

MARUCIA CHACUR

**MEDIAÇÃO QUÍMICA DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELOS
VENENOS DE SERPENTES *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* E POR
UMA MIOTOXINA COM ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE A₂ ISOLADA
DO VENENO DE *Bothrops asper***

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia**

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury

São Paulo

2000

Aos meus pais Roberto e Margarida,

pelo amor e dedicação,
por tudo o que me ensinaram,
e que de alguma forma eu possa passar
para frente esse exemplo

Aos meus irmãos, Cláudia, Lida e Beto

pela amizade, amor e carinho
que os fazem tão especiais!

Amo vocês!!!

Ao Lui,

pelo amor e companheirismo,
pelo apoio constante e incentivo

*“Sempre existe no mundo uma pessoa que espera a outra,
seja no meio do deserto,
seja no meio das grandes cidades.
E quando estas pessoas se cruzam e seus olhos se encontram,
todo o futuro perde qualquer importância,
e só existe aquele momento”*

Paulo Coelho

A Yara,

pela amizade, orientação e
pela confiança em mim depositada

*“o homem é um aprendiz,
a dor é sua mestra”*

Musset

AGRADECIMENTOS

Às amigas do “grupo de dor” do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan:

Gisele, ♥ pela amizade, pelos “constante” momentos de discussões e pela ajuda nos experimentos.

Rosana, pela grande amizade, pelas corridas e principalmente pelas “baladas”!

Ingrid, pelo carinho e companheirismo, que fazem você uma pessoa tão especial.

Camis, pela ajuda nos experimentos e amizade.

Eliane (Li), pelo apoio, ajuda (nos experimentos), amizade e principalmente pela qualificação.

Pat, pelo carinho e diálogo, que só você sabe fazer!

Sami, pela dedicação e ajuda, pelos momentos de corrida no CEPE!

Ana e Vanessa, pela amizade.

“Sem vocês eu nada seria...”

A Dra. Renata Giorgi, pelo auxílio e pelas discussões, pela amizade e pelos diálogos numa mesa de bar!

A Elaine-Lã, pela amizade desde os tempos de Faculdade.

A Dra. Ida S. Sano-Martins, por permitir a continuação deste trabalho e pelo apoio constante;

Ao Dr. J. M. Gutiérrez, pelas miotoxinas e veneno, sem eles este trabalho não teria sido realizado;

A Neusa Picon, pela amizade e ajuda durante toda a realização deste trabalho;

A Carla (Carlinha), pela amizade e os momentos bons dos congressos!

Ao Neco e Sudaca, pelos “papos no banquinho”, pelas festas e principalmente pela amizade.

Aos Rodrigos 1 e 2, pela amizade e proformas!

A todos os pesquisadores, pós-graduandos e funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, pela ajuda e amizade;

A Dra. Catarina F.P.Teixeira, pelo auxílio e dedicação no desenvolvimento deste trabalho;

A Denise, Érica, Ju, Lú, Cris, Estela e Mara, pela amizade;

Aos amigos (as) da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas, pela atenção, carinho e paciência com que me receberam;

Às bibliotecárias do Instituto Butantan, pelo apoio durante todo o período de realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação Butantan, pelo suporte financeiro;

Enfim,

A todos que de alguma forma participaram na realização deste trabalho,

Meu muito obrigado!!!! De ♥

Aos animais,
que deram a vida, sem direito de escolha.

“Um texto sempre vai depender de quem o leia. Assim, me considero agora completamente dependente de alguém, de qualquer, que me leia o texto, que me leia o coração”

autor desconhecido

Este trabalho foi realizado
no Laboratório de Fisiopatologia
do Instituto Butantan

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Papel do soro antiofídico.....	4
1.2- Fوسفولipasas A₂.....	6
1.3- Dor e Hiperálgia.....	11
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1- Animais.....	18
3.2- Veneno e Toxina.....	18
3.3- Antivenenos.....	18
3.4- Planejamento Geral.....	19
3.5- Avaliação da sensibilidade dolorosa.....	19
3.6- Avaliação do edema.....	20
3.7- Soroneutralização.....	21
3.8- Tratamentos Farmacológicos.....	22
3.9- Soluções utilizadas.....	24
3.10- Drogas e reagentes.....	24
3.11- Análise estatística.....	25

4. RESULTADOS.....	26
4.1- Caracterização dos efeitos hiperalgésico e edematogênico induzidos pelos veneno de <i>Bothrops jararaca</i>, <i>Bothrops asper</i> e pela miotoxina III.....	26
4.2- Capacidade dos antivenenos em neutralizar a hiperalgesia e o edema induzidos pelos venenos de <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Bothrops asper</i>	30
4.3- Efeito dos tratamentos farmacológicos sobre a hiperalgesia e o edema induzidos pelos venenos de <i>Bothrops jararaca</i>, <i>Bothrops asper</i> e pela miotoxina III.....	39
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

ABSTRACT

ABREVIATURAS

5-HT- 5- hidroxitriptamina
AMPc- adenosina monofosfato cíclico
AV- antiveneno
AVCP- antiveneno produzido no Instituto Clodomiro Picado da Costa Rica
AVIB- antiveneno produzido no Instituto Butantan
BK- bradicinina
CaNa₂EDTA- cálcio, disódio etilenodiaminotetracetato
e.v.- via endovenosa
FLA₂- fosfolipase A₂
GMPc- guanidil monofosfato cíclico
HETE- monohidroxicosatetranóico
HOE 140- D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸] bradicinina
i.p.- intraperitoneal
i.pl- intraplantar
IL- interleucina
IL1-ra- anticorpo anti-receptor de interleucina-1
LNMMA- N^g-Metil-₁-arginina
LPS- lipopolissacarídeo
LTB₄- leucotrieno B₄
MIII- miotoxina III
NDGA- ácido nor-dihidroguaiarético
NO- óxido nítrico
NOS- óxido nítrico sintase
PAF- fator ativador de plaqueta
PBS- tampão salina- fosfato
PGE₂- prostaglandina E₂
PGs- prostaglandinas
s.c.- subcutânea
SEM- soro equino normal
SNC- Sistema Nervoso Central
TNF- fator de necrose tumoral
TXA₂- tromboxano A₂
v.o.- via oral
VBa- veneno de *Bothrops asper*
VBj- veneno de *Bothrops jararaca*

RESUMO

Os venenos do gênero *Bothrops* induzem efeitos locais caracterizados por hemorragia, necrose, edema e dor intensa. Apesar da importância clínica do fenômeno de dor, os estudos sobre os mecanismos envolvidos na gênese deste fenômeno são ainda escassos. Além disso, não existem dados sobre a capacidade do antiveneno em neutralizar este fenômeno.

Neste trabalho foi investigada, a capacidade dos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e da miotoxina III (Fosfolipase A₂, variante Asp 49), uma toxina isolada do veneno de *Bothrops asper*, em induzir hiperalgesia em ratos, a mediação química deste fenômeno e a capacidade dos antivenenos em neutralizar esta ação dos venenos. A possível correlação entre a hiperalgesia e a resposta edematogênica causada pelos venenos ou miotoxina foi também avaliada.

O limiar de dor foi determinado antes e em diferentes tempos após a administração dos venenos ou toxina, empregando o teste de pressão de pata de rato. Para o estudo da resposta edematogênica, o aumento do volume das patas posteriores foi determinado por pletismografia. Os venenos e a toxina, administrados por via intraplantar, nas doses de 5µg (VBj), 15µg (VBa) ou 10µg (MIII), induziram hiperalgesia e edema, com respostas máxima na 1^a (VBj, MIII) ou 2^a (VBa) hora, não sendo mais detectadas na 24^a hora.

Para o estudo da neutralização, foram utilizados o antiveneno botrópico produzido no Instituto Butantan e o antiveneno polivalente produzido no Instituto Clodomiro Picado da Costa Rica, administrados por via endovenosa, 15 min. ou imediatamente antes ou 15 min. após a injeção dos venenos. O AVIB, quando injetado 15 min. antes do VBj, foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pelo veneno. Em relação ao edema, esta inibição foi observada quando o antiveneno foi administrado 15 min. ou imediatamente antes do VBj. Por outro lado, o AVCP

não interferiu com a dor e o edema acarretados pelo VBa. Quando o VBj e o VBa foram incubados, *in vitro*, por 30 min., a 37⁰C com os AV correspondentes, a hiperalgesia e o edema foram abolidos. Estes resultados indicam que a incapacidade do AVCP, quando administrado *in vivo*, de bloquear a hiperalgesia e o edema induzidos pelo VBa, não é consequência da ausência de anticorpos específicos no antiveneno, uma vez que estes efeitos foram inibidos quando o veneno foi pré-incubado com o antiveneno.

Para avaliação da mediação química da hiperalgesia e do edema, os animais foram submetidos a tratamentos com inibidores de síntese, antagonistas de receptores, anticorpos ou drogas depletoras destes mediadores. Os resultados mostraram que o Hoe-140, dexametasona e NDGA inibem a hiperalgesia induzida pelo VBa, enquanto que apenas a prometazina interferiu com o edema causado pelo veneno. A hiperalgesia induzida pela MIII foi revertida pelo tratamento com prometazina, metisergida, Hoe-140, dexametasona e por NDGA, enquanto que o edema foi inibido apenas por prometazina e dexametasona. Estes dados sugerem que: a) a MIII é um importante componente do veneno para a geração de hiperalgesia, b) a bradicinina e os derivados da lipoxigenase são mediadores da dor acarretada pelo VBa e pela MIII, c) histamina e serotonina participam também da hiperalgesia induzida pela miotoxina e d) a histamina é mediador do edema induzido pelo VBa e pela MIII. Com relação à hiperalgesia induzida pelo VBj, somente o tratamento com Hoe-140 diminuiu este fenômeno, indicando a participação da bradicinina. Por outro lado, este tratamento não foi capaz de interferir com o edema induzido por este veneno. Cabe ressaltar que TEIXEIRA *et al.* (1994) demonstraram a participação de eicosanóides e PAF na hiperalgesia induzida pelo VBj.

Os dados em conjunto sugerem ainda, dissociação entre os fenômenos de dor e edema acarretados por ambos os venenos e pela miotoxina.

ABSTRACT

Bothrops venoms cause pronounced local tissue-damage characterized by hemorrhage, myonecrosis, edema and pain. Venom-induced pain has been poorly investigated, despite its clinical relevance. Furthermore, the ability of antivenom to neutralize hyperalgesia induced by these venoms is not known.

In the present study the hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* (BjV) and *Bothrops asper* (BaV) venom and by myotoxin III-MIII (Asp49-phospholipase A₂), a toxin isolated from BaV, were investigated. The chemical mediators involved in these phenomena and the ability of the antivenom to neutralize the hyperalgesia and edema induced by these venoms were also investigated.

Pain threshold was assessed before and at several intervals after venom injection, using the rat paw pressure test. Edema of paw was measured phethismographically at the same periods of time. The intraplantar injection of BjV (5µg/paw), BaV (15µg/paw) or MIII (10µg/paw) caused hyperalgesia and edema, whose peak were observed at the 1st (BjV, MIII) or 2nd (BaV) hours after venom/toxin administration, decreasing thereafter.

For neutralization studies, the antivenoms produced either at Instituto Butantan from Brazil (AVIB) or Instituto Clodomiro Picado from Costa Rica (AVCP) were administered intravenously 15 min prior to, or immediately before, or 15 min after venoms injection. When the antivenom from Instituto Butantan was injected 15 min. before BjV, the hyperalgesia and edema were abolished. Furthermore, partial inhibition of edema was also observed when the antivenom was injected together with BjV. On the other hand, hyperalgesia and edema induced by BaV were not modified by AVCP.

Incubation of BjV and BaV, for 30 min. at 37°C, with the antivenoms *in vitro*, abolished the hyperalgesia and edema. The inability of the *in vivo* treatment with antivenom in abolishing hyperalgesia and edema induced by BaV seems not to be

related to the lack of neutralizing antibodies in antivenom, because neutralization was achieved in pre-incubation experiments.

In order to investigate the chemical mediation of hyperalgesia and edema induced by the venoms or toxin, animals were treated with several drugs. Pretreatment with Hoe-140, dexamethasone and NDGA blocked the hyperalgesia induced by BaV, whereas only promethazine reduced the edema induced by this venom. The MIII-induced hyperalgesia was blocked by promethazine, methysergide, Hoe-140, dexamethasone and NDGA, whereas the edema was reduced only by promethazine and dexamethasone. These results suggest that: a) MIII may contribute to the BaV-induced hyperalgesia, b) bradykinin and leukotrienes mediate the BaV- and MIII-induced pain and MIII; c) histamine and serotonin also participate in the myotoxin-induced hyperalgesia and d) the edema induced by BaV and MIII is mediated by histamine.

Pre-treatment of the animals with Hoe-140 abolished BjV-induced hyperalgesia, suggesting that bradykinin may mediate the venom-induced hyperalgesia. However, this treatment did not modify the BjV-induced edema. It is important to stress that previous studies have shown that BjV-induced hyperalgesia is mediated, at least partially, by eicosanoids and PAF (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

The data presented herein also suggest that distinct mechanisms may be involved in the development of hyperalgesia and edema induced by both venoms and myotoxin III.

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam, ainda, grave problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Anualmente, são relatados cerca de 20.000 acidentes no Brasil e cerca de 4.000 na América Central (SAÚDE, 1991; ARROYO *et al.*, 1999). Em geral, estes acidentes ocorrem com indivíduos do sexo masculino, pertencentes a uma faixa etária produtiva (SAÚDE, 1998).

Na América Latina, a grande maioria dos acidentes ofídicos é causada por serpentes do gênero *Bothrops* (família *Viperidae*). No Brasil, a espécie *Bothrops jararaca* (jararaca- Fig. 1A) é responsável por 90% dos acidentes ofídicos (SAÚDE, 1998) e a espécie *Bothrops asper* (terciopelo- Fig 1B) é responsável por 60% dos acidentes na Costa Rica (BOLAÑOS, 1982; ARROYO *et al.*, 1999).

A**B**

Fig. 1- Serpente *Bothrops jararaca* (A) e *Bothrops asper* (B)

Os efeitos causados pelo envenenamento botrópico podem ser classificados, clinicamente, de acordo com a presença de manifestações sistêmicas e locais.

Do ponto de vista sistêmico, as atividades coagulante, hemorrágica e proteolítica destes venenos têm sido bem estudadas (ROSENFELD & KELEN, 1971; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). As alterações de coagulação sanguínea são consideradas as reações sistêmicas mais importantes (KAMIGUTI & SANO-

MARTINS, 1995). A maioria dos venenos botrópicos ativa a coagulação sanguínea, por atuarem sobre o fibrinogênio, a protrombina (Fator II), o Fator X (NAHAS *et al.*, 1964; 1979) e o Fator VIII (KIRBY *et al.*, 1979; NISHIDA *et al.*, 1994). A coagulopatia de consumo, conseqüente à ativação da coagulação, determina incoagulabilidade sanguínea, representada, clinicamente, por sangramentos espontâneos, como gengivorragia e púrpuras. As principais causas de óbitos no envenenamento botrópico, estão relacionadas à insuficiência renal aguda (AMARAL *et al.*, 1985; 1986), sangramentos em órgãos vitais e choque (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1991).

Além de alterações na coagulação sanguínea, fatores hemorrágicos, presentes nestes venenos, contribuem para o desenvolvimento de distúrbios hemostáticos sistêmicos (KAMIGUTI *et al.*, 1991; 1992). As toxinas hemorrágicas são consideradas os principais fatores responsáveis pela hemorragia causada por peçonhas ofídicas (BJARNASON & FOX, 1988). Estas toxinas foram caracterizadas como metaloproteinases dependentes de zinco, capazes de romper a membrana basal dos vasos sanguíneos (BJARNASON & FOX, 1994). Diversas metaloproteinases hemorrágicas foram isoladas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrops jararaca* (MANDELBAUM *et al.*, 1982; MARUYAMA *et al.*, 1992; PAINE *et al.*, 1992) e *Bothrops asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995).

Os venenos botrópicos apresentam a importante peculiaridade de induzir sérias reações locais. Observa-se, no local da picada, dor forte, presença de exsudato purulento, edema intenso, equimose com material sero-sanguinolento e mionecrose (BOLAÑOS, 1982; BRAZIL, 1914; ROSENFELD, 1971) O edema pode acometer vários segmentos do membro afetado e, dependendo das proporções que adquire, acarreta aumento da pressão sangünea, em compartimentos que contém músculos, nervos e vasos, levando à síndrome

compartimental. O quadro local pode evoluir para necrose e, muitas vezes, determinar a perda do membro afetado (ROSENFELD, 1971).

Estudos experimentais têm evidenciado que a resposta inflamatória local, induzida por venenos do gênero *Bothrops*, é caracterizada por exsudação de proteínas plasmáticas e decorre da síntese e/ou liberação de mediadores endógenos, como histamina, serotonina, eicosanóides e fator ativador de plaquetas (PAF), além da ativação de receptores adrenérgicos α_1 e α_2 (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; TREBIEN & CALIXTO, 1989; CHAVES *et al.*, 1995). A lesão local é caracterizada ainda, pela presença de células inflamatórias. GUTIÉRREZ *et al.* (1986) e LOMONTE *et al.* (1993) demonstraram a que o veneno de *Bothrops asper* induz influxo leucocitário no tecido muscular de camundongos. A migração de neutrófilos para o foco da lesão, foi também observada após a administração de veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops erythromelas* e *Bothrops alternatus* (FLORES *et al.*, 1993; BURIGO *et al.*, 1996; FARSKY *et al.*, 1997). O recrutamento leucocitário acarretado pelo veneno de *Bothrops jararaca* acompanha a liberação de mediadores lipídicos, particularmente leucotrieno B₄ (LTB₄) e tromboxana A₂ (TXA₂), além da ativação do sistema complemento (FARSKY *et al.*, 1997). A participação de mediadores lipídicos nos fenômenos locais induzidos pelos venenos botrópicos indica que enzimas com atividade de fosfolipase A₂, presentes nestes venenos ou liberadas pela atuação dos mesmos, são relevantes para estes fenômenos (VIDAL *et al.*, 1972; ROTHSCHILD & ROTHSCHILD, 1979; GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; MOURA DA SILVA *et al.*, 1991; CHAVES *et al.*, 1998).

As lesões locais causadas por venenos do gênero *Bothrops*, com exceção do fenômeno da dor, têm sido amplamente investigadas, possibilitando o entendimento dos mecanismos farmacológicos e fisiopatológicos envolvidos na gênese destes fenômenos e a caracterização das substâncias presentes nestes venenos, responsáveis pelo quadro local. Apesar da importância clínica do

fenômeno de dor, poucos estudos foram realizados com o intuito de caracterizar os mecanismos envolvidos na gênese deste fenômeno.

Estudos pioneiros realizados por TEIXEIRA *et al.* (1994) demonstraram que o veneno de *Bothrops jararaca* acarreta hiperalgesia em ratos, mediada, ao menos em parte, por prostaglandinas, leucotrienos e PAF. Estes dados indicam, adicionalmente, a importância da atividade fosfolipásica e da geração de mediadores lipídicos para a indução da reação local, neste caso, da hiperalgesia.

Com relação aos envenenamentos causados por serpentes *Bothrops asper*, o efeito hiperalgésico e os mecanismos envolvidos no fenômeno causado por este veneno não foram ainda determinados.

1.1- Papel do soro antiofídico

O único tratamento conhecido e eficiente nos casos de acidentes ofídicos é a soroterapia específica (WARRELL, 1992). Antes da utilização da soroterapia, os envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* apresentavam prognóstico de morte de 2 a 3%, estando hoje reduzido para 0,5 a 0,6%.

Os antivenenos, produzidos pela administração do veneno em cavalos, contém anticorpos que neutralizam muitos dos efeitos sistêmicos e locais induzidos pelos venenos ofídicos (COETZER & TILBURY, 1982).

O soro antiofídico é eficaz na neutralização dos efeitos sistêmicos particularmente das alterações da coagulação sanguínea (CARDOSO *et al.*, 1993) e tem contribuído para a diminuição, ao longo do tempo, dos casos de letalidade (ROSENFELD, 1971; CARDOSO *et al.*, 1993).

O soro antiofídico, diferentemente de sua ação no quadro sistêmico, não neutraliza de modo eficaz as reações locais acarretadas pelos venenos ofídicos, ainda que administrado logo após o acidente (EICHBAUM, 1947; ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981; 1985; 1986; CARDOSO *et al.*, 1993; JORGE &

RIBEIRO, 1997; AGUIAR *et al.*, 1998). Mesmo após o tratamento com o soro, as lesões locais, particularmente o edema, progridem nas primeiras 24 horas, mantendo-se por vários dias (DOMINGOS, 1992).

A ineficácia do antiveneno em neutralizar os efeitos locais constitui um dos mais sérios problemas no tratamento do envenenamento botrópico. Algumas hipóteses são sugeridas para explicar esta ineficácia: 1) os efeitos locais, em geral, instalam-se rapidamente, o que, até o período de administração do soro, contribui para dificultar a reversão do processo já iniciado (DOMINGOS, 1992); 2) a maioria dos componentes do veneno, que desencadeiam os efeitos locais, são proteínas de baixo peso molecular (TU, 1982) e pouco imunogênicas em cavalos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1985), de modo que os antivenenos convencionais não contém anticorpos capazes de neutralizar os constituintes responsáveis pelos efeitos locais.

A dose de soro empregada no tratamento é determinada de acordo com a sintomatologia do envenenamento, classificada em leve, grave e moderada. Existem muitas controvérsias quanto à dosagem terapêutica e acredita-se que a administração de doses excessivas de soro tem contribuído para a alta incidência de reações anafiláticas observadas nos tratamentos (JORGE & RIBEIRO, 1997).

A utilização de fármacos, como terapêutica complementar à soroterapia, ainda não foi estabelecida, uma vez que não estão totalmente caracterizados os mecanismos envolvidos nas ações locais induzidas por estes venenos. Desta forma, estes efeitos locais, com exceção da dor, têm sido estudados de modo intenso, particularmente nesta última década. Alguns estudos experimentais têm indicado que a utilização de heparina poderia ser benéfica no tratamento das reações locais em alguns envenenamentos ofídicos (MELO & SUAREZ-KURTZ, 1988; MELO *et al.*, 1993). MELO & SUAREZ (1988) observaram que a heparina tem ação inibitória sobre os efeitos miotóxicos de venenos botrópicos, além de potenciar a ação do antiveneno específico. Ainda em relação à heparina,

LOMONTE *et al.* (1994) demonstraram que este fármaco se liga à miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂, presentes no veneno de *Bothrops asper*, o que pode contribuir para a neutralização do efeito miotóxico das mesmas.

1.2- Fosfolipases A₂

Como assinalado, os veneno botrópicos causam efeitos locais graves em homens e animais, caracterizados por hemorragia, edema, dor intensa e necrose (ROSENFELD & KALEN, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981). Estes efeitos têm sido atribuídos à ação de proteases (MANDELBAUM *et al.*, 1982; VITAL-BRAZIL, 1982), fatores hemorrágicos (HOUSSAY, 1930; ASSAKURA *et al.*, 1986) e fosfolipases (VIDAL *et al.*, 1972; GUTIÉRREZ *et al.*, 1985), presentes nesses venenos, bem como à liberação de compostos farmacologicamente ativos gerados pela ação dos venenos (ROTHSCHILD & ROTHSCHILD, 1979).

As fosfolipases A₂ são particularmente abundantes nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (MOURA DA SILVA *et al.*, 1991) e compreendem um grupo importante de enzimas presentes na maioria dos venenos e secreções orais de serpentes (TU, 1977; HARRIS, 1991). Além da função digestiva sobre a presa, tais enzimas, por interferirem com processos fisiológicos, causam vários efeitos farmacológicos e fisiopatológicos, caracterizados por efeitos neurotóxico, cardiotoxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, hemorrágico, inflamatório e mionecrótico (ROSENBERG, 1986; 1990; HARRIS, 1991).

As FLA₂ ou fosfatidil-acil-hidrolases (EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação acil-éster, na posição sn-2 de fosfoglicerídeos. Esta reação é dependente de íons cálcio e libera quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (HANAHAN, 1971; SLOTBOOM *et al.*, 1982). A unidade catalítica dessas enzimas é formada por His-48, Asp-99 e uma molécula de água (FREMONT *et al.*, 1993); os resíduos que

participam da alça de ligação para os íons Ca^{+2} são a Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e Asp-49.

Atualmente, as fosfolipases estão genericamente divididas em dois grandes grupos: as FLA₂ extracelulares ou de baixo peso molecular (14-18 kDa), também denominadas fosfolipases não pancreáticas ou secretadas (sFLA₂) e as FLA₂ intracelulares, de alto peso molecular (31-110 kDa), de origem citosólica (cFLA₂).

As sFLA₂ estão subdivididas em três grupos e diversos sub-grupos, com base na sequência de aminoácidos (HEINRIKSON *et al.*, 1977; DAVIDSON & DENNIS, 1990): grupo I, que compreende as enzimas encontradas no pâncreas de mamíferos e venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hidrophidae*. Estas fosfolipases são constituídas por aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos ligados por sete pontes dissulfídicas e são secretadas como zimogênio, manifestando sua atividade enzimática de forma limitada e somente através da clivagem protéica; grupo II, constituído por enzimas com 125 a 130 resíduos de aminoácidos. Estas FLA₂ são encontradas em venenos de serpentes da família *Viperidae* (subfamílias *Viperinae* e *Crotalinae*), no fluído sinovial humano e plaquetas (MURAKAMI *et al.*, 1995); grupo III, representado pelas FLA₂ de venenos de abelhas e do lagarto *Heloderma*. As sFLA₂ são também encontradas em exsudatos inflamatórios e grânulos de plaquetas e mastócitos (CLARK *et al.*, 1990; TAKAYAMA *et al.*, 1991).

As cFLA₂ foram isoladas do citosol de plaquetas e monócitos e expressam sua atividade catalítica em presença de concentrações mínimas de íons cálcio. Acredita-se que essas cFLA₂ são ativadas por estímulos ligados à transdução de sinal (CLARK *et al.*, 1991; SHARP *et al.*, 1991).

De modo geral, a ativação das fosfolipases depende de sua interação com grandes agregados lipídicos, em interfaces de lipídeo/água, o que permite a difusão do substrato para o sítio ativo. A natureza dessa interação ainda não está totalmente esclarecida e tem sido investigada empregando fosfolipases de venenos

animais e pancreáticas. Dessa forma, as enzimas isoladas de venenos de serpentes têm sido úteis como ferramentas para compreensão do mecanismo e de parâmetros de interação de enzimas solúveis com interfaces de fosfolipídeos.

As FLA₂ são enzimas importantes para a atividade celular, pois hidrolizam fosfolipídeos de membrana e constituem a via predominante para a produção de ácido araquidônico, precursor de segundos mensageiros que incluem as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. Ainda, por hidrolizarem 1-o, alquil, 2-araquidonil-glicerofosfocolina, algumas enzimas geram o liso-PAF, precursor do fator ativador de plaquetas (PAF). Os derivados do ácido araquidônico e o PAF, além de mediadores de fenômenos fisiológicos, estão envolvidos em vários processos inflamatórios (VISHWANATH *et al.*, 1988; SEILHAMER *et al.*, 1989; MURAKAMI *et al.*, 1990; OKA & ARITA, 1991).

A participação das fosfolipases do grupo II, em processos em que há o desenvolvimento de reação inflamatória, como artrite reumatóide e asma, está bem estabelecido. No fluído sinovial e sangue periférico de pacientes com artrite, foram detectadas taxas elevadas de prostaglandinas e leucotrienos, demonstrando a importância das FLA₂ na gênese deste fenômeno (BOMALASKI & CLARK, 1993). Vários dados sobre a atividade inflamatória destas enzimas estão baseados em estudos experimentais, utilizando FLA₂ purificadas de pâncreas e de venenos ofídicos (Pruzanski & Vadas, 1989; Vadas *et al.*, 1985). As fosfolipases induzem edema em animais (BRAIN *et al.*, 1977; VISHWANATH *et al.*, 1987; CIRINO *et al.*, 1989; CHAVES *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1991), acarretam desgranulação de mastócitos *in vivo* (DAMERAU *et al.*, 1975) e induzem infiltrado leucocitário na cavidade pleural ou bolsa de ar em ratos e em pele de coelho (PRUZANSKI *et al.*, 1985; BOMALASKI *et al.*, 1991; CIRINO *et al.*, 1994; ZHANG & GOPALAKRISHNAKONE, 1999; CASTRO *et al.*, 2000). Alguns destes efeitos não estão diretamente relacionados à atividade enzimática destas fosfolipases. Pelo menos três mecanismos são propostos para os efeitos pró-inflamatórios das sFLA₂:

a) atividade enzimática, b) quantidade de sítios positivos na molécula e c) presença de um sítio farmacológico com participação de resíduos positivos (WANG & TENG, 1990a; 1990b). Adicionalmente às ações pró-inflamatórias destas enzimas, foi verificado que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF α acarretam, em vários tecidos, a transcrição gênica de FLA₂ e o aumento subsequente da secreção destas enzimas (CROWL *et al.*, 1991; NAKAZATO *et al.*, 1991; SCHALKWIJK *et al.*, 1991). Estes achados reforçam a hipótese do envolvimento das fosfolipases na inflamação e colocam estas enzimas como ferramentas de pesquisa, importantes para estudos farmacológicos da resposta inflamatória.

A miotoxicidade é outra importante ação destas fosfolipases, particularmente daquelas presentes em venenos animais. Cabe ressaltar que, nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, a miotoxicidade é um efeito local relevante (QUEIROZ & PETTA, 1984; QUEIROZ *et al.*, 1985; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Dados da literatura sugerem que esse efeito é causado tanto por ação direta das fosfolipases, afetando a integridade da membrana plasmática das células musculares e/ou indireta, quanto pela isquemia dos vasos da microcirculação e artérias intramusculares (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; QUEIROZ & PETTA, 1984).

A atividade fosfolipásica parece ser importante mas não suficiente para o efeito lesivo sobre as células musculares. As miotoxinas isoladas de venenos botrópicos, embora apresentem grande homologia sequencial e estrutural entre si, não possuem atividades catalíticas e biológicas semelhantes. Assim, um importante grupo de FLA₂ miotóxicas, contendo aspartato na posição 49 (Asp 49), apresenta alta atividade catalítica, como as miotoxinas de *B. atrox*, *B. godmani* (DÍAZ *et al.*, 1991), miotoxina III de *B. asper* (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995) e frações SIII e SIV de *B. insularis* (SELISTRE *et al.*, 1990). No entanto, outras FLA₂ homólogas, com baixa ou nenhuma atividade catalítica,

mantém potente atividade miotóxica. Como exemplo, citam-se a miotoxina II do veneno de *B. asper* e BTX-I de *B. jararacussu*, as quais contêm uma molécula de lisina na posição 49 (Lys-49) (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). A substituição do resíduo Asp por Lys na posição 49, afeta drasticamente a capacidade de ligação destas proteínas ao íon cálcio, cofator essencial para a estabilização do intermediário tetraédrico, no mecanismo catalítico (VAN DEN BERGH *et al.*, 1988; SCOTT *et al.*, 1990; OWNBY *et al.*, 1999, para revisão). Apesar da baixa atividade enzimática, as FLA₂-Lys 49 homólogas mantêm a habilidade de lesar membranas biológicas e sintéticas, por um mecanismo pouco conhecido e independente de cálcio (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; RUFINI *et al.*, 1992). Este fato é intrigante, uma vez que essas FLA₂ conservam os resíduos essenciais do sítio catalítico (His-48, Asp-99 e uma molécula de água). É possível que essas FLA₂ contenham uma região da molécula, distinta do sítio catalítico, que seja importante para a sua atividade fisiopatológica. Neste contexto, LOMONTE *et al.* (1994) sugerem que uma região da molécula da miotoxina II de *B. asper*, rica em grupamentos hidrofóbicos e catiônicos, próxima do C-terminal, seja relevante para a atividade miotóxica da mesma. Mais recentemente, LOMONTE *et al.* (2000) demonstraram que a região 115-129 da miotoxina II constitui o principal sítio responsável pelo efeito miotóxico. Os resíduos catiônicos e hidrofóbicos desta região, contribuem para o mecanismo de lesão celular desta toxina.

Cabe ressaltar que o veneno de *Bothrops asper* é composto por diversas proteínas, sendo que as miotoxinas básicas correspondem a cerca de 15-25% do veneno total (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). Várias destas miotoxinas foram isoladas do veneno bruto: Miotoxina I e III (variante, Asp-49), com atividade enzimática, miotoxina II (variante, Lis-49) e IV, sem atividade enzimática. Estudos realizados por GUTIÉRREZ & LOMONTE (1995) e CHAVES *et al.* (1998), mostraram que estas toxinas, além de efeito miotóxico,

induzem edema em camundongos e que este edema é pelo menos em parte, mediado por prostaglandinas e mediadores adrenérgicos.

1.3- Dor e Hiperalgisia

Dor transitória é normalmente observada quando fibras nervosas primárias aferentes do tipo C e A δ são ativadas por estímulos breves de alta intensidade, que produzem pouco ou nenhum dano tecidual. Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, as fibras nervosas, particularmente as do tipo C, são ativadas por estímulos de baixa intensidade, acarretando dor mais persistente. Neste caso, a sensibilização dos receptores da dor (nociceptores), causando hiperalgisia, é o denominador comum de todos os tipos de dor inflamatória. O fenômeno de hiperalgisia envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas, pela ação de mediadores químicos, quanto facilitação central (corno dorsal da medula espinhal e tálamo) da transmissão nervosa (LEVINE *et al.*, 1993; DRAY, 1994).

O mecanismo pelo qual diferentes estímulos evocam a atividade das terminações nervosas nociceptivas, é compreendido apenas vagamente. Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual representa a causa imediata da dor. Esta lesão resulta na liberação local de diversos mediadores químicos que irão agir sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente, ou exacerbando sua sensibilidade para outras formas de estímulos (hiperalgisia).

É importante salientar que, além dos receptores polimodais C, um grupo adicional de nociceptores, denominados receptores “silenciosos” ou “adormecidos” (silent nociceptors/ sleeping nociceptors), são ativados durante processos inflamatórios, contribuindo para a hiperalgisia. Estas fibras aferentes são encontradas na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAIBLE & SCHMIDT, 1988; SCHEMELZ *et al.*, 1994).

A indução de hiperalgesia está baseada na teoria da "porta hiperalgésica", a qual considera que, quando o nociceptor está inativo, existe equilíbrio entre os níveis intracelulares de Ca^{2+} , AMPc e GMPc. Na vigência de hiperalgesia, ocorre incremento das concentrações intracelulares de AMPc, aumento do influxo de Ca^{++} intracelular, com conseqüente despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nervoso (FERREIRA, 1994, para revisão).

Várias substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório, tais como cininas, eicosanóides, neuropeptídeos, citocinas, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, entre outros, podem interferir com a atividade de fibras nervosas sensitivas aferentes. Estes mediadores, através da atuação em receptores específicos e geração de segundos mensageiros, agem: (a) ativando diretamente os nociceptores, causando dor (bradicinina, histamina e substância P, por exemplo) ou (b) induzindo hiperalgesia (eicosanóides, serotonina, dopamina). Alguns dos mediadores que ativam diretamente os nociceptores podem acarretar, também, hiperalgesia, pela liberação de agentes hiperalgésicos (CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1993; DRAY, 1995; 1997b).

As aminas básicas, como histamina e serotonina, em altas concentrações, podem atuar em neurônios nociceptivos, causando dor (SIMONE *et al.*, 1991). Os neurônios sensitivos expressam receptores H1, para histamina. A ativação destes receptores aumentam a permeabilidade ao cálcio, acarretando a liberação de neuropeptídeos e a síntese e liberação de PGs e HETEs. A liberação destes mediadores acarreta efeitos hiperalgésicos e pró-inflamatórios (RANG *et al.*, 1994). A serotonina, através da atuação em receptores 5HT-3, também causa excitação direta de neurônios sensitivos, por aumentar a permeabilidade ao sódio, levando à sensibilização de nociceptores (DRAY, 1995).

As cininas, através da atuação em receptores B1 e B2, são potentes substâncias algogênicas e podem produzir dor tanto por estimulação direta de nociceptores como por mecanismos hiperalgésicos (BECK & HANDWERKER,

1974; DRAY, 1995, para revisão). A bradicinina é considerada um dos mediadores mais importantes para a gênese da dor inflamatória (STERANKA *et al.*, 1988; DRAY & PERKINS, 1993).

Os receptores B2, acoplados à proteínas G, estão presentes em neurônios sensitivos. A estimulação destes receptores é acompanhada da ativação da proteína quinase C, aumento da permeabilidade aos íons sódio, influxo de cálcio, com consequente ativação de fibras nervosas e liberação de neuropeptídeos, como substância P, além da produção de ácido aracdônico e eicosanóides (THAYER *et al.*, 1988; DRAY, 1995, para revisão).

Os receptores B2 têm papel predominante na mediação da resposta hiperalgésica (FERREIRA *et al.*, 1993; HEAPY *et al.*, 1993), mas vários dados da literatura têm demonstrado que a hiperalgesia induzida por bradicinina é mediada por ambos os receptores B1 e B2 (PERKINS & KELLY, 1993; DAVIS & PERKINS, 1994; POOLE *et al.*, 1999). CAMBRIDGE & BRAIN (1998) demonstraram, em modelos de inflamação crônica no rato, incluindo artrite, que a ativação do receptor B1 causa hiperalgesia e edema, além de contribuir para o acúmulo de células inflamatórias.

Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1, IL-6, e o fator de necrose tumoral (TNF) induzem, em uma grande variedade de tecidos, a transcrição gênica de fosfolipase A₂ e o subsequente aumento na secreção dessas enzimas (CROWL *et al.*, 1991; RECKLIES & WHITE, 1991; SCHALKWIJK *et al.*, 1991). Assim, estas interleucinas, através da liberação de eicosanóides, são fatores importantes para o desenvolvimento de hiperalgesia (Ferreira, 1994; DRAY 1995, para revisão). Ainda, a IL-8, através da liberação de aminas simpatomiméticas, é responsável também pela indução de hiperalgesia (FERREIRA, 1994).

Os eicosanóides e as aminas simpatomiméticas são considerados os mediadores finais na indução da hiperalgesia inflamatória, para alguns agentes

lesivos, como carragenina, LPS e bradicinina. (CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA, 1994; ; DRAY, 1995, para revisão; WOOLF *et al.*, 1997). Estes agentes induzem hiperalgesia através da liberação de TNF α , apontado como o mediador inicial deste fenômeno. O TNF α , por sua vez, estimula a secreção de IL-1 e IL-6, responsáveis pela produção de eicosanóides, e de IL-8, responsável pela liberação de aminas simpatomiméticas (CUNHA *et al.*, 1992).

Os eicosanóides e o fator ativador plaquetário, além de mediadores de fenômenos fisiológicos, estão envolvidos em vários processos inflamatórios e algogênicos (SEILHAMER *et al.*, 1989; MURAKAMI *et al.*, 1990; OKA & ARITA, 1991). Estes mediadores não causam dor, mas acarretam sensibilização de neurônios sensitivos e hiperalgesia (FERREIRA, 1994; DRAY, 1995, para revisão). As prostaglandinas, atuando em receptores específicos, acoplados a segundo mensageiros, acarretam aumento dos níveis intracelulares de AMPc, contribuindo para a hiperalgesia. Vários dados têm demonstrado que o leucotrieno B₄ (LTB₄) também causa hiperalgesia, por diminuir o limiar de ativação das fibras C para estímulos nociceptivos mecânicos e térmicos (LEVINE *et al.*, 1993). O LTB₄ age indiretamente, via liberação de 8R,15 S-di HETE (VARGAFTIC & FERREIRA, 1981; DRAY, 1995, para revisão). Por outro lado, VARGAFTIG *et al.* (1981) demonstraram que injeção subcutânea de PAF em ratos, causa edema e hiperalgesia, dose-dependentes e de curta duração. A ação do PAF não é direta, mas dependente da síntese de leucotrienos (DALLOB *et al.*, 1987).

As aminas simpatomiméticas, como noradrenalina e dopamina promovem regulação funcional dos nociceptores durante o processo inflamatório. O efeito destas aminas parece ser indireto, através da geração de metabólitos do ácido aracdônico (NAKAMURA & FERREIRA, 1987; MCMAHON, 1991; LEVINE *et al.*, 1993; FERREIRA, 1994; DRAY, 1995, para revisão). Em alguns casos, o

receptor dopaminérgico DA-1 é o responsável pelo componente simpático da hiperalgesia inflamatória (NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

O óxido nítrico é um outro mediador importante no processo algógeno, porém, a participação do NO, como mediador de dor, é ainda bastante controverso, uma vez que vários dados de literatura têm evidenciado também ação analgésica periférica para este gás (NAKAMURA & NAKAMURA, 1996; LEVY & ZOCHODNE, 1998).

Várias hipóteses, não mutuamente exclusivas, têm sido propostas para explicar o efeito algogênico do óxido nítrico: a) aumento da liberação, pelo NO, de substâncias algésicas, b) inibição da ação periférica de substâncias antinociceptivas endógenas e/ou c) estimulação direta do nociceptor (ANBAR & GRATT, 1997, para revisão).

Por outro lado, o efeito analgésico do NO parece ser consequente ao aumento dos níveis intracelulares do GMPc na fibra nervosa, o que acarreta abertura de canais de K^+ e hiperpolarização da membrana celular, levando à reversão do “estado” de hiperalgesia (FERREIRA, 1994, para revisão).

É importante salientar que, além da estimulação das fibras nervosas sensitivas por mediadores algogênicos, vários eventos que caracterizam o processo inflamatório podem contribuir para a gênese da dor inflamatória. Alterações do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular local, migração e ativação de leucócitos, liberação de outros mediadores químicos e de fatores de crescimento, formação de edema e alterações do pH local interferem com a atividade das fibras nervosas (DRAY, 1995, para revisão).

*

* *

Em conjunto, os dados apresentados evidenciam que venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são misturas complexas de proteínas que, quando injetados em humanos e animais, promovem alterações sistêmicas e locais complexas. Dentre os efeitos locais, a dor, apesar da importância clínica, é pouco estudada e os mecanismos envolvidos na sua gênese não estão totalmente caracterizados. Por outro lado, não existem dados experimentais sobre a capacidade do antiveneno botrópico neutralizar este fenômeno.

Apesar da existência de dados mostrando que a liberação de mediadores lipídicos com atividade hiperalgésica, contribui para a dor acarretada pelo veneno de *B. jararaca*, a participação de outros mediadores hiperalgésicos como bradicinina, interleucinas e aminas simpatomiméticas na dor induzida por este veneno não foi caracterizada, até o presente momento. Em relação ao veneno de *B. asper*, não existem estudos clínicos ou experimentais sobre a atividade algogênica deste veneno, ou mesmo, a possível correlação entre este fenômeno e a resposta inflamatória local (edema) acarretada pelo mesmo.

É importante salientar que foram isoladas fosfolipases do veneno de *B. asper*, com ou sem atividade catalítica, que contribuem para os efeitos miotóxicos e edematogênicos deste veneno. Contudo, não foi determinado, até o momento, a importância destas enzimas, em particular, da miotoxina III (fosfolipase A₂, variante Asp-49), para a dor acarretada por este veneno.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- 1- avaliar a cinética da resposta hiperalgésica induzida pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* e pela miotoxina III (FLA₂, variante Asp-49) isolada do veneno de *B. asper*.
- 2- avaliar a capacidade do antiveneno em neutralizar a hiperalgesia induzida por estes venenos.
- 3- caracterizar a mediação química da hiperalgesia induzida pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* e pela MIII.
- 4- avaliar a possível correlação entre as respostas hiperalgésica e edematogênica causadas por esses venenos ou pela miotoxina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais: Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 170-190g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em uma sala apropriada, sob luz natural e temperatura ambiente, com livre acesso a água e ração, por um período de três dias antes dos experimentos.

3.2- Venenos e Toxina: Foram utilizados venenos extraídos de vários espécimes adultos de serpentes *Bothrops jararaca* (VBj) ou de *Bothrops asper* (VBa), fornecidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Brasil e pelo Instituto Clodomiro Picado da Costa Rica, respectivamente. Foi também empregada uma fosfolipase A₂, variante Asp-49 (miotoxina III), isolada do veneno de *B. asper*, fornecida pelo Instituto Clodomiro Picado (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1989; KAISER *et al.*, 1990). Os venenos ou a toxina, liofilizados, foram mantidos a 20° C e preparados (p/v) em solução estéril de NaCl 0,85%, no momento do uso.

3.3- Antivenenos: Foi utilizado antiveneno botrópico, fornecidos pela Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan, obtido de plasma hiperimune de cavalos. Para a obtenção do soro, as cavalos foram imunizados com uma mistura de venenos de serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moogeni*, *B. neuwiedi* e *B. alternatus* (lotes n° 9710158 e 9805055, potência frente ao veneno de *B. jararaca*- 5mg/ml). O antiveneno produzido no Instituto Clodomiro Picado foi obtido após imunização com os venenos de *B. asper*, *Crotalus durissus* e *Lachesis muta* (lote n° 2811096, potência frente ao veneno *B. asper*- 5mg/ml). Os soros foram mantidos a 4°C até o momento da utilização.

3.4-Planejamento Geral: Para a caracterização da cinética da resposta hiperalgésica e edematogênica, os venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* ou a miotoxina III foram injetados nos animais, pela via intraplantar (i.pl.) e a sensibilidade dolorosa ou o desencadeamento do edema avaliados pelo teste de pressão da pata de ratos ou por pletismografia, respectivamente, em diversos períodos de tempo após as injeções. Para a determinação da mediação química envolvida nestes fenômenos, foram realizados tratamentos farmacológicos com antagonistas de receptores, inibidores da síntese ou drogas depletoras destes mediadores ou anticorpos anticitocinas, administrados previamente ao veneno ou toxina, por diferentes vias.

Uma vez que os mediadores ora investigados estão envolvidos na gênese da dor ou do edema induzidos por carragenina (um polissacarídeo extraído de algas), este agente lesivo foi empregado como controle positivo em alguns dos ensaios (FERREIRA *et al.*, 1988; 1993; CUNHA *et al.*, 1991).

Cabe ressaltar que alguns mediadores químicos envolvidos na hiperalgesia e no edema induzidos pelo VBj, foram investigados previamente por TEIXEIRA *et al.*(1994) e TREBIEN & CALIXTO (1989), respectivamente.

Para investigar a capacidade do antiveneno em neutralizar a hiperalgesia e o edema induzidos pelos venenos, os antivenenos foram administrados por via endovenosa, antes, simultaneamente ou após a injeção i.pl. dos venenos, ou incubados com os venenos, *in vitro*, previamente à injeção intraplantar.

3.5-Avaliação da sensibilidade dolorosa: Foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy- Meter Ugo Basile, Itália), realizado de acordo com o método descrito por RANDALL & SELLITO (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a

reação de “retirada “do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (em g) necessária para indução desta reação (Fig. 2).



Fig. 2- Analgesímetro Ugo Basile

Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e em diversos tempos após (medidas finais) a administração i.pl. dos venenos, toxina ou salina estéril (animais controle). Os venenos ou toxina, diluídos em salina estéril foram administrados em um volume total de 100 μ l.

Os resultados foram analisados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.6-Avaliação do edema: Os venenos ou a toxina foram administrados nas mesmas doses e utilizadas para o estudo da hiperalgesia, por via i.pl., em uma das patas posteriores dos ratos. A pata contralateral foi injetada com igual volume de salina (controle).

Para a avaliação do edema, o volume das patas posteriores, até a articulação tíbio-társica, foi medido antes e em diversos tempos após os tratamentos, com o auxílio de pletismógrafo (Plethysmometer Ugo Basile, Itália), de acordo com a técnica descrita por VAN ARMAN *et al.* (1965).

O aumento percentual das patas foi calculado através da expressão:

$$E(\%) = \frac{(V_f - V_o)}{V_o} \times 100$$

onde: E(%)= aumento porcentual do volume da pata

V_o= volume inicial da pata

V_f= volume da pata após injeção do veneno/toxina ou salina

O resultado final foi obtido subtraindo-se os valores controles (patas injetadas com salina) dos valores testes (patas injetadas com os irritantes).

3.7- Soroneutralização:

- soroneutralização *in vitro*: os venenos foram incubados com diferentes concentrações dos respectivos antivenenos (em diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, V/V), durante 30 minutos, à 37° C. Após a incubação, as misturas foram injetadas em uma das patas posteriores do rato e os ensaios de hiperalgesia ou edema realizados conforme descrito nos ítems 3.6 e 3.7. Os animais controles receberam, pela mesma via, mistura de veneno/salina ou antiveneno/salina, nas mesmas condições experimentais;
- soroneutralização *in vivo*: os antivenenos ou salina (grupo controle) foram administrados, por via e.v., 15 minutos antes, imediatamente antes ou 15 minutos após a administração i.pl. dos venenos. Os ensaios de hiperalgesia ou edema foram realizados conforme descrito nos ítems 3.6 e 3.7.

Como grupo controle adicional, foi utilizado, em ambos os ensaios e nas mesmas condições experimentais, soro equino normal (SEM), fornecido pelo Instituto Butantan, em substituição aos soros hiperimunes. Este soro foi filtrado

em filtro de éster de celulose com poro de 0,22 µm de diâmetro em fluxo laminar, antes da sua utilização.

- soroneutralização cruzada: neste ensaio foi investigada a capacidade do: (a) antiveneno botrópico, produzido no Instituto Butantan, em neutralizar a hiperalgesia e o edema induzidos pelo veneno de *Bothrops asper*, (b) antiveneno polivalente, produzido pelo Instituto Clodomiro Picado, de bloquear os fenômenos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*. Os protocolos experimentais empregados foram os mesmos descritos acima, para os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.8- Tratamentos Farmacológicos: Para a caracterização da mediação química da hiperalgesia e do edema induzidos pelos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e pela miotoxina III, os seguintes tratamentos farmacológico foram utilizados:

- Prometazina (5mg/Kg), antagonista de receptor H1 de histamina, dissolvida em salina estéril e administrada por via i.p., 30 minutos antes dos venenos ou toxina.
- Metisergida (5mg/Kg), antagonista de receptor 5-HT de serotonina, dissolvida em salina estéril e administrada por via i.p., 30 minutos antes dos venenos ou toxina.
- Dexametasona (0,4mg/Kg), inibidor de fosfolipase A₂, dissolvido em salina estéril e administrado v.o., 90 minutos antes dos venenos ou toxina.
- Hoe-140 (5µg/50µl), antagonista de receptores B2 de bradicinina, dissolvido em salina estéril e administrado por via i.pl., concomitantemente aos venenos ou toxina.

- Anticorpo anti-TNF α (0,2 μ g/pata), dissolvido em PBS estéril e administrado por via i.pl., 30 minutos antes dos venenos ou toxina.
- Anticorpo anti receptor de IL1 (20 μ g/Kg), antagonista de IL-1, dissolvido em salina estéril e administrado e.v., 20 minutos antes dos venenos ou toxina.
- Indometacina (4mg/Kg), inibidor de ciclooxigenases, dissolvida em tampão TRIS 1M, pH 8, a 37° C. e solução salina estéril. A concentração final do tampão TRIS foi de 10%. A indometacina foi administrada por via e.v., 30 minutos antes dos venenos ou toxina.
- Meloxicam (200 μ g/50 μ l), inibidor de ciclooxigenase tipo 2, dissolvido em salina estéril e administrado por via i.pl., 20 minutos antes dos venenos ou toxina.
- NDGA (30mg/Kg), inibidor de ciclo e lipoxigenase, administrado por via i.p., 30 minutos antes do veneno de *B. asper* ou toxina. Para cada 30 mg do composto, adicionou-se 2 ml de solução contendo etanol-salina (1:9), sendo o pH ajustado para 7,5 com NaOH 0,1N, seguido de agitação em Vórtex.
- BN-5202 (5mg/Kg), inibidor de PAF, dissolvido em salina estéril e administrado por via e.v., 30 minutos antes do veneno de *B. asper* e toxina.
- Guanetidina (30mg/Kg), depletor de aminas simpatomiméticas periféricas, dissolvido em salina estéril e administrado por via s.c., por 3 dias consecutivos. Os venenos ou toxina foram injetados 24 horas após a última dose da guanetidina.
- LNMMA (50 μ g/pata), inibidor da enzima óxido nítrico sintase, dissolvido em salina e administrado por via i.pl., 1 hora antes dos venenos ou toxina.
- CaNa₂EDTA, agente quelante, dissolvido em salina, incubado com os venenos à 37° C, durante 30 minutos, previamente à administração intraplantar dos venenos.

3.9- Soluções Utilizadas:

3.9.1- Tampão fosfato-salina (PBS)

Solução Estoque de Salina

Cloreto de sódio	8,182 g
Água destilada	1000 ml

Solução Estoque de Fosfato

Fosfato de sódio monobásico	3,580 g
Fosfato de sódio dibásico	1,983 g
Água destilada	1000 ml

Preparado no momento da utilização, pela mistura de ambas as soluções diluídas 10 vezes.

3.10- Drogas e reagentes:

Ácido nor-dihidroguaiarético- NDGA (Sigma- EUA); Anticorpo IL1-RA (R&D-EUA); Anticorpo Anti-TNF α (Sigma- EUA); BN 52021 (Instituto Henri Beaufour – França, gentilmente cedido pelo Dr. Wothan Tavares de Lima); CaNa₂EDTA (Sigma- EUA); Carragenina (Marine Colloids- EUA); Dexametasona (Decadrom, Merck- Brasil); Guanetidina (gentilmente cedido pela Ciba Geigy- Brasil); Hoe 140- D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸] bradicinina (Hoechst- EUA); Indometacina (Sigma-EUA); Meloxicam (Sigma-EUA); Metisergida (RBI- EUA); N^g-Metil-L-arginina-LNMMA (Sigma-EUA); Prometazina (RBI- EUA);

3.11- Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através da Análise de Variância (SNEDECOR *et al.*, 1946) associada ao teste de Bonferroni (SOKAL & ROHLF, 1981). O índice de significância empregado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1- Caracterização dos efeitos hiperalgésico e edematogênico induzidos pelos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e pela miotoxina III:

4.1.1- Efeito do VBj

O veneno de *Bothrops jararaca* (5µg/pata), injetado em uma das patas posteriores do rato, acarretou diminuição do limiar de dor dos animais, quando comparado à medida inicial (Fig. 3A). O efeito hiperalgésico máximo foi observado 1 hora após a injeção do veneno (34%), decaindo a seguir. Não foram detectadas alterações significativas em relação à medida inicial, na 24^a hora. Animais controles tratados com salina, não apresentaram alterações significativas da sensibilidade à dor, durante todo o período de observação.

Este veneno acarretou também aumento do volume de pata (edema) dos animais (Fig. 3B). A cinética da resposta edematogênica foi semelhante à observada para o efeito hiperalgésico. A resposta máxima, detectada na 1^a hora, foi de 62%.

A dose do VBj empregada nestes estudos (5µg/pata), foi baseada em dados anteriores obtidos por TEIXEIRA *et al.*(1994).

4.1.2- Efeito do VBa

O VBa, administrado nas doses de 5, 10 ou 15µg/pata, aumentou a sensibilidade à dor em todas as doses empregadas. No entanto, houve variação no período inicial desse efeito que foi significativo a partir da 2^a h para as doses de 5 e 10µg e da 1^ah para a dose de 15µg. A hiperalgesia foi máxima na 2^a hora (45%)

para a dose de 15µg/pata e entre a 2^a e 4^a h (26% e 30%) para as doses de 10 e 5µg, respectivamente, decaindo progressivamente a seguir. Não foram mais detectados alterações significativas em relação à medida inicial, na 24^a hora (Fig. 4A).

Essas mesmas doses de veneno acarretaram efeito edematogênico, com cinética semelhante à hiperalgesia. A resposta máxima foi de 86% para a dose de 15µg (Fig. 4B).

Para os estudos subsequentes, foi escolhida a dose de 15µg de VBa/pata, em decorrência do efeito hiperalgésico máximo alcançado (45%).

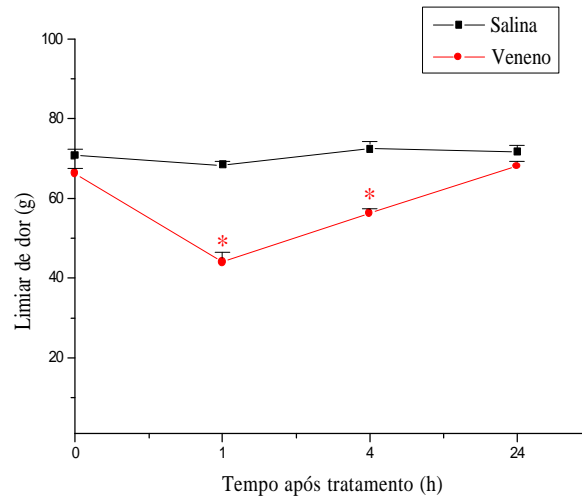
4.1.3- Efeito da MIII

Os animais foram injetados, por via i.pl., com a miotoxina (5, 10 ou 15µg/pata) ou salina (controle). A MIII acarretou aumento da sensibilidade a dor, em todas as doses testadas (Fig. 4C). O efeito hiperalgésico máximo foi observado 1 hora após a injeção da toxina. Não houve diferença na porcentagem do efeito máximo, entre todas as doses testadas.

A administração da MIII acarretou também edema. A resposta máxima, para as doses de 5, 10 e 15µg/pata foi observada 1 hora após o tratamento com a toxina, decaindo gradualmente a seguir, desaparecendo por completo, em 24 horas (Fig. 4D).

Para os estudos subsequentes, foi utilizada a dose de 10µg/pata de miotoxina III.

A



B

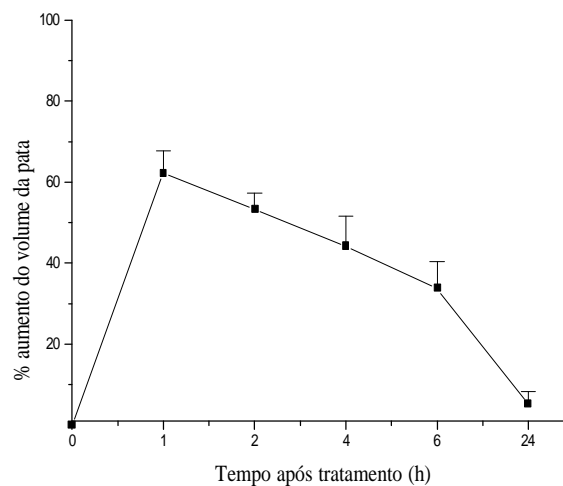


Figura 3- Efeito hiperalgésico (A) e edematogênico (B) do veneno de *Bothrops jararaca*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno (5µg/pata) ou salina (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a administração do veneno. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida inicial.

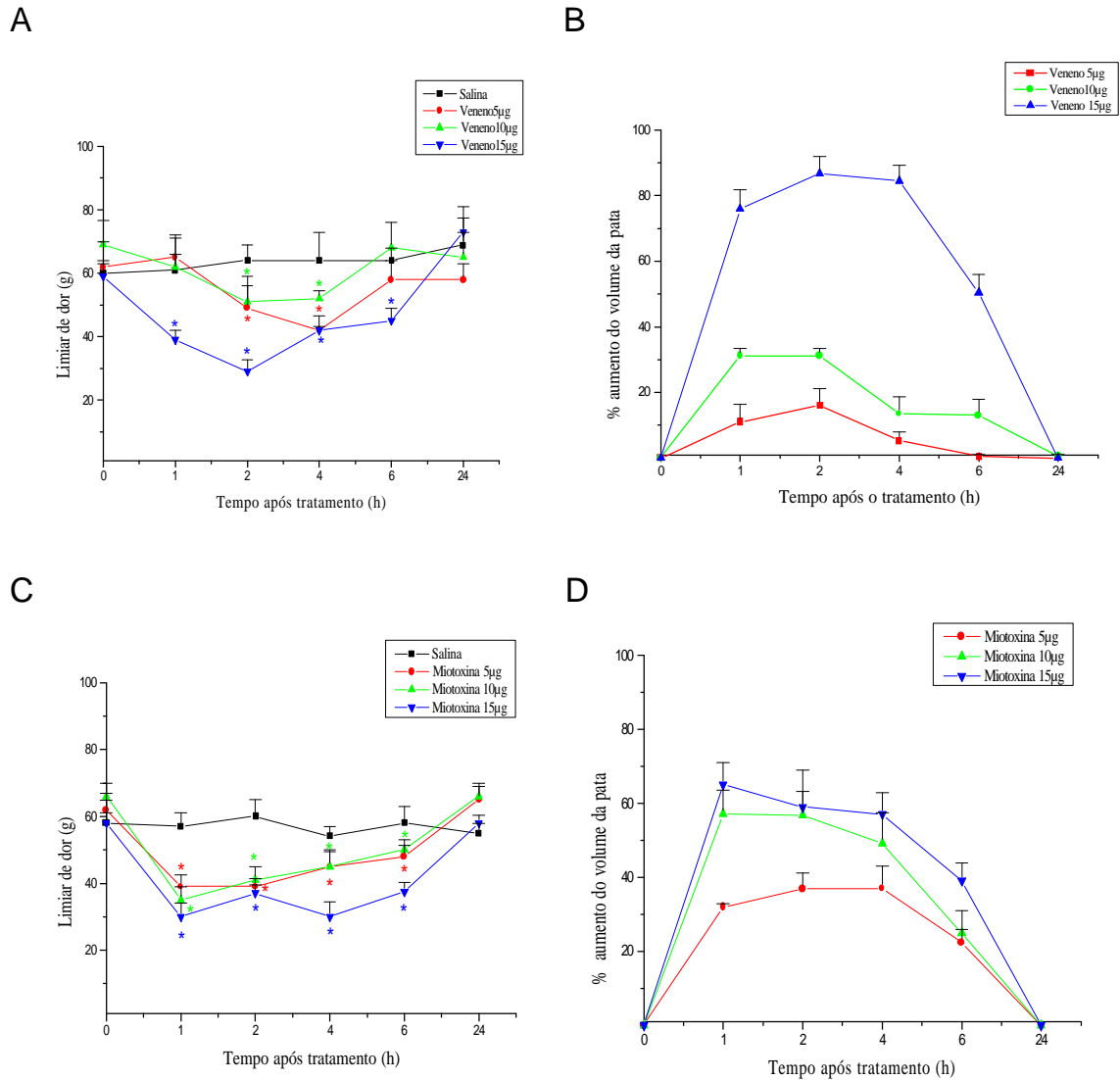


Figura 4- - Efeito hiperalgésico (A, C) e edematogênico (B, D) do veneno de *Bothrops asper* e da Miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno (5, 10 e 15µg/pata), miotoxina (5, 10 e 15µg/pata) ou salina (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a administração do veneno ou toxina. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida inicial.

4.2- Capacidade dos antivenenos em neutralizar a hiperalgesia e o edema induzidos pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*.

4.2.1- Soroneutralização *in vivo*

Para o estudo da soroneutralização *in vivo*, o antiveneno botrópico AVIB (Instituto Butantan) e o antiveneno polivalente AVCP (Instituto Clodomiro Picado) foram administrados por via endovenosa (e.v.), 15 minutos antes, imediatamente antes ou 15 minutos após a injeção i.pl. dos venenos.

O AVIB, quando injetado 15 minutos antes do veneno, reverteu a hiperalgesia induzida pelo VBj (Fig.5A). Animais controles tratados com salina ou soro, não apresentaram alterações da sensibilidade dolorosa, durante todo o período de observação (Fig. 3A). A administração do antiveneno, imediatamente antes ou 15 minutos após o veneno, não interferiu com a gênese ou o desenvolvimento deste fenômeno (Fig. 5C e 5E). A resposta edematogênica foi inibida parcialmente, quando o antiveneno foi injetado 15 minutos ou imediatamente antes do veneno (30% e 36% de inibição, respectivamente, no período de resposta máxima) (Fig. 5B e 5D). A administração do AVIB, 15 minutos após o veneno, não alterou o desenvolvimento do edema (Fig. 5F).

Como apresentado na figura 6, a administração do AVCP não interferiu com a hiperalgesia ou o edema induzidos pelo VBa, em todos os protocolos experimentais efetuados.

Ambos os antivenenos, *per se*, não acarretam resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 5 e 6).

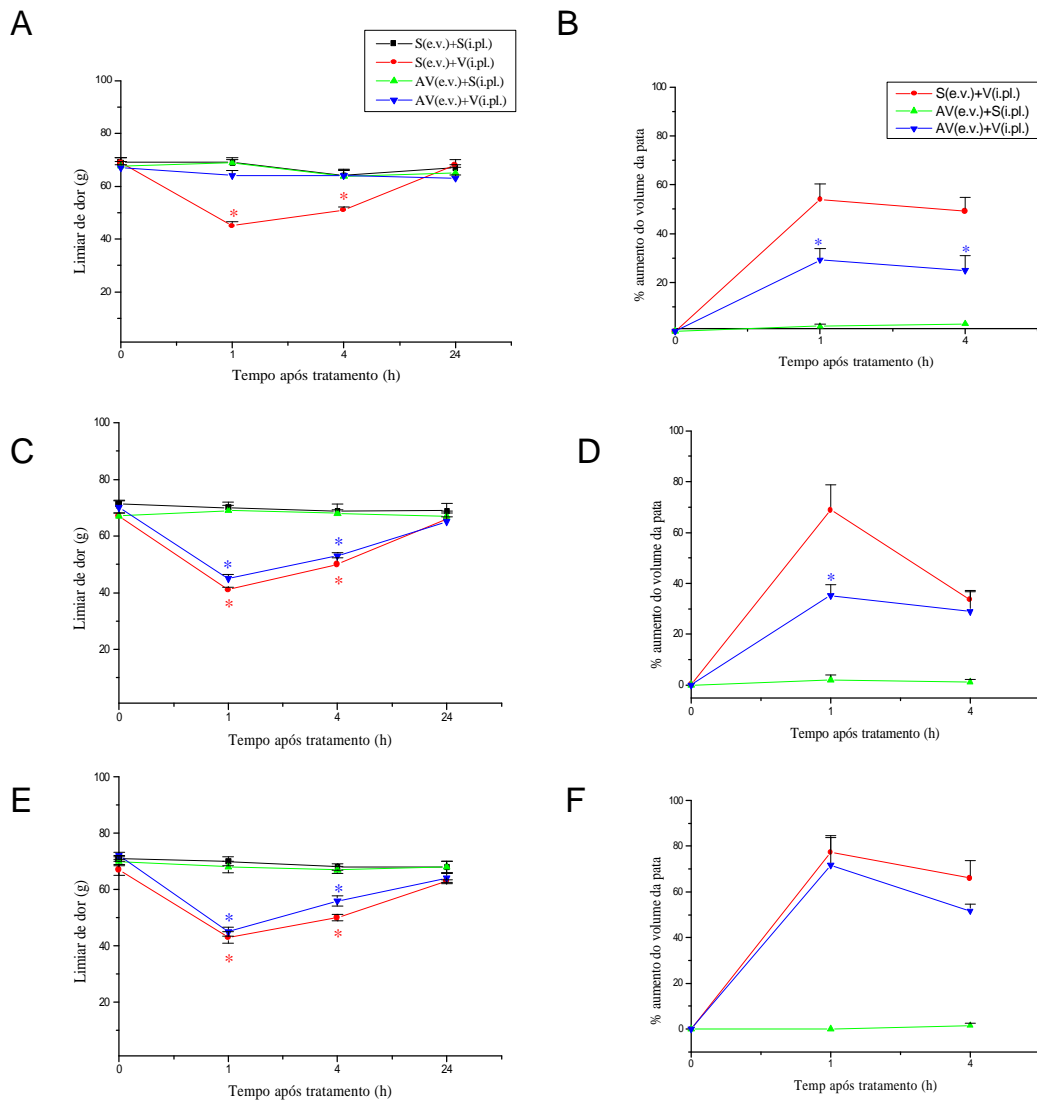


Figura 5- Efeito do antiveneno botrópico produzido no Instituto Butantan sobre a hiperalgesia (A, C, E) e o edema (B, D, F) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*: soroneutralização *in vivo*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a administração do veneno. Os animais foram tratados com o antiveneno-AV (0,5ml), ou salina (0,5ml), por via e.v., 15 min. antes (A, B), simultaneamente (C, D) ou 15 min. após a administração do veneno (E, F). Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A, C, E) ou com o grupo S+V (B, D).

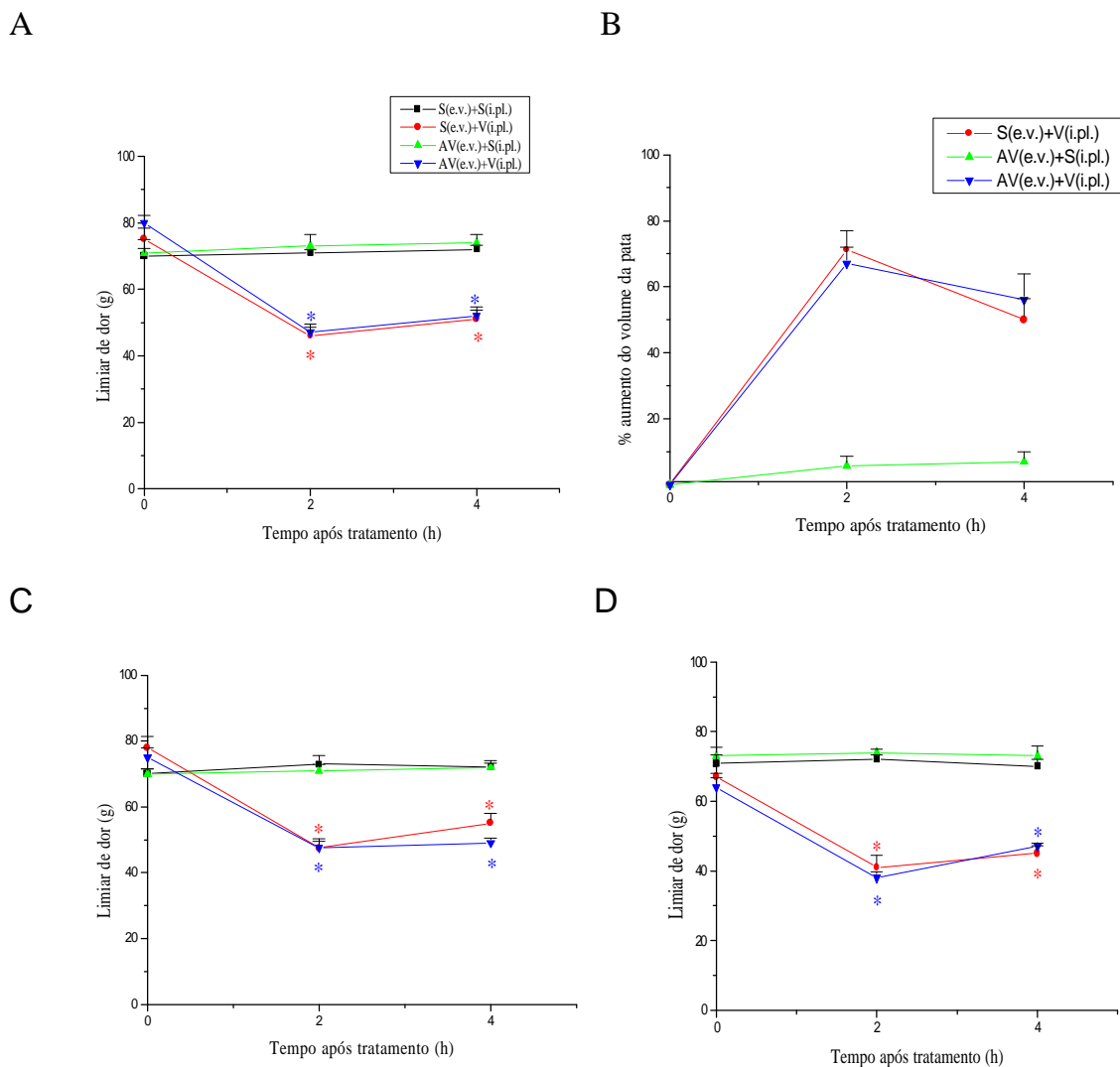


Figura 6- Efeito do antiveneno polivalente produzido no Instituto Clodomiro Picado sobre a hiperalgesia (A, C, D) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper*: soroneutralização *in vivo*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 2 e 4 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 2 e 4 horas após a administração do veneno. Os animais foram tratados com o antiveneno-AV (0,5ml), ou salina (0,5ml), por via e.v., 15 min. antes (A, B), simultaneamente (C) ou 15 min. após a administração do veneno (D). Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A, C, D).

4.2.2- Soroneutralização *in vitro*

Os dados apresentados nas figuras 5 e 6 mostram que a pré-incubação dos venenos de *B. jararaca* e *B. asper* com seus respectivos antivenenos foi capaz de inibir a hiperalgisia induzida por ambos os venenos. Este bloqueio foi observado até a diluição 1:8, para o VBj e 1:4, para o VBa (Fig. 7A e 8A, respectivamente). A resposta edematogênica induzida por ambos os venenos também foi bloqueada quando estes venenos foram pré-incubados com seus respectivos antivenenos. Esta inibição foi observada até a diluição 1:8 para o VBj (Fig. 7B) e 1:1 para o VBa (Fig. 8B). O antiveneno, *per se*, não foi capaz de interferir significativamente com a sensibilidade dolorosa ou com o volume das patas dos animais (Fig. 7 e 8).

Em decorrência da miotoxina III induzir hiperalgisia e por esta miotoxina ser um importante componente do veneno de *B. asper*, foi também avaliada a capacidade do AVCP em neutralizar a hiperalgisia e o edema induzidos por esta toxina. O antiveneno, quando incubado *in vitro* com a MIII, foi capaz de reverter as respostas hiperalgésica e edematogênica acarretada pela MIII (Fig. 8 C e D).

Em ambos os ensaios *in vivo* e *in vitro*, foi utilizado, como grupo controle adicional, soro equino normal, em substituição aos soros hiperimunes. Este soro não foi capaz de interferir com a hiperalgisia ou o edema induzidos pelos venenos ou de acarretar, *per se*, hiperalgisia ou edema (dados não demonstrados).

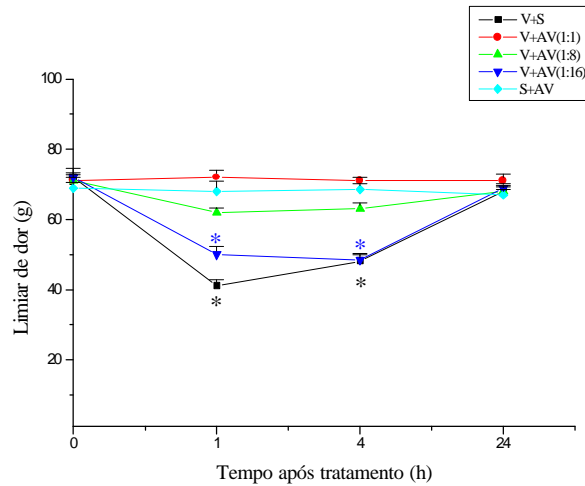
4.2.3- Soroneutralização cruzada

Nos ensaios de soroneutralização cruzada, foi avaliada a capacidade do antiveneno botrópico, produzido no Instituto Butantan, e do antiveneno polivalente, produzido no Instituto Clodomiro Picado, em neutralizar as

atividades hiperalgésica e edematogênica do veneno de *Bothrops asper* ou do veneno de *Bothrops jararaca*, respectivamente.

Nos ensaios *in vivo*, ambos os antivenenos, administrados 15 minutos antes dos venenos, não reverteram os fenômenos causados pelos venenos (Fig. 9 A e B e 10 A e B). Por outro lado, nos ensaios *in vitro*, em que o AVIB foi incubado com o VBa, ocorreu reversão parcial (54% de inibição da resposta máxima) da hiperalgeisa induzida por este veneno (Fig. 9 C). A resposta edematogênica foi também significativamente inibida por este tratamento (Fig. 9 D). O AVCP, por sua vez, quando incubado com o VBj, não interferiu com a hiperalgesia (Fig. 10 C) ou com a resposta edematogênica (Fig. 10 D) acarretadas por este veneno.

A



B

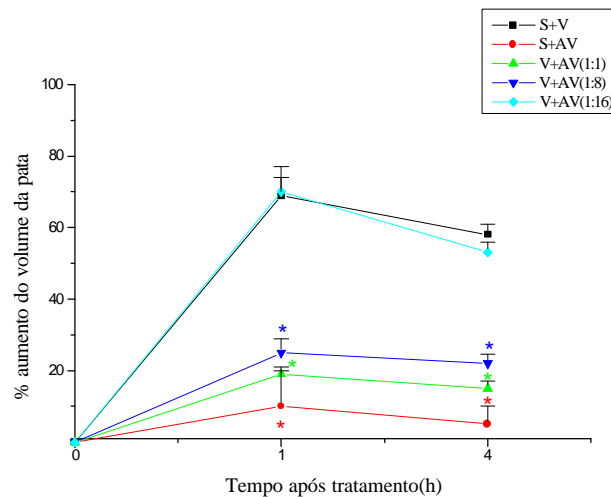


Figura 7- Efeito do antiveneno botrópico produzido no Instituto Butantan, sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*: soroneutralização *in vitro*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a administração do veneno. Para a soroneutralização, o veneno foi incubado, *in vitro*, com diferentes diluições do antiveneno-AV, por 30 min., a 37 °C. As misturas foram injetadas nos ratos, por via i.pl. Animais injetados com veneno incubado com salina (V+S) ou com antiveneno incubado com salina (AV+S), nas mesmas condições experimentais, foram considerados controles. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A) ou com o grupo S+V (B).

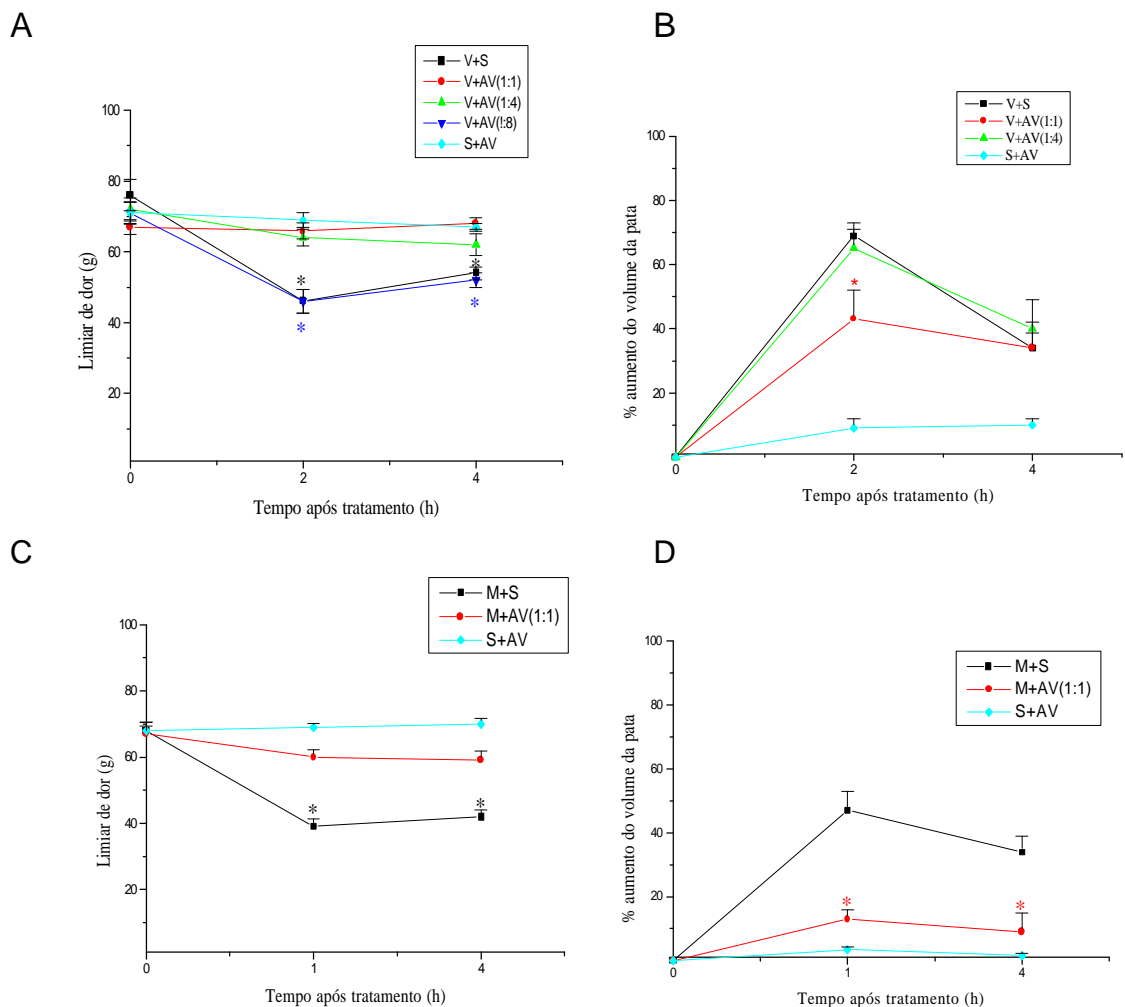


Figura 8- Efeito do antiveneno polivalente produzido no Instituto Clodomiro Picado, sobre a hiperalgesia (A, C) e o edema (B, D) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper* e miotoxina III: soroneutralização *in vitro*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1 ou 2 e 4 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), miotoxina-M (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1 ou 2 e 4 horas após a administração do veneno ou toxina. Para a soroneutralização, o veneno foi incubado, *in vitro*, com diferentes diluições do antiveneno-AV, por 30 min., a 37 °C. As misturas foram injetadas nos ratos, por via i.pl. Animais injetados com veneno incubado com salina (V+S) ou com antiveneno incubado com salina (AV+S), nas mesmas condições experimentais, foram considerados controles. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a mediada inicial (A, C) ou com o grupo S+V(B, D).

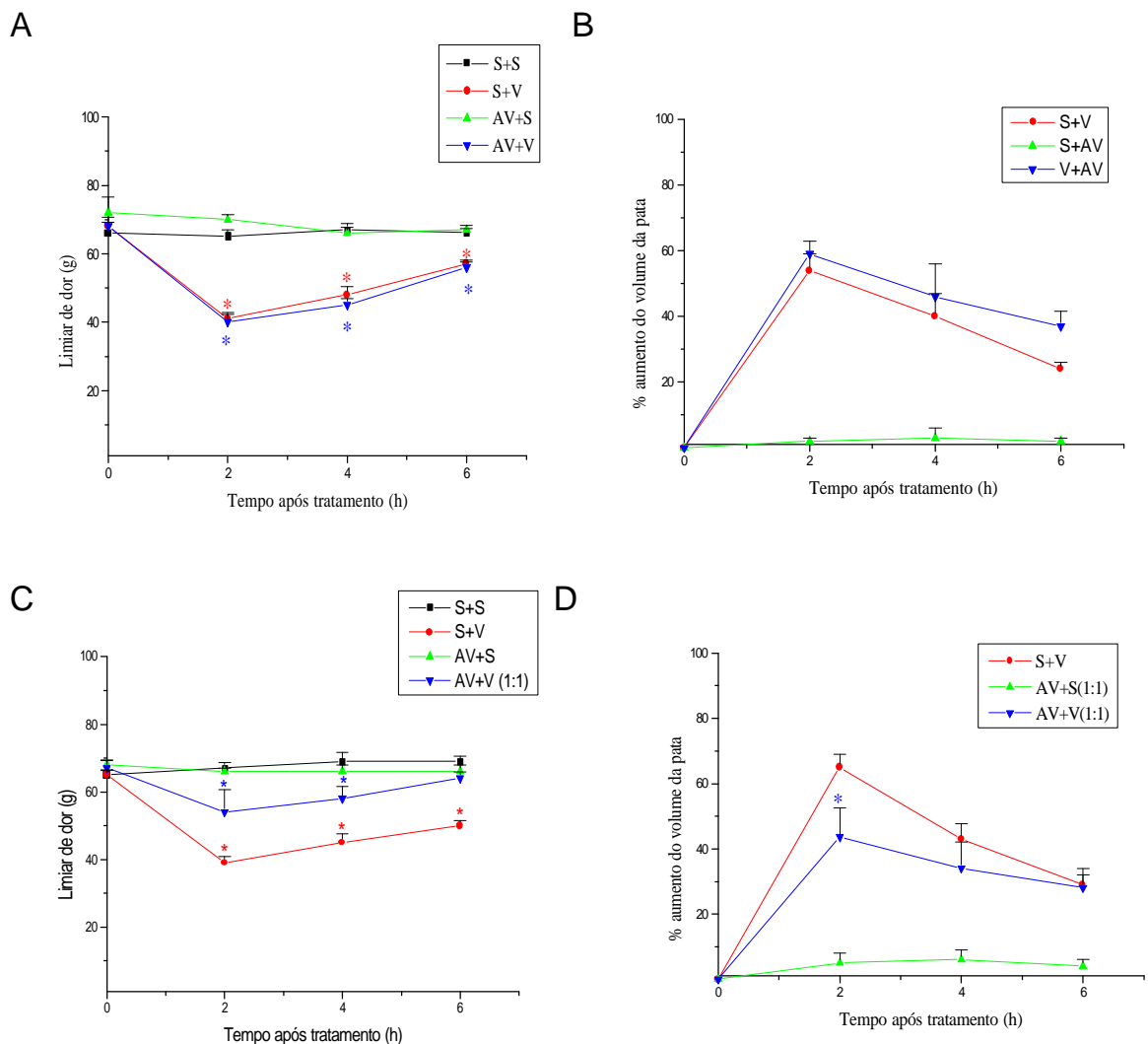


Figura 9- Efeito do antiveneno botrópico, produzido no Instituto Butantan sobre a hiperalgesia (A, C) e o edema (B, D) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper*: soroneutralização cruzada. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 2, 4 e 6 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 2, 4 e 6 horas após a administração do veneno. Para a soroneutralização *in vivo*, o antiveneno-AV foi administrado 15 min. antes do veneno (A, B). Na soroneutralização *in vitro*, o veneno foi incubado (1:1) com o antiveneno-AV, por 30 min., a 37 °C (C, D) As misturas foram injetadas nos ratos, por via i.pl. Animais injetados com veneno incubado com salina (V+S) ou com antiveneno incubado com salina (AV+S), nas mesmas condições experimentais, foram considerados controles. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A, C) ou com o grupo S+V (D).

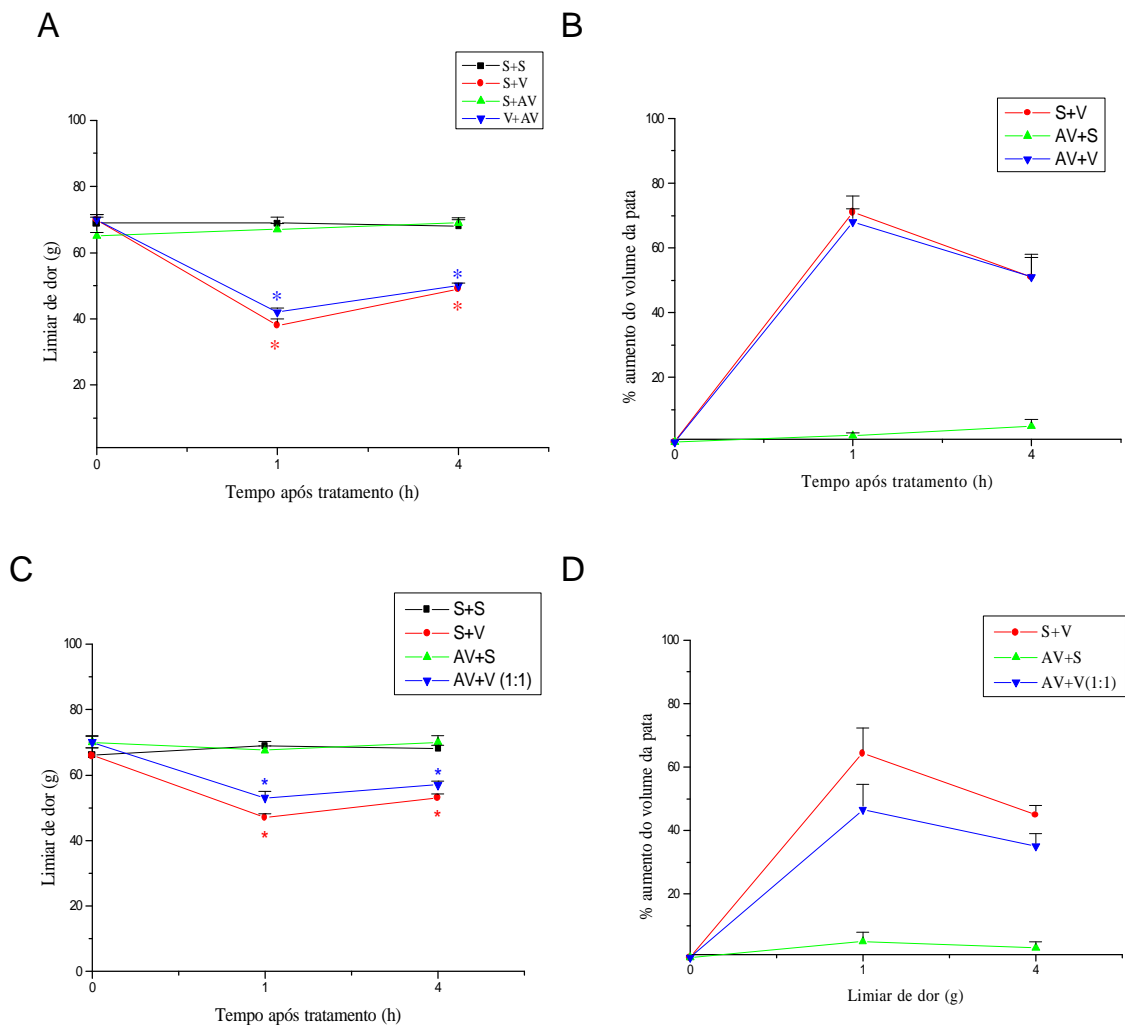


Figura 10- Efeito do antiveneno polivalente produzido no Instituto Clodomiro Picado sobre a hiperalgesia (A, C) e o edema (B, D) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*: soroneutralização cruzada. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção i.pl. do veneno-V ($5\mu\text{g/pata}$) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a administração do veneno. Para a soroneutralização *in vivo*, o antiveneno-AV foi administrado 15 min. antes do veneno. Na soroneutralização *in vitro*, o veneno foi incubado (1:1) com o antiveneno-AV, por 30 min., a 37°C . As misturas foram injetadas nos ratos, por via i.pl. Animais injetados com veneno incubado com salina (V+S) ou com antiveneno incubado com salina (AV+S), nas mesmas condições experimentais, foram considerados controles. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a mediada inicial (A, C) ou com o grupo S+V (D).

4.3- Efeito dos tratamentos farmacológicos sobre a hiperalgesia e o edema induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e pela miotoxina III:

4.3.1- Efeito da prometazina

O pré-tratamento com prometazina não interferiu com as atividades hiperalgésica ou edematogênica do veneno de *B. jararaca* (Fig. 11). Por outro lado, este tratamento acarretou diminuição do edema (33%, na 2^o hora) induzido pelo veneno de *B. asper* (Fig. 12 B) e da hiperalgesia e do edema acarretados pela miotoxina (Fig. 12 C, D). A prometazina, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 11 e 12).

4.3.2- Efeito da metisergida

O pré-tratamento com metisergida não interferiu com as atividades hiperalgésica ou edematogênica causadas pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*, durante todo o período de observação (Fig. 13 e 14 A, B). Por outro lado, este tratamento reduziu a hiperalgesia (48%, na 1^a hora) induzida pela miotoxina, sem contudo interferir com o edema (Fig. 12 C, D). A metisergida, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 13 e 14).

4.3.3- Efeito do tratamento com Hoe-140

Hoe-140 reverteu a hiperalgesia induzida pelos VBJ, (Fig. 15 A), VBa e MIII (Fig 16 A e C). Por outro lado, este antagonista não interferiu com a resposta edematogênica acarretada pelos venenos ou pela toxina (Fig 15 B, 16 B e D). Cabe ressaltar que este mesmo tratamento diminuiu significativamente a hiperalgesia e o edema induzidos pela carragenina, empregada como controle positivo. Neste caso, os valores representados na Fig. 15 correspondem ao pico das respostas hiperalgésica e edematogênica observado na 3^o hora após a administração intraplantar da carragenina (200µg/pata). O Hoe-140, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 15 e 16).

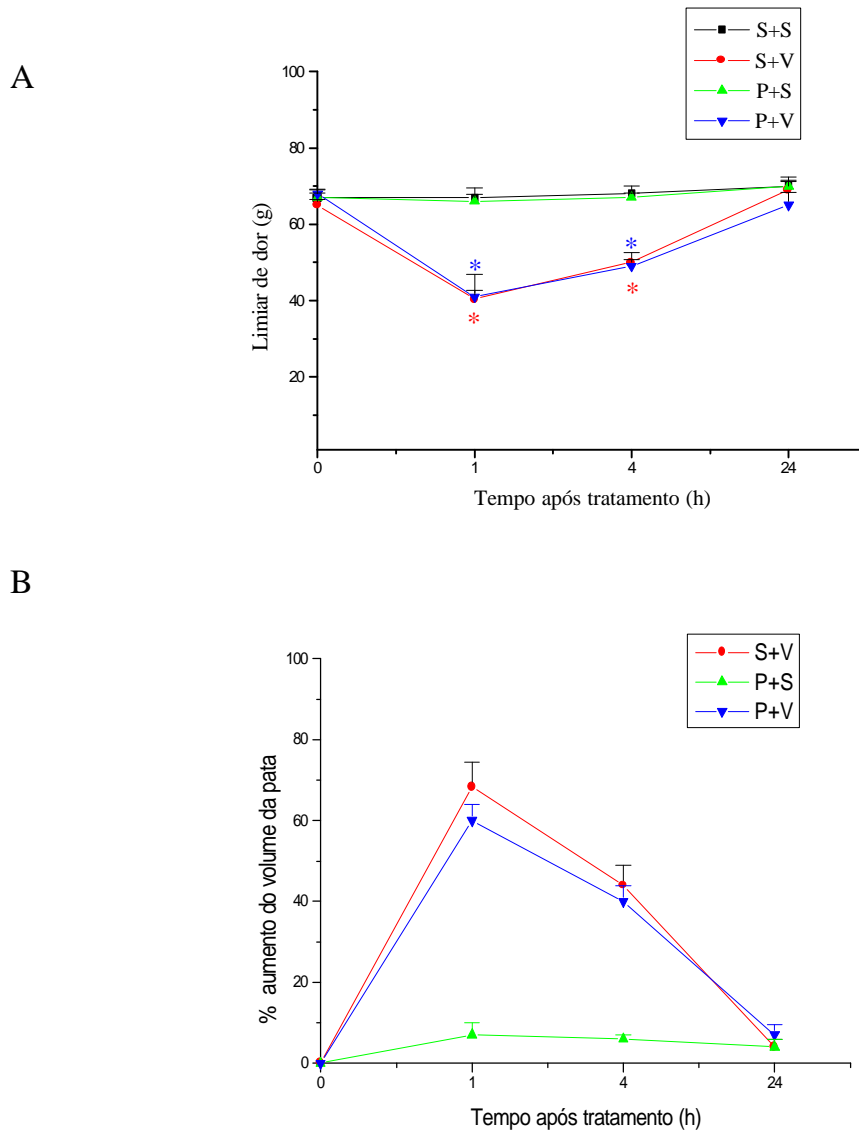


Figura 11- Efeito do tratamento com prometazina sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1,4 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (5 μ g/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a administração do veneno ou salina. Os animais foram tratados com prometazina-P (5mg/Kg) ou salina, por via i.p., 30 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a mediada inicial (A).

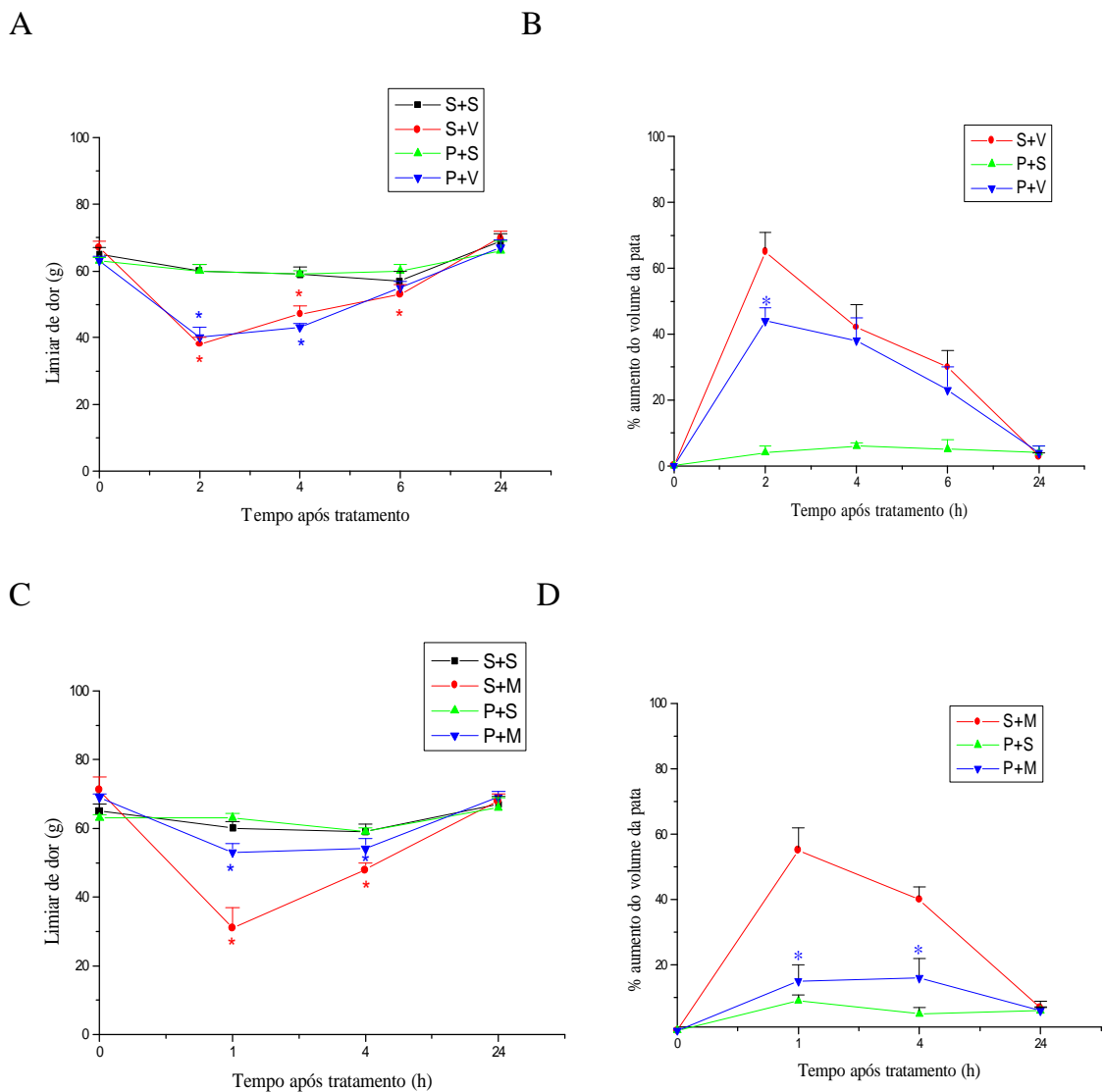
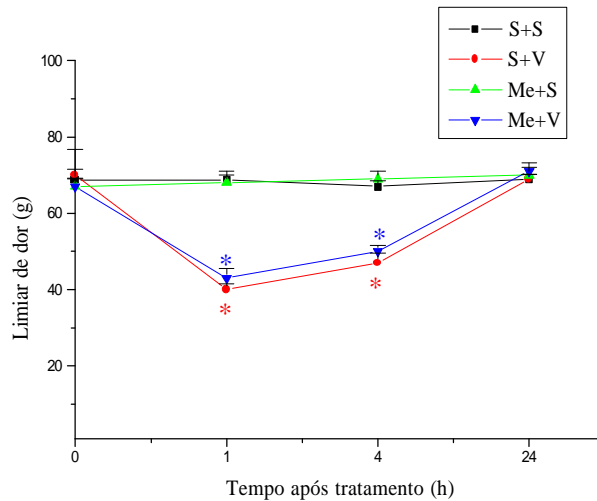


Figura 12- Efeito do tratamento com prometazina sobre a hiperalgesia (A, C) e o edema (B, D) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper* e pela miltotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e em diversos tempos após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), miltotoxina-M (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e em diversos tempos após a administração do veneno, miltotoxina ou salina. Os animais foram tratados com prometazina-P (5mg/Kg) ou salina, por via i.p., 30 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida inicial (A, C) ou com o grupo S+M (D).

A



B

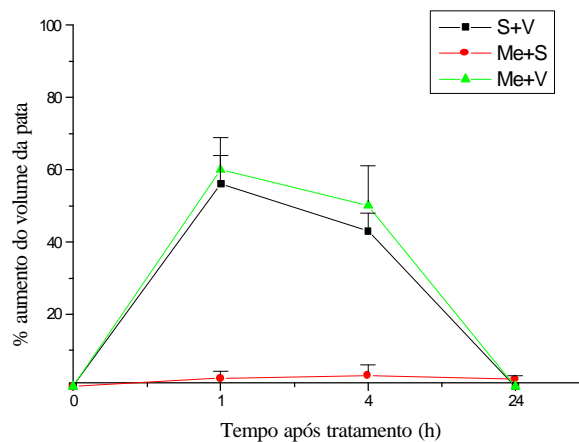


Figura 13- Efeito do tratamento com metisergida sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata dos ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno-V ($5\mu\text{g/pata}$) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a administração do veneno ($5\mu\text{g/pata}$) ou salina. Os animais foram tratados com metisergida-Me (5mg/Kg) ou salina, por via i.p., 30 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a mediada inicial (A).

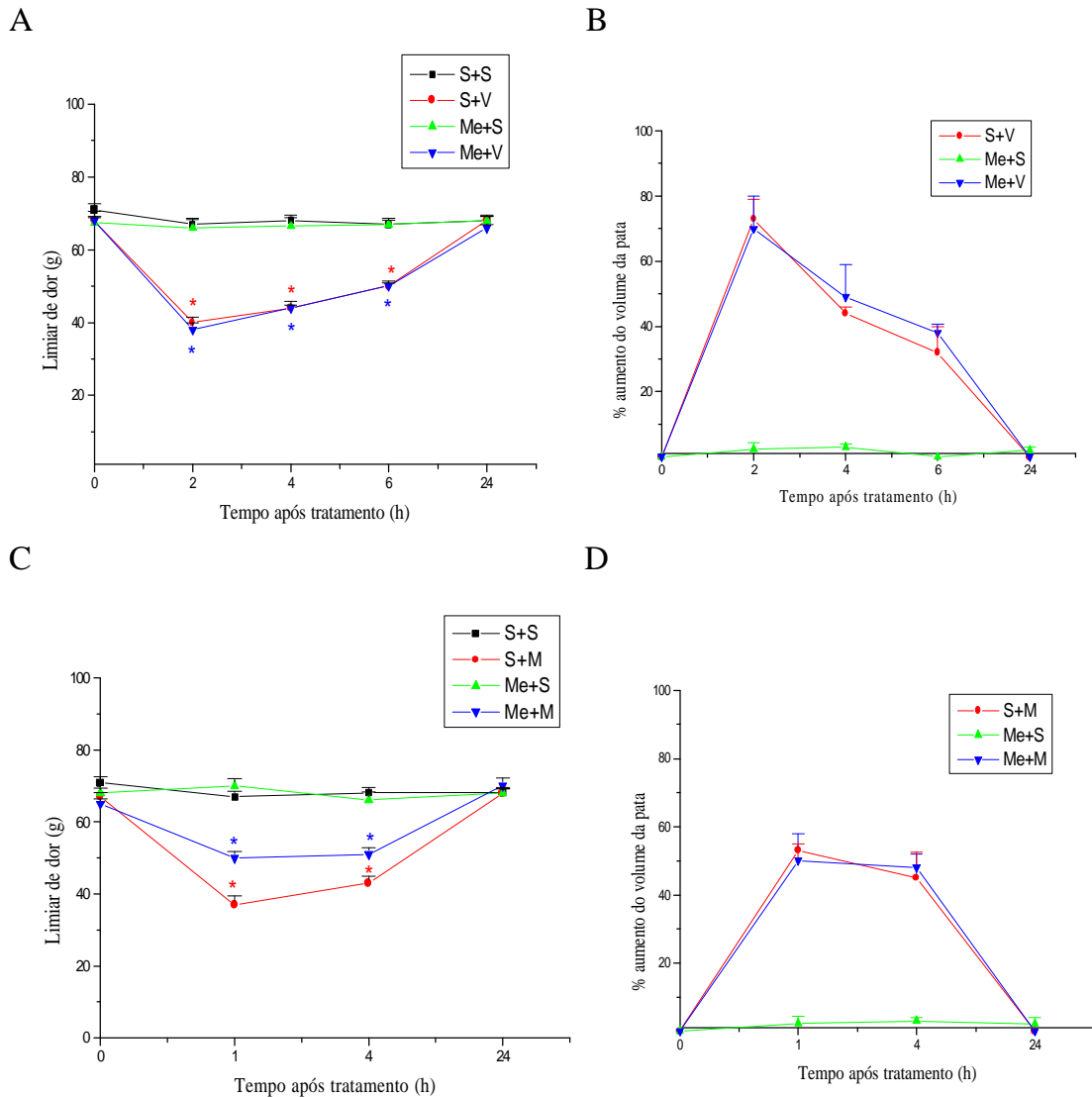


Figura 14- Efeito do tratamento com metisergida sobre a hiperalgesia (A, C) e o edema (B, D) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper* e pela miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e em diversos tempo após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), miotoxina-M (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e em diversos tempo após a administração do veneno, toxina ou salina. Os animais foram tratados com metisergida-Me (5mg/Kg) ou salina, por via i.p., 30 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A,C).

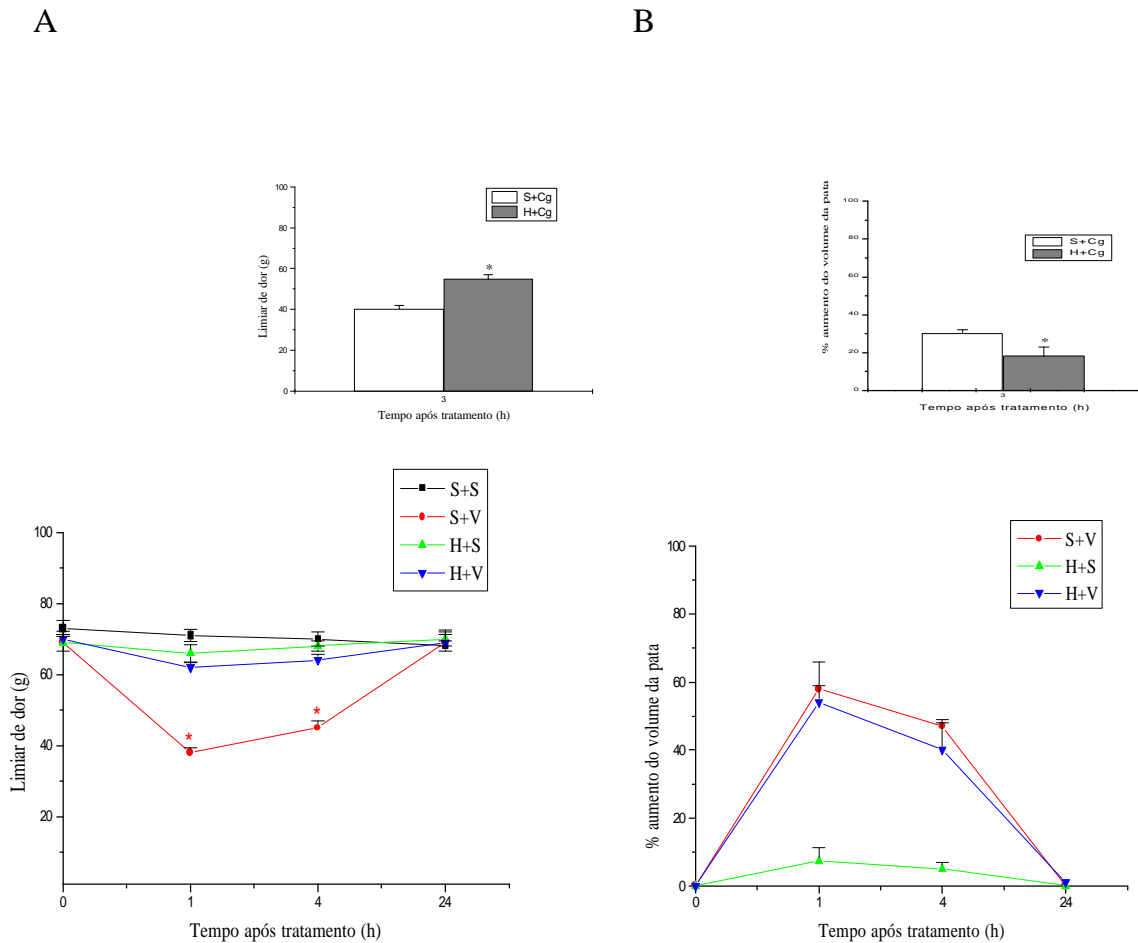


Figura 15- Efeito do tratamento com Hoe 140 sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a administração do veneno ou salina. Carragenina-Cg (200µg/pata) foi empregada como controle positivo (gráficos superiores). Neste caso, as determinações foram realizadas 3 h após a administração do irritante. Os animais foram tratados com o Hoe-140- H (5µg/pata) ou salina, por via i.pl.concomitante aos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A) ou com o grupo S+Cg (gráficos superiores).

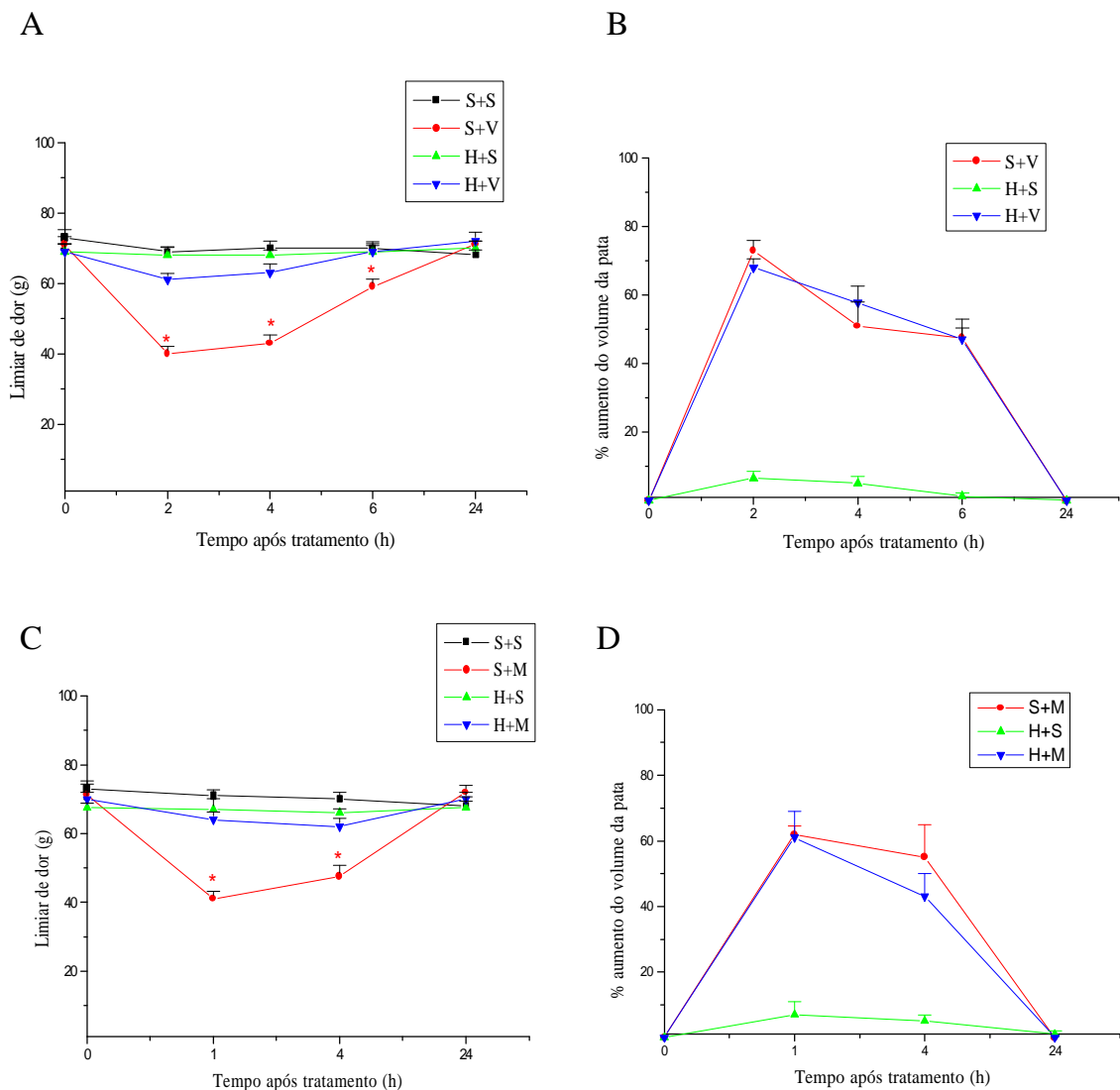


Figura 16- Efeito do tratamento com Hoe 140 sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper* e pela miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata dos ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e em diversos tempos após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), miotoxina-M (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e em diversos tempos após a administração do veneno, toxina ou salina. Os animais foram tratados com o Hoe-140-H (5µg/pata) ou salina, por via i.pl., concomitante aos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A, C).

4.3.4- Efeito do tratamento com anticorpo anti-TNF α

A administração do anticorpo anti-TNF α , 30 minutos antes da injeção i.pl. dos venenos ou toxina não interferiu com a intensidade ou evolução das respostas hiperalgésica e edematogênica (Fig. 17 A e B) causadas pelos mesmos.

Cabe ressaltar que este mesmo tratamento reverteu a hiperalgesia induzida pela carragenina, empregada como controle positivo (Fig. 17).

O anticorpo anti-TNF α , *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 17).

4.3.5- Efeito do tratamento com anticorpo anti-interleucina-1

O anticorpo anti-interleucina-1, quando administrado 20 minutos antes da injeção i.pl. do VBj, VBa ou MIII, não interferiu com o desenvolvimento das respostas hiperalgésica (Fig. 18 A) ou edematogênica (Fig.18 B) causadas pelos mesmos.

Este mesmo tratamento reverteu a hiperalgesia e o edema induzidos pela carragenina, empregada como controle positivo (Fig. 18). O anti-IL1, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 18).

4.3.6- Efeito do tratamento com dexametasona

Dexametasona, quando administrada 90 minutos antes dos estímulos, acarretou diminuição da resposta hiperalgésica acarretada pelo VBj (58 %, na 1^o hora, Fig 19A), VBa (53%, na 2^o hora, Fig. 20 A) e inibiu aquela causada pela MIII (Fig. 20 C).

Em relação à resposta edematogênica, este tratamento interferiu apenas com a resposta acarretada pela miotoxina (Fig. 20 D). Esta inibição foi detectada a partir da 2^o hora após a administração da miotoxina (53%).

A dexametasona, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 20).

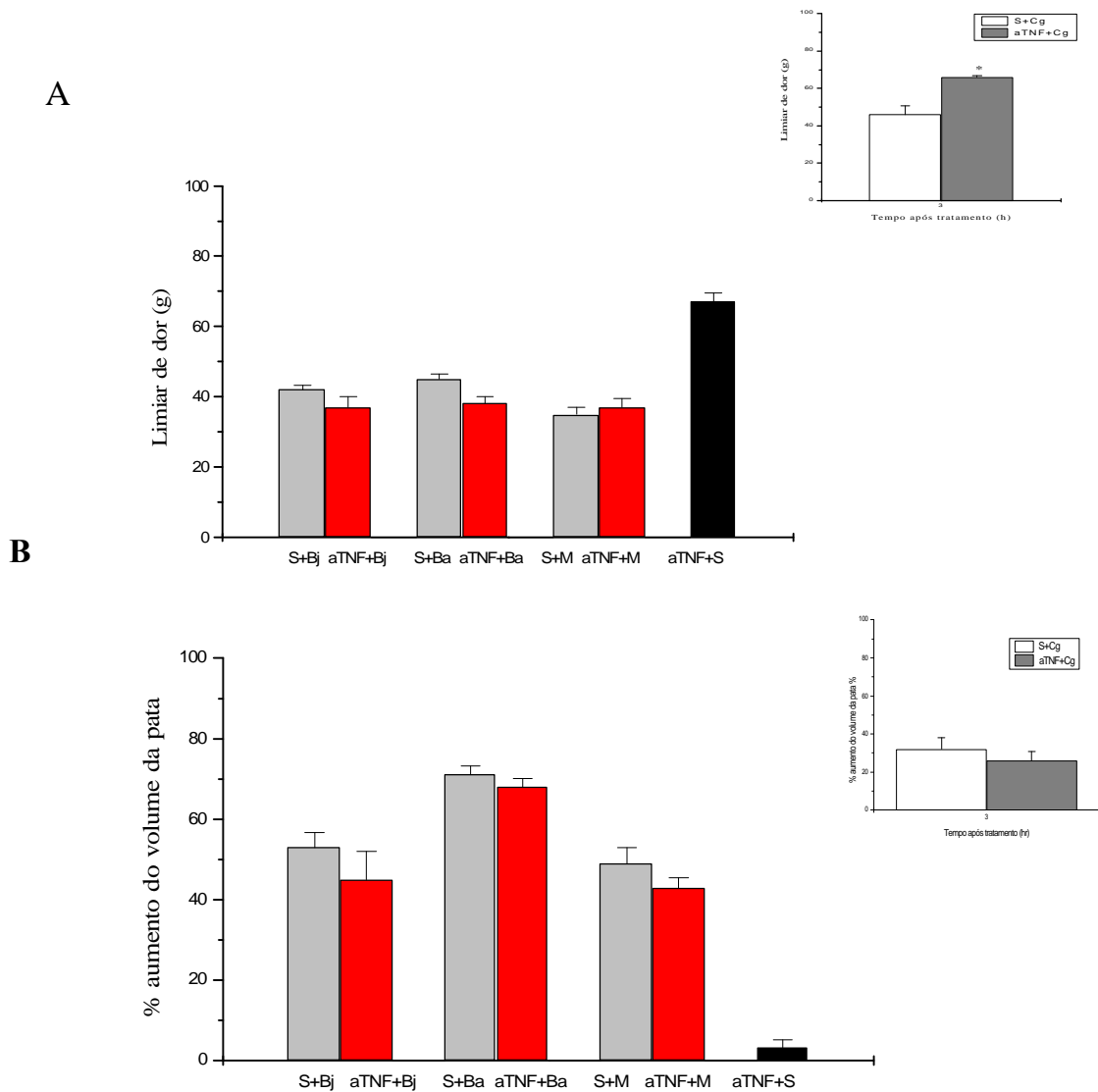


Figura 17- Efeito do tratamento com o anticorpo anti-TNF α sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e pela miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata dos ratos. O limiar de dor foi determinado 1 hora após a injeção i.pl. do veneno de *Bothrops jararaca*-Bj (15 μ g/pata) e miotoxina-M (10 μ g/pata) ou 2 horas após a injeção do veneno de *Bothrops asper*-Ba (5 μ g/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, no mesmo período de tempo. Os animais foram tratados com anticorpo anti-TNF α - aTNF (0.2 μ g/pata) ou salina, 30 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Carragenina-Cg (200 μ g/pata) foi empregada como controle positivo (gráficos superiores). Neste caso, as determinações foram realizadas 3 h após a administração do irritante. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo S+Cg (gráfico superior).

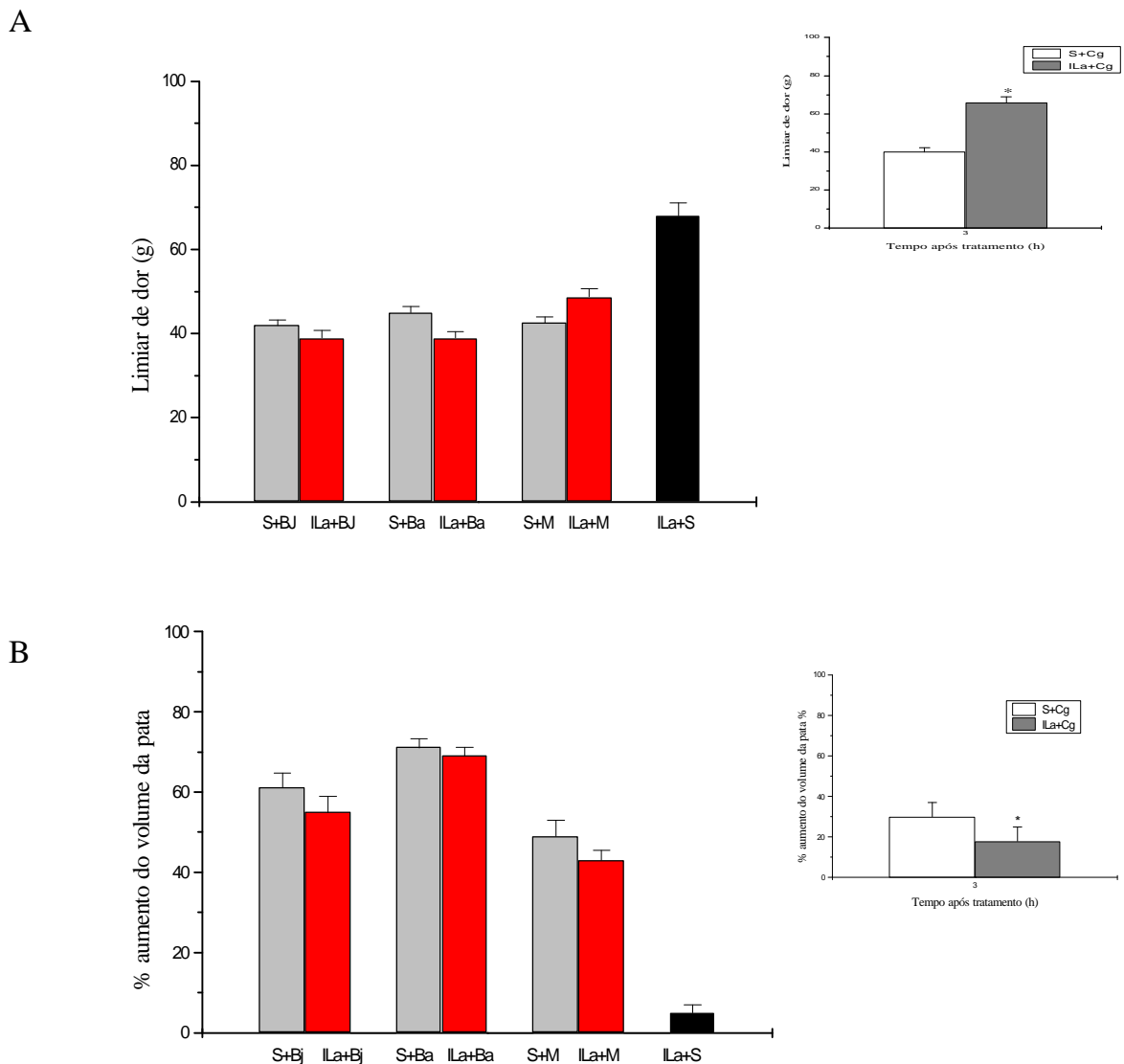
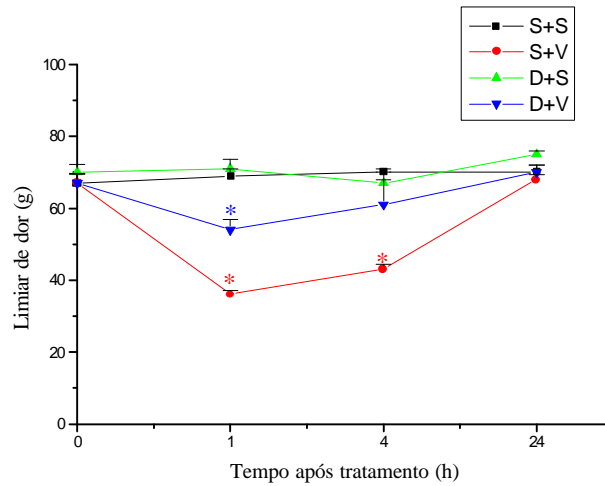


Figura 18- Efeito do tratamento com o anticorpo anti-interleucina-1 sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e pela mitoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata dos ratos. O limiar de dor foi determinado 1 hora após a injeção i.pl. do veneno de *Bothrops jararaca*-Bj (15µg/pata) e mitoxina-M (10µg/pata) ou 2 horas após a injeção do veneno de *Bothrops asper*-Ba (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, no mesmo período de tempo. Os animais foram tratados com anticorpo anti-interleucina-1-ILa (20µg/Kg) ou salina, 20 minutos antes da injeção dos irritantes. Carragenina-Cg (200µg/pata) foi empregada como controle positivo (gráficos superiores). Neste caso, as determinações foram realizadas 3 h após a administração dos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo S+Cg (gráficos superiores).

A



B

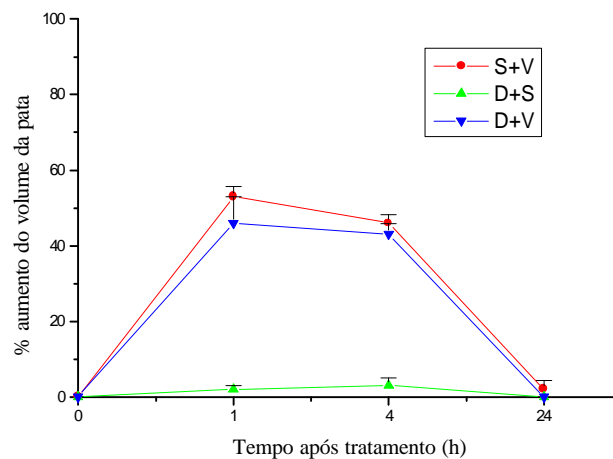


Figura 19- Efeito do tratamento com dexametasona sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e em diversos tempos após a injeção i.pl. do veneno-V (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e em diversos tempos após a administração do veneno ou salina. Os animais foram tratados com a dexametasona-D (0,4mg/Kg) ou salina, por via oral, 90 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a mediada inicial (A).

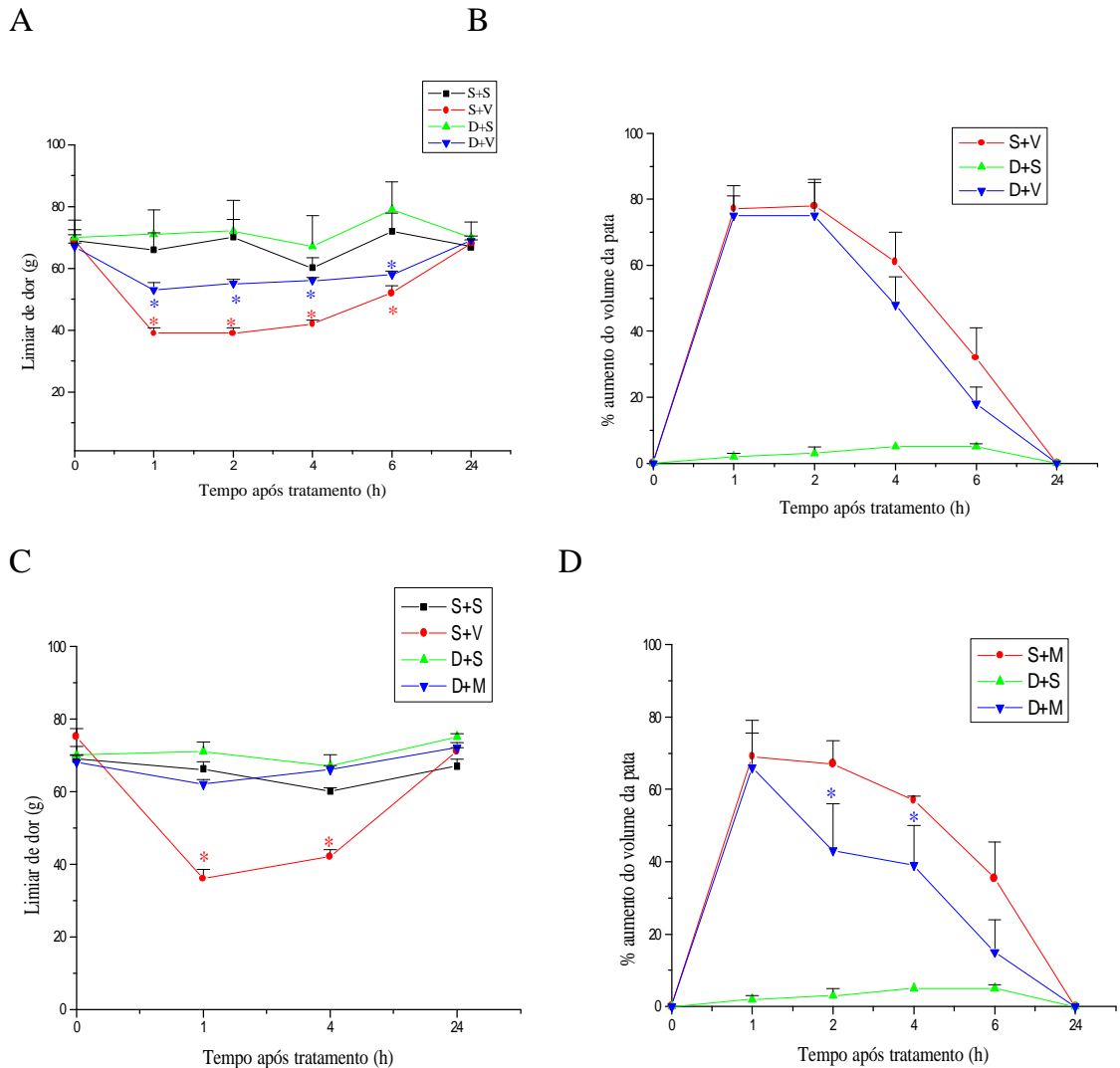


Figura 20- Efeito do tratamento com dexametasona sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper* e pela miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e em diversos tempos após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), miotoxina III-M (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e em diversos tempos após a administração do veneno, miotoxina ou salina. Os animais foram tratados com a dexametasona-D (0,4mg/Kg) ou salina, por via oral, 90 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A, C) ou com o grupo S+M (D).

4.3.7- Efeito do tratamento com indometacina ou meloxicam

Indometacina, inibidor não seletivo de ciclooxigenases, quando administrada 30 minutos antes dos venenos ou miotoxina, somente acarretou inibição da resposta hiperalgésica induzida pelo VBj (Fig 21 A). Meloxicam, inibidor preferencial da ciclooxigenase 2, administrado 20 minutos antes do VBj, VBa e MIII, não interferiu com o desenvolvimento da resposta hiperalgésica (Fig 21 e 22) acarretada pelos mesmos. Estes tratamentos não modificaram a resposta edematogênica induzida pelos venenos ou toxina (Fig. 21 B e 22 B e D).

Cabe ressaltar que ambos, indometacina e o meloxicam, reverteram a hiperalgesia e o edema induzidos pela carragenina, empregada como controle positivo (Fig. 21). A indometacina ou o meloxicam, *per se*, não acarretaram resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 21 e 22).

4.3.9- Efeito do tratamento com NDGA

O NDGA, quando administrado 30 minutos antes da injeção do VBa ou MIII, aboliu a resposta hiperalgésica acarretada pelos mesmos (Fig. 23 A,C), sem interferir com a resposta edematogênica (Fig. 23 B,D).

O NDGA, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica.

Observação: Estudos anteriores realizados por TEIXEIRA *et al.* (1994) demonstraram que o NDGA reduz significativamente a resposta hiperalgésica induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

A

B

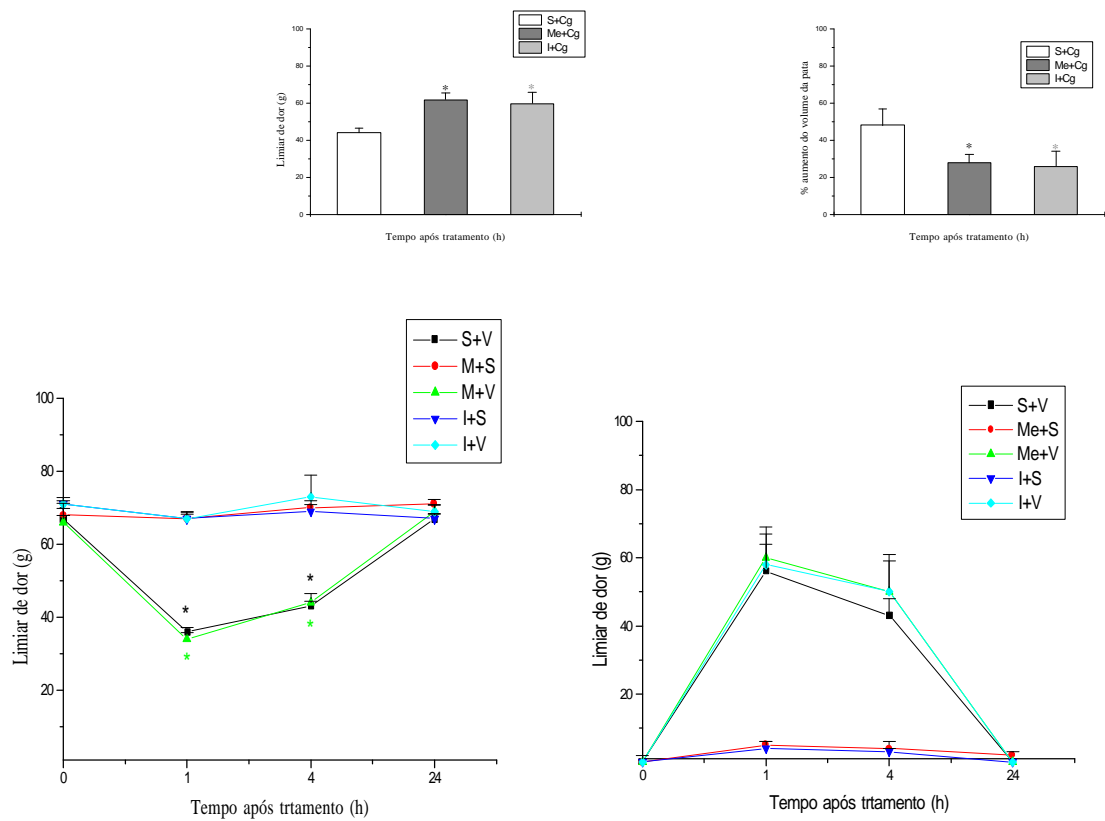


Figura 21- Efeito do tratamento com indometacina ou meloxicam sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 1, 4 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a administração do veneno ou salina. Carragenina-Cg (200µg/pata) foi empregada como controle positivo (gráficos superiores). Neste caso, as determinações foram realizadas 3 h após a administração do irritante. Os animais foram tratados com indometacina-I (2mg/Kg), meloxicam-M (200µg/pata) ou salina, por via i.pl., 30 e 20 minutos respectivamente, antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A) ou com o grupo S+Cg (gráficos superiores).

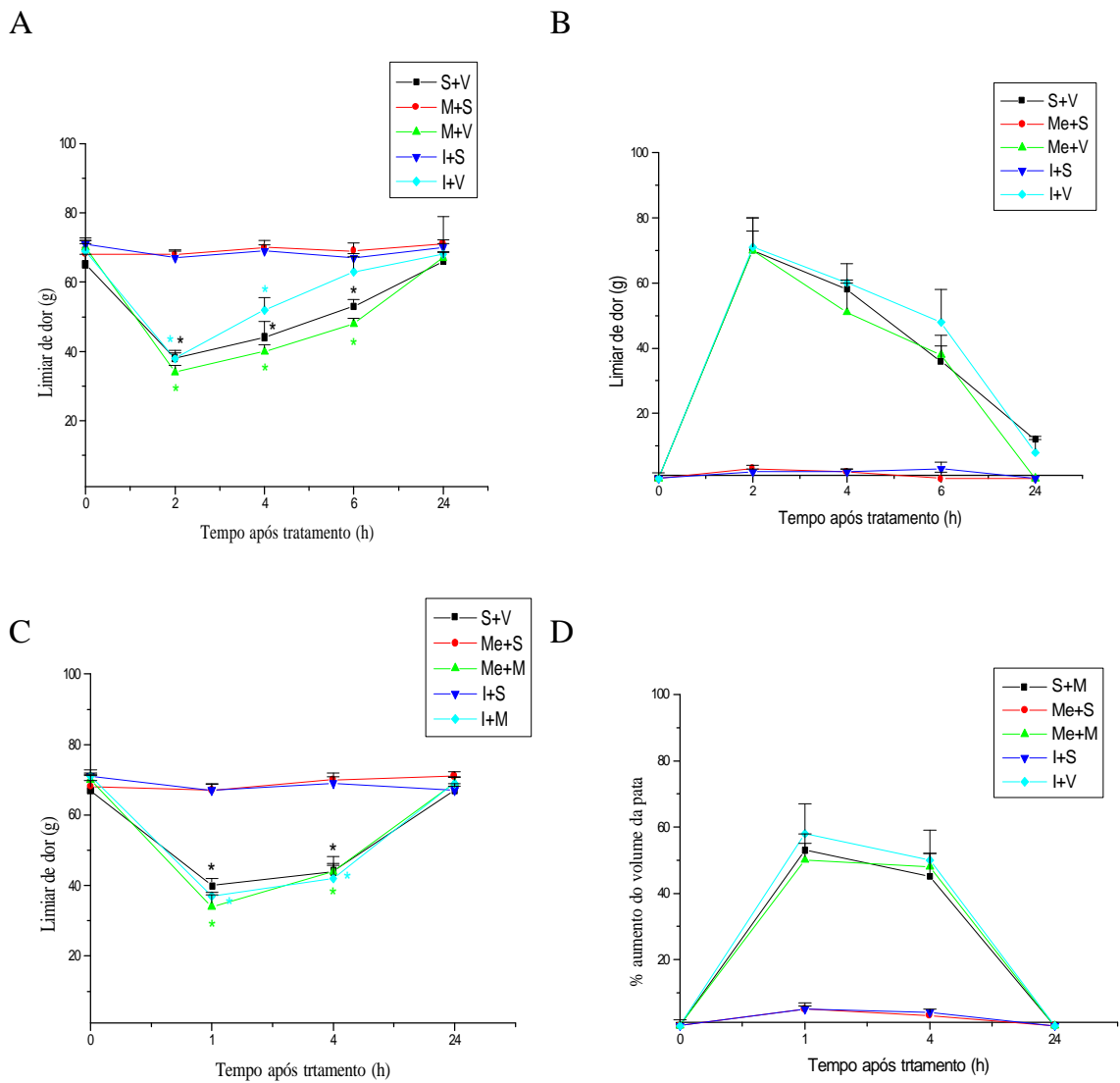


Figura 22- Efeito do tratamento com indometacina ou meloxicam sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper* e pela miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e em diversos tempos após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), miotoxina-M (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e em diversos tempos após a administração do veneno, toxina ou salina. Os animais foram tratados com indometacina-I (2mg/Kg), meloxicam-M (200µg/pata), ou salina, por via i.pl., 30 e 20 minutos respectivamente, antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a mediada inicial (A, C).

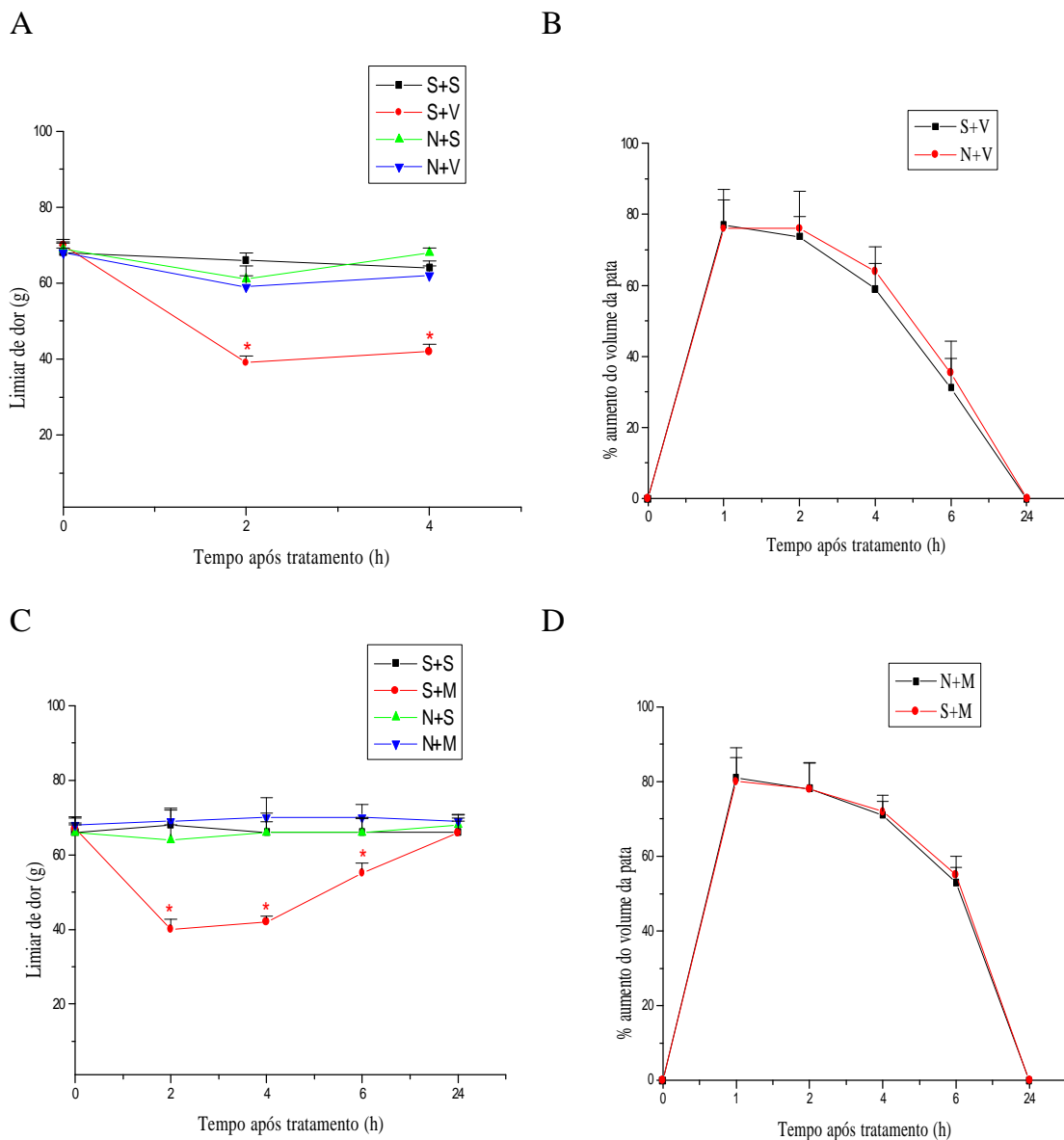


Figura 23- Efeito do tratamento com NDGA sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops asper* e pela mitorxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e em diversos tempo após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), mitorxina -M (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, antes (tempo zero) e 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a administração do veneno, toxina ou salina. Os animais foram tratados com NDGA-N (30mg/Kg) ou salina, por via i.p., 30 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida inicial (A, C).

4.3.10- Efeito do tratamento com BN 52021

BN-52021, antagonista de PAF, quando administrado 30 minutos antes da injeção i.pl. de VBa ou MIII, não interferiu com o desenvolvimento da resposta hiperalgésica (Fig. 24) causada pelos mesmos.

O BN52021, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 24).

Observação: Estudos anteriores realizados por TEIXEIRA *et al.* (1994) demonstraram que o BN 52021 reduz a resposta hiperalgésica induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

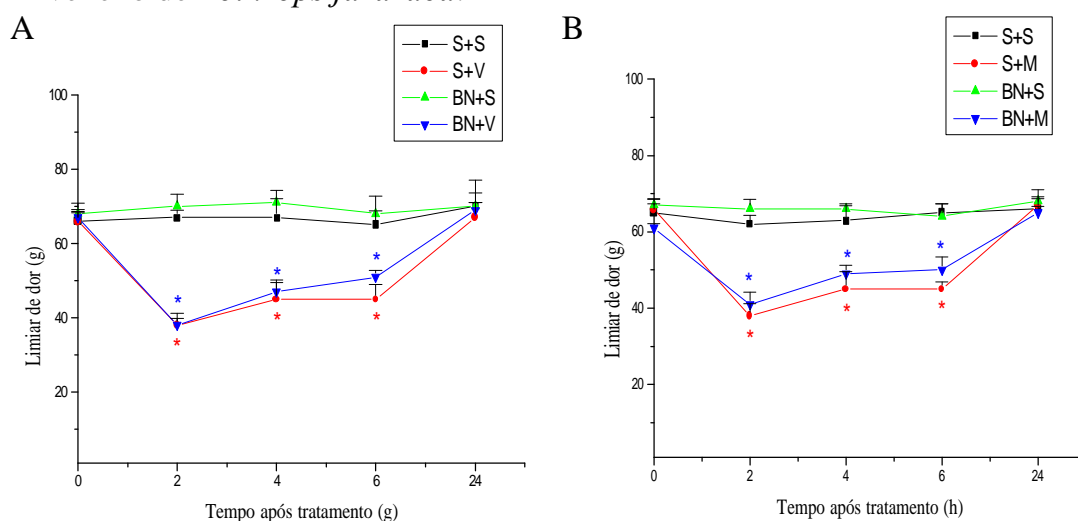


Figura 24- Efeito do tratamento com BN-52021 sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno de *Bothrops asper* (A) e miotoxina III (B). A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo zero) e 2, 4, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno-V (15µg/pata), miotoxina (10µg/pata) ou salina-S (grupo controle). Os animais foram tratados com BN-52021-BN (50µg/pata) ou salina, 60 minutos antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a mediada inicial.

4.3.11- Efeito do tratamento com guanetidina

Guanetidina, depletor de aminas simpatomiméticas periféricas, quando administrada previamente aos venenos ou toxina, não interferiu com o desenvolvimento da resposta hiperalgésica (Fig.25 A) ou edematogênica (Fig.25 B) induzida pelos mesmos.

Cabe ressaltar que este mesmo tratamento reverteu a hiperalgesia induzida por carragenina, empregada como controle positivo (Fig. 25). A guanetidina, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 25).

4.3.12- Efeito do tratamento com LNMMA

O LNMMA, inibidor da óxido nítrico sintase, quando administrado 1 hora antes do VBJ, VBA ou MIII não modificou as respostas hiperalgésica (Fig 26 A) e edematogênica (Fig.26 B) induzidas pelos mesmos.

O LNMMA, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 26).

*
* *

Os resultados obtidos com os diversos tratamentos farmacológicos estão apresentados, de forma resumida, na Tabela 1.

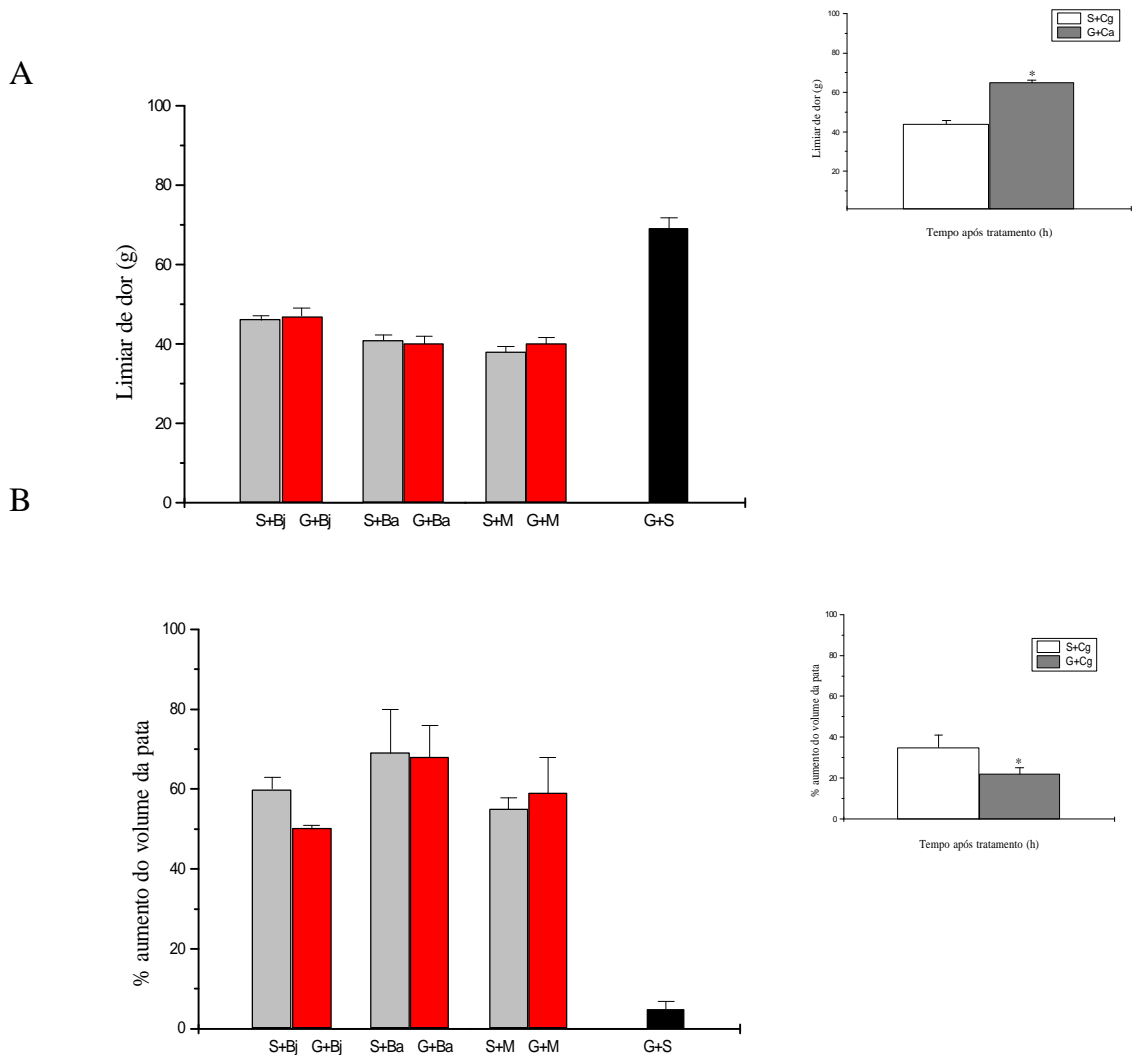
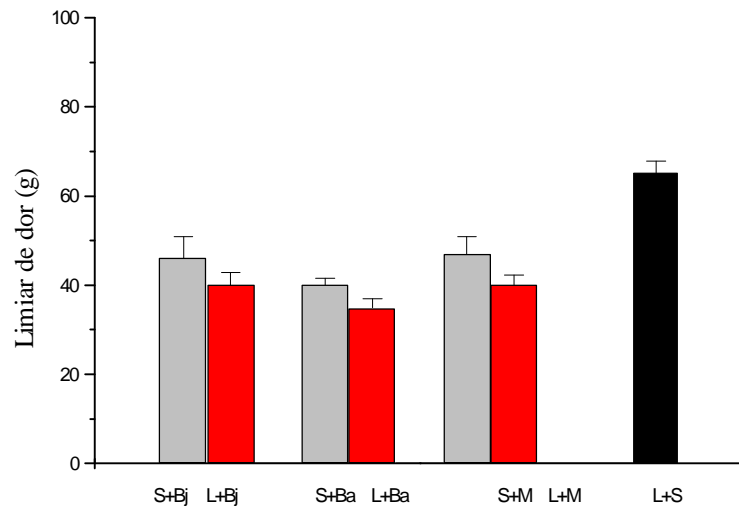


Figura 25- Efeito do tratamento com guanetidina sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e pela miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado 1 hora após a injeção i.pl. do veneno de *Bothrops jararaca*-Bj (15µg/pata) e miotoxina-M (10µg/pata) ou 2 horas após a injeção i.pl. do veneno de *Bothrops asper*-Ba (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, no mesmo período de tempo. Os animais foram tratados com guanetidina-G (30mg/Kg) ou salina, pela via s.c., durante 3 dias consecutivos. Carragenina-Cg (200µg/pata) foi empregada como controle positivo (gráficos superiores). Neste caso, as determinações foram realizadas 3h após a administração do irritante. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo.*p<0,05 por comparação com o grupo S+Cg (gráficos superiores).

A



B

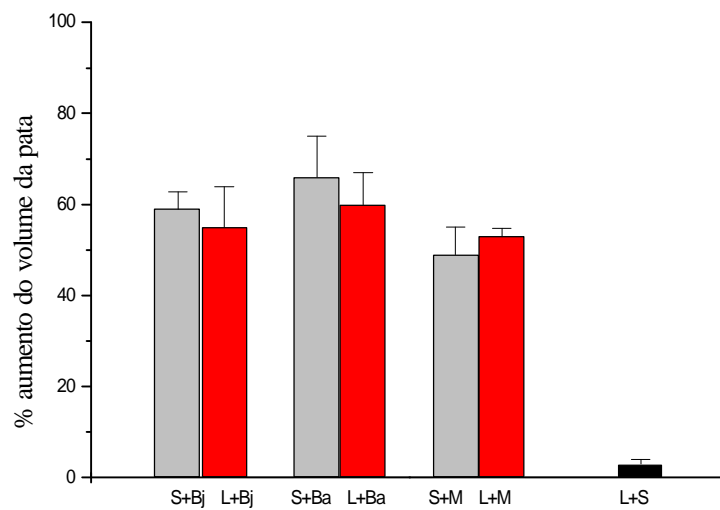


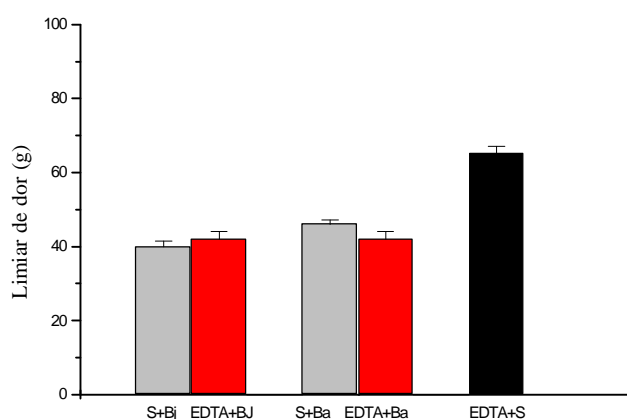
Figura 26- Efeito do tratamento com LNMMA sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e pela miotoxina III. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado 1 hora após a injeção i.pl. do veneno de *Bothrops jararaca*-Bj (15µg/pata) e miotoxina-M (10µg/pata) ou 2 horas após a injeção do veneno de *Bothrops asper*-Ba (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, no mesmo período de tempo. Os animais foram tratados com LNMMA-L (50µg/pata) ou salina, 60 min. antes da injeção dos agentes lesivos. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo.

4.4- Efeito do EDTA sobre a hiperalgesia e o edema induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e *Bothrops asper* (VBa):

CaNa₂EDTA, um quelante de cálcio, quando incubado com os venenos, não interferiu com a resposta hiperalgésica (Fig. 27 A) ou edematogênica (Fig. 27 B) causada pelos mesmos.

O EDTA, *per se*, não acarretou resposta hiperalgésica ou edematogênica (Fig. 27).

A



B

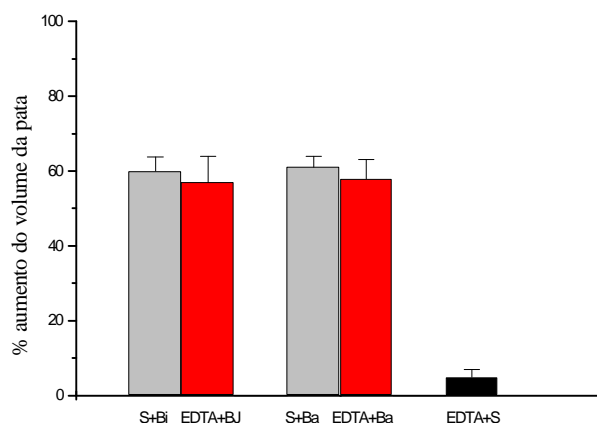


Figura 27- Efeito do tratamento com CaNa₂EDTA sobre a hiperalgesia (A) e o edema (B) induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*. A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão da pata de ratos. O limiar de dor foi determinado 1 hora após a injeção i.pl. do veneno de *Bothrops jararaca*-Bj (15µg/pata) e miotoxina-M (10µg/pata) ou 2 horas após a injeção do veneno de *Bothrops asper*-Ba (5µg/pata) ou salina-S (grupo controle). O edema foi avaliado por pletismografia, no mesmo período de tempo. O veneno foi incubado, *in vitro*, com o EDTA, por 30 min., a 37 °C. Os resultados representam a média ± epm de 5 animais por grupo.

Tabela 1- Quadro resumo do efeito dos diversos tratamentos farmacológicos sobre a hiperalgesia e o edema induzido pelos venenos de *B. jararaca*, *B. asper* e pela miotoxina III.

drogas	VBj		VBa		MIII	
	hiperalgesia	edema	hiperalgesia	edema	hiperalgesia	edema
Prometazina	—	—	—	RP	RP	RP
Metisergida	—	—	—	—	RP	—
Hoe-140	R	—	R	—	R	—
Anti-TNF α	—	—	—	—	—	—
Anti-IL1	—	—	—	—	—	—
Dexametasona	RP	—	RP	—	R	RP
Indometacina	R	—	—	—	—	—
Meloxicam	—	—	—	—	—	—
NDGA	*	ND	R	—	R	—
BN-52021	*	ND	—	ND	—	ND
Guanetidina	—	—	—	—	—	—
LNMA	—	—	—	—	—	—
EDTA	—	—	—	—	—	—

R- reversão

RP- reversão parcial

— - sem efeito

*-resultado obtido por TEIXEIRA *et al.*(1994)

ND- não determinado

5. DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* induzem reações locais caracterizadas por mionecrose, hemorragia, edema e dor. Diferentemente do que ocorre no quadro sistêmico, essas reações locais não são neutralizadas de modo eficiente pelos antivenenos, ainda que este seja administrado logo após o acidente (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981, 1986). Apesar da importância clínica da dor induzida por estes venenos, a caracterização dos mecanismos envolvidos na gênese deste fenômeno é ainda escassa e incompleta. Além disso, não existem estudos sobre a capacidade do antiveneno em neutralizar esta reação local.

Assim, o presente trabalho visou ampliar os conhecimentos sobre a dor acarretada pelos venenos de *B. jararaca* e *B. asper*, duas serpentes de importância epidemiológica nos acidentes ofídicos que ocorrem na América Latina. Estes estudos envolveram a avaliação da cinética e da mediação química da resposta hiperalgésica e a sua correlação com a resposta edematogênica induzida pelos mesmos. Além disso, foi investigada a ação hiperalgésica da miotoxina III, uma fosfolipase A₂ variante Asp-49, com atividade enzimática, isolada do veneno de *Bothrops asper*. Cabe ressaltar que as miotoxinas são importantes constituintes do veneno de *Bothrops asper* e contribuem de modo crucial para o desenvolvimento de alguns dos efeitos locais deste veneno, como a miotoxicidade e o edema (BOLAÑOS, 1982). Foram isoladas do veneno, até o momento, quatro isoformas com estrutura de fosfolipases A₂: duas com atividade enzimática (Miotoxina I e III) e duas sem atividade (Miotoxina II e IV) (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; KAISER *et al.*, 1990; DÍAZ *et al.*, 1995).

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa, foi utilizado o teste de pressão da pata de rato, baseado no método descrito por RANDALL & SELITTO (1957).

Este teste emprega um estímulo mecânico (pressão em gramas), aplicado sobre a pata dos animais. Este estímulo evoca resposta motora, traduzida pela retirada da pata. O teste de pressão da pata é, em geral, empregado como modelo para indução de hiperalgesia, caracterizada pela diminuição do limiar de dor dos animais. Ainda, por estas características, este modelo é usualmente utilizado para o estudo de fármacos com atividade antiinflamatória e/ou analgésica periférica.

Os venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e a miotoxina III induzem hiperalgesia, caracterizada pela diminuição da força (em gramas) necessária para a indução da reação de retirada da pata, após a administração intraplantar dos mesmos.

A dose de VBJ empregada (5µg/pata) baseou-se em trabalho anterior realizado por TEIXEIRA *et al.*(1994). Estes autores demonstraram que a hiperalgesia induzida pelo VBJ é mediada, ao menos em parte, por prostaglandinas, leucotrieno e PAF.

No presente estudo, a resposta hiperalgésica máxima acarretada pelo veneno de *Bothrops jararaca* foi observada 1h (34%) após a administração do mesmo, desaparecendo em 24 horas. Nossos resultados diferem daqueles obtidos por TEIXEIRA *et al.*(1994), que mostraram que a hiperalgesia ainda está presente 24 horas após a administração do veneno. É importante salientar que os venenos empregados nestes estudos são uma mistura de venenos proveniente da extração de vários espécimes adultos de serpentes *Bothrops jararaca*. Desta forma, diferenças no “pool” de venenos, empregado em ambos os estudos, podem ter contribuído para a obtenção de resultados distintos.

O veneno de *B. asper* causou hiperalgesia em todas as doses testadas (5, 10 e 15µg/pata). Este fenômeno foi mais significativo para a dose de 15µg/pata, não tendo sido detectadas diferenças significativas entre as doses de 5 e 10µg. A hiperalgesia foi máxima 2 h após a administração do VBA (45% para a dose de 15µg/pata), não sendo mais detectada na 24^a hora. Para os estudos subsequentes,

foi utilizada a dose de 15µg/pata, uma vez que esta dose causou hiperalgesia de magnitude suficiente para a determinação da mediação química deste fenômeno e não causou hemorragia local. A ausência de hemorragia foi constatada através da análise histológica das patas (dados não demonstrados).

Estes dados, indicam uma atividade hiperalgésica mais potente para o veneno de *Bothrops jararaca*, em relação ao veneno de *Bothrops asper*. Diferenças na composição das peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*, que possam acarretar ações fisiopatológicas ou a geração de mediadores químicos hiperalgésicos distintos, podem explicar as diferenças observadas na intensidade do fenômeno hiperalgésico. Dados recentes mostram diferenças nos efeitos tóxicos de ambos venenos, sendo o veneno de *Bothrops jararaca* mais potente que o veneno de *Bothrops asper* para a indução de letalidade e hemorragia (BOGARÍN *et al.*, 2000).

A administração da miotoxina III (fosfolipase A₂ variante Asp-49) também acarretou hiperalgesia em todas as doses testadas (5, 10 e 15 µg/pata). Diferentemente da ação do veneno bruto, o pico da resposta induzida pela MIII, ocorreu 1h após a sua administração (56% para 10µg/pata).

Estes dados sugerem que a miotoxina III pode contribuir para o efeito hiperalgésico do veneno bruto de *B. asper*.

Ambos os venenos e toxina induziram, além da hiperalgesia, resposta edematogênica. A evolução de ambos os fenômenos foi semelhante. Porém, a resposta edematogênica, para os venenos brutos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*, foi mais intensa do que a hiperalgésica. As diferenças observadas em relação à intensidade do fenômeno inflamatório e hiperalgésico, indicam que mecanismos distintos devem estar envolvidos na gênese e/ou no desenvolvimento deste fenômeno. O envolvimento de diferentes mediadores químicos e/ou a participação de componentes distintos presentes nestes venenos, na gênese destes fenômenos, podem contribuir para as diferenças observadas.

Como assinalado anteriormente, um dos graves problemas nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* é a ineficácia do antiveneno em neutralizar as reações locais (ROSENFELD, 1971; CARDOSO *et al.*, 1993). Até o início dos nossos estudos, não haviam dados na literatura sobre a capacidade do antiveneno em neutralizar o fenômeno da dor causado pelos venenos de *B. jararaca* e *B. asper*.

Assim, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a capacidade dos antivenenos produzidos no Instituto Butantan (AVIB) e no Instituto Clodomiro Picado da Costa Rica (AVCP) em reverter a hiperalgesia e o edema induzidos pelos venenos de *B. jararaca* e *B. asper*.

Os dados obtidos nos ensaios *in vivo*, mostrando que apenas o AVIB, quando administrado previamente ao veneno, é capaz de interferir com a hiperalgesia induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*, corroboram os dados de literatura sobre a fraca capacidade do soro em neutralizar os efeitos locais. Deve-se salientar que a neutralização da hiperalgesia presentemente observada é decorrente da presença de anticorpos específicos no antiveneno, uma vez que o soro equino normal não interferiu com a hiperalgesia acarretada pelo VBj (dados não mostrados).

Por outro lado, a incapacidade do antiveneno polivalente do Instituto Clodomiro Picado (AVCP), em bloquear *in vivo*, a hiperalgesia acarretada pelo VBa, não deve ser conseqüente à ausência de anticorpos específicos no antiveneno, uma vez que este efeito foi inibido quando o veneno foi pré-incubado com o antiveneno. Uma explicação para a ineficácia *in vivo*, seria a dificuldade de acesso do antiveneno ao sítio de ativação do efeito hiperalgésico.

Em relação ao edema, somente o antiveneno botrópico produzido no Instituto Butantan, quando injetado 15min. antes ou concomitante ao VBj foi capaz de interferir com este fenômeno. Nos ensaios de soroneutralização *in vitro*,

a pré-incubação do veneno com seus respectivos antivenenos, resultou em inibição do edema.

Os dados sobre neutralização do edema estão de acordo com aqueles obtidos por DOS SANTOS *et al.* (1992); GONCALVES, (1993), e GUTIERREZ *et al.* (1998), mostrando que o antiveneno é efetivo em bloquear a resposta edematogênica apenas quando incubado com o veneno previamente à injeção intraplantar ou em inibi-la parcialmente, quando administrado *in vivo*, se este tratamento ocorrer antes ou até 5 minutos após a aplicação do veneno. Neste sentido, os resultados mostram que a neutralização *in vitro* foi mais eficiente em bloquear os efeitos hiperalgésico e edematogênico.

Dentre as hipóteses levantadas na literatura, para explicar a ineficácia do soro em neutralizar os efeitos locais, está a de que estes eventos, por serem consequência da ação de diversas toxinas ou substâncias presentes no veneno e por instalarem-se rapidamente, comprometem a ação do antiveneno (GUTIÉRREZ *et al.*, 1998). Ainda, o fato do soro, quando injetado *in vivo*, previamente ao veneno, não ser totalmente eficaz na neutralização destes efeitos, indica que a concentração de anticorpos no tecido é insuficiente para acarretar a neutralização das toxinas responsáveis pelo desencadeamento destes efeitos.

Ainda, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, mostrando que o AVIB é capaz de neutralizar a hiperalgesia e o edema acarretado pelo VBj até a diluição 1:8 indicam que, em comparação com o AVCP, o antiveneno produzido pelo Instituto Butantan é mais eficaz na neutralização destes efeitos. Como assinalado em Material e Métodos, para a obtenção do AVIB, é utilizado, nos processos de imunização, uma mistura de venenos de cinco espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo a *B. jararaca*. Por outro lado, para a obtenção do AVCP, além da *B. asper*, são empregados venenos de serpentes do gênero *Crotalus* e *Lachesis*. Estas diferenças nos processos de imunização podem contribuir para as diferenças observadas na capacidade de neutralização de ambos os antivenenos.

Adicionalmente, estes estudos de neutralização sugerem, dissociação entre os fenômenos de hiperalgesia e edema, uma vez que somente o antiveneno botrópico, produzido no Instituto Butantan, quando administrado *in vivo*, mostrou-se mais eficaz em neutralizar a resposta edematogênica acarretada pelo veneno de *Bothrops jararaca*, do que a hiperalgésica.

Como a miotoxina III parece ter papel relevante para a atividade algogênica do veneno de *B. asper*, foi nosso objetivo também, investigar a capacidade do AVCP em neutralizar o efeito hiperalgésico desta toxina. Nos ensaios *in vitro*, o AVCP reverteu não só a hiperalgesia, mas também o edema induzidos por esta toxina. Estes resultados reforçam o papel desta fosfolipase como componente hiperalgésico e edematogênico do veneno bruto e indicam elevada capacidade imunogênica desta toxina.

Apesar de variações interespecífica e intraespecífica significantes na composição química e na atividade farmacológica de venenos (JIMENÉZ-PORRAS, 1964; TU, 1977; GUTIÉRREZ *et al.*, 1980), a existência de reações cruzadas entre venenos das diferentes espécies do gênero *Bothrops*, e diversos antivenenos, tem sido demonstrada (ROSENFELD & KELEN, 1966; GUTIÉRREZ *et al.*, 1985; KORNALÍK & TÁBORSKÁ, 1989; DOS SANTOS *et al.*, 1992; BOGARÍN *et al.*, 1999). De acordo com estas observações, investigamos a capacidade do AVIB em neutralizar os efeitos induzidos pelo VBa ou do AVCP em interferir com os efeitos causados pelo VBj.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, mostraram que o antiveneno produzido no Instituto Butantan é capaz de reverter a dor induzida pelo veneno de *B. asper*, além de ser mais efetivo do que o AVCP em interferir com a resposta edematogênica (33% e 15%, respectivamente). Estes dados evidenciam relação imunológica entre os componentes do veneno de *B. asper* e dos demais venenos botrópicos que participam da mistura de imunização do AVIB, em particular,

para aquelas toxinas envolvidas diretamente com os efeitos hiperalgésicos e edematogênicos.

Estudos comparativos recentes realizados por BOGARÍN *et al.* (2000), indicam reatividade cruzada entre os antivenenos produzidos no Instituto Butantan e no Instituto Clodomiro Picado e os venenos de serpentes Crotalinae da América do Sul e América Central, incluindo os venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*. Esses autores observaram ainda, que o antiveneno botrópico produzido no Instituto Butantan tem maior potência contra a maioria dos venenos Crotalinae, especialmente contra venenos de serpentes da América do Sul, enquanto que o antiveneno produzido no Instituto Clodomiro Picado é mais efetivo na neutralização do veneno de *Bothrops asper*.

Os dados apresentados até o momento apontam, mais uma vez, para a necessidade de alternativas terapêuticas complementares à soroterapia, para o tratamento das lesões locais induzidas por venenos botrópicos. O conhecimento da mediação química dos fenômenos de hiperalgesia e edema e dos mecanismos da ação intracelular dos mesmos pode contribuir para estas alternativas terapêuticas. Portanto, em continuidade a estes estudos, caracterizamos alguns dos mediadores químicos envolvidos na gênese da hiperalgesia e do edema induzidos por estes venenos e toxina.

É importante salientar que, em alguns ensaios experimentais, foi utilizada carragenina como controle positivo, uma vez que foi demonstrado este agente lesivo evoca hiperalgesia mediada pela liberação sequencial de mediadores, incluindo bradicinina, citocinas, como TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8, produtos da ciclooxigenase e aminas simpatomiméticas (NAKAMURA & FERREIRA, 1987; FERREIRA *et al.*, 1988; CUNHA *et al.*, 1991; 1992).

A hiperalgesia induzida pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* não parece depender da liberação de histamina ou serotonina, uma vez que o pré-tratamento dos animais com os antagonistas de receptores H1, ou de

receptores 5-HT, não interferiu com a dor induzida por ambos os venenos. Por outro lado, aquelas aminas são importantes mediadores da hiperalgesia acarretada pela miotoxina III, uma vez que este fenômeno foi significativamente inibido por estes antagonistas.

Dados recentes demonstraram que botropstoxina-I (FLA₂ variante Lys-49, sem atividade enzimática) e botropstoxina-II (FLA₂ variante Asp-49, com pouca atividade enzimática), duas fosfolipases A₂ isoladas do veneno de *B. jararacussu*, acarretam formação de edema em ratos, dependente de desgranulação de mastócitos. Estas FLA₂ induzem, *in vitro*, liberação de serotonina de mastócitos peritoneais de ratos (LANDUCCI *et al.*, 1998). Estes dados, associados aos nossos resultados, indicam uma ação da miotoxina III, em mastócitos, com consequente liberação de aminas, as quais participam, da gênese da dor acarretada por esta toxina. Estudos posteriores, avaliando a ação desta miotoxina sobre mastócitos de ratos, poderão contribuir para o esclarecimento desta hipótese.

Em relação à resposta edematogênica, os dados obtidos sugerem que a histamina está envolvida na fase inicial do fenômeno edematogênico induzido pelo VBa, uma vez que o pré-tratamento com o antagonista de receptor H1 interferiu com o edema induzido pelo mesmo, na 2ª hora. Por outro lado, não foi possível detectar a participação de serotonina na resposta edematogênica acarretada pela MIII ou pelo VBj.

Outro mediador de importância para a hiperalgesia induzida pelos venenos botrópicos e a MIII é a bradicinina. A hiperalgesia produzida por estes venenos e pela toxina foi bloqueada pelo Hoe-140, um antagonista de receptor B2.

Está bem demonstrado que a bradicinina é um mediador importante em processos algogênicos, através da ativação e sensibilização de nociceptores. Cabe lembrar que a sensibilização dos nociceptores é o fenômeno responsável pelo desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória (FERREIRA, 1972; FERREIRA *et*

al., 1978). Os receptores B2 têm papel predominante no desenvolvimento da resposta hiperalgésica (FERREIRA *et al.*, 1993; HEAPY *et al.*, 1993), porém tem sido demonstrado que ambos os receptores B1 e B2 estão envolvidos nestes fenômenos (PERKINS & KELLY, 1993; DAVIS & PERKINS, 1994; POOLE *et al.*, 1999). Estudos mostraram ainda, que os receptores B2 têm papel significativo nos estágios iniciais da hiperalgesia inflamatória, enquanto que os receptores B1 são responsáveis pela manutenção do estado hiperlagésico durante o processo inflamatório (DRAY, 1993).

Apesar do Hoe-140 ter abolido a resposta hiperalgésica induzida pelos venenos e miotoxina, o papel do receptor B1, neste fenômeno, não pode ser totalmente descartado.

Os resultados presentemente obtidos indicam que os receptores B2 não estão envolvidos com o edema acarretado pelos venenos ou toxina, corroborando dados da literatura que indicam a maior relevância desses receptores para o desenvolvimento de eventos hiperalgésicos do que edematogênicos.

Dados da literatura têm mostrado que citocinas, como TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8, induzem hiperalgesia. Este fenômeno é indireto e mediado por: a) secreção de eicosanóides, b) aumento da expressão de receptores para bradicinina e neuropeptídeos e c) liberação de aminas do sistema nervoso simpático (CUNHA *et al.*, 1991;1992; FERREIRA, 1994).

Os dados apresentados sugerem que o TNF α e a IL-1 não são mediadores importantes da dor e do edema induzidos pelos venenos de *B. jararaca*, *B. asper* e MIII, uma vez que o pré-tratamento com o anticorpo anti-TNF α ou anti-IL-1 não interferiu com estes fenômenos.

Cabe ressaltar que dados da literatura têm mostrado aumento dos níveis séricos de citocinas em humanos ou camundongos após envenenamento por serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* (LOMONTE *et al.*, 1993;

BARRAVIERA *et al.*, 1995; PETRICEVICH *et al.*, 2000). A injeção intravenosa de uma DL-50 de ambos os venenos promove aumento dos níveis séricos de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e IFN- γ (PETRICEVICH *et al.*, 2000). Por outro lado, a administração de 50 μ g de veneno de *B. asper* na pata de camundongos, acarreta aumento de IL-6, mas não de TNF- α ou IL-1 (LOMONTE *et al.*, 1993). Estes dados sugerem que o incremento nos níveis circulantes de citocinas ocorre principalmente em envenenamentos graves e situações de choque, em contraste aos moderados ou de fraca intensidade, como é o caso do modelo experimental por nós utilizado. Apesar das diferenças nos procedimentos experimentais empregados, os resultados obtidos por LOMONTE *et al.* (1993) podem contribuir para o entendimento da ausência de efeitos do TNF e IL-1 para o desenvolvimento da hiperalgesia acarretada pelo veneno de *B. asper*.

Os resultados ora apresentados sugerem também a participação de mediadores lipídicos na hiperalgesia desencadeada pelo veneno de *Bothrops asper* ou pela toxina, uma vez que a dexametasona reduziu a dor causada pelos mesmos (64% e 85%, respectivamente). O efeito inibitório da dexametasona sobre fosfolipases A₂, parece envolver a síntese de lipocortina. FLOWER (1979, 1994) demonstrou que a lipocortina é um mediador importante da inibição, pela dexametasona, da hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina, bradicinina e citocinas.

Em relação ao veneno de *Bothrops jararaca*, TEIXEIRA *et al.* (1994) evidenciaram que a resposta hiperalérgica induzida por este veneno é inibida por dexametasona. Estes resultados em conjunto, apontam a importância da atividade fosfolipásica para a gênese da dor acarretada pelos venenos botrópicos.

O tratamento com dexametasona foi efetivo em inibir a resposta edematogênica causada apenas pela miotoxina III. No entanto, estudos realizados por CHAVES *et al.* (1995) mostraram que a dexametasona e a mepacrina foram

efetivas em reduzir a resposta edematogênica induzida tanto pelo VBa quanto pela MIII, em camundongos (CHAVES *et al.*, 1995; 1998). Diferenças na dose de veneno e na espécie animal utilizadas em ambos os estudos podem ter contribuído para a obtenção de resultados distintos. Além disso, os dados por nós obtidos sugerem que o efeito estabilizador da dexametasona sobre a membrana de mastócitos, deve ter contribuído para a redução do edema causado pela MIII e reforça a possível ação dessa toxina sobre mastócitos.

O pré-tratamento com indometacina, um inibidor da ciclooxigenase, ou com meloxicam, inibidor preferencial para ciclooxigenase 2 (VANE & BOTING, 1996; BEZERRA *et al.*, 2000) não interferiu com a hiperalgesia e o edema induzidos pelo VBa e MIII, sugerindo que os produtos da ciclooxigenase não contribuem de modo significativo para estes fenômenos. Por outro lado, o NDGA, um inibidor de lipoxigenase e ciclooxigenase, bloqueou a resposta hiperalgésica induzida pelos mesmos. Estes dados sugerem que os leucotrienos devem ser mediadores importantes da hiperalgesia induzida pelo VBa e pela miotoxina. Vários dados da literatura demonstram que o leucotrieno B₄, através da atuação em nociceptores, causa hiperalgesia e pode contribuir para o componente da hiperalgesia que é resistente a agentes antiinflamatórios não esteroidais (RACKHAM & FORD-HUTCHINSON, 1983; LEVINE *et al.*, 1984; MARTIN, 1990; MADISON *et al.*, 1992).

A utilização futura de inibidores específicos da lipoxigenase ou de antagonistas de receptores para leucotrieno B₄ permitirá avaliar mais adequadamente o papel dos leucotrienos na hiperalgesia acarretada pelo veneno de *B. asper*.

O PAF, outro importante mediador lipídico, que contribui para a dor inflamatória (VARGAFTIC & FERREIRA, 1981; BRAQUET *et al.*, 1987), não parece estar envolvido na hiperalgesia induzida pelo VBa e MIII, uma vez que BN 52021, não interferiu com este fenômeno.

Em relação ao veneno de *Bothrops jararaca*, como mencionado anteriormente, TEIXEIRA *et al.*(1994), demonstraram que os produtos tanto da ciclooxigenase, como da lipoxigenase e o PAF, são importantes mediadores da dor induzida por este veneno. Esses dados sugerem diferenças importantes nos constituintes dos dois venenos, responsáveis pelo seus efeitos hiperalgésicos.

Além da participação de mediadores lipídicos, foi também investigado o papel de aminas simpatomiméticas na gênese da hiperalgesia acarretada pelos venenos ou miotoxina. As aminas simpatomiméticas acarretam excitação de neurônios sensoriais, contribuindo para o fenômeno de hiperalgesia (DRAY, 1997a, para revisão). Quando utilizamos guanetidina, um depletor de aminas periféricas, não foi possível observar diferença significativa na resposta hiperalgésica edematogênica induzida pelos venenos ou toxina. Ainda, o pré-tratamento dos animais com ioimbina, prazosin ou atenolol, antagonistas de receptores alfa 1, alfa 2 e receptores β adrenérgicos, respectivamente, não interferiu com as ações acarretadas pelos venenos (dados não mostrados). Estes resultados, em conjunto, sugerem que aminas simpatomiméticas não medeiam o efeito hiperalgésico nem edematogênico dos venenos. Cabe ressaltar que TREBIEN & CALIXTO (1989) demonstraram que receptores α e β adrenérgicos participam do edema induzido pelo VBJ (30 μ g/pata). Mais uma vez, diferenças na dose ou na potência de venenos empregados em ambos os estudos, podem explicar a obtenção de resultados distintos.

Da mesma forma, o óxido nítrico não está envolvido nas respostas hiperalgésica e edematogênica acarretadas pelo VBJ, VBA ou toxina, uma vez que o tratamento dos animais com LNMMA, um inibidor de NOS, não interferiu com as respostas induzidas por estes agentes.

Metaloproteinases hemorrágicas possuem papel importante na gênese dos efeitos locais induzidos por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*

(GUTIÉRREZ *et al.*, 1995; KAMIGUTI *et al.*, 1991; 1996; 1997; RUCAVADO *et al.*, 1995; 1998). Além de hemorragia (RUCAVADO *et al.*, 1995), estas enzimas induzem edema (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995), mionecrose (RUCAVADO *et al.*, 1995, GUTIÉRREZ *et al.*, 1995) e lesão tecidual (RUCAVADO *et al.*, 1998).

Estudos realizados por CHAVES *et al.* (1995) mostraram que a resposta edematogênica induzida pelo VBa, em camundongos, é causada, pelo menos em parte, por metaloproteinases. Adicionalmente LËON *et al.* (1998) e RUCAVADO *et al.* (2000) demonstraram que o EDTA, um agente quelante de íons capaz de inibir a ativação das enzimas metaloproteinases, é efetivo em inibir as atividades hemorrágica e dermonecrótica induzidas pelo VBa, sugerindo a participação destas enzimas nestes efeitos do veneno.

Com base nos dados acima apresentados, foi nosso objetivo investigar o papel das metaloproteinases na gênese da dor e do edema induzidos pelos venenos de *B. jararaca* e *B. asper*.

Nossos resultados mostraram que o EDTA, quando incubado com os venenos de *B. jararaca* e *B. asper*, não modifica as ações hiperalgésica e edematogênica destes venenos. Estes resultados sugerem que as metaloproteinases, pelo menos para as doses de venenos presentemente empregadas, não têm papel preponderante na gênese da dor e/ou que sua atividade seja possivelmente, mascarada ou suprimida por outros componentes presentes nestes venenos, como as fosfolipases A₂.

Em conjunto, os dados apresentados indicam que os venenos de *B. jararaca* e *B. asper* e a miotoxina III induzem resposta hiperalgésica e edematogênica. Os dados obtidos com o VBj, associados àqueles obtidos por TEIXEIRA *et al.* (1994) indicam que a bradicinina, os eicosanóides e o PAF são mediadores importantes da hiperalgesia acarretada pelo VBj. Em relação ao VBa,

a bradicinina e os derivados da lipoxogenase participam da gênese deste fenômeno. Estes resultados indicam ainda, que a bradicinina e a atividade fosfolipásica presente ou gerada por estes venenos, têm papel relevante para a ação algogênica de venenos botrópicos. A importância das fosfolipases nestes venenos é corroborada pelos dados obtidos com a miotoxina III, uma fosfolipase A_2 variante Asp-49 presente no veneno de *B. asper*. No entanto, são necessários estudos adicionais que investiguem de modo mais detalhado, a relação entre atividade catalítica e o efeito algogênico dessas FLA₂ ou mesmo, que caracterizem os domínios da molécula da toxina envolvidos nesse efeito. Diferentemente do observado para a resposta hiperalgésica, estes mediadores não estão envolvidos na gênese ou com o desenvolvimento da resposta edematogênica acarretada por estes venenos. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o edema e a hiperalgesia acarretados por estes venenos ou toxinas.

.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos até o momento sugerem que:

- Os venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e uma miotoxina isolada do veneno de *Bothrops asper*, com atividade de FLA₂ (miotoxina III), são capazes de induzir hiperalgesia e edema em ratos.
- Apesar do antiveneno conter anticorpos específicos capazes de neutralizar o edema e a hiperalgesia, a neutralização destes efeitos, uma vez desencadeados, não é efetiva.
- O veneno de *Bothrops asper* possui atividades biológicas e antígenos comuns a outros venenos do gênero *Bothrops*, uma vez que foi detectada neutralização cruzada entre este veneno e o antiveneno produzido no Instituto Butantan.
- A histamina participa da hiperalgesia e do edema induzidos pela miotoxina III, enquanto a serotonina participa somente da resposta hiperalgésica acarretada por esta toxina. Em relação aos venenos brutos, apenas a histamina participa dos estágios iniciais da resposta edematogênica causada pelo veneno de *B. asper*.
- A bradicinina é um mediador importante para o efeito hiperalgésico acarretado pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *B. asper* e pela FLA₂, mas não para o efeito edematogênico induzido pelos mesmos.
- Os leucotrienos participam da resposta hiperalgésica causada pelo VBJ, VBA e MIII, enquanto as prostaglandinas parecem estar envolvida apenas na resposta acarretada pelo VBJ. Estes eicosanóides não participam do edema causado pelo VBJ, VBA ou MIII.
- A Interleucina-1, o TNF α , o óxido nítrico e as metaloproteases não estão envolvidos com a resposta hiperalgésica e edematogênica acarretados por os ambos venenos e pela toxina.

- A dor acarretada pelos venenos *Bothrops jararaca* e *B. asper* e pela miotoxina III não está diretamente relacionada com a manifestação da resposta edematogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G. F.; FAN, H. V.; CARDOSO, D. F.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. P. Efficacy of bothropic antivenom in events induced by *Bothrops jararaca* venom on microcirculation. Intravital microscopic study. In: **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxicologia**, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; DOS REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **28**: 220-227, 1986.

AMARAL, C. F. S.; SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, **23**: 877-885, 1985.

ANBAR, M. & GRATT, B. M. Role of nitric oxide in the physiopathology of pain. **J. of Pain and Symptom Management**, **14** (4): 225-254, 1997.

ARROYO, O.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamiento por mordedura de sepiente en Costa Rica en 1996: epidemiologia y consideraciones clínicas. **Acta Médica Costarricense**, **41**: 23-29, 1999.

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, **24** (9): 943-946, 1986.

BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MEIRA, D. A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. **J. Venom Anim. Toxins**, **1**: 11-22, 1995.

BECK, P. W. & HANDWERKER, H. O. Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibres. **Pflugers Archives**, **347**: 209-222, 1974.

BEZERRA, M. M.; DE LIMA, V.; ALENCAR, V. B.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, **71** (6): 1009-1014, 2000.

BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol.- Toxins Reviews**, **7**: 121-209, 1988.

BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, **62**: 325-372, 1994.

BOGARÍN, G.; MORAIS, J. F.; YAMAGUCHI, I. K.; STEPHANO, M. A.; MARCELINO, J. R.; NISHIKAWA, A. K.; GUIDOLIN, R.; ROJAS, G.; HIGASHI, H. G.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, **38**: 1429-1441, 2000.

BOGARÍN, G.; ROMERO, M.; ROJAS, G.; LUTSCH, C.; CASADAMONT, M.; LANG, J.; OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops snake* venom. **Toxicon**, **37**: 551-557, 1999.

BOLAÑOS, R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. **Rev. cost. Cienc. Méd.**, **3**: 165-184, 1982.

BOMALASKI, J. S. & CLARK, M. A. Phospholipase A2 and arthritis. **Arthritis Rheum.**, **36** (2): 190-198, 1993.

BOMALASKI, J. S.; LAWTON, P.; BROWNING, J. L. Human extracellular recombinant phospholipase A2 induces an inflammatory response in rabbit joints. **J. Immunol.**, **146** (11): 3904-3910, 1991.

BRAIN, S.; LEWIS, G. P.; WHITTLE, B. J. R. Actions of phospholipase-A on mast-cell histamine release and paw oedema in the rat [proceedings]. **Br. J Pharmacol.**, **59** (3): 440P-441P, 1977.

BRAQUET, P.; TOUQUI, L.; SHEN, T. Y.; VARGAFTIG, B. B. Perspectives in platelet activating factor. **Pharmacol. Rev.**, **39**: 97-145, 1987.

BRAZIL, V. **La défense contre l' ofhidism.**, Pocaí& weiss, São Paulo, 1914.

BURIGO, A. C.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J Pharm Pharmacol.**, **48** (1): 106-111, 1996.

CAMBRIDGE, H. & BRAIN, S. D. Kinin B2 and B1 receptor-mediated vasoactive effects in rabbit synovium. **Peptides**, **19** (3): 569-576, 1998.

CARDOSO, J. L. C.; FAN, H. W.; FRANCA, 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. B.; KAMIGUTI, A. S.; KELEN, E. M. A.; HIRATA, M. H.; MIRANADOLA, R. M. S.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brasil. **Q. J. Med.**, **86**: 315-325, 1993.

CASTRO, R. C.; LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A2 into the rat pleural cavity. **Toxicon**, **38**: 1773-1785, 2000.

CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, **33**: 31-39, 1995.

CHAVES, F.; LÉON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **toxicon**, **36** (12): 1861-1869, 1998.

CIRINO, G.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; MAIELLO, F. M.; BROWNING, J. L. Recombinant secreted nonpancreatic phospholipase A2 induces a synovitis-like inflammation in the rat air pouch. **J. Rheumatol.**, **21** (5): 824-829, 1994.

CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R. J. A study of phospholipase A2-induced oedema in rat paw. **Eur. J. Pharmacol.**, **166**: 505-510, 1989.

CLARK, J. D.; LIN, L.; KRIZ, R. W.; RAMESHA, C. S.; SULTAMAN, L. A.; LIN, A. Y.; MILONA, N.; KNOPF, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, **65** (6): 1043-1051, 1991.

CLARK, J. D.; MILONA, N.; KNOPF, J. L. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937. **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)**, **87** (19): 7708-7712, 1990.

COETZER, P. W. & TILBURY, C. R. The epidemiology of snakebite in northern Natal. **S. Afr. Med.**, **62** (7): 206-212, 1982.

CROWL, R. M.; STELLER, T. J.; CONTROY, R. R.; STONER, C. R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. **J. Biol. Chem.**, **266** (4): 2647-2651, 1991.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol.**, **104** (3): 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 660-664, 1992.

DALLOB, A.; GUINDON, Y.; GOLDENBERG, M. M. Pharmacological evidence for a role of lipoxygenase products in platelet-activating factor (PAF)-induced hyperalgesia. **Biochem Pharmacol.**, **36** (19): 3201-3204, 1987.

DAMERAU, B.; LEGE, L.; OLDIGS, H. D.; VOGT, W. Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. **Naunym Sch. Arch. Pharmac.**, **287** (2): 141-156, 1975.

DAVIDSON, F. F. & DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. **J. Mol. Evol.**, **31** (3): 228-238, 1990.

DAVIS, A. J. & PERKINS, M. N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, **113**: 63-68, 1994.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GENE, J. A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta**, **1070**: 455-460, 1991.

DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A2 variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Nat. Toxins.**, **3** (1): 26-31, 1995.

DOMINGOS, M. O. Resposta imune humoral em pacientes acidentados por *Bothrops spp* e biodistribuição e neutralização do veneno de *B. jararaca* em

camundongos. *In* Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

DOS SANTOS, M. C.; GONCALVES, L. R. C.; FORTES-DIAS, C. L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F. D. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Tropical São Paulo**, **34**: 77-83, 1992.

DRAY, A. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. **TIPS**, **14**: 287-290, 1993.

DRAY, A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurones. **Pain Rev.**, **1**: 153-171, 1994.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, **75**: 125-131, 1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Can. J. Physiol. Pharmacology**, **75**: 704-712, 1997a.

DRAY, A. **The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology**, Springer, Berlin, 1997b.

DRAY, A. & PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neuroscience**, **16**: 99-104, 1993.

EICHBAUM, F. W. Ação dermatotóxica de venenos ofídicos e sua neutralização pelos antivenenos. **Mem. Inst. Butantan**, **20**: 79-94, 1947.

FARSKY, S. H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**, **35** (2): 185-193, 1997.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature New Biol.**, **240**: 200-203, 1972.

FERREIRA, S. H. **Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores**, Serviço de Publicaciones de la Universidad de Cantabria, Cantabria, 1994.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; BRISTOW, A. F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, **334** (6184): 698-700, 1988.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORRÊA, F. M. A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, **53**: 39, 1978.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 1227-1231, 1993.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, **31** (12): 1551-1559, 1993.

FLOWER, R. J. & BLACCKWELL, G. J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, **278** (5703): 456-459, 1979.

FLOWER, R. J. & ROTHWELL, N. J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol. Sciences**, **15**: 71-76, 1994.

FREMONT, D. H.; ANDERSON, D. H.; WILSON, I. A.; DENNIS, E. A. Crystal structure of phospholipase A2 from Indian cobra reveals a trimeric association. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, **90** (1): 342-346, 1993.

GONCALVES, L. R. C. Hemorragia local induzida experimentalmente pelo veneno de serpentes *Bothrops jararaca*: participação de fatores endógenos do tecido lesado. *In* Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, **18**: 603-610, 1980.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, **23** (6): 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J. M.; LÉON, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, **36** (11): 1529-1538, 1998.

GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, **51**: 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, **33**: 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops aspe*. **Exp. Molec. Pathol.**, **40**: 367-379, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, E.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CERDAS, L. Comparative study of the edema-formation activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. **Comp. Biochem. Physiol.**, **85C**: 171-175, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, **33** (1): 19-29, 1995.

HANAHAN, D. J. **The enzymes**, : 71-85, 1971.

HARRIS, J. B. **In: Snake Toxins**, Pergamon Press, New York, 1991.

HEAPY, C. G.; SHAW, J. S.; FARMER, S. C. Differential sensitivity of antinociceptive assays to the bradykinin antagonist Hoe 140. **Br J Pharmacol.**, **108** (1): 209-213, 1993.

HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A2 based upon structural determinants. **J. Biol. Chem.**, **252** (14): 4913-4977, 1977.

HOUSSAY, B. A. Classification des actions des venins de serpents sur l'organisme animal. **C. R. Séanc. Soc. Biol.**, **105**: 308-310, 1930.

JIMENÉZ-PORRAS, J. M. Venoms proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. **Toxicon**, **2**: 155-166, 1964.

JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peconhentas do gênero *Bothrops*. **Rev. Ass. Med. Brasil**, **43** (1): 74-76, 1997.

KAISER, I. I.; GUTIÉRREZ, J. M.; PLUMMER, D.; ARID, S. D.; ODELL, G. V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. biophys.**, **278**: 319-325, 1990.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2B1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, **320**: 635-641, 1996.

KAMIGUTI, A. S.; MARKLAND, F. S.; ZHOU, Q.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Proteolytic cleavage of the $B1$ subunit of platelet $\alpha 2B1$ integrin by the metalloproteinase jararhagin compromises collagen-stimulated phosphorylation of pp72syk. **J. Biol. Chem.**, **51**: 32599-32605, 1997.

KAMIGUTI, A. S.; RUGMAN, F. P.; THEAKSTON, R. D.; FRANCA, F. O.; ISHII, H.; HAY, C. R. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. **Thromb. Haemost.**, **67**: 484-488, 1992.

KAMIGUTI, A. S. & SANO-MARTINS, I. S. South American snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol.- Toxins Reviews**, **14**: 3590374, 1995.

KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; DESMON, H.; HUTTON, R. A. Systemic haemorrhage in rats induced by haemorrhagic fraction from *Bothrops jararacai* venom. **Toxicon**, **29**: 1097-1105, 1991.

KIRBY, E. P.; NIEWIAROWSKI, S.; STOCKER, K.; KETTNER, C.; SHAW, E.; BUDZINSKI, T. M. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom, 1. Purification and characterization of the enzyme. **Biochemistry**, **18**: 3564-3570, 1979.

KORNALÍK, F. & TÁBORSKÁ, E. Cross reactivity of mono- and polyvalent antivenoms with viperidae and crotalidae snake venoms. **Toxicon**, **27** (10): 1135-1142, 1989.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M.; GUIMARES, S. M. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, **85** (4): 552, 1991.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.;

DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur J Pharmacol.**, **19** (343): 257-263, 1998.

LÉON, G.; ESTRADA, R.; CHAVES, F.; ROJAS, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Inhibition by CaNa₂EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. **Toxicon**, **36** (2): 321-331, 1998.

LEVINE, J. D.; FIELD, H. L.; BASBAUM, A. I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.**, **13**: 2273-2286, 1993.

LEVINE, J. D.; LAU, W.; KWIAT, G.; GOETZL, E. J. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, **225** (4663): 7430-7745, 1984.

LEVY, D. & ZOCHODNE, D. W. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. **Eur J Neurosci.**, **10** (5): 1846-1855, 1998.

LIU, C. S.; CHEN, J. M.; CHANG, C. H.; CHEN, S. W.; TENG, C. M.; TSAI, I. H. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A2 homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochem. Biophys. Acta**, **1077** (3): 362-370, 1991.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; NUNEZ, C. E.; CALDERON, L. Identification of the muotoxic site of "Lys49"phospholipase A2 from crotalid snake venoms. In: **XIII World Congress of the International society on Toxinology**, Paris, 18 setembro.

LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, **27**: 725-733, 1989.

LOMONTE, B.; LUNDGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. **Toxicon**, **32**: 41-55, 1994.

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

MADISON, S.; WHITSEL, E. A.; SUAREZ-ROCA, H.; MAIXNER, W. Sensitizing effects of leukotriene B4 on intradental primary afferents. **Pain**, **49** (1): 99-104, 1992.

MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, **20**: 955-972, 1982.

MARTIN, H. A. Leukotriene B4 induced decrease in mechanical and thermal thresholds of C-fiber mechanonociceptors in rat hairy skin. **Brain Research**, **509** (2): 273-279, 1990.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, **30**: 853-864, 1992.

MCMAHON, S. B. Mechanisms of sympathetic pain. **Br. Medical Bulletin**, **47**: 584-600, 1991.

MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, **31**: 285-291, 1993.

MELO, P. A. & SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **Toxicon**, **26** (1): 87-95, 1988.

MOURA DA SILVA, A.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. I. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, **29**: 713-719, 1991.

MURAKAMI, M.; KUDO, I.; NAKAMURA, H.; YOKOYAMA, Y.; MORI, H.; INOUE, K. Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A2. **FESB Lett.**, **268** (1): 113-116, 1990.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; HARA, N.; KUDO, I.; INOUE, K. **Phospholipase A2 in Clinical Inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology.**, CRC Press, New York, 1995.

NAHAS, L.; DENSON, K. W. E.; MACFARLANE, R. G. A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, **12**: 355-367, 1964.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemostas.**, **41**: 314-328, 1979.

NAKAMURA, M. & FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacology**, **135**: 145-153, 1987.

NAKAMURA, M. & NAKAMURA, S. Conversion of metmyoglobin to NO myoglobin in the presence of nitrite and reductants. **Biochim Biophys Acta.**, **17** (1289 (3)), 1996.

NAKAZATO, Y.; SIMONSON, M. S.; HERMMAN, W. H.; KONIECZOWSKI, M.; SEDOR, J. R. Interleukin-1 alpha stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (type II) phospholipase A2. **J. Biol Chem.**, **266** (21): 14119-14127, 1991.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OSAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemintry**, **33**: 1843-1849, 1994.

OKA, S. & ARITA, H. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. **J. Biol. Chem.**, **266** (15): 9956-9960, 1991.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, **37** (3): 411-445, 1999.

PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. G. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning and molecular characterization of high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, **267**: 22869-22876, 1992.

PERKINS, M. N. & KELLY, D. Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 1441-1444, 1993.

PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; TAMBOURGI, D. V.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice

injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, **38**: 1253-1266, 2000.

POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, **126** (3): 649-656, 1999.

PRUZANSKI, W. & VADAS, P. Phospholipase A2 and inflammation. **Ann. Rheum. Dis.**, **48** (11): 962-963, 1989.

PRUZANSKI, W.; VADAS, P.; STEFANSKI, E.; UROWITZ, M. B. Phospholipase A2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme. **J Rheumatol.**, **12** (2): 211-216, 1985.

QUEIROZ, L. S. & PETTA, C. A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **26** (5): 247-253, 1984.

QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, **23** (2): 341-345, 1985.

RACKHAM, A. & FORD-HUTCHINSON, A. W. Inflammation and pain sensitivity: effects of leukotrienes D4, B4, and prostaglandin E1 in the rat paw. **Prostaglandins**, **25**: 193-203, 1983.

RANDALL, L. O. & SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. **Arch. Inst. Pharmacodyn.**, **111**: 209-219, 1957.

RANG, H. P.; BEVAN, S. J. F.; DRAY, A. **Nociceptive peripheral neurones: cellular properties**, Wall, P. D., Melzack, R., 1994.

RECKLIES, A. D. & WHITE, C. Phospholipase A2 is a major component of the salt-extractable pool of matrix proteins in adult human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, **34** (9): 1106-1115, 1991.

ROSENBERG, P. **Natural Toxins**, Oxford, 1986.

ROSENBERG, P. **Handbook of Toxinology**, Marcel Dekker, New York, 1990.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In **Venomous Animals and their Venoms**. Ed. W. B. E. E. Buckley, Academic Press, New York, 1971. v. 2, p. 345-403, .

ROSENFELD, G. & KALEN, E. M. Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application. **Rev Paul Med.**, **77** (4): 149-150, 1971.

ROSENFELD, G. & KELEN, E. M. A. Cross neutralization of the coagulant activity of some snake venoms by antivenoms. **Toxicon**, **4**: 7-15, 1966.

ROTHSCHILD, A. M. & ROTHSCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In **Handbook of Experimental Pharmacology: Snake Venoms**, Lee, C. Y. ed., Springer, Berlin, 1979. v. 52, p. 591-629, .

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LÉON, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. 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.**, , 2000.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.**, **63**: 186-199, 1995.

RUCAVADO, A.; NUÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Pathol.**, **79**: 245-254, 1998.

RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENZEK, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J. Z. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, **31** (49): 12424-12430, 1992.

SAÚDE, M. D. Ofidismo: análise epidemiológica. **Brasília, D.F.**, : 49, 1991.

SAÚDE, M. D. Manual de diagnóstico e tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**, , 1998.

SCHAIBLE, H. G. & SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandins E₂. **J. Physiology**, **403**: 91-104, 1988.

SCHALKWIJK, C.; PFEILSCHIFTER, J.; MARKI, F.; VAN DEN BOSCH, H. Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A2 in rat mesangial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, **174** (1): 268-275, 1991.

SCHEMELZ, M.; SCHMIDT, R.; RINGKAMP, M.; HANDWERKER, H. O.; TOREBJORK, H. E. Sensitization of intensive branches of C nociceptors in human skin. **J. Physiology**, **480**: 389-394, 1994.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINIWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A2. **Science**, **250**: 1541-1544, 1990.

SEILHAMER, J. J.; PRUZANSKI, W.; VADAS, P.; PLANT, S.; MILLER, J. A.; KLOSS, J.; JOHNSON, L. K. Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. **J. Biol. Chem.**, **264** (10): 5335-5338, 1989.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A.; DE SOUZA, G. E.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, **28** (3): 261-273, 1990.

SHARP, J. D.; WHITE, D. L.; CHIOU, X. G.; GOODSON, T.; GAMBOA, G. C.; MCCLURE, D.; BURGETT, S.; HORSKINS, J.; SKATRUD, P. L.; SPORTSMAN, J. R.; BECKER, G. W.; KANG, L. H.; ROBERTS, E. F.; KRAMER, R. M. Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2. **J. Biol. Chem.**, **266** (23): 14850-14853, 1991.

SIMONE, D.; ALREJO, M.; LAMOTTE, R. H. Psychophysical studies of the itch sensation and itchy skin ("alloknesis") produced by intracutaneous injection of histamine. **Somatosensory and Motor Research**, **8**: 271-279, 1991.

SLOTBOOM, A. J.; VERHEIJ, H. M.; HAAS, G. H. , 1982.

SNEDECOR, G. W.; SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Statistical methods Biometry**, Owa State University Press, New York, 1946.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. **Biometry**, New York, 1981.

STERANKA, R. R.; MANNING, D.; DEHASS, C. J.; FERKANY, J. W.; BOROSKY, S.; CONNO, J. R.; VAVREK, R. J.; STEWART, J. M.; SNYDER,

S. H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, **85**: 3245-3249, 1988.

TAKAYAMA, K.; KUDO, I.; KIM, D. K.; NAGATA, K.; NOZAWA, Y.; NOUE, K. Purification and characterization of human platelet phospholipase A2 which preferentially hydrolyzes an arachidonoyl residue. **FESB Letter**, **282** (2): 326-330, 1991.

TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, **32** (4): 419-426, 1994.

THAYER, S. A.; PERNEY, T. M.; MILLER, R. J. Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. **J. Neurosci.**, **8** (11): 4089-4097, 1988.

TREBIEN, H. A. & CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents and Actions**, **26** (3/4): 292-300, 1989.

TU, A. T. **Venoms: Chemistry and molecular biology**, John Wiley & Sons, New York, 1977.

TU, A. T. Chemistry of Rattlesnake Venoms. In **Rattlesnake Venoms, their Actions and Treatment.**, Marcel Dekker, New York, 1982. , p. 247, .

VADAS, P.; STEFANSKI, E.; PRUZANSKI, W. Characterization of extracellular phospholipase A2 in rheumatoid synovial fluid. **Life Sci.**, **36** (6): 579-583, 1985.

VAN ARMAN, C. G.; BEGANY, A. J.; MILLER, J. M.; PLESS, H. H. Some details of the inflammation caused by yeast and carragenin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **150**: 328-333, 1965.

Van den Bergh, C. J.; Slotboom, A. J.; Verheij, H. M.; De Haas, G. H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A2. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A2 and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49]phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. **Eur. J. Biochem**, **176** (2): 353-357, 1988.

VANE, J. R. & BOTING, R. M. Mechanism of Action of Anti-inflammatory Drugs. **Scand. J. Rheumatol.**, **25** (Suppl. 102): 9-21, 1996.

VARGAFTIC, B. B. & FERREIRA, S. H. Blockade of the inflammatory effects of platelet-activating factor by cyclo-oxygenase inhibitors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **14**: 187-189, 1981.

VIDAL, J. C.; MOLINA, H.; STOPPANI, A. O. A general procedure for the isolation and purification of phospholipase A isoenzymes from Bothrops venoms. **Acta Physiol Lat Am**, **22** (2): 91-109, 1972.

VISHWANATH, B. S.; FAWZY, A. A.; FRANSON, R. C. Edema-inducing activity of phospholipase A2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. **Inflammation**, **12** (6): 549-561, 1988.

VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A2 enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, **25** (5): 501-515, 1987.

VITAL-BRAZIL, O. Peconhas. In **Farmacodinâmica** Ed. C. E. Corbett, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982. , p. 1044, .

WANG, J. P. & TENG, C. M. Effect of anti-inflammatory drugs on the cardiotoxin-induced hind-paw oedema in rats. **J Pharm Pharmacol.**, **42** (12): 842-845, 1990a.

WANG, J. P. & TENG, C. M. Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A2 enzymes isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **J Pharm Pharmacol.**, **42** (12): 846-850, 1990b.

WARRELL, D. A. **The global problem of snake bite: its prevention and treatment.**, National University of Singapore, 1992.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Citokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia : the contribution of tumour necrosis factor α . **Br. J. Pharmacol.**, **121**: 417-424, 1997.

ZHANG, C. & GOPALAKRISHNAKONE, P. Histopathological studies of the acute inflammation in synovial tissue of rat knee joint following intra-articular injection of PLA2 from Chinese Cobra (*Naja naja atra*) venom. **Toxicon**, **37** ((5)): 783-799, 1999.