Pp 24h	$57,9 \pm 4,0$ *	$240 \pm 1,0$ *

Figura 20: SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (17,5%) das proteínas de músculos gastrocnêmio de camundongos inoculados com 60µg do veneno de *Philodryas patagoniensis* de acordo com o método de LAEMMLI et al., 1970. Foram aplicados 15µl por poço. Gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue. Foram utilizados como marcadores de massa molecular: Phosphorylase b (94 kDa), albumina de soro bovina (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20.1 kDa) e lisozima (14.4 kDa). **1:** Padrão de peso molecular; **2:** Proteínas do músculo controle inoculado com PBS; **3:** Proteínas do músculo 3 horas após a inoculação; **4:** Proteínas do músculo 6 horas após a inoculação **5:** Proteínas do músculo 24 horas após a inoculação.

4.2.4.5 Estudo do infiltrado inflamatório

A cinética da migração celular induzida pelo veneno de *Philodryas patagoniensis* mostra que a máxima ação indutora de migração ocorre no período de três a quatro horas após a injeção ($5,57 \pm 0,04 \times 10^6$ células/ml), sendo significativamente diferente da salina utilizada como controle (Figura 21A). A contagem celular diferencial mostrou que os neutrófilos (PMN) foram as células que predominaram durante os primeiros estágios (3-24h), enquanto células mononucleares apareceram mais tardiamente (48h) (Figura 21B e C).

Figura 21: Cinética do infiltrado inflamatório induzido pela injeção intra-peritoneal de 5µg do veneno de *Philodryas patagoniensis*. **A)** Contagem total de leucócitos; **B)** Contagem diferencial de leucócitos polimorfonucleares (PMN); **C)** Contagem diferencial de leucócitos mononucleares (MN). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de cinco animais. (*) Diferença significativa do grupo controle, analisado estatisticamente por ANOVA e Post Hoc de Tukey HSD, utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

4.2.4.6 Alterações microcirculatórias analisadas por microscopia intravital

A administração tópica de veneno de *Philodryas patagoniensis* sobre a rede microcirculatória do músculo cremaster de camundongos (Figura 22A), induziu notáveis distúrbios em vênulas pós-capilares, caracterizados por modificações nos diâmetros das vênulas, lesões hemorrágicas (Figura 22D) e interações leucócito-endotélio, tais como rolling e adesão (Figura 22B e C), além do aumento do fluxo sanguíneo, o que poderia indicar um possível recrutamento celular.

Na dose de 0,1µg observou-se proeminente vasodilatação (1min: $0,47 \pm 0,25$; 3min: $3,16 \pm 1,28$; 5min: $3,35 \pm 1,13$; $n = 5$) (Figura 23C), bem como redução do número de células em rolling (Figura 23A) e aumento da adesão celular (Figura 23B). Ao administrarmos uma dose maior (0,5µg), observa-se uma constrição transitória das vênulas, seguida por proeminente dilatação (1min: $-0,44 \pm 0,25$; 3min: $0,29 \pm 0,16$; 5min: $0,90 \pm 0,32$; $n = 5$) (Figura 24C). Nesta dose observou-se também a redução do comportamento de rolling (Figura 24A), o acréscimo da adesão (Figura 24B) e aumento do fluxo.

Em relação às lesões hemorrágicas, elas foram observadas sob a forma de focos (microsangramentos) espalhados pelo tecido (Figuras 22E e F) 15 minutos após a aplicação do veneno (0,1µg) totalizando $77.424,72 \pm 19.185,10 \mu\text{m}^2$ distribuídos em $15,40 \pm 2,6$ focos hemorrágicos, no entanto, ao aumentarmos a dose (0,5µg), 15 minutos após a aplicação, observa-se uma lesão hemorrágica contínua e intensa, o que nos impossibilitou de realizar a contagem e a medida das áreas dos focos hemorrágicos nesta dose.

A cinética dos eventos após a injeção subcutânea de veneno na bolsa escrotal de camundongos, nos mostra que em uma e duas horas ocorre um significativo decréscimo no número de leucócitos em rolling (Figura 25A) e aumento das células aderidas à parede do vaso (Figura 25B), bem como de células migradas em relação aos animais do grupo tratado com salina (Figura 25C). Adicionalmente, em 24h os leucócitos em rolling não diferem dos valores do controle, no entanto, as células aderidas e migradas ainda estavam aumentadas, iniciando a normalização de seus níveis somente a partir de 48h, mas ainda diferentes do controle em 48 e 72h.

Figura 22: Fotomicrografias da rede microcirculatória do músculo cremaster de camundongos. **A)** Vênula pós capilar e capilar; **B)** Vênula após aplicação tópica de veneno, mostrando menor número de células em rolling e mais aderidas; **C)** Vênula após aplicação tópica de salina, mostrando maior número de células em rolling e menos aderidas; **D)** Foco hemorrágico (microsangramento) após 15 min da aplicação de 0,1µg de veneno. Barra: 40µm. Setas brancas representam células aderidas; Setas vermelhas representam células em rolling.

Figura 23: Distúrbios observados em vênulas pós-capilares após aplicação tópica do veneno de *Philodryas patagoniensis* ou salina sobre a rede microcirculatória do músculo cremaster de camundongos. **A)** Células em rolling após aplicação de 0,1µg de veneno ou salina; **B)** Células aderidas à parede do endotélio após aplicação de 0,1µg de veneno ou salina; **C)** Diâmetro das vênulas após aplicação de 0,1µg de veneno ou salina. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média de cinco animais. (*) Significativamente diferente do grupo controle. Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Figura 24: Distúrbios observados em vênulas pós-capilares após aplicação tópica do veneno de *Philodryas patagoniensis* ou salina sobre a rede microcirculatória do músculo cremaster de camundongos. **A)** Células em rolling após aplicação de 0,5 μg de veneno ou salina; **B)** Células aderidas à parede do endotélio após aplicação de 0,5 μg de veneno ou salina; **C)** Diâmetro das vênulas após aplicação de 0,5 μg de veneno ou salina. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de cinco animais. (*) Significativamente diferente do grupo controle. Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Figura 25: Cinética das interações leucócito-endothélio induzidas pela injeção subcutânea se 0,1µg/100µl do veneno de *Philodryas patagoniensis* ou salina estéril na bolsa escrotal de camundongos. Foram realizadas contagens celulares de um minuto. **A)** Contagem dos leucócitos em rolling ao longo dos 100µm da vênula; **B)** Contagem dos leucócitos aderidos, considerando aqueles que permaneceram estacionários na parede vascular por um período ≥ 30 s; **C)** Contagem dos leucócitos migrados em uma área correspondente a 50µm de cada lado do segmento vascular analisado. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de cinco animais. (*) Significativamente diferente do grupo controle. Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

Figura 26: Cinética das interações leucócito-endotélio induzidas por 0,1µg/100µl do veneno de *Philodryas patagoniensis* ou salina injetado no subcutâneo da bolsa escrotal de camundongos. **A)** Salina duas horas após a inoculação; **B)** Salina 24 horas após a inoculação; **C)** Salina 72 horas após a inoculação; **D)** Veneno uma hora após a inoculação; **E)** Veneno duas horas após a inoculação; **F)** Veneno 24 horas após a inoculação; **G)** Veneno 48 horas após a inoculação; **H)** Veneno 72 horas após a inoculação. Barra: 40µm. Setas brancas representam células aderidas; setas vermelhas representam células em rolling; setas amarelas representam células migradas.

4.2.4.7 Análise da liberação de histamina de mastócitos peritoneais

Os resultados mostraram que o veneno de *Philodryas patagoniensis* foi capaz de induzir a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de camundongos após 30 min de incubação a 37°C. Tal liberação mostrou-se concentração dependente, sendo que a menor concentração induz a liberação de $46,7 \pm 1,28$ % e a maior induziu $71,8 \pm 0,72$ % em relação ao controle (Figura 27).

Figura 27: Liberação de histamina induzida pelo veneno de *Philodryas patagoniensis* *in vitro* dosada através de espectrofluorimetria. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de oito repetições. (*) Significativamente diferente das demais concentrações de veneno. Analisado estatisticamente por ANOVA e Tukey utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

5. DISCUSSÃO

Os venenos ofídicos são em geral, misturas complexas contendo mais de 20% de componentes orgânicos e inorgânicos (sólidos), sendo que cerca de 90% destes são proteínas com ou sem atividade enzimática, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (DEUTSCH & DINIZ, 1955; IWANAGA & SUZUKI, 1979; BJARNASON & FOX, 1988/89). Enquanto os componentes inorgânicos mais comuns são Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn, sendo que alguns exercem função de mantenedores de estabilidade estrutural de certas proteínas, como as metaloproteinases, que são fatores hemorrágicos, outros funcionam como catalisadores em funções enzimáticas específicas (FRIEDERICH & TU, 1971; BJARNASON & FOX, 1988/89). No entanto, grande variabilidade na composição e atividades dos venenos ofídicos é relatada em diversos trabalhos e pode ser observada em vários níveis: entre famílias, gêneros, inter e intra-específica, sazonal, ontogenética, sexual, geográfica (CHIPPAUX *et al.*, 1991).

Segundo WEINSTEIN & KARDONG, (1994), HILL & MACKESSY, (2000) e MACKESSY, (2002), o teor de proteínas totais dos venenos de colubrídeos é amplamente variável, ocorrendo diversificação da ordem de 15 a 100% em vários venenos estudados.

O veneno de *Philodryas patagoniensis* após a liofilização apresentou o conteúdo de proteínas totais de aproximadamente 70-75%, sendo desta forma, menos protéico que o veneno referência nacional de *Bothrops jararaca*, o qual apresenta teor protéico total da ordem de 100%. Estes achados corroboram os estudos realizados por ROCHA & FURTADO, (2007) e ACOSTA *et al.*, (2003).

As diferenças para mais entre os valores obtidos para as proteínas totais através do teste colorimétrico de LOWRY e cols., (1951), modificado por MARKWELL *et al.*, (1978) podem ser justificadas pela maior quantidade de aminoácidos aromáticos presentes nos venenos em relação ao padrão na construção da curva de calibração com albumina sérica bovina.

Estudos da análise eletroforética dos venenos de colubrídeos opistóglifos tem demonstrado que sua composição é variável. Entre os representantes da subfamília Colubrinae, o veneno da *Boiga irregularis*, apresenta uma

composição bastante simples (VEST *et al.*, 1991; WEINSTEIN & SMITH, 1993), enquanto que os Dispholidinae - *Dispholidus typus* e os Natricinae - *Rhabdophis subminiatus*, apresentam padrões eletroforéticos mais complexos (FERLAN *et al.*, 1983; MINTON & WEINSTEIN, 1987). Os venenos dos xenodontíneos apresentam uma composição relativamente simples. A eletroforese dos venenos de *Hydrodynastes gigas* (GLENN *et al.*, 1992), *Hypsiglena torquata texana* (VEST, 1988), *Erythrolamprus bizona* (LEMOINE & RODRÍGUEZ-ACOSTA, 2003) e *Thamnodynastes strigilis* (LEMOINE *et al.*, 2004b) tem mostrado que estes apresentam um baixo número de bandas protéicas, variando entre quatro e sete bandas majoritárias.

PEICHOTO *et al.* (2005) descreveram para o veneno de *P. patagoniensis* um perfil eletroforético com quatro bandas majoritárias, alocadas entre os pesos moleculares de 14 e 70 KDa.

No presente estudo, o veneno de *P. patagoniensis* e como parâmetro de comparação o veneno de *B. jararaca* apresentaram respectivamente sete e treze bandas, ambos mostrando quatro delas como majoritárias em faixas de peso molecular aproximado, que variam de 15 a 62 KDa. Estes achados podem reforçar hipóteses de estreita semelhança no que diz respeito às ações e atividades dos venenos de representantes das famílias Colubridae e Viperidae e corroboram com a análise eletroforética realizada por ROCHA *et al.*, (2005).

Os venenos de colubrídeos, nos últimos anos têm sido mais frequentemente estudados e muitos de seus componentes e ações têm sido descritos. De modo geral, tem-se sugerido que há uma grande semelhança entre alguns destes venenos e os dos membros da família Viperidae, devido à presença de proteases, fosfolipases, hialuronidases, entre outras enzimas que levam à lesão local culminando em edema, dor (hiperalgesia), equimose, bolhas e necrose (PUORTO & FRANÇA, 2003; SALOMÃO *et al.*, 2003).

As proeminentes atividades edematogênica e hiperalgésica, características em acidentes ofídicos, e seus rápidos desenvolvimentos são típicos sinais do processo inflamatório agudo, decorrente da ação de substâncias endógenas liberadas após o estímulo lesivo, como bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, entre outros (LOMONTE, 1994; CHACUR *et al.*, 2001). Vários componentes dos venenos podem ser responsáveis pela formação do edema,

tais como aminas biogênicas, pequenos peptídeos, proteínas, esterases, enzimas liberadoras de cininas; porém, ainda são escassas as pesquisas quanto à purificação e caracterização destes componentes (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003).

É interessante notar que poucos trabalhos tratam da elucidação dos processos envolvidos no edema e na hiperalgesia, que são os sintomas mais evidentes nos envenenamentos causados por colubrídeos (NICKERSON & HENDERSON, 1976; SILVA & BUONONATO, 1983/84; RIBEIRO *et al.*, 1999; SALOMÃO *et al.*, 2003).

Estudos do desenvolvimento do edema induzido por *P. patagoniensis* determinaram sua dose mínima edematogênica como 0,26µg, sendo mais edematogênico que alguns venenos botrópicos (ACOSTA *et al.*, 2003; PEICHOTO *et al.*, 2004).

Experimentos realizados com venenos de serpentes têm mostrado que a iniciação e o tempo requerido para que o edema atinja sua ação máxima variam consideravelmente (VISHWANATH *et al.*, 1987; SELISTRE *et al.*, 1990; TAN & SAIFUDDIN, 1990).

Nossos resultados mostraram que o veneno apresenta uma ação edematogênica máxima 30 min após a inoculação, seguido por um gradual declínio igualando-se ao controle em 24 horas, sendo 0,82µg a dose mínima edematogênica determinada, achados estes, que corroboram os resultados encontrados por ROCHA & FURTADO, (2007). Nossos resultados mostraram que o veneno de *Philodryas patagoniensis* demonstra uma cinética mais rápida que muitos venenos como, por exemplo, *Bothrops insularis* que alcança seu pico de edema três horas após a inoculação (BARBOSA *et al.*, 2003), *Bothrops asper* com pico uma hora após a inoculação em ratos (CHAVES *et al.*, 1994) e duas horas após a inoculação em camundongos (CHACUR *et al.*, 2001), *Lachesis muta rhombeata* com pico uma hora após (SOARES DE MOURA *et al.*, 1998), *Cerastes gasperetti*, duas horas (AL-ASMARI & ABDU, 2006), *Bothrops jararaca* com pico uma hora após a inoculação (TEIXEIRA *et al.*, 1994), entre outros.

Agentes quelantes tais como EDTA reduzem as atividades hemorrágica, edematogênica e letal de alguns venenos de serpentes (BORKOW *et al.*, 1993; CHAVES *et al.*, 1995), provavelmente pela inibição da atividade enzimática de

metaloproteinases hemorrágicas (BJARNASSON & FOX, 1994). Estas hemorraginas são enzimas zinco-dependentes que hidrolisam proteínas da lâmina basal de vasos capilares produzindo hemorragia (FRANCISCHI *et al.*, 1993; BJARNASSON & FOX, 1994; KAMIGUTI *et al.*, 1996; GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000). Uma vez que a hemorragia é vista macroscopicamente logo após a injeção de veneno e possivelmente interfere com o desenvolvimento do edema inflamatório, o veneno de *P. patagoniensis* foi incubado com 5mM de EDTA e este foi capaz de reduzir em aproximadamente 45% o edema induzido pelo veneno. Esta redução muito provavelmente resultou da ação quelante do EDTA sobre cátions divalentes de metaloproteinases, uma vez que estas enzimas são dependentes de zinco (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000) ou cálcio (FRANCISCHI *et al.*, 1993).

Além do edema, o fenômeno da dor ou hiperalgesia tem sido estudado experimentalmente em ratos com os venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops*, demonstrando que o edema e a hiperalgesia podem ou não ser modulados por diferentes mediadores (TEIXEIRA *et al.*, 1994; CHACUR *et al.*, 2001).

Estudos recentes realizados por ROCHA & FURTADO, (2007) sobre as atividades biológicas presentes em venenos de colubrídeos, demonstraram que o veneno de *Philodryas patagoniensis* é capaz de induzir relevante nocicepção, sendo mais ativo em comparação ao veneno de *Philodryas olfersii*.

Nossos resultados demonstraram que o veneno de *P. patagoniensis* induziu em camundongos, respostas hiperalgésicas dose-dependente, sendo muito semelhante à hiperalgesia induzida pelo veneno de *B. jararaca* (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

As respostas hiperalgésicas induzidas por este veneno mostraram-se independentes de metaloproteinases, uma vez que a incubação prévia do veneno com EDTA não foi capaz de reduzir tal atividade. A partir disso, podemos sugerir que a hemorragia não interfere nas respostas nociceptivas induzidas pelo veneno estudado, uma vez que o EDTA é capaz de inibir a hemorragia através do bloqueio da atividade de metaloproteinases hemorrágicas (LÉON *et al.*, 1998; RUCAVADO *et al.*, 2000). Tal sal quelante também não foi capaz de reduzir o efeito hiperalgésico induzido pelos venenos de *Bothrops asper* (CHACUR *et al.*, 2001) e *Bothrops jararaca* (CHACUR *et al.*,

2002), entretanto, aliadas a degranulação de mastócitos, as metaloproteinases contribuem para a hiperalgesia induzida pelo veneno de *B. jararaca* em ratos (BONAVITA *et al.*, 2006).

Observando-se ainda, que as respostas nociceptivas apresentaram um padrão onde a maior reatividade dos animais se mostrou aproximadamente entre 10 e 15 minutos após a inoculação e o pico máximo de edema é atingido 30 minutos após a inoculação, poderíamos sugerir que tais atividades estariam ligadas diretamente ao processo inflamatório, porém estudos mais específicos, como as investigações realizadas por TEIXEIRA *et al.*, (1994) para o veneno de *Bothrops jararaca*, FERREIRA, (2000) para o veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* e CHACUR *et al.*, (2001) para o veneno de *Bothrops asper*, são necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos na dor e no edema, bem como sua ligação com a reação inflamatória.

Baseados na inexistência de tais estudos específicos, no fato de que sinais inflamatórios (dor e edema) são observados no quadro clínico humano de envenenamento por *P. patagoniensis* e de que, em geral, a resposta inflamatória clássica é desencadeada pela ação de substâncias endógenas liberadas após o estímulo, passamos à caracterização farmacológica das respostas edematogênica e nociceptiva, através do tratamento prévio com diversos fármacos, buscando esclarecermos o mecanismo de ação local do veneno, bem como compreender a ineficácia de alguns medicamentos utilizados no tratamento de acidentes.

Danos teciduais causados por estímulos químicos, mecânicos ou térmicos, infecções, isquemia, tumores ou processos auto-imunes deflagram uma resposta inflamatória sustentada e orquestrada por múltiplos mediadores e células do sistema imune. Entre estes mediadores, estão as purinas (ATP), aminas (histamina e serotonina), eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos), citocinas (interleucinas e TNF α), fatores de crescimento (NGF e outros), íons (incluindo H⁺ e outros radicais livres), peptídeos (cininas, taquicininas e endotelinas), e espécies reativas do nitrogênio e oxigênio. Tais substâncias são sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório, podendo interferir nos sinais cardeais da inflamação (CARR & GOUDAS, 1999; SCHOLZ & WOOLF, 2002).

A lesão tecidual local representa a principal causa da dor e isso resulta possivelmente na liberação local de uma ampla variedade de agentes bioquímicos que podem estar envolvidos na formação do edema e que agem sobre terminações nervosas nociceptivas. Os receptores opióides nas terminações nervosas mediam a inibição da liberação de neurotransmissores, que podem agir diretamente ou propiciar a liberação de outros mediadores que atuam no desenvolvimento da dor e do edema.

Para testar o envolvimento de receptores opióides na mediação da dor e do edema, nós usamos o Tramal, um analgésico opióide de ação central. Este analgésico é um agonista puro não seletivo de receptores μ (mi), δ (delta) e κ (kappa), com maior afinidade pelo receptor μ (mi). Nossos resultados mostraram que este analgésico foi capaz de reduzir a dor, mas não o edema, sugerindo assim o envolvimento de tais receptores apenas no desenvolvimento da dor, corroborando com os resultados encontrados por NASCIMENTO Jr. *et al.*, (2005) com o veneno de *Tityus serrulatus* e FERREIRA, (2000) com o veneno do peixe *Talassophryne nattereri*.

Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico podem prevenir o edema induzido por numerosos agentes flogísticos (HO *et al.*, 1993; ERD *et al.*, 1993).

A ciclooxigenase (COX) é a enzima que catalisa a biosíntese de prostaglandinas a partir do substrato ácido araquidônico (VANE *et al.*, 1998). Os eicosanóides prostaglandinas (PGs) têm uma gama de atividades biológicas, as quais são importantes em processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a inflamação (MITCHELL *et al.*, 1995; PORTANOVA *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1998). Prostaglandina E₂ (PGE₂) é o principal produto em sítios inflamatórios e contribui para o aumento do fluxo sanguíneo local, formação de edema e sensibilização à dor (GIULIANO & WARNER, 2002).

Metabólitos do araquidonato possivelmente produzidos pela via das ciclooxigenases podem estar envolvidos na formação do edema e na indução da nocicepção pelo veneno de *P. patagoniensis*, uma vez que a Indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases foi capaz de reduzir ambas as atividades.

O envolvimento da via das ciclooxigenases na formação do edema é também encontrado nos venenos de *Cerastes gasperetti* (AL-ASMARI & ABDO, 2006), *Echis pyramidum* (AL-ASMARI, 2003), *Echis coloratus* (AL-ASMARI, 2003b), *Bothrops asper* em camundongos (CHAVES *et al.*, 1995), *Lachesis muta rhombeata* (SOARES DE MOURA *et al.*, 1998), *Bothrops insularis* (BARBOSA *et al.*, 2003), *Bothrops lanceolatus* em camundongos (LÔBO-DE-ARAÚJO *et al.*, 2000), *Bothrops jararaca* em ratos (TREBIEN & CALIXTO, 1989) e camundongos (PERALES *et al.*, 1992) e pela miotoxina I do veneno de *B. asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986b). Entretanto, outros venenos como o da lagarta *Lonomia obliqua* (BASTOS *et al.*, 2004), do escorpião *Tityus serrulatus* (NASCIMENTO Jr. *et al.*, 2005), *Bothrops asper* em ratos (CHACUR *et al.*, 2001), e *Bothrops lanceolatus* em ratos (GUIMARÃES *et al.*, 2004) não contam com a participação desta via na formação do edema.

Já o envolvimento desta via no desenvolvimento da dor foi também relatado em outros venenos animais, como *Tityus serrulatus* (NASCIMENTO Jr. *et al.*, 2005), *Lonomia obliqua* (BASTOS *et al.*, 2004) e *Bothrops jararaca* (TEIXEIRA *et al.*, 1994). No entanto, *B. asper* não conta com a participação dos metabólitos do ácido araquidônico na indução da dor (CHACUR *et al.*, 2001).

Sabe-se que existem pelo menos duas isoformas distintas da COX (COX-1 e COX-2), as quais possuem diferenças em propriedades cinéticas e estruturais (MORITA *et al.*, 1995; MURAKAMI *et al.*, 1999). COX-1 é responsável pela produção de prostaglandinas com função geral fisiológica e a COX-2 é induzida em sítios inflamatórios, mas é também expressa constitutivamente em alguns tecidos, como rim e cérebro (SAKAMOTO, 1998; JACKSON *et al.*, 2000; PORCHER *et al.*, 2002).

Tentando elucidar a participação das isoformas da COX no edema e na nocicepção, nós testamos dois inibidores seletivos da COX-2 (Etoricoxibe e Celecoxibe) e foi possível observar que nenhum dos medicamentos foi capaz de interferir nas atividades testadas. Estes resultados sugerem a não participação da COX-2 na formação do edema e no desenvolvimento da nocicepção, como acontece com o veneno de *B. asper* (CHACUR *et al.*, 2001). Entretanto, a falta de efeito destes inibidores seletivos pode indicar que o edema e a nocicepção induzidos pelo veneno de *P. patagoniensis* dependam inicialmente da ativação da COX-1, com rápida geração de prostanoídes

inflamatórios, dos quais os níveis são mantidos pela subsequente ativação da COX-2, não detectado aqui, talvez pelo longo período requerido para a indução, expressão e ação da mesma (KUJUBU *et al.*, 1991; RISTIMAKI *et al.*, 1994). Tal fato também foi visto por BARBOSA *et al.*, (2003) estudando o veneno de *Bothrops insularis*, que teve seu edema reduzido por um inibidor seletivo para COX-2, três horas após a inoculação do veneno, e por OLIVO *et al.*, (2006), que mostrou que o edema induzido por *B. jararaca* é mediado também por produtos da COX-2 e *B. asper* induz edema mediado somente por estes produtos.

Outra evidência da participação da via que envolve os metabólitos do ácido araquidônico no desenvolvimento do edema por *P. patagoniensis* também foi encontrada, uma vez que o corticosteróide Dexametasona significativamente reduziu a atividade edematogênica do veneno, assim como ocorre nos venenos de *Bothrops lanceolatus* (GUIMARÃES *et al.*, 2004), *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* (OLIVO *et al.*, 2006), *Bothrops insularis* (BARBOSA *et al.*, 2003), *Cerastes gasperetti* (AL-ASMARI & ABDO, 2006), *Echis pyramidum* (AL-ASMARI, 2003b), *Echis coloratus* (AL-ASMARI, 2003a), *Bothrops asper* em camundongos (CHAVES *et al.*, 1995) e *Lachesis muta rhombeata* (SOARES DE MOURA *et al.*, 1998).

Corticosteróides como a Dexametasona indiretamente inibem fosfolipase A₂, uma enzima criticamente envolvida na mobilização do ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana, através da liberação da lipocortina (FLOWER, 1989). Entretanto o efeito aqui observado pode também ter um envolvimento na ação direta sobre leucócitos e outros tipos celulares que inibem a liberação de citocinas (ANGELI *et al.*, 1999) ou outros mediadores inflamatórios envolvidos nas respostas induzidas pelo veneno. Este corticosteróide pode adicionalmente interferir com a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM – I) e a liberação de quimiocina KC de mastócitos, suprimindo assim, a acumulação leucocitária (TAILOR *et al.*, 1999), e também inibir a penetração dos leucócitos através das junções das membranas (KATORI *et al.*, 1990). Estes e outros efeitos da Dexametasona não mediados pela lipocortina poderiam estar contribuindo para o efeito do corticosteróide no edema induzido pelo veneno.

Nossos resultados também mostraram que a Dexametasona não foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo veneno, corroborando com os estudos de NASCIMENTO Jr. *et al.*, (2005) com o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e contrastando com TEIXEIRA *et al.*, (1994) e CHACUR *et al.*, (2001) com os venenos de *Bothrops jararaca* e *B. asper*, respectivamente.

A falta de efeito antinociceptivo da Dexametasona pode estar relacionada ao fato de que o comportamento nociceptivo é desenvolvido e observado imediatamente após a inoculação e têm curta duração. Drogas antiinflamatórias esteroidais inibem a transcrição de genes para muitas citocinas inflamatórias (BRATTSAND & LINDEN, 1996) e estimulam a produção de proteínas que inibem a fosfolipase A₂ (GOULDING & GUYRE, 1992), efeitos estes, que não ocorrem imediatamente.

Dentre os mediadores possivelmente envolvidos em vias de desenvolvimento de dor e edema, testamos também as chamadas aminas vasoativas, como a serotonina e a histamina, que exercem um papel fundamental na inflamação sendo capazes de causar dilatação de vênulas pós-capilares e conseqüentemente aumentar o fluxo sangüíneo e a permeabilidade vascular (BARNES *et al.*, 1988). Além disso, elas estão implicadas em processos nociceptivos em diversas condições inflamatórias (BESSON, 1997), inclusive em humanos (SCIBERRAS *et al.*, 1987), bem como na formação do edema (KAY, 2001), a histamina e a serotonina agem sinergicamente com a bradicinina induzindo hiperalgesia térmica (LAVICH *et al.*, 2003).

A serotonina é estocada em plaquetas e mastócitos, sendo capaz de ser liberada sob estímulo inflamatório (HOURANI & CUSACK, 1991). Esta amina está envolvida na nocicepção e inflamação através de receptores serotoninérgicos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ and 5-HT₇ (SUFKA *et al.*, 1992; DOAK & SAWYNOK, 1997; PARADA *et al.*, 2001; LAVICH *et al.*, 2003). Quando a serotonina é aplicada periféricamente, ela provoca dor em humanos e potencializa o comportamento nociceptivo em diversos modelos animais. A administração endógena estimula uma reação inflamatória que consiste de edema e eritema em humanos e camundongos (MALING *et al.*, 1974; SUFKA *et al.*, 1992).

Para avaliar a participação dessas aminas biogênicas no edema e nocicepção induzidos pelo veneno de *P. patagoniensis* nós utilizamos a

Cyproheptadina, um antagonista de receptores 5-HT_{1/2} e H₁ e a Prometazina, um antagonista somente de receptores H₁. Nossos achados revelaram que a Cyproheptadina foi capaz de inibir a atividade nociceptiva, mas não a edematogênica, enquanto que a prometazina não foi eficaz na redução de nenhuma das atividades testadas.

Estes resultados indicam que a ativação de receptores 5-HT pode ser importante para a resposta nociceptiva induzida por este veneno, mas não interfere no edema. Receptores 5-HT ativando agentes hiperalgésicos diretamente foram encontrados no veneno dos escorpiões *Lychas laevifrons* (BASU *et al.*, 1990) e *Tityus serrulatus* (NASCIMENTO Jr. *et al.*, 2005). No entanto, a serotonina parece não estar envolvida na formação do edema induzido pelo veneno, semelhante aos venenos de *Bothrops asper* em camundongos (CHAVES *et al.*, 1995) *Bothrops insularis* (BARBOSA *et al.*, 2003) e *Bothrops jararaca* em ratos (TREBIEN & CALIXTO, 1989) e camundongos (PERALES *et al.*, 1992).

Por outro lado, diversos autores têm mostrado que a serotonina desempenha um importante papel na indução do edema por diversos venenos animais, uma vez que reduz significativamente o edema induzido pelos venenos de *Bothrops lanceolatus* (GUIMARÃES *et al.*, 2004), *Echis coloratus* (ASMARI, 2003a), *Echis pyramidum* (AL-ASMARI, 2003b), *Lachesis muta rhombeata* (SOARES DE MOURA, 1998), *Tityus serrulatus* (NASCIMENTO Jr. *et al.*, 2005), *Cerastes gasperetti* (AL-ASMARI & ABDO, 2006) entre outros.

A histamina é também um importante autacóide na formação do edema por muitos agentes flogísticos. A Prometazina, um antagonista de receptores H₁, não foi efetiva na redução das atividades edematogênica e nociceptiva induzidas pelo veneno de *Philodryas patagoniensis*, sugerindo que a histamina não está envolvida na patogênese de tais eventos, bem como com o veneno de *B. jararaca* em ratos (TREBIEN & CALIXTO, 1989) e camundongos (PERALES *et al.*, 1992), *Bothrops asper* em ratos (CHACUR *et al.*, 2001) e camundongos (CHAVES *et al.*, 1995) e *Tityus serrulatus* (NASCIMENTO Jr. *et al.*, 2005). Em contrapartida, a histamina pode agir diretamente na formação do edema, como ocorre nos venenos de *Bothrops insularis* (BARBOSA *et al.*, 2003), *Lachesis muta rombheata* (SOARES DE MOURA *et al.*, 1998), *Bothrops lanceolatus* (GUIMARÃES *et al.*, 2004), *Echis coloratus* (AL-ASMARI, 2003), *Echis*

pyramidum (AL-ASMARI, 2003b), *Cerastes gasperetti* (AL-ASMARI & ABDO, 2006), *Lonomia obliqua* (BASTOS *et al.*, 2004) e em uma miotoxina (Miotoxina I) isolada do veneno de *B. asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986b).

Serotonina, histamina ou catecolaminas periféricas não desempenham um papel relevante na hiperalgesia induzida pelo veneno de *B. jararaca* como demonstrado por CHACUR *et al.*, (2001, 2002). Estes resultados contrastam com trabalhos que mostram a participação de aminas biogênicas como mediadores da hiperalgesia induzida por este veneno (ROCHA *et al.*, 2000; BONAVIDA *et al.*, 2006).

Entretanto, a histamina é considerada o principal mediador da fase inicial do aumento da permeabilidade vascular, e ocasiona a abertura de poros venulares pela ativação de receptores H₁ de células endoteliais. A ativação destes receptores resulta num aumento da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais (COLE & LEWIS, 1989). Então é possível que a histamina possa contribuir para a amplificação do edema e da nocicepção pelo aumento da síntese de prostanóides.

De fato, ao dosarmos através de fluorimetria, a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de camundongos 30 min após o contato com o veneno, foi possível observar que o mesmo induziu uma liberação de histamina concentração-dependente. Tal observação nos leva a sugerir que o veneno de *P. patagoniensis* envolve liberação de histamina no desenvolvimento de suas reações locais, no entanto, este envolvimento pode ocorrer de maneira indireta, onde a estimulação do veneno sobre mastócitos induz a liberação da amina vasoativa, que por sua vez, contribui para o aumento da permeabilidade vascular e através da ativação de células endoteliais, estimula o aumento da produção de prostaglandinas, que como visto acima, participam da patogênese do edema e da nocicepção induzidas pelo veneno. Evidências experimentais mostram que outros venenos e componentes isolados exibem também esta ação direta sobre a degranulação de mastócitos, como por exemplo, os venenos de *Naja naja* (DUTTA & NARYANAN, 1952), *Walterinnesia aegyptia*, *Echis carinatus*, *Naja nigricollis* (MOHAMED *et al.*, 1957, 1968, 1971), *Trimeresurus mucrosquamatus* (CHEN *et al.*, 1984), *Bothrops lanceolatus* (GUIMARÃES *et al.*, 2004), *Bothrops jararaca* (BONAVIDA *et al.*, 2006) e uma metaloproteinase isolada do veneno de *Naja atra* (WEI *et al.*, 2006).

Outro importante mediador envolvido nas respostas inflamatórias é o óxido nítrico (NO). Sua presença tem sido relacionada à transmissão sináptica central e periférica (MELLER *et al.*, 1994). Tal molécula gasosa é formada juntamente com a L-citrulina, a partir da L-arginina e o oxigênio molecular, pela ação de uma enzima denominada óxido nítrico sintase (NOS) (MONCADA *et al.*, 1991). Evidências experimentais têm sugerido o envolvimento desta via na transmissão nociceptiva prolongada em neurônios medulares dorsais (DICKENSON, 1995). Além disso, a mesma via é ativada durante processos inflamatórios agudos e crônicos em ratos (IALENTI *et al.*, 1993; TOMLINSON *et al.*, 1994), bem como na resposta nociceptiva em camundongos (MOORE *et al.*, 1991; MORGAN *et al.*, 1992; DAMBISYA & LEE, 1995).

Nossos resultados mostraram que o uso de L-NAME na dose de 10mg/kg potencializou a resposta nociceptiva induzida pelo veneno, entretanto ao aumentarmos a dose para 50mg/kg, a resposta nociceptiva não sofreu significativa alteração. Isto provavelmente se deve ao chamado “*dual effect*” do NO na inflamação, onde possui propriedades pró-inflamatórias (potente vasodilatador, aumenta a permeabilidade vascular, aumenta a produção de prostaglandinas inflamatórias e participa da defesa contra microrganismos) e antiinflamatórias (inibe agregação plaquetária e adesão de neutrófilos) e em pequenas quantidades é capaz de estimular a atividade da COX, enquanto que em grandes quantidades pode inibir a atividade desta enzima (RANG *et al.*, 2003). SALVEMINI *et al.*, (1995a, 1996) e TRACEY *et al.*, (1995) propuseram que inibidores da NOS podem modular a resposta inflamatória pela dupla inibição de NO e prostaglandinas, uma vez que diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a influência do NO sobre a atividade da COX. Primeiramente, a vasta maioria dos efeitos mediados pelo NO seguem da interação com o ferro ou com enzimas que contenham ferro. As enzimas COX são hemoproteínas (VAN DER OUDERAA *et al.*, 1979; PICOT *et al.*, 1994) e são, portanto potenciais alvos do NO (SALVEMINI *et al.*, 1993). Secundariamente, NO é um radical livre, o qual pode nitrosilar grupos cisteína livres (MORIGUCHI *et al.*, 1992). A COX possui diversos resíduos de cisteína livres, alguns dos quais são críticos para sua atividade (KENNEDY *et al.*, 1994). A nitrosilação de alguns grupos cisteína em particular pode ter um significativo efeito sobre a atividade da COX. É possível que o NO interfira na

transcrição da enzima COX-2 por alterar a disponibilidade de fatores de transcrição (DELA TORRE *et al.*, 1997). Finalmente, NO em locais onde a COX foi ativada, estimula a atividade da fosfolipase A₂ para liberar ácido araquidônico (FLOWER, 1988). No entanto, nenhum destes sistemas está bem estabelecido (LORNA *et al.*, 1998).

SWIERKOSZ *et al.*, (1995) propuseram que NO endógeno ou exógeno inibe a expressão da enzima COX-2 e que o exógeno também inibe sua atividade.

DONI *et al.*, (1988); KEEN *et al.*, (1990) e MATHEWS *et al.*, (1993) demonstraram que NO exibe efeito inibitório sobre prostaglandina I₂ (PGI₂) em células endoteliais. Mais interessante, NO endógeno tem um papel inibitório similar em células, mas pela adição de L-NMMA (inibidor competitivo da NOS), causou um significativo aumento na liberação de PGI₂ e aumento na expressão da COX-2.

Em adição ao efeito inibitório do NO sobre a expressão da COX-2, também foi encontrada na maioria dos casos, a redução da atividade da enzima. Por exemplo, em homogenatos de células tratadas com LPS por 12h, a adição de nitroprussiato de sódio (doador de NO) por 30 min inibiu a formação de prostanoídes, mesmo quando a atividade da COX era máxima. Similarmente, o NO inibe a atividade da COX-2 em células de Kupffer (STADLER *et al.*, 1993), condrócitos estimulados com LPS (STADLER *et al.*, 1991) e células endoteliais (KEEN *et al.*, 1990). Entretanto, outros autores têm relatado que o NO pode estimular a atividade da COX em macrófagos RAW tratados com LPS (SALVEMINI *et al.*, 1993), células musculares lisas vasculares (INOUE *et al.*, 1993), ilhotas de Langerhans (CORBETT *et al.*, 1993), neurônios hipotalâmicos (RETTORI *et al.*, 1993), musculatura lisa uterina (FRANCHI *et al.*, 1994) e condrócitos estimulados por LPS e citocinas (STADLER *et al.*, 1991). Então como podemos explicar este aparente conflito?

Talvez existam diferentes concentrações de NO em vários sistemas de ensaio usados, como o L-NMMA, por exemplo, que suprime a liberação de PGE₂ em condrócitos tratados com IL-1, quando a produção endógena de NO é baixa, mas eleva a liberação da mesma, quando a produção de NO endógeno é alta.

A influência do NO sobre a síntese de prostanóides pode, portanto, variar em diferentes tipos celulares com variações nas taxas de síntese, estado de ativação da célula e quantidade de iNOS e COX presentes (MEHTA *et al.*, 1983a,b; SCHROR *et al.*, 1988; LEVIN *et al.*, 1981; NAKABAYASHI *et al.*, 1985) ou não (MEHTA *et al.*, 1983b; FITZGERALD *et al.*, 1984; LEVIN *et al.*, 1982; DE CATERINA *et al.*, 1985; BENNETT *et al.*, 1987; BROTHERTON, 1986).

O duplo efeito modulatório do NO sobre a atividade da COX pode também estar relacionada aos níveis de outros radicais livres formados por macrófagos, tais como ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (BECKMAN *et al.*, 1990; HEINZEL *et al.*, 1992). As concentrações desses agentes podem também variar grandemente entre os tipos celulares, provendo uma explicação alternativa para as conflitantes observações descritas acima (LANDS, 1985).

Então, NO possui um duplo efeito sobre a atividade da COX (potencializando em pequenas quantidades e inibindo em grandes quantidades) e um efeito inibitório sobre a expressão da COX, entretanto, não existe uma boa explicação para a sugestão de que o NO diretamente estimula a atividade da COX (STADLER *et al.*, 1991; CORBETT *et al.*, 1993; RETTORI *et al.*, 1993; SALVEMINI *et al.*, 1993; FRANCHI *et al.*, 1994).

Como a nocicepção induzida pelo veneno de *P. patagoniensis* é principalmente mediada pelos produtos da via da COX, a ação do NO sobre a atividade desta enzima pode ter sido um ponto crucial para o comportamento nociceptivo ter sido exacerbado quando nós usamos uma baixa dose de L-NAME e sem alterações em relação ao controle, quando utilizamos uma dose maior.

Inibidores da NOS tem sido utilizados como ferramentas para estabelecer o papel do óxido nítrico (NO) no edema induzido por diferentes agentes flogísticos (ANTUNES *et al.*, 1992). Muitos dados experimentais demonstraram que o NO tem um importante papel na inflamação, no entanto, os mecanismos da contribuição do NO em tal processo ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que pode participar na fisiopatologia do edema pelo aumento da biosíntese de prostaglandinas no sítio inflamatório e pela produção de citocinas (IANARO *et al.*, 1994).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que o NO não desempenha um papel importante no edema induzido pelo veneno de *P. patagoniensis*, uma vez que o L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS não foi capaz de reduzir a atividade, semelhante aos resultados encontrados por CHACUR *et al.*, (2001) e TREBIEN & CALIXTO, (1989) que mostraram que o NO parece não estar envolvido na formação do edema pelos venenos de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca*, respectivamente.

Em contraste, tal inibidor reduziu o edema induzido pelos venenos de *Cerastes gasperetti* (AL-ASMARI & ABDO, 2006) *Bothrops lanceolatus* (FARIA *et al.*, 2001), *Lachesis muta rhombeata* (SOARES DE MOURA *et al.*, 1998) e *Bothrops insularis* (BARBOSA *et al.*, 2003).

Para avaliarmos a participação do sistema cininogênio-caliceína-cinina no edema e na nocicepção, os animais foram pré-tratados com Captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, o qual não foi capaz de interferir no edema, no entanto, a atividade nociceptiva foi potencializada em cerca de 22% por este fármaco.

Este sistema tem sido relacionado a muitos processos fisiopatológicos. As cininas reproduzem os sinais cardeais da inflamação como dor, edema e eritema, em diversas espécies animais, inclusive no homem (POLOSA, 1993; SHARMA, 1993), entretanto nossos resultados sugerem que esta via não está envolvida no desenvolvimento do edema pelo veneno de *P. patagoniensis*, contrastando com os resultados obtidos por FERREIRA, (2000) com o veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*, onde o edema foi potencializado em cerca de 80% pelo uso do Captopril.

Em relação à atividade nociceptiva, sugere-se que possa estar ocorrendo uma liberação de cininas induzida pelo veneno, resultados estes, que corroboram os dados encontrados na atividade nociceptiva do veneno de *Talassophryne nattereri* (FERREIRA, 2000). Entretanto, são necessárias maiores investigações a respeito do envolvimento de cininas na dor induzida pelo veneno aqui estudado, uma vez que cininas como a bradicinina, contribuem para a hiperalgesia induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (CHACUR *et al.*, 1999) e *Bothrops asper* (CHACUR *et al.*, 2001), ativam e sensibilizam receptores de dor (nociceptores) causando hiperalgesia inflamatória (FERREIRA *et al.*, 1972, 1978).

Grande parte dos venenos com ação local apresentam altos níveis de atividade fosfolipásica A_2 . Entretanto o veneno aqui estudado expressa diminuta ou nenhuma atividade de fosfolipases (ROCHA & FURTADO, 2007) e a ausência desta atividade pode sugerir que mecanismos peculiares estejam envolvidos no desenvolvimento dos sinais locais ocasionados por este veneno. Diante disto, resolvemos investigar mais profundamente as alterações induzidas diretamente na microcirculação, uma vez que a manutenção da integridade do tecido depende da microvasculatura e modificações no comportamento da rede microcirculatória levam a condições patológicas. As modificações vasculares associadas a processos inflamatórios, hipertensão, distúrbios de coagulação ocorrem devido a eventos que se iniciam em nível microvascular (BRAIN, 1994).

A resposta inflamatória compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos (ALBEDA & BUCK, 1990; OSBORN, 1990) e está intimamente ligada à indução e severidade dos efeitos locais desencadeados por venenos ofídicos.

Dentre os eventos vasculares estão as alterações hemodinâmicas que culminam no extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Inicialmente ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação que favorece o aumento de fluxo sanguíneo, causando calor e rubor no local da injúria. Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso caracterizadas principalmente pela contração de células endoteliais e abertura de junções entre essas células. Isto, por sua vez, leva ao aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (KOWAL-VERN *et al.*, 1997; RANKIN, 2004), o qual caracteriza o edema inflamatório (JANEWAY & TRAVERS, 1994; TEDGUI & MALLAT, 2001). As vênulas pós-capilares são o principal sítio de controle do processo inflamatório e participam ativamente dos eventos vasculares do mesmo, pois é nesses vasos que as células endoteliais irão agir, dependendo do estímulo, aumentando a permeabilidade vascular, levando a formação do edema e/ou iniciando eventos que levam a acumulação de células inflamatórias em tecidos (BRAIN, 1994).

As alterações de diâmetros de vênulas aqui observados indicam que o veneno de *P. patagoniensis* pode estar agindo na indução dos eventos iniciais do processo inflamatório agudo, o qual posteriormente culminará no aumento

da permeabilidade vascular, formação do edema e acúmulo de células no local da inflamação. Tal perfil de diâmetros de vênulas aqui relatado foi também observado por FARSKY *et al.*, (1999) com o veneno de *B. jararaca* aplicado tópicamente sobre a fáscia espermática de ratos e é tipicamente encontrado em inflamações agudas, uma vez que, a vasodilatação ocorre minutos após uma injúria aguda, a qual primariamente envolve arteríolas, capilares e vênulas e reduz a velocidade hidrodinâmica, sendo assim, pequenas alterações no diâmetro dos vasos podem levar a significativas reduções de velocidade e forma do fluxo sanguíneo, facilitando assim a migração celular (BRAIN, 1994; JANEWAY *et al.*, 2002).

LOMONTE *et al.*, (1994) em estudos com o veneno de *Bothrops asper*, encontraram concomitante com contrações musculares, o mesmo perfil de diâmetro de vênulas aqui observado, onde a dose mais baixa resultou numa proeminente vasodilatação e ao aumentarmos a dose ocorreu uma vasoconstrição transitória seguida por vasodilatação relevante, e respostas semelhantes também foram encontradas em estudos com veneno do Crotalídeo asiático *Trimeresurus flavoviridis* (OHSAKA *et al.*, 1979).

Sabe-se que vênulas pós capilares contêm uma pequena camada de células musculares lisas, se comparadas com arteríolas, mas estas estão aderidas a uma camada descontínua de pericitos perivasculares, que são células presentes na parede vascular, embebidas na membrana basal, onde entram em contato focal com o endotélio vascular (ARMULIK *et al.*, 2005). Estas células contêm actina e miosina, e, portanto, sob a ação do veneno, poderiam também estar envolvidas nas modificações de diâmetros venulares (BRAIN, 1994). Isto também pode sugerir que os pericitos tenham um papel modulatório nas alterações de permeabilidade microvascular (BRAIN, 1994).

As alterações hemodinâmicas ocasionadas nos eventos vasculares da inflamação propiciam o contato dos leucócitos com as células endoteliais. Inicialmente os leucócitos rolam sobre o endotélio e em seguida aderem-se firmemente à superfície vascular. Posteriormente, migram em direção ao foco inflamatório. Estes eventos envolvem a expressão de uma grande variedade de moléculas de adesão, entre elas as selectinas, as integrinas e seus ligantes (família das Imunoglobulinas) (SPRINGER, 1995; RANKIN, 2004).

Este processo que permite o extravasamento de leucócitos em áreas de inflamação foi esclarecido em nível molecular; onde os leucócitos circulantes podem se ligar as selectinas expressas pela ativação do endotélio vascular. Tal ligação com as selectinas faz com que os leucócitos desacelerem seu movimento (redução do movimento de rolling) sobre o endotélio. Com isso, os leucócitos podem ser ativados por quimiorreceptores aumentando a afinidade de seus receptores de adesão (integrina β_2) para os ligantes do endotélio ativado (aumentando a adesão). Um sinal quimiotático induz os leucócitos a se “espremerem” entre as células endoteliais do vaso e migrarem para o centro de inflamação (BRAIN, 1994; JANEWAY *et al.*, 2002).

A aplicação tópica do veneno de *P. patagoniensis* em vênulas pós-capilares provocou alterações nas interações leucócito-endotélio determinadas pela redução do número de leucócitos em rolling e aumento dos leucócitos aderidos ao endotélio, o que provavelmente indica o recrutamento celular para o foco inflamatório. O comportamento inicial de rolling proporciona uma aderência mais firme ao endotélio e a relação inversa entre adesão e rolling é um indicativo de que quando um número ótimo de leucócitos estacionários prevalece, a redução no número de células em rolling pode ser observada (DAHLÉN *et al.*, 1981; FIRREL & LIPOWSKY, 1989; FARSKY *et al.*, 1995).

A cinética dos eventos após a injeção subcutânea do veneno de *P. patagoniensis* na bolsa escrotal de camundongos nos mostra que em uma e duas horas ocorre um significativo decréscimo no número de leucócitos em rolling e aumento das células aderidas à parede do vaso, bem como de células migradas em relação aos animais do grupo tratado com salina. Adicionalmente, em 24h os leucócitos em rolling não diferem dos valores do controle, no entanto, as células aderidas e migradas ainda estavam aumentadas. Este quadro é característico de interações leucócito-endotélio que ocorrem em tecido inflamados e corroboram os dados obtidos por FARSKY *et al.*, (1999) após a aplicação tópica do veneno de *B. jararaca* na fáscia espermática de ratos e por ZYCHAR *et al.*, (2008) em duas e 24h após a inoculação subcutânea do veneno de *B. jararaca* na bolsa escrotal de camundongos.

Dessa forma podemos sugerir que o veneno estudado desencadeia um inicial e relevante evento que leva a mobilização de leucócitos, o qual pode ser

mediado pela interferência do veneno na expressão de moléculas de adesão por leucócitos e células endoteliais e este efeito pode ser indireto, provavelmente pela liberação de mediadores inflamatórios, semelhante à ação do veneno de *Bothrops jararaca* (ZAMUNER & TEIXEIRA, 2002). Tais interações contribuem para a acumulação local de células pelo veneno durante o desenvolvimento da reação inflamatória (BÚRIGO *et al.*, 1996; FARSKY *et al.*, 1997), corroborando os estudos realizados com o veneno de *B. jararaca* em ratos (FARSKY *et al.*, 1999), veneno de *Bothrops asper* e uma miotoxina isolada do mesmo (miotoxina II) (LOMONTE *et al.*, 1993), veneno do peixe *Talassophryne nattereri* (FERREIRA, 2000), entre outros.

Os efeitos locais severos ocasionados por venenos, são caracterizados principalmente por uma aguda reação inflamatória com largo influxo celular (LOMONTE *et al.*, 1993; FLORES *et al.*, 1993; LOMONTE, 1994; FARSKY *et al.*, 1997; BARROS *et al.*, 1998; PETRICEVICH *et al.*, 2000; ZAMUNER *et al.*, 2001). Sabendo que o veneno de *P. patagoniensis* induz alterações microcirculatórias que indicam recrutamento celular, inicial desenvolvimento de uma inflamação aguda e que os leucócitos desempenham um papel central na defesa do organismo contra agentes “ofensivos”, através de sua capacidade de migrar em direção ao foco inflamatório, produzir uma variedade de mediadores inflamatórios, bem como apresentar antígenos, fagocitar e destruir microorganismos (ZHENG *et al.*, 1999), resolvemos investigar a capacidade do veneno de induzir influxo celular para o local da inoculação.

A injeção intra-peritoneal do veneno de *P. patagoniensis* induziu um significativo influxo leucocitário de longa duração. Os neutrófilos foram as células que predominaram durante os primeiros estágios (3-24h), enquanto células mononucleares apareceram mais tardiamente (48h), corroborando estudos realizados com diversos venenos botrópicos, os quais têm sido mostrados como fortes indutores de acumulação leucocitária no sítio do dano tecidual (FLORES *et al.*, 1993; ACOSTA DE PÉREZ *et al.*, 1996; FARSKY *et al.*, 1997).

O tipo de leucócito que migra varia com a duração da resposta inflamatória e com o tipo de estímulo. Na maioria dos tipos de inflamação aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras seis a 24 horas, sendo substituídos pelos monócitos depois de 24 a 48 horas. Existem

várias razões para esta sequência: os neutrófilos são mais numerosos no sangue, respondem mais rapidamente às quimiocinas e podem se ligar mais firmemente às moléculas de adesão que são rapidamente induzidas nas células endoteliais, como as P e E-selectinas. Além disso, após entrarem nos tecidos, os neutrófilos têm uma sobrevivência curta; sofrem apoptose e desaparecem depois de 24 a 48 horas, enquanto os monócitos sobrevivem por mais tempo (BRAIN, 1994; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A menor dose de veneno (0,1µg) utilizada sobre a microcirculação induziu microsangramentos originados preferencialmente em capilares e vênulas pós-capilares. O tempo de formação das lesões foi rápido (15 min), por outro lado quando utilizamos a maior dose (0,5µg), as lesões hemorrágicas foram contínuas e intensas espalhadas por todo o tecido e não mais em focos. Tais lesões foram caracterizadas como “explosivas” e estas observações podem ser comparadas aos estudos realizados por FARSKY *et al.*, (1999) com o veneno de *Bothrops jararaca*, LOMONTE *et al.*, (1994) com o veneno de *Bothrops asper* e OHSAKA *et al.*, (1979) com o veneno de *Trimeresurus flavoridis*, mostrando o potencial hemorrágico destes venenos. Segundo LOMONTE, (1994) este caráter explosivo do processo de extravasamento de eritrócitos está em concordância com o conceito de hemorragia *per rhexis*, observada por ele com o veneno de *B. asper*.

Outro aspecto observado nos envenenamentos por serpentes é muito importante em sua patogênese é a necrose. Praticamente todos os tecidos moles podem ser necrosados, como pele, músculos, vasos sanguíneos, tendões, cartilagens, entre outros (GUTIÉRREZ & CHAVES, 1980; GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000). Neste complexo fenômeno, há a intervenção de múltiplos fatores, bem como os mais diversos mecanismos farmacológicos (BOLAÑOS, 1984; BRAZIL, 1984; GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003).

A mionecrose pode ser causada devido à ação direta de miotoxinas dos venenos sobre a membrana plasmática das células musculares, e indireta devido ao desenvolvimento de isquemia, resultante de drásticas alterações causadas por tais venenos (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000; MACKESSY, 2002). As miotoxinas são um grupo de componentes responsáveis pelo dano muscular, sendo estes componentes

denominados “miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂”. Entretanto, em algumas pode estar ausente o efeito enzimático (MANDELBAUM & ASSAKURA, 1988; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; GUTIÉRREZ *et al.*, 1989; SELISTRE *et al.*, 1990; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991).

Pouco se conhece sobre as miotoxinas entre os venenos de colubrídeos, e na maioria dos estudos elas têm sido somente parcialmente caracterizadas. Os efeitos mionecróticos já foram descritos para as espécies *Thamnophis elegans vagrans* (JANSEN, 1987), *Boiga irregularis* (WEINSTEIN *et al.*, 1991) e *Philodryas olfersii*, da qual foi isolada uma miotoxina (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1996, 1998).

Devido a pouca informação disponível sobre a importância da miotoxidade no modo de ação das secreções de colubrídeos, nós investigamos através de análises histológicas as lesões induzidas pelo veneno de *Philodryas patagoniensis* em músculo gastrocnêmio de camundongos. As análises mostraram que o veneno foi capaz de induzir alterações morfológicas: hemorragia interfibrilar, edema, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e necrose de fibras (mionecrose dos tipos coagulativa e miolítica).

HOMMA & TU, (1971) classificaram a necrose de fibras musculares produzidas por 37 venenos em três tipos, baseados em características histológicas: (1) **tipo coagulativa**: diagnosticada tipicamente por células, nas quais o material interfibrilar tem uma aparência hialina com distribuição homogênea; (2) **tipo miolítica**: caracterizada por apresentar fibras, onde o material interfibrilar está aparentemente agrupado e alternando-se com espaços vazios no citoplasma; (3) **tipo misto**: diagnosticada por apresentar características de ambos os tipos citados anteriormente.

Estudos sobre a atividade miotóxica deste veneno avaliada *in vitro*, mostram algumas discrepâncias no que diz respeito à liberação da enzima intramuscular creatino-kinase (CK), a qual é frequentemente utilizada como marcador de lesão muscular. PEICHOTO *et al.*, (2004), mostraram que 40µg do veneno foi capaz de induzir um aumento do nível sérico de CK, o qual foi significativo a partir de três horas após a inoculação e atingiu seus maiores valores entre 10 e 16 horas após. Em contraste, ROCHA & FURTADO, (2007) não detectaram diferenças significativas entre a liberação de CK pelo veneno (30µg) e pelo grupo controle, no entanto, ambos observaram lesões

musculares *in vivo*. Segundo MEBS *et al.*, (1978) a dosagem dos níveis séricos de creatino-kinase é um método clínico estabelecido para a estimativa de doenças envolvendo células musculares, isto é, danos celulares e/ou mionecrose. Os efeitos de venenos sobre os níveis de creatino-kinase são extensivamente investigados, utilizando tanto venenos brutos quanto toxinas puras e quase sempre os resultados mostram que há uma boa correlação entre o aumento dos níveis séricos de creatino-kinase e destruição tecidual, quando se utilizam toxinas puras. Quanto aos venenos brutos, uma interpretação mais cuidadosa dos resultados é necessária.

Nossa avaliação histológica dos efeitos miotóxicos corrobora os estudos realizados por PEICHOTO *et al.*, (2004) e ROCHA & FURTADO, (2007), no que diz respeito às alterações induzidas *in vivo*. Lesões semelhantes também foram encontradas para o veneno de *Philodryas olfersii* (ACOSTA DE PÉREZ *et al.*, 2003; ROCHA & FURTADO, 2007). Tais alterações são também descritas para venenos de espécies do gênero *Bothrops*, mas nesses casos, a intensidade e os intervalos de tempo nos quais as lesões são vistas se diferenciam daqueles aqui mostrados, podendo indicar mecanismos diferentes na indução da mionecrose (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; TEIBLER *et al.*, 2001). As modificações morfológicas em tecido muscular aqui descritas foram também induzidas pelos venenos de espécies dos gêneros *Agkistrodon*, *Crotalus*, *Trimeresurus*, *Bitis*, *Vipera*, *Naja*, *Ophiophagus*, *Bungarus* e *Dendroaspis* (HOMMA & TU, 1971).

Durante as primeiras horas após o desenvolvimento da lesão muscular, não ocorre degradação significativa de actina e miosina (GUTIÉRREZ *et al.*, 1990; FAIZ *et al.*, 1995; HARRIS *et al.*, 2003). Em intervalos de tempo maiores, especialmente após seis horas pode ocorrer uma ampla degradação de actina, miosina e outras proteínas miofibrilares, associadas com a presença de um abundante infiltrado inflamatório de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1990).

ISHIURA *et al.*, (1984) estudando a mionecrose induzida por Plasmocid, uma droga antimalárica, propôs um mecanismo de degradação miofibrilar baseado em dois passos. (1) Durante as primeiras 12h, existe uma limitada hidrólise de componentes específicos, especialmente a alfa-actinina, embora a organização estrutural das miofibrilas tenha sido extensivamente afetada. (2)

Após 12h, células do infiltrado inflamatório acumulado e cathepsinas lisossomais derivadas destas células seriam os responsáveis por uma maior degradação de proteínas miofibrilares. Assim como visto por GUTIÉRREZ *et al.* (1986) com o veneno de *B. asper*, nossos resultados com o veneno de *P. patagoniensis* estão de acordo com este mecanismo, uma vez que estudos eletroforéticos mostraram pouca degradação miofibrilar antes das seis horas, embora os miofilamentos tenham sido estruturalmente afetados neste período, como visto nas análises histológicas. Por outro lado, uma queda no teor de proteínas não colágenas foi observado em seis e 24h juntamente com a evidência de uma maior degradação protéica em eletroforese. No entanto, em 24h as alterações morfológicas vistas nas análises histológicas, já não eram mais tão intensas, mostrando indícios de um inicial processo de regeneração.

Desta forma podemos apontar que a inicial desorganização e agregação dos miofilamentos não estão relacionadas à degradação protéica generalizada, mas provavelmente a limitada alteração de componentes estruturalmente relevantes pela ação do veneno, o que consequentemente resultou na perda da organização miofibrilar sem uma ampla degradação protéica, mostrando que o veneno é capaz de causar proteólise de componentes musculares, porém de forma limitada. Por outro lado, a maior degradação de proteínas miofibrilares em 24h está correlacionada com a presença do infiltrado inflamatório, o qual provavelmente esta desempenhando o papel de degradação final e remoção do material necrótico (debris), um processo essencial para a regeneração do tecido (GROUNDS, 1991; TIDBALL, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Além dos componentes denominados miotoxinas, os venenos ofídicos contém proteases que podem participar do desenvolvimento da mionecrose. As metaloproteinases são as principais envolvidas nos danos locais, uma vez que além da hemorragia, são capazes de ocasionar edema (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995), formação de bolhas e demonecrose (RUCAVADO *et al.*, 1998). Além das metaloproteinases, os venenos contém também serinoproteinases, as quais afetam a cascata de coagulação, por especialmente ativarem componentes sanguíneos envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária, ou por degradação proteolítica (SERRANO & MAROUN, 2005). As serinoproteinases não são caracterizadas por participarem dos efeitos locais

dos venenos, no entanto, podem participar indiretamente contribuindo para a hemorragia ou ativando metaloproteinases de matriz extracelular, que por sua vez, causam dano tecidual (NAGASE & WOESSNER, 1999; SARAVIA-OTTEN *et al.*, 2004). Diante da importância de tais enzimas nos danos locais e da baixa ou inexistente atividade fosfolipásica deste veneno, resolvemos investigar a participação das proteinases na mionecrose induzida por *P. patagoniensis*.

A mionecrose provocada pelo veneno aqui estudado foi abolida quando o veneno foi previamente incubado com 1-10 phenantrolina e PMSF, sugerindo a participação de metalo e serinoproteinases na patogênese da mionecrose.

Metalos e serinoproteinases são capazes de causar fibrose e perda de tecido após envenenamento por serpentes (GUTIERREZ *et al.*, 1995), e tal fato permitiu a formulação da hipótese de que a inibição de tais componentes poderia reduzir significativamente os danos teciduais locais (ESCALANTE *et al.*, 2000).

Estudos prévios sobre a habilidade do EDTA na neutralização de patologias locais têm demonstrado que este e outros compostos têm potencial terapêutico no tratamento dos acidentes com serpentes, uma vez que o CaNa_2EDTA tem mínima toxicidade quando injetado intramuscularmente ou subcutaneamente, induzindo somente leve edema (LEON *et al.*, 1998).

Um recente estudo demonstrou que a mistura de CaNa_2EDTA com uma fração do soro de *B. asper* (antídoto natural) e o corrente antiveneno polivalente resultou em uma inibição altamente efetiva da hemorragia local e sistêmica provocada pelo envenenamento por *B. asper* (BORKOW *et al.*, 1997). A incubação de CaNa_2EDTA com o veneno de *B. asper* inibiu as atividades hemorrágica e dermonecrótica, porém não foi capaz de reduzir a formação de edema e a miotoxicidade (LEON *et al.*, 1998).

Estes estudos corroboram com nossos resultados, uma vez que quando o veneno de *Philodryas patagoniensis* foi incubado com EDTA, somente a hemorragia foi inibida completamente, permanecendo reduzida mionecrose, edema e infiltrado inflamatório, corroborando os dados obtidos por PEICHOTO *et al.*, (2004) que encontraram redução parcial da mionecrose induzida pelo veneno de *P. patagoniensis* do nordeste da Argentina, quando incubada com EDTA.

A diferença no modo de ação dos três inibidores utilizados poderia explicar o fato de que apenas dois deles foram eficazes na inibição completa da mionecrose: O EDTA age como um agente quelante, formando complexos não estáveis através de ligações reversíveis no seqüestro dos íons metálicos, além de formar complexos fortes especialmente com Mn(II), Cu(II), Fe(III), e Co(III), os quais não são os principais íons presentes na estrutura das metaloproteinases de venenos de serpentes (HOLLEMAN & WIBERG, 2001), enquanto que o PMSF tem a capacidade de ligar-se a um aminoácido essencial das serinoproteinases, que é a serina do sítio catalítico, provocando uma ligação irreversível e inativando-a, e a ¹⁻¹⁰phenantrolina interage especificamente no sítio catalítico da enzima, que contém o íon acoplado, inativando-o irreversivelmente (HOLLEMAN & WIBERG, 2001).

Os resultados aqui obtidos nos mostram que o veneno de *Philodryas patagoniensis* é capaz de induzir edema proeminente, dor dependente de prostaglandinas e serotonina, alterações inflamatórias em nível microvascular caracterizadas por vasodilatação e modificação em interações leucócito-endotélio, bem como mionecrose, a qual conta com a participação de serino e metaloproteinases em sua patogênese.

Tais dados nos remetem a parte da cascata de eventos que ocorrem após o contato do veneno com o tecido e projetam contribuições relevantes para a Saúde Pública, pois um mais profundo entendimento do mecanismo de ação local deste veneno, pode contribuir tanto para o diagnóstico diferencial, quanto para maior compreensão do ofidismo, promovendo a otimização dos tratamentos clínicos dos acidentados.

Os registros recentes apontam para uma nova visão sobre a importância médica dos representantes da família Colubridae, fazendo-se necessária e urgente a realização de pesquisas relacionadas à composição dos seus venenos, ações tóxicas e enzimáticas, seus potenciais imunogênicos, características antigênicas, além de estudos de soro-neutralização. O interesse no conhecimento dos venenos de serpentes da família Colubridae envolve desde aspectos atuais de pesquisas voltadas para novas toxinas, até a utilização destas como ferramentas nas investigações de mecanismos fisiopatológicos, assim como na área biotecnológica.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- ✓ O veneno de *Philodryas patagoniensis* possui aproximadamente 70% de proteínas;
- ✓ A análise eletroforética revelou que o veneno possui maior densidade nas bandas protéicas nas faixas de alto e médio peso molecular e possui quatro bandas majoritárias nas faixas de 62, 48, 35 e 30 KDa;
- ✓ O veneno é capaz de induzir edema dose-dependente, com máxima atividade 30 min após a inoculação, tendo este, a participação de metaloproteinases e sendo mediado pela via das Ciclooxygenases (prostaglandinas);
- ✓ A atividade nociceptiva induzida pelo veneno mostrou-se de maneira dose-dependente, não conta com a participação de metaloproteinases, a hemorragia não interfere em tal atividade e esta é mediada por receptores opióides, pela serotonina, prostaglandinas e pode ainda ter o envolvimento de cininas;
- ✓ O veneno induz influxo celular de longa duração para o local da inoculação, sendo este predominantemente polimorfonuclear;
- ✓ Induz alterações na microcirculação caracterizadas por mudanças nas interações leucócito-endotélio (aumento da adesão; redução de rolling), vasodilatação e migração celular característicos de um perfil inflamatório agudo;
- ✓ Induz microsangramentos caracterizados como explosivos na microcirculação 15 min após a exposição ao veneno;
- ✓ Produz mionecrose de músculo esquelético, a qual conta com a participação de metalo e serinoproteinases;
- ✓ Induz leve degradação de proteínas musculares não-colágenas e miofibrilares totais;
- ✓ É capaz de degranular mastócitos *in vitro* causando liberação de histamina concentração-dependente.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. & LICHTMAN, A.H. 2005. **Imunologia Celular e Molecular**. Tradução da 5ª edição. Elsevier.
- ACOSTA DE PÉREZ, O.C., KOSCINCZUK, P., GUTIÉRREZ, J.M., 1996. Actividades hemorrágica y coagulante del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, **30(4)**: 401–405.
- ACOSTA DE PÉREZ, O.; VILA, L.L.; PEICHOTO, M.E.; MARUÑAK, S.; RUÍZ, R.; TEIBLER, P.; GAY, C.; REY, L. 2003a. Edematogenic and myotoxic activities of the Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* from the north-east region of Argentina. **Biocell** **27(3)**: 363-370.
- ACOSTA DE PÉREZ, O.; LEIVA, L. C.; PEICHOTO, M. E. MARUÑAK, S.; TEIBLER, P; REY, L. 2003b. Hemorrhagic activity of the Duvernoy's glands secretion of the Xenodontine Colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. **Toxicon**, **41**: 1007-1012.
- AL-ASMARI AK. 2003a. Pharmacological characterization of the rat's paw oedema induced by *Echis coloratus* venom. **On line J. Biol. Sci.**, **3**: 309-19.
- AL-ASMARI AK. 2003b. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Echis pyramidum* venom. **On line J. Biol. Sci.**, **3**: 824-33.
- AL-ASMARI, K. & ABDO, N.M. 2006. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by *Cerastes gasperetti* (*cerastes*) venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, **12(3)**: 400-417.
- ALBEDA, S.M. & BUCK, C.A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB (Fed. Am. Soc. Biol. J.)**, **4**: 286-290.
- ALBOLEA, A.B.P.; SALOMÃO, M.G. and ALMEIDA-SANTOS, S.M. 2000. Why do nonpoisonous snakes cause snakebite? **Toxicon** **38**: 567-568.
- AMARAL, A. 1921. Últimos trabalhos inéditos de J. Florencio Gomes: Duas novas espécies de Colubrídeos opisthoglyphos brasileiros (*Philodryas oligolepis* e *Apostolepis longicaudata*). **Ann. Paul. Med. E Cir. IX: (7 e 8)**:157-221.
- AMARAL, A.1933. Mecanismo e gênero de alimentação das serpentes do Brasil. **Bol. Mus. Biol. São Paulo** **1**: 2-4.
- AMARAL, A. 1978. **Serpentes do Brasil: Iconografia ilustrada**. 2 ed. São Paulo: Melhoramentos/Universidade de São Paulo. P.246.

- ANDRIÃO-ESCRASO, S. H.; SAMPAIO, S.V.; CUNHA, O. A. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. 1997. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) venom. **Toxicon** **35** (7): 1043-1052.
- ANGELI A., MASERA RG., SARTORI ML., FORTUNATI N., RACCA S., DOVIO A., STAURENGHI A., FRAIRIA R. 1999. Modulation by cytokines of glucocorticoid action. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **876**: 210-20.
- ANTUNES, E.; GIRALDELO, C.M.M.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. 1992. Effects of NG-monomethyl-L-arginine and its D-enantiomer on rat paw oedema. In: **Biology of Nitric Oxide**. Ed. Hibbs, Marleta and Moncada. p.264-266.
- ARAÚJO, F.A.A.; SANTALÚCIA, M. e CABRAL, R.F. 2003. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD, V.JR (Ed.). **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 6-12.
- ARAÚJO, M.E. & SANTOS, A.C.M.C.A. 1997. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **30**(6): 517-519.
- ARMULIK, A.; ABRAMSSON, A.; BETSHOLTZ, C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. **Circ.Res.**, **97**(6): 512-523.
- ASSAKURA, M.T.; SALOMÃO, M.G.; PUORTO, G. and MANDELBAUM, F.R. 1992. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon** **30**(4): 427-438.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL A.P. and MANDELBAUM, F.R. 1994. Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon** **32**(7): 819-831.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon** **23**: 631-636.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. 1987. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomations in human causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon** **11**: 1163-1168.
- BAEZ, S. 1973. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by *in vivo* microscopy. **Microvasc. Res.** **5**: 384-394.
- BAILEY, G.S.; AL-JOUFI, A.; RAWAT, S.; SMITH, D.C. 1991. Neutralization of kinin releasing enzymes of crotalid venoms by monoespecific and polyespecific antivenoms. **Toxicon** **29**: 777-781.

- BARBARINI, C.C. 1998. **Aspectos Osteológicos e Histológicos do Aparelho de Veneno dos Ofídios (Reptilia-Squamata-Ophidia)**. Monografia, Departamento de Biologia da Universidade Cidade de São Paulo, São Paulo, 55p.
- BARBOSA, A.M.; DO AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. 2003. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** **42**: 515-523.
- BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma. **Pharmacol. Rev.**, **40**: 49-848.
- BARRAVIERA, B., PEREIRA, M. C. P. 1999. Acidentes por serpentes do gênero "*Bothrops*". In: BARRAVIERA, B. **Venenos- Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB, 411p.
- BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKY, A.; HANSON, L. ; MEIRA, D. 1995. Acute -phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**, **1(1)**: 1-10.
- BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. 1998. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediat. Inflamm.**, **7**: 339-346.
- BASTOS, L.C.; VEIGA, A.B.G.; GUIMARÃES, J.A.; TONUSSI, C.R. 2004. Nociceptive and edematogênica responses elicited by a crude bristle extract of *Lonomia oblique* caterpillars. **Toxicon** **43**: 273-278.
- BASU, A., GOMES, A., GOMES, A., DASGUPTA, S.C., LAHIRI, S.C. 1990. Histamine, 5-HT and hyaluronidase in the venom of the scorpion *Lyctas laevifrons* (Pock.). **Indian J. Med. Res.** **92**: 371-373.
- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A. & FREEMAN, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **87**: 1620-1624.
- BEIRAN, D. & CURRIE, G. 1967. Snake bite due to *Thelotornis kirtlandii*. **Centr. Afri. J. Med.**, **13**: 137.
- BENNETT, A., MELHUISH, P.B. & STAMFORD, I.F. 1987. Nitrates do not affect prostacyclin formation by rat arteries: this is unrelated to increased vascular prostacyclin formation with age. **J. Pharm. Pharmacol.**, **38**: 1039-1041.

- BERGENDORFF, A. & UVNÄS, B. 1972. Storage of 5-hydroxytryptamine in rat mast cells: evidence for an ionic binding to carboxyl groups in a granular-protein complex. **Acta Physiol. Scand.** 84,320.
- BESSON, J. M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain.1997. **Drugs.** 53 (Suppl. 2): 1-9.
- BJARNASON, J.B.; BARISH, A.; DIRENZO, G.S.; CAMPBELL, R.; FOX, J.W. 1983. Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.** 258, 12566-12573.
- BJARNASON, J. & FOX, J.W. 1988/89. Hemorrhagic Toxins Snake Venoms. **J. Toxicol. Toxin Reviews** 7: 121-209.
- BJARNASON, J. & FOX, J.W. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacological Therapeutic** 62: 325-372.
- BOLAÑOS, R. 1984. 2. Veneno de Serpientes. Estructura química y actividades biológicas y farmacológicas. In: Universidad de Costa Rica (Ed.). **Serpientes, venenos y ofidismo en Centro América.** San José, p. 45-81.
- BONAVITA, A.G.C.; COSTA, A.S.; PIRES, A.L.A; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; PERALES, J.; CORDEIRO, R.S.B.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M.R. 2006. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon** 47: 885-893.
- BONTA, I.L.; VARGAFITG, B.B.; BÖHM, G.M. 1979. Snake venoms as an experimental tool to induce and study models of microvessel damage. In: **Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52, Snake Venoms** (LEE, C.Y.,Ed), pp. 629-683. Berlin, Springer-Verlag.
- BOQUET, P. & SAINT-GIRONS, H. 1972. Etude immunologique des glandes salivaires du vestibule bucal de quelques colubridae opisthoglyphes. **Toxicon**, 10: 635-644.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. 1993. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon** 31: 1137-1150.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. 1997. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. **Toxicon** 35: 865–877.
- BRAIN, S.D. 1994. **Immunopharmacology of the Microcirculation.** San Diego, Academic Press, 239p.
- BRATTSAND, R. & LINDEN, M. 1996. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 10 (Suppl. 2): 81-90.

- BROADERS, M. & RYAN, M.F. 1997. Enzymatic properties of the Duvernoy's secretion of Blanding's tree snake (*Boiga blandingi*) and of the mangrove snake (*Boiga dendrophila*). **Toxicon** **35**: 1143-1148.
- BROTHERTON, A.F.A. 1986. Induction of prostacyclin biosynthesis is closely associated with increased guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate accumulation in cultured human endothelium. **J. Clin. Invest.**, **78**: 1253-1260.
- BÚRIGO, A.C.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. 1996. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.** **48**: 106-111.
- CABRAL, G. A. 2005. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sciences** **77**: 1669-1710.
- CADLE, J.E. 1983. Problems and approaches in the evolutionary history of venomous snakes. **Mem. Inst. Butantan** **46**: 255-274.
- CADLE, J.E. 1988. **Phylogenetics Relationships among Advanced Snakes: A molecular perspective**. University California, Berkeley, Publ. Zool. **199**: 1-77.
- CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICKZ, C.; MONLÉON, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUAREZ, P.; SANZ, L. 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, **45**: 1063-1074.
- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. 1989. **The Venomous Reptiles of Latin America**. 6 ed., Ithaca and London, Comstock, 425 pp.
- CARDOSO, J.L.C.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; SANTORO, M.L.; CHUDZINSKI, A.M.; CASTRO, S.C.B.; KAMIGUTI, A.S.; KELEN, E.M.A.; HIRATA, M.H.; MIRANDOLA, R.M.S.; THEAKSTON, R.D.G.; WARREL, D. A. 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quart. J. Med.** **86**, 315-325.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. HADDAD, V.J. 2003. **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 6-12.
- CARR, D.B. & GOUDAS, L.C. 1999. Acute pain. **Lancet.**, **353**: 2051-2058.
- CARVALHO, M.A. & NOGUEIRA, F. 1998. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. **Cad. Saúde Publ.** **14**: 753-763.

- CECHIN, S. 1999. **História Natural de uma Comunidade de Serpentes na região da depressão central (Santa Maria), Rio Grandre do Sul, Brasil.** Tese Doutorado, Instituto de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.
- CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. 1999. Participação da bradicinina na hiperalgesia induzida pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*. **XIV Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambu, Brasil.
- CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. 2001. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon** **39**: 1173-1181.
- CHACUR, M.; PICOLO, G.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. 2002. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** **40**: 1047-1051.
- CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, **33**: 31-39.
- CHEN, I.J.; CHIU, H.F.; HUANG, H.T.; TENG, M.C. 1984. Edema formation and degranulation os mast cells by *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon**, **22**: 17-28.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V. WHITE, J. 1991. Snake venoms variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** **29 (11)**: 1279-1303.
- CHRISTENSEN, P.A. 1968. The Venoms of Central and South African Snakes. In: BUECHERL, W.; BUCKLEY, E.E. and DEULOFEU, V. (Eds.). **Venomous Animals and Their Venoms, v.1**, New York, Acedemic Press, pp. 437-461.
- COBERLY, W.A. & PRICE, J.A. 2005. Analysis of histamine release assays using the Bootstrap. **J. Immunological Methods**, **296**: 103-114.
- COLE, O.F., LEWIS, G.P., 1989. Prostanoid production by rat aortic endothelial cells by bradykinin and histamine. **Eur. J. Pharmacol.** **169**, 307–312.
- COOK, D.G. 1984. A case of envenomation by the Neotropical Colubrid Snake *Stenorrhina freminvillei*. **Toxicon**, **22(5)**: 823-827.
- CORBETT, J.A., KWON, G., TURK, J. & MCDANIEL, M.L. 1993. IL- 1b induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. **Biochemistry**, **32**: 13767 - 13770.

- CUPO, P.; MELLO DE OLIVEIRA, J.A.; HERING, S.E.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. 1992. Miopathology in human striate muscle in *Crotalus* envenomation: a clinical and histoenzymologic study. In: (WEGMANN, R.J. & WEGMANN, M.A. eds) **Recent Advances in Cellular and Molecular Biology** vol.5, p.45-50. Peeters Press, Leuven, Belgium.
- DAHLÉN, S.E.; BJÖRK, J.; HEDQVIST, P.; ARFORS, K.E.; HAMMARSTROM, S.; LUNDGREN, J.A.; SAMUELSSON, B. 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**: 3887-3891.
- DAMBISYA, Y.M. & LEE, T. 1995. Effects L-NG-nitro arginine methyl ester (L-NAME), L-NG-monomethyl arginine (L-NMMA) and L-arginine on the antinociceptive effects of morphine in mice. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, **17**: 577-582.
- DATTA, G. & TU, A. T. 1993. Toxicology and Biochemistry of Colubridae Venom. **J. Toxicol. - Toxin Reviews** **12(1)**: 63-89.
- DE CATERINA, R., DORSO, C.R., TACK-GOLDMAN, K. & WEKSLER, B.B. 1985. Nitrates and endothelial prostacyclin production: studies in vitro. **Circulation**, **71**: 176-182.
- DELA TORRE, A., SCHROEDER, R.A. & KUO, P.C. 1997. Alteration of NF-kappa B P50 binding kinetics by S-nitrosylation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **238**: 703 - 706.
- DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. 1955. Proteolytic activities of snake venoms. **J. Biol. Chem.** **216**: 283-288.
- DIAZ, F.; NAVARRETE, L.F.; PEFAUR, J.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. 2004. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **46(5)**: 287-290.
- DI BERNARDO, M. 1999. **História Natural de uma comunidade de serpentes da borda oriental do planalto das araucárias, Rio Grande do Sul, Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- DICKENSON, A. 1995. Central acute pain mechanisms. **Ann. Med.**, **27**: 223-227.
- DOAK, G. J. and SAWYNOK, J. 1997. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience.**, **80 (3)**: 939-949.
- DONI, M.G., WHITTLE, B.J.R., PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. 1988. Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. **Eur. J. Pharmacol.**, **151**: 19-25.

- DUFTON, M.J. & HIDER, R.C. 1991. The structure and pharmacology of Elapid cytotoxins. In: HARVEY, A.L. (Ed.). **Snake Toxins**. Pergamon Press, New York, p. 259-302.
- DUFTON, M.J. 1993. Kill and cure: the promising future for venom research. **Endeavour** **17**: 138-140.
- DUTTA, N. K., & NARAYANAN, K. G. 1952. Release of histamine from rat diaphragm by cobra venom. **Nature**, **169**: 1064–1065.
- EBNET, K. & VESTWEBER, D. 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. **Histochem. Cell Biol.** **112**: 1-23.
- ERD, F.; TRK, K.; ARNYI, P.; SZKELY, J.I. 1993. A new assay for antiphlogistic activity: zymosan induced mouse ear inflammation. **Agents Actions**, **39**: 137-142.
- ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M. 2000. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. Pharmacol.** **60**, 269–274.
- ESTES, R.; QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J. 1988. Phylogenetic relationships within Squamata. In: **ESTES, R.; PREGILL, G. editors. Phylogenetics relationships of the Lizard families**. Essays Commemorating Charles L. Camp. Stanford, California: Stanford University Press, 199-281.
- FAIZ, M.A., HARRIS, J.B., MALTIN, C.A., MANTLE, D., 1995. Comparison of structural protein and proteolytic enzyme levels in degenerating and regenerating rat muscle induced by *Notechis scutatus* venom. **Comp. Biochem. Physiol.** **110B**: 241–253.
- FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. 2001. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops Lanceolatus* (Fer de Lance) venom. **Toxicon**, **39**: 825-830.
- FARSKY, S.H.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. 1995. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation: a direct vital microscopy study. **J. Leukoc. Biol.** **57**: 379-386.
- FARSKY, S.H.P.; COSTA-CRUZ, J.W.M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F.P. 1997. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* venom: studies in vivo and in vitro. **Toxicon** **35**: 185-193.
- FARSKY, S. H. P.; GONÇALVES, L. R. CURY, Y. 1999. Characterization of local tissue damage evoked by *Bothrops jararaca* venom in the rat connective tissue microcirculation: an intravital microscopy study. **Toxicon**, **37**: 1079-1083.

- FERLAN, I.; FERLAN, A.; KING, T.; RUSSELL, F.E. 1983. Preliminary studies on the venom of the colubrid snake *Rhabdophis subminiatus* (red-necked keelback). **Toxicon** **21**(4): 570-574.
- FERREIRA, M.L. 2000. ***Thalassophryne nattereri* (niquim): Do veneno à Terapia**. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 176p.
- FERREIRA, S.H. 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature New Biol.**, **240**: 200-203.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., CORRÊA, F.M.A. 1978. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, **53**: 39.
- FERRER, X.; MORENO, J.J. 1992. Effects of copper, iron and zinc on edema formation induced by phospholipase A₂. **Comp. Biochem. Physiol.** **102C**: 325-327.
- FIRREL, J.C. & LIPOWSKY, H.H. 1989. Leucocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. **Am. J. Physiol.** **256**: H1667-H1674.
- FITZGERALD, D.J., ROY, L., ROBERTSON, R.M. & FITZGERALD, G.A. 1984. The effects of organic nitrates on prostacyclin biosynthesis and platelet function in humans. **Circulation**, **70**: 297-302.
- FITZSIMONS, D.C. & SMITH, H.M. 1958. Another rear fanged South African snake lethal to humans. **Herpetologica** **14**: 198-202.
- FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCO, J. 1993. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon** **31**(12): 1551-1559.
- FLOWER, R.J. 1988. Lipocortin and the mechanism of action of glucocorticoids. **Br. J. Pharmacol.**, **94**: 987-1015.
- FLOWER, R.J. 1989. Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A₂. In: SCHELMER, R.P.; CLAMOR, H.N. ORONSKY, A.L. editors. **Antiinflammatory Steroid Action Basic And Clinical Aspects**. New York: Academic Press, 48-66.
- FONTANA, M.D., HELENO, M.G. and VITAL BRAZIL, O. 1996. Mode of action of Duvernoy's gland secretion *Dryadophis bifossatus* in the chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. **Toxicon** **34**(10): 1187-1190.
- FOWLER, I.R. & SALOMÃO, M.G. 1994. A study of sexual dimorphism in six species from the colubrid snake genus *Philodryas*. **Snake** **26**: 117-122.

- FRANCHI, A.M.; CHAUD, M.; RETTORI, V.; SUBURO, A.; MCCANN, S.M. & GIMENO, M. 1994. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **91**: 539 - 543.
- FRANCIS, B.R.; WILLIAMS, E.S.; SEBART, C.; KAISER, I.I. 1993. Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. **Toxicon** **31**: 447-458.
- FRANCISCHI J.N.; DIAS, M.F.; ROCHA, O.A.; DE ABREU, M.S.; KIYOMI FUNAUAMA TATSUO, M.A.; FARINELLI, P. 1993. Pharmacological characterization of Sephadex-induced oedema in rat paws: predominant role of serotonin and platelet-activating factor. **Int. Arch. Allergy Immunol** **109**: 398-406.
- FRANCO, F.L. 2003. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD, V.JR. (Ed.) **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 13-32.
- FRIEDERICH, C. & TU, A.T. 1971. Role of metal in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochemistry** **18**(4): 678-684.
- FRY, B.G.; WÜSTER, W.; RAMJAN, S.F.R.; JACKSON, T.; MARTELLI, P.; KINI, R.M. 2003. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **17**: 2047–2062.
- FRY, B. G. et al. 2003a. Isolation of a neurotoxin (alpha-colubritoxin) from a 'non-venomous' colubrid: evidence for early origin of venom in snakes. **J. Mol. Evol.** **57**: 446-452.
- FRY, B. G. et al. 2003b. LC/MS (liquid chromatography, mass spectrometry) analysis of Colubroidea snake venoms: evolutionary and toxinological implications. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** **17**: 2047-2062.
- FRY, B.G. & WÜSTER, W. 2004. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Mol. Biol. Evol.**, **21**: 870–883.
- FRY, BG.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAM, S.F.R.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S.B.; RICHARDSON, M.K.; HODSON, W.C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. 2005. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature** **439**: 584-588.
- GANS, C. 1978. Reptilian venoms: some evolutionary considerations. In: GANS, C. (Ed.). **Biology of the Reptilia**, v. 8. Academic Press, London, N. York., 782 pp.

GARFIN, S.R.; CASTILONIA, R.R.; MUBARAK, S.J.; HARGENS, A.R.; AKESON, W.H.; RUSSELL, F.E. 1985. The effect of antivenin on intramuscular pressure elevations induced by rattlesnake venom. **Toxicon** **23**: 677-680.

GIULIANO, F., WARNER, T.D., 2002. Origins of prostaglandin E₂: involvements of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) in human and rat systems. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **303**: 1001–1006.

GLENN, J.L.; PORRAS, L.W.; NOHAVEC, R.D. and STRIGHT, R.C. 1992. Analysis of the Duvernoy's gland and oral secretions of *Hydrodynastes gigas* (Duméril, Bibron, and Duméril) (Reptilia: Serpentes). In: **STRIMPLE, P.D. and STRIMPLE, J.L. (Ed.). Contributions in Herpetology**. Cincinnati, OH: Cincinnati Museum of Natural History. p.19-26.

GLIESCH, R. 1925. As Cobras do Estado do Rio Grande do Sul. **Almanaque Agrícola Brasileiro, São Paulo**, **14**: 97-118.

GOULD, R.J.; POLOKOFF, M.A.; FRIEDMAN, P.A.; HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; COOK, J.J.; NIEWIAROWSKI, S. 1990. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **195**: 168-171.

GOULDING, N.J. & GUYRE, P.M. 1992. Regulation of inflammation by lipocortin-1. **Immunol. Today** **13**: 295-297.

GREENE, H.W. 1997. **Snakes: the Evolution on Mistery in Nature**. Berkeley: University California Press. 351p.

GROUND, M. 1991. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Pathol. Res. Pract.**, **187**: 1-22.

GUIMARÃES, A.Q.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FERREIRA DE ARAÚJO, P.M.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. 2004. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm. Res.** **53**: 284-291.

GUTIÉRREZ, J.M. & CHAVES, F. 1980. Efectos proteolítico, hemorrágico Y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon** **18**: 315-321.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. 1981. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon** **19**, 493-500.

GUTIÉRREZ, J.M. & CERDAS, L. 1984. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. **Rev. Biol. Trop.** **32**: 213-222.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. 1984. Patogénesis of myonecrosis induced, by crude venoms and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Pathol.** **40**: 367-379.

- GUTIÉRREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon** **23**, 887-893.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. 1986. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev. Biol. Trop.**, **34**(2): 209-219.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, E.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; CERDAS, L. 1986b. Comparative study of the edema-formation activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalente antivenom. **Comp. Biochem. Physiol.**, **85C**: 171-175.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; GENE, J.A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z. and SCHOSINSKY, K. 1989. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon** **27**(7):735-45.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, a review. **Mem. Inst. Butantan** **51**(14): 211-233.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ÁVILA, C.; CAMACHO, Z.; LOMONTE, B. 1990. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (Bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon** **28**(4): 419-426.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; DA SILVA, N.J.; NUÑEZ, J. 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). **Toxicon** **30**: 1299-1302.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** **33**(11): 1405-1424.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon** **33**: 19-29.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. 1997. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R.M. (Ed.). **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley & Sons, Chichester, p. 321-352.
- GUTIÉRREZ, J.M. & RUCAVADO, A. 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** **82**: 841-850.
- GUTIÉRREZ, J.M. 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.** **50**(2):377-394.

- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. 2003. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD, V.JR. (ED.). **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 310-323.
- GYGAX, P. 1971. Development, morphology and function of the venom gland (Duvernoy's gland) of *Natrix tessellata*. **Acta Trop.** **28(3)**: 226-274.
- HARRIS, J.B. & CULLEN, M.J. 1990. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc. Rev.**, **3**: 183-211.
- HARRIS, J.B., 2003. Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon** **42**: 933–945.
- HARTMANN, P.A. & MARQUES, O.A.V. 2005. Diet and habitat use two sympatric species of *Philodryas* (Colubridae), in south Brazil. **Amphibia-Reptilia** **26**: 25-31.
- HAYES, W.K. & HAYES, F.E. 1985. Human envenomation from the bite of the Eastern Garter Snake, *Thamnophis s. sirtalis* (SERPENTES: COLUBRIDAE). **Toxicon**, **23(4)**: 719-721.
- HEGEMAN, G. 1961. Enzymatic constitution of *Alsophis* saliva and its biological implications. **Breviora** **134**: 1-8.
- HEINZEL, B., JOHN, M., KLATT, P., BOHME, E. & MAYER, B. 1992. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. **Biochem. J.**, **281**: 627-630.
- HEISE, P.J.; MAXSON, L.R.; DOWLING, H.G. & HEDGES, S.B. 1995. Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes. **Mol. Biol. Evol.** **12(2)**: 259-265.
- HILL, R.E. & MACKESSY, S.P. 2000. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. **Toxicon** **38**: 1663-1687.
- HITE, L.A.; FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. 1992a. A new family of proteinases is defined by snake venom metalloproteinases. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler** **373**: 381-385.
- HO, C.L.; HWANG, L.L.; CHEN, C.T. 1993. Edema-inducing activity of lethal protein with phospholipase A1 activity isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon** **32**: 605-613.
- HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E. 2001. **"Inorganic Chemistry"**. Academic Press: San Diego.

- HOMMA, M. & TU, A.T. 1971. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Brit. J. Exp. Pathol.**, **52**: 536-542.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & GIGLIO, J.R. 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of Bothropstoxin. **Toxicon** **26(7)**: 615-627.
- HOURANI, S. M. and CUSACK, N. J. 1991. Pharmacological receptors on bloods platelets. **Pharmac. Rev.**, **43**: 243-298.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. 1985. Formalin test in mice, a useful technic for avaluation mild analgesics. **J. Neurosci. Methods**, **14**: 769-785.
- IALENTI, A.; IANAMARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal of Pharmacology** **211**: 177-182.
- IALENTI, A., MONCADA, S. & DI ROSA, M. 1993. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 701 - 706.
- INOUE, T., FUKUO, K., MORIMOTO, S., KOH, E. & OGIHARA, T. 1993. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E₂ production by vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **194**: 420 - 424.
- ISHIURA, S.; NONAKA, I.; NAKASE, H.; TADA, A.; SUGITA, H. 1984. Two-step mechanism of myofibrillar protein degradation in acute plasmocid induced muscle necrosis. **Biochem. Biophys. Acta**. **798**: 333-342.
- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. 1979. Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. (Ed.). **Snake Venoms**. Berlin, Springer-Velag, p. 61.
- JACKSON, K. 2003. The evolution of venom-delivery systems in snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society** **137**: 337-354.
- JACKSON, K. 2007. The evolution of venom-conducting fangs: Insights for the developmental biology. **Toxicon**, **49(7)**: 975-981.
- JACKSON, L.M., WU, K.C., MAHIDA, Y.R., JENKINS, D., HAWKEY, C.J., 2000. Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. **Gut**, **6**: 762-770.
- JANEWAY, C.A. & TRAVERS, P. 1994. The immune system in treahth and disease. In: **Immunobiology**. New York: Ed. Current Biology/ Garland Publishing. P.12-16.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. 2002. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed. 767p.

- JANSEN, D.W. 1987. The myonecrotic effect of Duvernoy's gland secretion of the snake *Thamnophis elegans vagrans*. **J. Herpetol.** **21**: 81-83.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. 1968. Pharmacology of peptides and proteins in snake venoms. **Ann. Rev. Pharmacol.** **8**: 299-318.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. 1970. Biochemistry of snake venoms. **Clin. Toxicol.**, **3**: 389-431.
- KAMIGUTI, A.S. & CARDOSO, J.L.C. 1989. Haemostatic changes caused by venoms of South American snakes. **Toxicon** **27**: 955-963.
- KAMIGUTI, A.S.; RUGMAN, F.P.; THEAKSTON, R.G.D.; FRANÇA, F.O.S.; ISHII, H.; HAY, C.R.M. and B.I.A.S.G. 1992. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. **Thromb. Haemost.** **67**: 484-488.
- KAMIGUTI, A.S.; SLUPSKY, J.R.; ZUZEL, M.; HAY, C.R. 1994. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb. Haemost.**, **72(2)**:244-9.
- KAMIGUTI, A.S. & SANO-MARTINS, I.S. 1995. South american snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, **14**: 359-374.
- KAMIGUTI, A.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M. 1996. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon** **34**: 627-642.
- KAMIGUTI, A.S.; DAVID, R.; THEAKSTON, G.; SHERMAN, N.; FOX, J.W. 2000. Mass spectrophotometric evidence for P-III/P-IV metalloproteinases in the venom of the Boomslang (*Dispholidus typus*). **Toxicon** **38**: 1613-1620.
- KARDONG, K.V. 1982. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrid & elapids. **Mem. Inst. Butantan** **46**: 105-118.
- KARDONG, K.V. 2002. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. **J. Toxicol.- Toxin Reviews**, **21**: 1-19.
- KATORI, M.; ODA, T.; NAGAI, K. 1990. A site of action of dexamethasone on leukocyte extravasation in microcirculation. **Agents Actions** **29**: 24-26.
- KAY, A. B. 2001. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, **344**: 30-37.
- KEEN, M., PICKERING, S.A.W. & HUNT, J.A. 1990. Modulation of bradykinin-stimulated release of prostacyclin from endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.**, **101**: 524P.

- KENNEDY, T.A., SMITH, C.J. & MARNETT, L.J. 1994. Investigations of the roles of cysteines in catalysis by prostaglandin endoperoxide synthase. **J. Biol. Chem.**, **269**: 27357 - 27364.
- KINI, R.M. & IWANAGA, S. 1986. Structure-function relationships of phospholipases II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon** **24**: 895-905.
- KINI, R.M. & EVANS, H.J. 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon** **27(6)**: 613-635.
- KINI, R.M. 1997. Chapter 1. Phospholipase A₂ – a complex multifunctional protein puzzle. In: KINI, R.M. (Editor). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. England: Wiley, pp.1-28.
- KNIGHT, A. & MINDELL, D. 1994. On the phylogenetic relationship of Colubrinae, Elapidae, and Viperidae and the evolution of front-fanged venom systems in snakes. **Copeia**, **1**: 1-9.
- KOCHVA, E. 1963. The development of the venom gland in the opisthoglyph snake *Telescopus fallax* with remarks on *Thamnophis sirtalis* (Colubridae, Reptilia). **Copeia** **1965(2)**: 147-154.
- KOCHVA, E. 1978. Oral glands of the reptilia. In: GANS, C. (Ed.). **Biology of the Reptilia**, v. 8. Academic Press, London, N. York, 782 pp.
- KOCHVA, E. 1987. The Origin of snake and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** **25(1)**: 65-106.
- KOUYOUMDIJAN, J.A.; POLIZELL, C.; LOBO, S.M.A.; GUIMARÃES, S.M. 1991. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**: 552.
- KOWAL-VERN, A.; WLANGA, J.M.; SHAPIRO-PUCCI, M.; HOPPENSTEADT, D.; GAMELLI, R.L. 1997. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endothelin-1, and C1 esterase inhibitor. **J. Burn Care Rehabil.**, **18**: 99-103.
- KUCH, U. & JESBERGER, U. 1993. Human envenomation from the bite of the South American colubrid snake species *Philodryas baroni* Berg, 1895. **Snake**, **25**: 63–65.
- KUCH, U. & MEBS, D. 2002. Envenomations by Colubrid Snakes in Africa, Europe, and the Middle East. **J. Toxicol.-Toxin Reviews.**, **21**: 159-179.
- KUJUBU, D.A., FLETCHER, B.S., VARNUM, B.C., LIM, R.W., HERSCHMAN, H.R., 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J. Biol. Chem.**, **266**: 12866–12872.

- LACERDA, B.J. 1884. **Leçons sur le Venins des Serpents du Brésil e sur la Méthode de Traitement des Morsures Venimeuses**. Reluir et Libraire Lombaerts & Co. Rio de Janeiro, 194 pp.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, **227**: 680-685.
- LANDS, W.E.M. (1985). Interactions of lipid hydroperoxides with eicosanoid biosynthesis. **J. Free Rad. Rio. Med.**, **1**: 97-101.
- LAPORTA-FERREIRA, I.L. & SALOMÃO. M.G. 1991. Morphology, physiology and toxicology of the oral glands of tropical cochleophagous snake, *Sibynomorphus neuwiedi* (Colubridae-Dipsadinae). **Zool. Anz.**, **227(3/4)**:198-208.
- LAVICH, T.R., CORDEIRO, R.S., CALIXTO, J.B., SILVA, P.M., MARTINS, M.A., 2003. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **462**: 185–192.
- LEE, C.Y. & LEE, S.Y. 1979. Cardiovascular effects of snake venoms. In: LEE, C.Y. (Ed). **Handbook of Experimental Pharmacology: Snake Venoms**. Berlim, Springer-Verlag. v. **52** cap. 15 p. 547-556.
- LEE, M.S.Y. 1997. The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. **Phil. Trans. R. Soc. London** **352B**: 53-91.
- LEE, M.S.Y. & CALDWELL, M.W. 1998. Anatomy and relationships of *Phachyrhachis problematicus*, a primitive snakes with hindlimbs. **Phil. Trans. R. Soc. London** **352B**: 1521-1552.
- LEE, M.S.Y. 1998. Convergent Evolution and Character Correlation in Burrowing Reptiles: Towards a Resolution of Squamate Relationships. **Biol. J. Linnean Soc.** **65**: 369-453.
- LEE, M.S.Y. & SCANLON, J.D. 2002. The Cretaceous marine squamate *Mesoleptos* and the origin of snakes. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond (Zool.)** **68(2)**: 131-142.
- LEITE PINTO, R.N.; JORGE DA SILVA, N.JR. and AIRD, S.D. 1991. Human envenomation by the South American ophistoglyph *Clelia clelia plumbea* (Wied). **Toxicon** **29(12)**: 1512-1516.
- LEMA, T. 1973. As serpentes do estado do Rio grande do Sul. **Iheringia (Ser. Divul.)**, **3**: 19-33.
- LEMA, T. 1978a. As cobras não peçonhentas que matam. **Natureza em Revista** **4**: 38-46.

LEMA, T. 1978b. Relato de um envenenamento por uma cobra não venenosa. **Natureza em Revista**, 4: 62-63.

LEMA, T. & AZEVEDO, A.C.P. 1983. Contribuição ao conhecimento da alimentação e do modo alimentar de serpentes do Brasil. **Com. Muus. Ci. Tecnol. PUCR-RS. Sér. Zool.**, 26: 41-121.

LEMOINE, K. & RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. 2003. Haemorrhagic, proteolytic and neurotoxic activities produced by Duvernoy's gland secretion from the false coral snake (*Erythrolamprus bizona* Jan, 1863) (Serpentes: Viperidae). **Revista Científica, FCV-LUZ XIII (5)**: 371-377.

LEMOINE, K.; SALGUEIRO, L.M.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. 2004b. Neurotoxic, Hemorrhagic and Proteolytic Activities of Duvernoy's Gland Secretion from Venezuelan Ophistoglyphous Colubrid Snakes in Mice. **Vet. Human Toxicol.** 46(1): 10-14.

LEON, G.; ESTRADA, R.; CHAVES, F.; ROJAS, G.; OVADIA, M.; GUTIERREZ, J.M. 1998. Inhibition by CaNa_2EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. **Toxicon** 36: 321-331.

LESK, A.M. & FORDHAM, W.D. 1996. Conservation and variability in the structures of serine proetinsases of the chymotrypsin family. **Journal Molecular Biology** 258: 501-537.

LEVIN, R.I., WEKSLER, B.B. & TACK-GOLDMAN, K. 1981. Nitroglycerin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured human endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, 67: 762-769.

LEVIN, R.I., WEKSLER, B.B. & JAFFE, E.A. 1982. The interaction of sodium nitroprusside with human endothelial cells and platelets: nitroprusside and prostacyclin synergistically inhibit platelet function. **Circulation**, 66: 1299-1305.

LIU, C.S.; CHEN, J.M.; CHANG, C.H.; CHEN, S.W.; TENG, C.M.; TSAI, I.H. 1991. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A_2 homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochim. Biophys. Acta** 1077: 362-370.

LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J. M. 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Rev. Biol. Trop.** 31(1): 37-40.

LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; RAMÍREZ, G. 1990b. Isolation a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon** 28: 75-81.

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

- LOMONTE, B. 1994. **Tissue damage and inflammation induced by snake venoms**. Dissertation for degree of Doctor of Philosophy. University of Göteborg, Göteborg, 87p.
- LOMONTE, B.; LUNGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. 1994. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle; na intravital. **Toxicon**, **32**: 41-55.
- LORNA, C.; HAMILTON; WARNER, D.T. 1998. Interactions between inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in vivo: investigations using the selective inhibitors, 1400W and celecoxib. **British Journal of Pharmacology** **125**: 335 - 340
- LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265-275.
- LUMSDEN, N.G.; FRY, B.G.; VENTURA, S.; KINI, R.M.; HODGSON, W.C. 2005a. Pharmacological characterization of a neurotoxin from the venom of *Boiga dendrophila* (Mangrove catsnake). **Toxicon** **45**: 329-334.
- LUMSDEN, N.G.; VENTURA, S.; DAUER, R.; HODGSON, W.C. 2005b. A Biochemical and pharmacological examination of *Rhamphiophis oxrhynchus* (Rufous beaked snake) venom. **Toxicon** **45**: 219-231.
- MACKESSY, S.P. 2002. Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, **21**: 43-83.
- MACKINSTRY, D.M. 1983. Morphologic evidence of toxic saliva in Colubrid snakes: a checklist of world genera. **Herpetological Review** **14(1)**: 12-15.
- MALING, H. M.; WEBSTER, M. E.; WILLIAMS, M. A.; SAUL, W.; ANDERSON, W. Jr. 1974. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48-80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **191**: 300-310.
- MANDELBAUM, F.R. & ASSAKURA M.T. 1988. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, **26(4)**: 379-85.
- MARKLAND, F.S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, **36**: 1749-1800.
- MARKWELL, M.; HASS, S.M.; BIEBER, L.L.; TOLBERT, N.E. 1978. A modification of the Lowry procedures to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal. Biochem.**, **87**: 206-210.
- MARQUES, O.A.V.; ETEROVIC, A.; SAZINA, I. 2001. **Serpentes da Mata Atlântica: Guia Ilustrado para Serra do Mar**. Holos, Ribeirão Preto, 184p.

- MARSHAL, L.A.; CHANG, J.Y.; CALHOUN, W.; YU, J.; CARLSON, R.P. 1989. Preliminary studies on phospholipase A₂ induced mouse paw edema as a model to evaluate antiinflammatory agents. **J. Cell. Biochem.** **40**: 147-155.
- MARTINS, N. 1916. **Das Opisthoglyphas Brasileiras e o seu Veneno**. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 111p.
- MATHER, H.M.; MAYNE, S.; MENAGLE, T.M. Mc. 1978. Severe envenomation from "harmless" pet snake. **Brit. Med. Journal**, **1**: 1324-1325.
- MATTHEWS, J.S., KEEN, M. & KEY, B.J. 1993. Inhibition of bradykinin-stimulated prostacyclin release from endothelial cells following chronic exposure to sodium nitroprusside. **Br. J. Pharmacol.**, **108**, p283.
- MCDOWELL, S. 1987. Systematics. In: SEIGEL, R.A., COLLINS, J.T., NOVAK, S.S., (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillian Publishing Co., p. 3-50.
- MEBS, D. 1968. Analysis of *Leptodeira annulata* venom. **Herpetologica** **24**: 338-339.
- MEBS, D. 1970. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int. J. Biochemistry**, **1**: 335-342.
- MEBS, D.; SCHARRER, I.; STILLE, W. & HAUKE, H. 1978. A fatal case of snake bite due to *Thelotornis kirtlandii*. In: ROSENBERG, P. (Ed.). **Animal, Plant and Microbial Toxins**. Pergamon Press, **16**: p. 477-479.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. 1983. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon** **21(3)**: 393-404.
- MEBS, D. & OWNBY, C.L. 1990. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.** **48**: 223-236.
- MEHTA, J., MEHTA, P. & OSTROWSKI, N. 1983a. Effects of nitroglycerin on human vascular prostacyclin and thromboxane A₂ generation. **J. Lab. Clin. Med.**, **102**: 116-122.
- MEHTA, J., MEHTA, P., ROBERTS, A., FARO, R., OSTROWSKI, N. & BRIGMON, L. 1983b. Comparative effects of nitroglycerin and nitroprusside on prostacyclin generation in adult human vessel wall. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **2**: 625-630.
- MÉIER, J. & WHITE, J. 1995. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: MÉIER, J. & WHITE, J. (Eds.). **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. CRC Press: Boca Raton: Florida. p. 367-412.

- MELLER, S.T.; CUMMINGS, C.P.; TRAUB, R.J.; GEBHART, G.F. 1994. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**, **50**: 367-374.
- MÉNEZ, A. Functional architectures of animal toxins: A clue to drugs design? 1998. **Toxicon**, **36** (11): 1557-1572.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 1998. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília. Fundação Nacional da Saúde.
- MINTON, S.A. & MINTON, M.R. 1980. **Venomous Reptiles**. New York: Scribners.
- MINTON, A. 1985. Venom Antigens Oral Secretions of Colubridae Snakes. **Indiana Academy of Science**, **94**: 600.
- MINTON, S.A. & WEINSTEIN, S.A. 1987. Colubrid Snake Venoms: Immunologic Relationships, Eletrophoretic Patrens. **Copeia**, **4**: 993-1000.
- MINTON, S.A. 1990. Venomous bites non venomous snakes: a bibliography of Colubrid envenomation. **J. Wild. Med.** **1**: 119-127.
- MITCHELL, J.A., LARKIN, S., WILLIAMS, T.J., 1995. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. **Biochem. Pharmacol.**, **50**: 1535–1542.
- MITTLEMAN, M.B. & GORIS, R.C. 1974. Envenomation from the bite of the Japanese colubrid snake, *Rabdophis tigrinus* (Boie). **Herpetologica** **30**: 113-119.
- MOHAMED, A.H. & ZAKI, O. 1957. Effect of Egyptian black snake toxin on histamine of blood and its relation to blood eosinophils. **Am. J. Physiol.**, **190**: 113.
- MOHAMED, A.H.; KAMEL, A.; AYOBE, M.H. 1968. Effects of *Echis carinatus* venom on tissue and blood histamine and their relations to local tissue reactions and eosinophil changes. **Toxicon** **6**: 51-54.
- MOHAMED, A.H.; EL-SEROUGI, M.S.; HAMED, R.M. 1971. Effects of *Naja nigricollis* venom in blood and tissue histamine. **Toxicon** **9**: 51-62.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43** (2): 109-42.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. 1991. L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antonociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **102**: 198-202.

- MORGAN, C.V.J.; BABBEDGE, R.C.; GAFFEN, Z.; WALLACE, P.; HART, S.L.; MOORE, P.K. 1992. Synergistic anti-nociceptive effect of N-N^G-nitro arginine methyl ester (L-NAME) and flurbiprofen in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **106**: 493-497.
- MORI, A. & MIZUTA, T. 2006. Envenomation by the Madagascan Colubrid Snake *Ithycyphus miniatus*. **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**, **12**(3): 512-520.
- MORIGUCHI, M., MANNING, L.R. & MANNING, J.M. 1992. Nitric oxide can modify amino acid residues in proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **183**: 598 - 604.
- MORITA, I., SCHINDLER, M., REGIER, M.K., OTTO, J.C., HORI, T., DEWITT, D.L., SMITH, W.L., 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, **270**: 10902–10908
- MOURA-DA-SILVA, S.M.; DESMOND, H.; LAING, G. & THEAKSTON, R.D.G. 1991. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** **29** (6): 713-723.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; LAING, G.D.; PAINE, M.J.; DENNISON, J.M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D. 1996. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.** **26**(9): 2000-2005.
- MURAKAMI, M., KAMBE, T., SHIMBARA, S., KUDO, I., 1999. Functional coupling between various phospholipase A₂ and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. **J. Biol. Chem.**, **274**: 3103–3115.
- NAGASE, H., WOESSNER, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, **274**: 21491–21494.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; HOGE, A.R. & GORIS, R.C. 1976. Characterization of the coagulant activity in the venom of aglyphous *Rhabdophis tigrinus* snake. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K. & SAWAI, Y. (Eds.). **Animal, Plant and Microbial Toxins**. Plenum Press, N. York, London **1**: p. 159-170.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, A.R. 1979. Thrombin-like and factor X – activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemostasis** **41**: 314-328.
- NAIR, X.; NETTLETON, D.; CLEVER, D.; TRAMPOSCH, K.M.; GHOSH, S.; FRANSON, R.C. 1993. Swine as a model of skin inflammation: phospholipase A₂-induced inflammation. **Inflammation** **17**: 205-215.

- NAKABAYASHI, S., UYAMA, O., NAGATSUKA, K., UEHARA, A., WANAKA, A., YONEDA, S., KIMURA, K. & KAMATA, T. 1985. The effect of isosorbide dinitrate and isosorbide-5-mononitrite on prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) generation in rat and human arteries. **Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.**, **47**: 323-328.
- NASCIMENTO Jr., E.B.; COSTA, K.A.; BERTOLLO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; ROCHA, L.T.S.; SOUZA, A.L.S.; GLÓRIA, M.B.A.; MORAES-SANTOS, T.; COELHO, M.M. Pharmacological investigation of nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. 2005. **Toxicon** **45**: 585-593.
- NICKERSON, A.M. & HENDERSON, R.W. 1976. A case of envenomation by the South American colubrid *Philodryas olfersii*. **Herpetologica** **32**(2):197-198.
- NISHIOKA, S.A.; & SILVEIRA, P.V.P. 1992. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**: 805-810.
- NISHIOKA, S.A. & SILVEIRA, P.V.P. 1994. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **36**(3): 279-281.
- NORELL, M. A.; MCKENNA, M. C.; NOVACEK, M. J. 1992. *Estesia mongoliensis*, a new fossil varanoid from the Late Cretaceous Barun Goyot Formation of Mongolia. **Am. Mus. Novit.**, **3045**: 1-24.
- OGUCHI, Y.; SUDA, T.; SUZUKI, T.; OHTANI, Y.; TAKAHASHI, H. 1986. Isolation and physiological action of capillary permeability increasing-enzyme from the venom of *Agkistrodon caliginosus*. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **198**: 557-564.
- OHSAKA, A. 1979. Hemorrhagic necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**, vol. **52**, **Snake venoms** (Lee, C.Y., Ed.), pp. 480-456. Berlin, Springer-Verlag.
- OHTANI, Y. & TAKAHASHI, H. 1983. Purification of capillary permeability increasing-enzyme from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-mamushi). **Toxicon** **21**: 871-878.
- OLIVO, R.A.; TEIXEIRA, C.F.P.; WALLACE, J.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. 2007. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, **49**(5): 670-677.
- OSBORN, L. 1990. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell.**, **62**: 3-6.
- OTERO, P.N.; LEONOR JOFRÉ, M.; DAVID OSCHILEWSKI, L.; BENJAMÍN SUBERCASEAUX, S.; NELSON MUÑOZ, S. 2007. Mordedura por *Philodryas chamissonis*: Presentación de un caso y revisión de la literatura. **Rev Chil Infect.**, **24** (3): 236-241

- OVADIA, M. 1984. Embryonic development of Duvernoy's gland in the snake *Natrix tessellata* (Colubridae). **Copeia** **1984**: 516-521.
- OWNBY, C.L.; COLBERG, T.R.; ODELL, G.V. 1984. A new method for quantitating haemorrhage induced by rattlesnake venoms. Ability of polyvalent antivenom to neutralize haemorrhagic activity. **Toxicon**, **22**: 227-233.
- OWNBY, C.L. 1990. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: **Handbook of Toxinology** (Shier, W.T. and Mebs, D., Eds.), pp. 602-654. New York, Marcel Dekker.
- PAINE, M.J.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.; CRAMPTON, J.M. 1992. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, **267**: 22869-22876.
- PARADA, C.A.; TAMBELLI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formaline-induced nociception. **Neurosci.**, **102**: 937-9444.
- PAYNE, A.N.; GARLAND, L.C. 1978. Interaction between barium, strontium and calcium in histamine release by compound 48/80. **Eur. J. Pharma.**, **52**: 329.
- PEICHOTO, M.E.; ACOSTA, O.; LEIVA, L. TEIBLER, P.; MARUÑAK, S.; RUÍZ, R. 2004. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. **Toxicon**, **44**: 589-596.
- PEICHOTO, M.E.; LEIVA, L.C.; GUAIMÁS MOYA, L.E.; REY, L.; ACOSTA, O. 2005. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: effects on blood coagulation. **Toxicon**, **45**: 527-534.
- PEICHOTO, M.E.; TEIBLER, P.; RUIZ, R.; LEIVA, L.; ACOSTA, O. 2006. Systemic pathological alterations caused by *Philodryas patagoniensis* colubrid snake venom in rats. **Toxicon**, **48**: 520-528.
- PERALES, J.; AMORIM, C.Z.; ROCHA, S.L.G.; DOMONT, G.B.; MOUSSATCHÉ, H. 1992. Neutralization of oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by na antiothropic isolated from Opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Agents Actions**, **37**: 250-259.
- PETERS, J.A. & OREJAS-MIRANDA, B. 1970. Catalogue of the Neotropical Squamata: Part I. Snakes. **Bull. U.S.Natl. Mus.**, **297**: 1-347.
- PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.P.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ J.M. 2000. Increment in serum cytokine and nitric oxide in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, **38**: 1253-1266.

- PICOT, D., LOLL, P.J. & GARAVITO, R.M. (1994). The x-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. **Nature**, **367**: 243 - 249.
- POLOSA, R. 1993. Role of the kinin-kalikrein pathway in allergic diseases. **Allergy**, **48**: 217-225.
- POMMIER, P. & DE HARO, L. 2007. Envenomation by Montpellier snake (*Malpolon monspessulanus*) with cranial nerve disturbances. **Toxicon**, **50**: 868-869.
- POPE, C.H. 1958. Fatal bite of captive african rear-fanged snake (*Dispholidus*). **Copeia** **4**: 280-282.
- PORCHER, C., HOROWITZ, B., BAYGUINOV, O., WARD, S.M., SANDERS, K.M., 2002. Constitutive expression and function of cyclooxygenase-2 in murine gastric muscles. **Gastroenterology**, **122**: 1442–1454.
- PORTANOVA, J.P., ZHANG, Y., ANDERSON, G.D., HAUSER, S.D., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., GREGORY, S.A., ISAKSON, P.C., 1996. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J. Exp. Med.**, **184**: 883–891.
- POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H. & WELLS, K.D. 1998. **Herpetology**. Prentice Hall, Upper Saddle River: New Jersey. 337p.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S.; COGO, J. C.; ANDRADE, A.L.; ASSAKURA, M.; CRUZ-HÖFLING, M.A. and RODRIGUES-SIMIONI, L. 1996. The effects of Duvernoy's gland secretion from the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* on striated muscle and the neuromuscular junction: partial characterization of a neuromuscular fraction. **Toxicon** **34(4)**: 459-466.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S.; COGO, J.C.; ANDRADE, A.L.; ASSAKURA, M.T; REICHL, A.P.; CRUZ-HÖFLING, M.A. and RODRIGUES-SIMIONI, L. 1998. Characterization of a Myotoxin from the Duvernoy's Gland Secretion of the Xenodontinae Colubrid *Philodryas olfersii* (Green snake): Effects on Striated Muscle and the Neuromuscular Junction. **Toxicon** **36(10)**: 1407-1421.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & HYSLOP, S. 2002. South American colubrid envenomations. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, **21**: 117-158.
- PREGILL, G.K.; GAUTHIER, J.A.; GREENE, H.W. 1986. The evolution of Helodermatidae squamates, with description of a new taxon and an overview of Varanoidea. **Trans. San Diego Soc. Nat. Hist.**, **21**: 167-202.

- PUORTO, G. & FRANÇA, F.O.S. 2003. Serpentes não peçonhentas e aspectos clínicos dos acidentes. **In:** CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD, V.JR. (Eds.). **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed. São Paulo, Sarvier, p. 108-114.
- RAGE, J.C. 1994. La diversité des Serpents. **In:** BAUCHOT, R. (Ed.). **Les Serpents**. Bordas: Paris. 34-45.
- RAMSEY, H.W.; TAYLOR, W.J.; BORUCHOW, I.B.; SNYDER, G.K. 1972. Mechanism of shock produced by an elapid snake (*Micrurus f. fulvius*) venom in dogs. **Am. J. Physiol.** **222(3)**: 782-786.
- RANG, H.P., DALE, M.M. and RITTER, J.M. 2003. **Pharmacology**. 5th edition. Churchill Livingstone.
- RANG, H.P.; DALE, M.M. e RITTER, J.M. 2001. **Farmacologia**. 4 Ed. Guanabara Koogan 703p.
- RANKIN, J.A. 2004. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical issues**, **15(1)**: 03-17.
- RENNER, M. 1999. **Caracterização Enzimática do Veneno e Estudo Histológico da Glândula de Duvernoy de *Clelia plumbea* (Wied, 1820) (Serpentes:Xenodontinae)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 83p.
- RETTORI, V., BELOVA, N., DEES, W.L., NYBERG, C.L., GIMENO, M. & MCCANN, S.M. 1993. Role of nitric oxide in the control of luteinising hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **90**: 10130-10134.
- RIBEIRO, L.A., PUORTO, G., JORGE, M.T., 1999. Bites by the colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. **Toxicon**, **37**: 943-948.
- RIEPPPEL, O. 1988a. The classification of the Squamata. **In:** BENTON, M. editor. **The phylogeny and classification of Tetrapods. Vol. I Amphibians, Reptiles, Birds. Systematics Association Special Volume nº 35A**. Oxford: Clarendon Press: 261-293.
- RIEPPPEL, O. 1988b. A review of the origin of snakes. **In:** HECHT, M.K.; WALLACE, B.; PRANCE, G.T. (Eds.). **Evolutionary Biology**. Plenum Press: New York. **Vol. 22**: 37-130.
- RIEPPPEL, O. & ZAHER, R. 2000. The intermandibular joint in squamates, and the phylogenetic relationships of the fossil snakes *Pachyrhachis problematicus* Hass. **Fieldiana Geology**, **43**: 1-36.

- RIEPPPEL, O. & ZAHER, R. 2001. Re-building the bridge between mosasaurs and snakes. **N. Jb. Geol. Paläont. Abh.**, **221(1)**: 111-132.
- RISTIMAKI, A., GARFINKEL, S., WESSENDORF, J., MACIAG, T., HLA, T., 1994. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. **J. Biol. Chem.**, **269**:11769–11775.
- ROBERTSON, S.S.D. & DELPIERRE, G.R. 1969. Studies on African snake venoms-VI. Some enzymatic activities in the venom of the boomslang *Dispholidus typus*. **Toxicon**, **7**: 189-194.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. 1949. Bradykinin, a hipotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by tripsin. **Am. J. Physiol.**, **156**: 261-273.
- ROCHA, C.F.D.; VRCIBRADIC, D. 1998. Reptiles as predators of vertebrates and as prey in a restinga habitat of southeastern Brasil. **Ci. Cult.**, **50**: 364-368.
- ROCHA, M.M.T.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R. e SATO, C. 2003. Reports of Human Snake Accidents Caused by *Philodryas olfersii*. **Mem. Inst. Butantan**, **60**:142.
- ROCHA, M. M. T. 2005. **Estudo comparado dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) e *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (SERPENTES: COLUBRIDAE)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 144p.
- ROCHA, M.M.T.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; TAMBOURGI, D.V.; FURTADO, M.F.D. 2006. Duvernoy's gland secretion os *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). **Toxicon**, **47**: 95-103.
- ROCHA, M.M.T. & FURTADO, M.F.D. 2007. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *Philodryas patagoniensis* (Girard) (Serpentes Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, **24(2)**: 410-418.
- ROCHA, S.L.G.; FRUTUOSO, V.S.; DOMONT, G.B.; MARTINS, M.A.; MOUSSTCHÉ, H.; PERALES, J. 2000. Inhibition of the hyperalgesic activity of *Bothrops jararaca* venom by an antiothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon**, **38**: 875-880.
- ROSENBERG, H.I.; BDOLAH, A and KOCHVA, E. 1985. Lathal factors and enzymes in the secretion from Duvernoy's gland of three colubrid snakes. **J. Exp. Zool.**, **233**: 5-14.
- ROSENFELD, G. 1971. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKELEY, E.E.; DEULKOFEU, V. (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms Vol. II**, New York, Academic Press, p. 345-384.

- RUCAVADO, A.; NUÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. 1998. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Path.**, **79**: 245-254.
- RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LÉON, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. 2000. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**
- RUSSEL, F.E.; CARLSON, R.W.; WAINSCHEL, J.; OSBORNE, A.H. 1975. Snake venom poisoning in the United States. Experiences with 550 cases. **J.A.M.A.**, **233**: 341-344.
- RUSSELL, F. E. 1980. **Snake Venom Poisoning**. J.B. Lippincott: Philadelphia, 562 p.
- SAADI, S.; WRENSHALL, L.E.; PLATT, J.L. 2002. Regional manifestations and control of the immune system. **Faseb J.** **16**(8): 849-856.
- SAKAMOTO, C., 1998. Roles of cox-1 and cox-2 in gastrointestinal pathophysiology. **J. Gastroenterol.**, **33**: 618–624.
- SAKAI, A.; HONNA, A. and SAWAI, Y. 1984. Study on the toxicity of venoms extracted from Duvernoy's gland on certain Asian colubrid snakes. **The Snake**, **16**:16-20.
- SALOMÃO, E. L. & DI BERNARDO, M. 1995. *Philodryas olfersii*: uma cobra comum que mata. Caso registrado na área da 8a Delegacia Regional de Saúde. **Arquivos da SBZ** **14/15/16**. Sorocaba. p.21.
- SALOMÃO, M.G.; ALBOLEA, A.B.P.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. 2003. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpet. Review**, **34**(4): 307-312.
- SALVEMINI, D., MISKO, T.P., MASFERRER, J., SEIBERT, K., CURRIE, M.G. & NEEDLEMAN, P. 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **90**: 7240-7244.
- SALVEMINI, D., MANNING, P.T., ZWEIFEL, B.S., SEIBERT, K., CONNOR, J., CURRIE, M.G., NEEDLEMAN, P. & MASFERRER, J.L. 1995a. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. **J. Clin. Invest.**, **96**: 301 - 308.
- SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, **118**: 829-838.

- SAMEL, M.; SIIGUR, E.; SIIGUR, J. 1987. Purification and characterization of two arginine ester hydrolases from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Toxicon**, **25**: 379-388.
- SANTOS-COSTA, M.C.; OUTEIRAL, A.B.; D'AGOSTINI, F.; CAPPELIARI, L. 2000. Envenomation by the Neotropical Colubrid *Boiruna maculata* (Boulenger, 1896): A case report. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **42(5)**.
- SANTOS-COSTA, M.C.; OUTEIRAL, A.B.; D'AGOSTINI, F.; CAPPELIARI, L. 2001. Frequência de acidentes ofídicos na região da grande Porto Alegre e cidades próximas, RGS, Brasil. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Série Zool.** **14(1)**: 89-93.
- SARAVIA-OTTEN, P., FRISAN, T., THELESTAM, M., GUTIÉRREZ, J.M., 2004. Membrane-independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. **Toxicon**, **44**: 749-764.
- SAWAI, Y; HONMA, M.; KAWAMURA, Y.; SAKI, A. & HATSUSE, M. 2002. *Rhabdophis tigrinus* in Japan: Pathogenesis of Envenomation and Production of Antivenom. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, **21**: 181-201.
- SAZIMA, I. & HADDAD, C.,F.B. 1992. Répteis da Serra do Japi: Notas sobre a história natural. In: MORELLATO, L.P. **História Natural da Serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma área Florestal no Sudeste do Brasil**. FAPESP, Campinas, p. 212-237.
- SBH. 2007. *Brazilian reptiles – List of species*. Acessível em <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. (Consultado em 18/03/2008).
- SCANLON, J.D.; LEE, M.S.Y.; CALDWELL, M.D.; SHINE, R. 1999. The paleoecology of the primitive snake *Pachyrhachis*. **Hist., Biol.** **13**: 127-152.
- SCANLON, J.D. & LEE, M.S.Y. 2002. Varanoid-like Dentition in primitive snakes (Madtsoiidae). **J. Herpetol.** **36(1)**: 100-106.
- SCHOLZ, J. & WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Rev. Neurosci.**, **5**: 1062-67, 2002.
- SCHROR, K., AHLAND, B., WEISS, P. & KONG, E. 1988. Stimulation of vascular PGI₂ by organic nitrates. **Eur. Heart J.**, **9**: 25-32.
- SCIBERRAS, D. G.; GOLDENBERG, M. M.; BOLOGNESE, J. A.; JAMES, I.; BABER, N. S. 1987. Inflammatory responses to intradermal injection of platelet activating factor, histamine and prostaglandin E2 in healthy volunteers: a double blind investigation. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **24**: 753-61.
- SEIB, R.L. 1979. Human envenomation from the bite of aglyphous false coral snake, *Pliocercus elapoides* (SERPENTES: COLUBRIDAE). **Toxicon**, **18**: 399-401.

- SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B. DE SOUZA, G.E.P. & GIGLIO, J.R. 1990. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca Ilhoa) snake venom. **Toxicon** **28(3)**: 261-273.
- SERIÉ, P. 1916. **Las serpientes de la Argentina**. Buenos Aires. Establecimiento Tipográfico J. Weiss y Preusche. 20p.
- SERRANO, S.M.T. & MAROUN, R.C. 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, **45(8)**: 1115-1132.
- SHARMA, J.N. 1993. Therapeutic prospects of bradykinin receptor antagonists. **Gen. Pharmacol.**, **24**: 267-274.
- SCHENOME, H. & REYES, H. 1965. Animales ponzonosos de Chile. **Bol. Chil. Parasitol.**, **20**: 104-108.
- SHORE, P.A.; BURKHALTER, A.; COHN, V.H. 1959. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissue. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, **127**: 182.
- SILVA, M. V. & BUONONATO, M. A. 1983/84. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. **Mem. Inst. Butantan**, **47/48**: 121-126.
- SILVEIRA, P.V.P. & NISHIOKA, S.A. 1992. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in a brazilian teaching Hospital. Analysis of 91 cases. **Rev. Inst. Trop. S. Paulo**, **34**: 499-503.
- SINAN – **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Animais peçonhentos**. Acessível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>. (Consultado em 18/03/2008).
- SMITH, C.J., ZHANG, Y., KOBOLDT, C.M., MUHAMMAD, J., ZWEIFEL, B.S., SHAFFER, A., TALLEY, J.J., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., ISAKSON, P.C., 1998. Pharmacological analysis of cyclooxygenase- 1 in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **95**: 13313–13318.
- SMOLKA, M.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. 1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** **36 (7)**: 1059-1063.
- SOARES DE MOURA, R.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; CARVALHO, L.C.R.M. 1998. Pharmacological aspects of mouse hind paw edema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon** **36**: 771-780.

- SOUZA FILHO, S.P.; PRIANTI JR, A.C.G.; HYSLOP, S.; FONTANA, M.D.; PUORTO, G.; COGO, J.C. 2000. Colubrid *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (parelheira) snake venom and effects on neuromuscular junctions. **In: Toxins from animals, plants and microbes – XII World Congress of the International Society on Toxinology** – Paris : 286.
- SPRINGER, T.A. 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte migration. **Annu. Rev. Physiol.**, **57**: 827-872.
- STADLER, J., STEFANOVIC-RACIC, M., BILLIAR, T.R., CURRAN, R.D., MCINTYRE, L.A., GEORGESCU, H.I., SIMMONS, R.L. & EVANS, C.H. 1991. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, **147**: 3915-3920.
- STADLER, J., HARBRECHT, B.G., DI SILVIO, M., CURRAN, R.D., JORDAN, M.L., SIMMONS, R.L. & BILLIAR T.R. 1993. Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupffer cells. **J. Leukoc. Biol.**, **53**: 165 - 172.
- SUFKA, K. J.; SCHOMBURG, F. M; GIORDANO, J. 1992. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **41**: 53-6.
- SWIERKOSZ, T.A., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., BOTTING, R.M.; VANE, J.R. 1995. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. **Br. J. Pharmacol.**, **114**: 1335 - 1342.
- TAILOR, A.; TOMLINSON, A.; SALAS, A.; PANES, J.; GRANGER, D.N.; FLOWER, R.J. 1999. Dexamethasone inhibition of leukocyte adhesion to rat mesenteric postcapillary venules: role of intercellular adhesion molecule 1 and KC. **Gut**, **45**: 705-712.
- TAN, N. H. AND SAIFUDDIN, M. N. 1990. Comparative study of the edema-inducing activity of snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **97C**: 293-296.
- TAN, N.H. & SAIFUDIN, M.N.; YONG, W.Y. 1991. The edema inducing activity of phospholipase A2 enzymes. **Biochem. Int.**, **23**: 175-181.
- TAUB, A.M. 1966. Ophidian cephalic glands. **J. Morphol.** **118(4)**: 529-542.
- TCHERNOV, E.; RIEPPEL, O.; ZAHER, H.; POLCYN, M.J.; JACOBS, L.L. 2000. A fossil snake with limbs. **Science**, **287 (5460)**: 2010-2012.
- TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2001. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circ. Res.**, **88**: 877-887.

- TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; MARUÑAK, S.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M.; ORTEGA, H. 2001. Muscular regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom from Argentina. **Biocell**, **25**: 257-264.
- TEIXEIRA, C.F.P., CURY, I, OGA, S. and JANCAR, S. 1994. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activation factor (PAF). **Toxicon** **32(4)**: 419-426.
- TEIXEIRA, C.F.P.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M. 2003. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* venom. **Muscle Nerve**, **28**: 449–459.
- TENG, C.M.; WANG, J.P.; PENG, H.C.; OUYANG, C. 1989. Edema-producing proteins isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon**, **27**: 899-905.
- THEAKSTON, R.D.G; REID, H.A.; ROMER, J.D. 1979. Biological properties of the red-necked keel-back snake (*Rabdophis subminiatus*). **Toxicon**, **17**: 190.
- THEAKSTON, R.D.G. & A.S. KAMIGUTI. 2002. A list animal toxins and some other natural products with biological activity. **Toxicon**, **40**: 579-651.
- THOMAS, R.A. 1976. **A Revision of the American Colubrid Snake Genus *Philodryas* Wagler, 1830**. Tese (Doutorado) – Graduate College of Texas A and M University, 338p.
- THOMAS, R.G. & POUGH, F.H. 1979. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, **17**: 221-228.
- TIDBALL JG. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med Sci Sports Exerc.**, **27**:1022–1032.
- TILMISANY, A.K.; MUSTAFA, A.A.; ABDEL-AZIZ, A.; OSMAN, O.H. 1986. Evidence for the presence of histamine in Gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom. **Toxicon**, **24**: 1159-1161.
- TOMLINSON, A., APPLETON, I., MOORE, A.R., GILROY, D.W., WILLIS, D., MITCHELL, J.A., WILLOUGHBY, D.A., 1994. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, **113**: 693–698.
- TRACEY, W.R., NAKANE, M., KUK, J., BUDZIK, G., KLINGHOFER, V., HARRIS, R. & CARTER, G. 1995. The nitric oxide synthase inhibitor, L-NG-monomethylarginine, reduces carrageenan induced pleurisy in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **273**: 1295 - 1299.

- TREBIEN, H.A. & CALIXTO, J.B. 1989. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents and Actions**, **26** (3/4): 292-300.
- TU, A.T. & HOMMA, M. 1971. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br. J. exp. Path.**, **52**: 538.
- UNDERWOOD, G. 1997. An Overview of Venomous Snake Evolution. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, **70**: 1-13.
- VAN ARMAN, C. G., BEGANY, A. J ., MILLER, L. M.; PRESS, H. H. 1965. Some details of inflammations caused by yeast and carrageenan. **J. Pharmacol. exp. Ther.**, **150**: 328-334.
- VAN DER OUBERA, F.J., BUYTENHEK, M., SLIKKERVEER, F.J. and VAN DORP, D.A. 1979. On the haemoprotein character of prostaglandin endoperoxide synthetase. **Biochim. Biophys. Acta.**, **572**: 29 - 42.
- VANE, J. R. and BOTTING, R. M. 1998. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **38**: 97-120.
- VARGAFITZ, B.B.; BHARGAVA, N.; BONTA, I.L. 1974. Haemorrhagic and permeability increasing effects of *Bothrops jararaca* and other Crotalidae venoms as related to amine or kinin release. **Agents Actions**, **4**: 163-168.
- VEST, D.K. 1988. Some effects and properties of Duvernoy's gland secretion from *Hypsiglena torquata texana* (Texas night snake). **Toxicon**, **26**(4): 417-419.
- VEST, D.K.; MACKESSY, S.P. and KARDONG, K.V. 1991. The unique Duvernoy's secretion of the brown tree snake (*Boiga irregularis*). **Toxicon**, **29**(4/5):532-535.
- VIDAL, N. & HEDGES, S.B. 2002. Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. **C. R. Biol.**, **325**: 987-995.
- VIDAL, N. 2002. Colubroid systematics: evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, **21**: 21-41.
- VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. 1985. Purification of an edema-inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* venom and its interaction with aristolochic acid. **Toxicon**, **23**: 617.
- VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. 1987. Characterization of three edema inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, **25**: 501-515.

- VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. 1988. Purification and partial biochemical characterization of an edema-inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* (Russell's Viper) snake venom. **Toxicon**, **26**: 713-720.
- VITAL BRAZIL, O. & VELLARD, J. 1926. Contribuição aos estudo das glândulas das serpentes aglyphas. **Mem. Inst. Butantan Tombo III**: 301-322.
- VITAL BRAZIL, O. 1972. Neurotoxins from the South American Rattlesnake venoms. **J. Formosan. Med. Assoc.**, **71**: 394-398.
- VITAL BRAZIL, O. 1980. Os venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Méd. Brasil**, **26**: 212-218.
- VITAL BRAZIL, O. 1982. Peçonhas. In: **CORBETT, C.E. ed. Farmacodinâmica**. pp.1044-1074. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- VITAL BRAZIL, O. 1984. Peçonhas. In: **COBERTT, C.E. (Ed.) Farmacodinâmica**. 6 ed. COBERT, C.E. (ed), Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 71 p.1044 -74.
- VITAL BRAZIL, O. 1987. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **29(3)**: 119-126.
- WANG, J.P. & TENG, C.M. 1990a. comparison of the enzymatic and edema-producing activities of two venom phospholipase A₂ enzymes. **Eur. J. Pharmacol.**, **190**: 347-354.
- WANG, J.P. & TENG, C.M. 1990b. Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A₂ enzyme isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, **42**: 846-850.
- WANG, J.P. & TENG, C.M. 1991. Effects of anti-inflammatory drugs on rat hind-paw swelling caused by phospholipase A₂ from *Naja naja atra* venom. **Naunyn-Schmiedeberg's Archs. Pharmacol.**, **344**: 377-381.
- WANG, J.P. & TENG, C.M. 1992. Roles of PMN leucocytes, platelets and some mediators in rat hind-paw oedema induced by two phospholipase A₂ enzymes from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, **44**: 300-305.
- WANG, J.P.; PENG, H.C.; TENG, C.M. 1991. Rat hind-paw swelling effect of an edema-producing protein isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Naunyn-Schmiedeberg's Archs. Pharmacol.**, **343**: 399-404.
- WARRELL, D.A. 2004. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, Clinical Features, and Clinical Management. In: CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. (Eds.) **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere Vol. II**. 6 ed., Ithaca and London, Comstok, 425 pp.

- WEI, J.F.; YA-ZHEN MOA; LI-YA QIAO A; XIAO-LONG WEI A; HAN-QIU CHENA; HUA XIE A; YI-LING FUA; WAN-YU WANG B; YU-LIANG XIONG B; SHAO-HENG HEA. 2006. Potent histamine releasing activity of atrahagin, a novel snake venom metalloproteinase. **Int. J. Biochem. & Cell Biol.**, **38**: 510-520.
- WEINSTEIN, S.A.; CHISZAR, D.; BELL, R.C.; SMITH, L.A. 1991. Lethal potency and fractionation of Duvernoy's secretion from the brown tree snake *Boiga irregularis*. **Toxicon**, **29**: 401-408.
- WEINSTEIN, S.A & SMITH, L.A. 1993. Chromatographic profiles and properties of Duvernoy's secretions from some boigine and dipholidine colubrids. **Herpetologica**, **49**: 78-94.
- WEINSTEIN, S.A. & KARDONG, K.V. 1994. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. **Toxicon**, **32(10)**: 1161-1185.
- WU, W. 1998. Cobra cardiotoxin and phospholipase A₂ as GAG-binding toxins. On the path from structure to cardotoxicity and inflammation. **Trends in Cardiovascular Medicine**, **8**: 270-278.
- YAMAZAKI, Y.; SUGIYAMA, Y.; SHIN, Y.; MORITA, T. 2000. Novel CAP family proteins in snake venom: Purification and characterization. In: **IST World Congress Abstracts, Paris**.
- YOUNG, B.A. & KARDONG, K.V. 1996. Dentitional surface features in snakes (Reptilia, Serpentes). **Amphibia-Reptilia**, **17**: 261-276.
- ZAHER, R. 1998. The phylogenetic position of *Pachyrhachis* within snakes (Squamata, Lepidosauria). **J. Vertebrate Paleontol.**, **18(1)**: 1-3.
- ZAMUNER, S.R.; GUTÍERREZ, J.M.; MUSCARA, M.N.; TEIXEIRA, A.S.; TEIXEIRA, C.F.P. 2001. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, **39**: 1505-1513.
- ZAMUNER, S.R., TEIXEIRA, C.F., 2002. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm.**, **11**: 351-357.
- ZHENG, L.; ZOMERDIJK, T.P.L.; VAN DER BARSELLAR, M.T.; GEERTSMA, M.F.; VAN FURTH, R.; NIBBERING, P.H. 1999. Arachidonic acid but not its metabolites, is essential for FcγR-stimulated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. **Immunol.**, **96**: 90-97.
- ZINGALI, R.B.; BIANCONI, M.L.; MONTEIRO, R.Q. 2001. Interaction of Bothrojaracin with prothrombin. **Haemostasis**, **31**: 273-278.

ZYCHAR, B.C.; CASTRO-Jr, N.C.; MARCELINO, J.R.; GONÇALVES, L.R.C. 2008. Phenol used as a preservative in Bothrops antivenom induces impairment in leukocyte–endothelial interactions. **Toxicon**, (2008) *In Press*, doi:[10.1016/j.toxicon.2008.01.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.01.016).