

**NORBERTO CARONE CASTRO JUNIOR**

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL  
NEUTRALIZANTE DOS SOROS  
ANTIBOTRÓPICO COMERCIAL E  
EXPERIMENTAL FRENTE ÀS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS VENENOS DE *BOTHROPS  
JARARACA* E *BOTHROPS ERYTHROMELAS***

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação Interunidades em  
Biotecnologia/USP/Instituto Butantan/  
IPT, para obtenção do título de Mestre  
em Biotecnologia.

**São Paulo  
2008**

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL  
NEUTRALIZANTE DOS SOROS  
ANTIBOTRÓPICO COMERCIAL E  
EXPERIMENTAL FRENTE ÀS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS VENENOS DE *BOTHROPS  
JARARACA* E *BOTHROPS ERYTHROMELAS***

**NORBERTO CARONE CASTRO JUNIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia/USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo  
2008**

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL  
NEUTRALIZANTE DOS SOROS  
ANTIBOTRÓPICO COMERCIAL E  
EXPERIMENTAL FRENTE ÀS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS VENENOS DE *BOTHROPS  
JARARACA* E *BOTHROPS ERYTHROMELAS***

**NORBERTO CARONE CASTRO JUNIOR**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação Interunidades em  
Biotecnologia/USP/Instituto Butantan/  
IPT, para obtenção do título de Mestre  
em Biotecnologia.

Área de concentração:  
Biotecnologia

Orientador:  
Dr. Luis Roberto de Camargo  
Gonçalves

**São Paulo  
2008**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Castro Júnior, Norberto Carone.

Comparação do potencial neutralizante dos soros antitoxinogênico comercial e experimental frente às atividades biológicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas* / Norberto Carone Castro Júnior. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Luis Roberto de Camargo Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Fisiopatologia dos envenenamentos por animais peçonhentos nas reações locais induzidas por venenos animais.

Versão do título para o inglês: Comparison of the neutralizing potential of the commercial and experimental anti-botropic serum front the biological activities of the *Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* venom.

Descritores: 1. *Bothrops erythromelas* 2. Soro antitoxinogênico 3. Soroterapia 4. Drogas antiinflamatórias 5. Edema 6. Associação farmacológica I. Gonçalves, Luis Roberto de Camargo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB125/2008



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Norberto Carone Castro Júnior.

Título da Dissertação: Comparação do potencial neutralizante dos soros antibotrópico comercial e experimental frente às atividades biológicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*

Orientador(a): Luis Roberto de Camargo Gonçalves.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## RESUMO

Castro Jr NC. Comparação do potencial neutralizante dos soros antiofídico comercial e experimental frente às atividades biológicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

---

Na região nordeste é registrado o maior índice de letalidade por acidentes ofídicos do Brasil. As serpentes *Bothrops erythromelas* (*Be*) são as responsáveis pela maioria dos acidentes na região, e o veneno dessa serpente não integra o *pool* de antígenos utilizado para a obtenção do soro antiofídico (SAB). Nesse estudo avaliou-se a potência do SAB na neutralização de algumas atividades do veneno (V) de *Be*. Os resultados mostraram que o SAB neutraliza as atividades do V*Be*, mas, exceto para a atividade coagulante e letalidade, a potência do SAB foi significativamente menor, quando comparado à neutralização das mesmas atividades do veneno de *B. jararaca*. A utilização de um soro obtido após a inclusão do V*Be* ao *pool* de antígenos não melhorou significativamente a potência do SAB. O SAB neutralizou também o edema inflamatório induzido pelo V*Be*, mas a associação do SAB à dexametasona inibiu o edema quando aplicado até 45 min após o envenenamento. Nesse tempo, SAB ou dexametasona aplicados isoladamente não foram efetivos em diminuir esse edema.

**Palavras-chave:** *Bothrops erythromelas*; Soro antiofídico; Soroterapia; Drogas antiinflamatórias; Edema; Associação farmacológica.

**ABSTRACT**

Castro Jr NC. Comparison of the neutralizing potential of the commercial and experimental anti-bothropic serum front biological activities of the *Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* venom [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

---

The highest lethality provoked by snakebites in Brazil occurs in the northeast region. *Bothrops erythromelas* (*Be*) snakes cause most snakebites in this region, but its venom is not part of the pool of antigens used to produce *Bothrops* antivenom (*BAV*). In the present study, the potency of *BAV* to neutralize certain activities of *Be* venom (*V*) was evaluated.–Results showed that *BAV* has a potency significantly lower to neutralize *BeV* activities than to neutralize the activities of *Bothrops jararaca* venom, except for coagulant activity and lethality. When *BeV* was included in the pool of antigens, *BAV* potency to neutralize *BeV* activities was not enhanced. *BAV* also neutralized the inflammatory edema induced by *BeV*, but the association of *BAV* with dexamethasone decreased the edema, when they were administered up to 45 min after venom. At this time, antivenom or dexamethasone administered alone were ineffective in inhibiting edema.

**Key words:** *Bothrops erythromelas*; Anti-bothropic serum; Serum therapy; Anti-inflammatory drugs; Edema; Pharmacological association.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AIES</b>	Fármacos antiinflamatórios esteróidais
<b>AINES</b>	Fármacos antiinflamatórios não esteróidais
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenase-1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>COX-3</b>	Ciclooxigenase-3
<b>D-NAME</b>	7-N <sup>G</sup> -nitro d arginina metil ester
<b>F(ab')<sub>2</sub></b>	Fragmento da molécula do anticorpo de IgG
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico induzida
<b>L-NAME</b>	L-N <sup>G</sup> -nitro arginina metil ester
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NDGA</b>	Ácido nordiidroguaiarético
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>SAB</b>	Soro Antibotrópico
<b>SABex</b>	Soro Antibotrópico experimental
<b>VBe</b>	Veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>
<b>VBj</b>	Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Atividades biológicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*.....42

**Tabela 2-** Neutralização das atividades biológicas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas* pelo soro antiofídico comercial e soro antiofídico experimental.....43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>Processo inflamatório.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2</b>	<b>Edema nos envenenamentos botrópicos.....</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Venenos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Antivenenos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.</b>	<b>Estudo da soroneutralização.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5</b>	<b>Atividades biológicas dos venenos e suas neutralizações.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Atividade letal.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Atividade hemorrágica.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Atividade coagulante.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Atividade desfibrinante.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Atividade fosfolipásica.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.6</b>	<b>Atividade edematogênica.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Caracterização do perfil farmacológico do edema induzido pelo veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização das atividades biológicas dos venenos de <i>Bothrops erythromelas</i> e <i>Bothrops jararaca</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Soroneutralização das atividades biológicas.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>Soro experimental.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Atividade edematogênica.....</b>	<b>44</b>

4.4.1	Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata de camundongo induzido por veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> .....	47
4.4.2	Associação terapêutica – Soro antiofídico + Dexametasona.....	61
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

**NORBERTO CARONE CASTRO JUNIOR**

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL  
NEUTRALIZANTE DOS SOROS  
ANTIBOTRÓPICO COMERCIAL E  
EXPERIMENTAL FRENTE ÀS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS VENENOS DE *BOTHROPS  
JARARACA* E *BOTHROPS ERYTHROMELAS***

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação Interunidades em  
Biotecnologia/USP/Instituto Butantan/  
IPT, para obtenção do título de Mestre  
em Biotecnologia.

**São Paulo  
2008**

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

Lopes-Ferreira M, Emim JA, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH, Araujo Mda S, Juliano L, Lapa AJ, Souccar C, Moura-da-Silva AM. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68(11): 2151-7.

Majno G, Joris I. Inflammation: The actors and their language. In: Cells, tissues and disease. Principles of general pathology. 2 ed. Nova York: Oxford University Press; 2004. p. 307-82.

Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H, Nakajima, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon*. 1992;30:853-64.

Meier J, Banks B, Creppy EE, Habermehl G, Kornalik F, Lee CY, Mebs D, Rosenberg P, Theakston RDG. Ethical standards for animal experiments in toxinological research. *Toxicon*. 1993; 31(1): 9-12.

Ministério da saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet. *Biochem Pharmacol*. 1988;37:3495-501

Mota MR, Criddle DN, Alencar NM, Gomes RC, Meireles AV, Santi-Gadelha T, Gadelha CA, Oliveira CC, Benevides RG, Cavada BS, Assreuy AM. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006; 374(1): 1-10.

Moura-da-Silva AM, Desmond H, Laing G, Theakston RDG. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*. 1991; 29(6):713-23.

Moura-da Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM, Theakston RD. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinase: a hypothesis explaining local tissue damage following snakebite. *Eur J Immunol*. 1996;26:2000-5.

Muniz EG, Maria WS, Estevao-Costa MI, Buhrnheim P, Chavez-Olortegui C. Neutralizing potency of horse antiotheric Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. *Toxicon*. 2000; 38(12): 1859-63.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil são notificados cerca de 30 mil casos de acidentes ofídicos por ano (Sinan, 2008). Dos acidentes causados por serpentes peçonhentas, cerca de 90% são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (Ministério da Saúde, 2001).

A região nordeste do Brasil é a que apresenta o menor coeficiente de incidência anual de acidentes ofídicos (7,65 acidentes/100 mil habitantes) quando comparado ao coeficiente nacional (13,94 acidentes/100 mil habitantes). Apesar disso, segundo o Ministério da Saúde (2001), a região Nordeste é a que detém o maior índice de letalidade (0,81%) em relação às outras regiões fisiográficas do país (0,63% no CO; 0,53% no N; 0,33% no S; 0,23 no SE e 0,45% na média nacional).

Fatos como uma provável sub-notificação do número de acidentes pelas dificuldades de transporte nas regiões mais distantes do Nordeste, e deficiências de serviços médicos da região, poderiam influenciar tanto no coeficiente anual de acidentes ofídicos como no índice de letalidade. Entretanto, além destes, também há que se levar em consideração se o antiveneno estaria sendo eficaz no tratamento desses casos de envenenamento ofídico, como é no tratamento de envenenamentos nas regiões sul-sudeste e centro-oeste. Na região nordeste do Brasil os acidentes botrópicos são causados principalmente por *Bothrops erythromelas*.

Esse veneno não compõe o *pool* de antígenos utilizado na produção do soro antibotrópico. Assim estudos para comprovação da eficácia desse soro na neutralização das toxinas presentes nesse veneno são necessários e de extrema importância.

A eficácia da soroterapia no tratamento dos envenenamentos ofídicos vem sendo demonstrada por inúmeros trabalhos publicados desde o início do século XX (Brazil, 1911), sendo este considerado o único tratamento efetivo em casos de acidentes ofídicos (Warrel, 1992). No Brasil, desde 1901 são produzidos soros anti-peçonhentos. Trabalhos pioneiros de Vital Brazil demonstraram a necessidade da utilização de soros específicos para cada tipo

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL  
NEUTRALIZANTE DOS SOROS  
ANTIBOTRÓPICO COMERCIAL E  
EXPERIMENTAL FRENTE ÀS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS VENENOS DE *BOTHROPS  
JARARACA* E *BOTHROPS ERYTHROMELAS***

**NORBERTO CARONE CASTRO JUNIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia/USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo  
2008**



**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL  
NEUTRALIZANTE DOS SOROS  
ANTIBOTRÓPICO COMERCIAL E  
EXPERIMENTAL FRENTE ÀS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DOS VENENOS DE *BOTHROPS  
JARARACA* E *BOTHROPS ERYTHROMELAS***

**NORBERTO CARONE CASTRO JUNIOR**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação Interunidades em  
Biotecnologia/USP/Instituto Butantan/  
IPT, para obtenção do título de Mestre  
em Biotecnologia.

Área de concentração:  
Biotecnologia

Orientador:  
Dr. Luis Roberto de Camargo  
Gonçalves

**São Paulo  
2008**

de envenenamento ofídico e que, mesmo em envenenamentos por um mesmo gênero havia variações de potência do antiveneno. O fato é que desde a introdução do tratamento com antivenenos, observou-se uma redução significativa do número de óbitos causados por acidentes ofídicos (Ministério da Saúde, 2001).

O antiveneno é produzido através da imunização de cavalos inoculados sucessivamente com um *pool* de antígenos pré-determinado, seguindo o determinado pela Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde (portaria nº 174, Diário Oficial da União, 1996). O sangue dos animais é coletado, o plasma é separado e as imunoglobulinas são purificadas, geralmente por precipitação com sulfato de amônio, ou por precipitação com ácido caprílico (Lalloo e Theakston, 2003; Rojas, 1994). Em alguns centros, a molécula de IgG é utilizada íntegra (Gutiérrez et al., 2003), porém a maioria dos produtores, incluindo-se os brasileiros, submetem essa molécula a uma clivagem dessa imunoglobulina pela pepsina, removendo-se a fração Fc, potencialmente alergênica, e utilizando para a terapêutica do acidente ofídico apenas a fração F (ab')<sub>2</sub> (Raw et al., 1991).

No Brasil, o *pool* de antígenos utilizado para a imunização de cavalos na obtenção do antiveneno botrópico é composto pelos seguintes venenos: 50% *B. jararaca*; 12.5% *B. alternatus*; 12.5% *B. jararacussu*; 12.5% *B. moojeni* e 12.5% *B. newviedi*.

Espécie predominante na região das caatingas nordestinas, a serpente *Bothrops erythromelas*, popularmente conhecida como jararaca-da-seca e/ou jararaca-do-sertão, é a principal causadora de acidentes na região (Figura 1).



**Figura 1.** Serpente *Bothrops erythromelas*

Essa serpente possui como característica, pequeno porte (aproximadamente 50 cm de comprimento), hábitos terrestres, e escamas avermelhadas na região ventral (Grantsau, 1991).

Seu veneno, assim como nos demais venenos botrópicos, possui atividades coagulante, hemorrágica e proteolítica (Nahas et al., 1979; Maruyama et al., 1992), porém, apresenta a diferença de não ter em sua peçonha, toxinas tipo-trombina - serinoproteases que atuam diretamente sobre a molécula de fibrinogênio - encontradas em outros venenos botrópicos (Maruyama et al., 1992). A atividade coagulante presente no veneno de *B. erythromelas* é devida à presença de toxinas pró-coagulantes, ativadoras de fator II e X, que levam à formação de trombina endógena (Maruyama et al., 1992; Kamiguti e Sano-Martins, 1995).

Silva et al. (2003) isolaram desse veneno uma proteína ativadora de protrombina denominada “berythractivase”, uma metaloprotease de alto peso molecular da classe PIII, porém, sem atividade hemorrágica.

De acordo com suas estruturas moleculares, as metaloproteases de venenos de serpentes (**Snake Venom MetalloProteases** – SVMP) são divididas em 4 classes. A classe P1 possui apenas um pró-domínio e um domínio catalítico; a P2 apresenta um pró-domínio, um domínio catalítico e um domínio disintegrina. A classe P3 apresenta, além destes, um domínio rico em cisteína e, finalmente, a classe P4 apresenta ainda um domínio tipo lectina (Fox e

Serrano, 2005; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006). Essas SVMP dependem da presença de íons zinco para sua atividade catalítica e, geralmente, apresentam atividade hemorrágica.

As metaloproteases dos venenos botrópicos também podem contribuir para os distúrbios da coagulação por possuírem ação fibrinogenolítica (Maruyama et al., 1992; Kamiguti et al., 1994) e por inibirem a agregação plaquetária (Kamiguti et al., 1996). Além destas toxinas proteolíticas, os venenos botrópicos possuem fosfolipases A<sub>2</sub> que podem apresentar atividade anticoagulante (Alvarado e Gutiérrez, 1988) e lectinas com atividade anti-trombina (Zingali et al., 1993).

Além disso, os venenos botrópicos induzem sérias reações locais, tais como edema, dor, hemorragia local e necroses, podendo resultar em grandes perdas teciduais e seqüelas (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez e Lomonte, 2003).

Como espécies de importância regional - *B. atrox* na região Norte e *B. erythromelas* na região Nordeste - não estão presentes no *pool* de antígenos utilizado para imunização de eqüinos para obtenção do soro, freqüentemente questiona-se sobre o grau de eficiência do soro antibotrópico no tratamento dos envenenamentos por essas serpentes (Muniz et al., 2000).

Camey et al. (2002) avaliaram o poder neutralizante do soro antibotrópico contra algumas atividades biológicas dos venenos integrantes do *pool* de antígenos, entretanto consideraram esse antiveneno eficiente contra os venenos de *B. atrox* e *B. erythromelas* apenas baseados no título de anticorpos contra estes venenos, não avaliando a neutralização de atividades biológicas dos mesmos.

No geral, a soroterapia específica tem se mostrado altamente eficaz contra a letalidade e no tratamento das alterações sistêmicas induzidas por venenos botrópicos, tanto é que a eficiência do tratamento pode ser monitorada pela reversão do quadro de incoagulabilidade sangüínea (Rosenfeld, 1971; Cardoso et al., 1993; Sano-Martins et al., 1994). A dose de soro empregada no tratamento é determinada de acordo com a sintomatologia do envenenamento, classificada em leve, moderada ou grave (Ministério da Saúde, 2001). No entanto, apesar da eficiência em neutralizar os sintomas sistêmicos, as reações

locais induzidas por estes venenos nem sempre respondem satisfatoriamente a esse tratamento (Cardoso et al., 1993, Gutiérrez et al., 1998). Isso é devido à rápida manifestação destas reações locais e pelo fato de que os antivenenos não são capazes de reverter às lesões já estabelecidas ou desencadeadas, e nem de neutralizar os mediadores endógenos que participam do processo (Rosenfeld, 1971).

O fato de a soroterapia ser pouco eficaz no tratamento das reações locais induzidas pelos venenos botrópicos estimula a procura de tratamentos complementares que possibilitem a melhora desse quadro.

Em humanos acidentados por serpentes do gênero *Bothrops*, dependendo do grau de envenenamento, o edema aparece rapidamente após a picada e é de longa duração (França e Málaque, 2003). Esse edema pode resultar em conseqüências graves, como a compressão tissular que, por sua vez, pode resultar numa síndrome compartimental, comprimindo o feixe vaso-nervoso do membro afetado e produzindo isquemia das extremidades (Gutiérrez e Lomonte, 2003). Essa isquemia, somada à ação proteolítica do veneno, pode favorecer o aparecimento de necroses (Ministério da Saúde, 2001).

Experimentalmente, o edema é um dos principais efeitos locais provocados por serpentes do gênero *Bothrops* e, talvez, o de mais difícil neutralização pela soroterapia (Gutiérrez et al., 1986; Picolet et al., 2002). O edema desencadeado pelos venenos botrópicos evoluem rapidamente devido à rápida liberação de mediadores do processo inflamatório, originados endogenamente pelos tecidos lesados (Gonçalves e Mariano, 2000). Assim, como já citado anteriormente, o soro neutraliza o veneno circulante, mas não os mediadores inflamatórios liberados no tecido lesado nem as lesões já estabelecidas (Rosenfeld, 1971).

### **1.1 Processo inflamatório**

A palavra inflamação, derivada do latim *inflammatione*, significa fogo, área em chamas. Descrições das características clínicas da inflamação foram

encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os quatro sinais cardinais da inflamação foi Celsius, no século I d.C., que relatou os sinais como calor, rubor, tumor e dor. A perda de função, quinto sinal clínico, foi adicionada posteriormente pelo patologista alemão Rudolph Virchow (Rocha e Silva e Garcia-Leme, 1972).

A inflamação é conhecida desde a antiguidade como sendo uma resposta protetora cujo objetivo é livrar o organismo da causa inicial da lesão. Em 1793 John Hunter, observou que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica que tem um efeito salutar sobre seu hospedeiro. No século XX, Thomas Lewis estabeleceu o conceito de que substâncias químicas, como a histamina, induzidas localmente pela lesão, medeiam as alterações vasculares da inflamação (Kumar et al., 2005).

A inflamação pode ser definida como uma reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local, que dependendo do tipo e/ou persistência do agente lesivo pode ser classificada como aguda ou crônica (Kumar et al., 2005). Esta lesão pode ser ocasionada por estímulos mecânicos, químicos, por invasão de microorganismos ou devido a reações de hipersensibilidade (Kumar et al., 2005).

A resposta inflamatória aguda possui fases características como, o aumento de fluxo sanguíneo com vasoconstrição seguida de uma vasodilatação; aumento da permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento de proteínas plasmáticas; e recrutação e migração de células inflamatórias para o local da lesão (Kumar et al., 2005).

Estes eventos ocorrem principalmente devido à liberação de substâncias endógenas após o estímulo lesivo, denominado de mediadores inflamatórios (Saadi, 2002). Vários são os mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo. Dentre eles, citamos as aminas vasoativas, os metabólitos lipídicos derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas, os leucotrienos e as lipoxinas, gerados a partir de fosfolípidos de membrana, e as citocinas, que atuam como importantes moduladores da resposta inflamatória (Cabral, 2005).

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, são os primeiros mediadores a serem liberados no processo inflamatório. A histamina pré-

formada está presente em mastócitos e é liberada pela degranulação destes em resposta a vários estímulos, causando dilatação das arteríolas e aumento na permeabilidade das vênulas. A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um mediador liberado por plaquetas no fenômeno de agregação plaquetária, após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexo antígeno-anticorpo (Kumar et al., 2005).

Os mediadores lipídicos são produzidos pela ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> sobre fosfolípidios de membrana. A metabolização do ácido araquidônico e libera seus derivados, os eicosanóides que são mediadores de diversas condições patológicas especialmente nos processos inflamatórios (Cabral, 2005).

A metabolização do ácido araquidônico pode ser evidenciada por duas vias: a via da ciclooxigenase e a via da lipoxigenase (Collins, 2000; Spinosa et al., 1999).

A via das ciclooxigenases (COX), a qual é mediada por enzimas que catalisam a biosíntese das prostaglandinas e tromboxanos. Segundo Chandrasekharan et al. (2002), a COX possui três isoformas: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é expressa constitutivamente em vários tecidos, como intestino, rins e estômago, onde possui papel citoprotetor. A COX-2, por sua vez, não é expressa de maneira constitutiva, mas é induzida mediante a ocorrência de processo inflamatório, dando origem a diversos prostanóides, como por exemplo, as prostaglandinas, que potencializam eventos inflamatórios importantes, como a vasodilatação (Kumar et al., 2005). A COX-3 pode ser encontrada no córtex cerebral e no coração e não participa da produção de prostanóides pró-inflamatórios (Chandrasekharan et al., 2002).

As prostaglandinas, de uma forma geral, possuem efeito vasodilatador e hiperalgésico no processo inflamatório, além de possuírem papel importante na mediação da febre, como é o caso da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Kumar et al., 2005).

Os tromboxanos, além de possuírem ação vasoconstritora, facilitam a agregação plaquetária. São produzidos nas plaquetas, e normalmente

encontram-se em equilíbrio homeostático no sistema circulatório, juntamente com as prostaciclina (PGI<sub>2</sub>).

O ácido araquidônico pode também ser metabolizado pela via das lipoxigenases resultando na formação dos leucotrienos. A principal enzima desse grupo é a 5-lipoxigenase (5-LO), que o converte em derivados hidroperóxidos (5-HPETE-ácido hidroperoxieicosatetraenóico) nos leucócitos, dando origem aos leucotrienos (Majno e Joris, 2004). O LTB<sub>4</sub> é um potente ativador das respostas funcionais de neutrófilos, atuando na aderência de leucócitos ao endotélio, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas (Collins, 2000). Já os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (Kumar et al., 2005).

A secreção de citocinas e quimiocinas amplifica a resposta inflamatória. As citocinas são proteínas sintetizadas por diversos tipos celulares, principalmente linfócitos e macrófagos ativados, mas também por células endoteliais, epitélio e tecido conjuntivo. São produzidas durante respostas imune e inflamatória, podendo atuar influenciando a síntese ou ação de outras citocinas, ligando-se a receptores específicos nas células alvo. As citocinas são agrupadas em classes, de acordo com suas funções ou com a natureza das células-alvo. As Interleucinas -1 (IL-1), -6 (IL-6) e o TNF-  $\alpha$  são uma das principais citocinas que participam do processo inflamatório. No endotélio elas aumentam a adesão leucocitária, síntese de mediadores químicos, incluindo outras citocinas e quimiocinas, eicosanóides, óxido nítrico (NO) e anticorpos (Kumar et al., 2005). Outras interleucinas como a IL-2 e IL-4 regulam a ativação, crescimento e diferenciação de linfócitos (Collins, 2000).

As quimiocinas compõem um grupo específico de citocinas que compartilham a capacidade de estimular a quimiotaxia e a migração direcionada, um processo chamado de quimiotaxia (Murdoch e Finn, 2000). Além disso, estes mediadores estão envolvidos em vários processos fisiopatológicos, tais como estímulo da angiogênese, disseminação de tumores, choque séptico, interação leucócito-endotélio, agindo nos leucócitos aderidos e estimulando as células a migrarem através dos espaços endoteliais na direção de um gradiente quimiotático (Kumar et al., 2005).



O óxido nítrico (NO), um mediador pleitrópico da inflamação, é um gás solúvel produzido pelas células endoteliais, pelos macrófagos e por células nervosas, incluindo neurônios e células da glia. O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem duas isoformas de NOS: a constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a induzível (iNOS), não expressa em condições normais. Essa isoforma é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo macrófagos, linfócitos, células endoteliais, neutrófilos e plaquetas (Moncada, et al., 1988). As isoformas constitutivas compreendem a NOS neuronal (nNOS), presente em neurônios, e a NOS endotelial (eNOS), presente em células endoteliais e plaquetas (Moncada, et al., 1988; Radomski et al., 1990).

O NO produzido pela eNOS tem papel essencial no processo de relaxamento vascular, que em condições fisiológicas ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (acetilcolina, bradicinina, serotonina, entre outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (Busconi e Michel, 1993). Por outro lado, a ativação da iNOS possui ação citostática e citotóxica, resultante da ação direta ou indireta de outros compostos liberados durante o processo inflamatório. Nesse processo, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais ativadas secretam simultaneamente NO e intermediários reativos de oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido resulta na formação de peroxinitrito, um poderoso oxidante de proteínas, aumentando efetivamente a ação tóxica do NO (Dusse et al., 2003).

Ainda nos eventos vasculares, deve ser destacada a participação dos seguintes mediadores: os fragmentos C3a e C5a do sistema complemento; os fibrinopeptídeos, originados na formação da fibrina; a bradicinina, proveniente do sistema das cininas, além do fator de ativação plaquetária (PAF) (Kumar et al., 2005).

A resposta inflamatória é um processo fisiológico, que inclui a liberação de substâncias pró inflamatórias pelo organismo afetado. Entretanto o mesmo organismo libera substâncias antiinflamatórias na tentativa de regular o processo, retornando a homeostasia (Cabral et al., 2005). A resolução

completa do processo inflamatório ocorre com a neutralização ou degradação de mediadores, além do retorno da permeabilidade vascular a condições fisiológicas, e com o término da infiltração leucocitária e da apoptose de neutrófilos. A remoção de líquido e proteínas do edema, de leucócitos, de agentes estranhos e de fragmentos necróticos do local, também fazem parte desse processo resolutivo.

Alguns mediadores gerados a partir do ácido araquidônico podem estar envolvidos nesta resolução. As lipoxinas, que possuem uma relação inversa entre a quantidade de leucotrienos formados, aparentemente regulando negativamente a ação dos leucotrienos (Serhan e Savill, 2005), e as resolvinas, que inibem o recrutamento e ativação dos leucócitos, em parte através da inibição das citocinas (Kumar et al., 2005; Serhan e Savill, 2005).

Além desses mediadores, os vasos linfáticos e as células fagocitárias participam da resolução do processo inflamatório, tendo como consequência reparo ou substituição do tecido lesado (Kumar et al., 2005).

No entanto, o processo inflamatório pode causar danos ao organismo quando é muito exacerbado, ou quando a resolução do processo inflamatório não é satisfatória, podendo ocorrer à progressão dessa resposta para uma cronificação do processo (Cabral et al., 2005).

## **1.2 Edema nos envenenamentos botrópicos**

Experimentalmente tem-se demonstrado que o edema observado após o envenenamento botrópico é resultante de uma ação conjunta de diversas toxinas encontradas nestes venenos, e mediadas principalmente por metabólitos do ácido araquidônico (Gutiérrez et al., 1998; Gonçalves e Chudzinski-Tavassi, 2004; Chaves et al., 1995; Barbosa et al., 2003; Guimaraes et al., 2004; Araújo et al., 2007). Em ratos, aminas vasoativas e adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  também participam desse processo e, aparentemente, a bradicinina não é um dos mediadores responsáveis pelo edema induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca* (Trebien e Calixto, 1989). Diferentemente do observado em ratos, histamina não participa da mediação do edema induzido

por esse veneno em camundongos (Perales et al., 1992; Gonçalves e Mariano, 2000). Outros mediadores endógenos participam do processo inflamatório induzido por veneno botrópico. Dentre eles, podemos citar componentes do sistema complemento (Farsky et al., 2000), óxido nítrico (Guzzo et al., 2000; Zamuner et al., 2001) e citocinas, como o TNF- $\alpha$ , interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6 (Lomonte et al., 1993; Moura-da-Silva et al., 1996; Petricevich et al., 2000; Rucavado et al., 2002).

O fato de a soroterapia ser pouco eficaz no tratamento das reações locais induzidas pelos venenos botrópicos estimula a procura de tratamentos complementares que possibilitem a melhoria desse quadro.

A associação de antiveneno a uma classe de antiinflamatórios esteroidais, os glicocorticóides, vêm sendo utilizados no tratamento do edema induzido por veneno de *Bothrops jararaca* em modelos experimentais (Araújo et al., 2007) e em ensaios pré-clínicos (Suzaki et al., 2005), apresentando resultados satisfatórios principalmente em tempos tardios pós envenenamento, onde somente a associação foi capaz de reverter significativamente o edema instalado.

Dada a sua importância, é de extrema valia verificar se o mesmo efeito é visto para os demais venenos botrópicos, em particular, para os que não integram o *pool* de antígenos utilizado para obtenção do soro antibotrópico.

## 2 OBJETIVO

Pelo exposto, os objetivos gerais do presente trabalho são:

- 1) Avaliar o poder neutralizante do antiveneno botrópico comercial contra as principais atividades biológicas do veneno de *Bothrops erythromelas*, comparativamente ao veneno de *B. jararaca*, bem como verificar se a inclusão do veneno de *B. erythromelas* no *pool* de antígenos utilizados na imunização de cavalos para a obtenção do antiveneno aumentaria esse poder neutralizante.
  
- 2) Avaliar o efeito da associação de antiinflamatórios ao antiveneno no tratamento do edema inflamatório induzido pelo veneno de *B. erythromelas* na pata de camundongos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 18 – 22g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. A utilização dos animais seguiu as recomendações éticas da Sociedade Internacional de Toxinologia (Meier et al., 1993), e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan) – CEUAIB.

#### 3.2 Venenos

Foram utilizados lotes de venenos liofilizados, resultantes da extração de vários exemplares adultos de serpentes *Bothrops jararaca* e *B. erythromelas*, fornecidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. As soluções de veneno foram preparadas com salina (NaCl 0,15 M) estéril, no momento do uso. A quantificação protéica de ambos os venenos foi estimada por espectrofotometria (A280 nm).

#### 3.3 Antivenenos

Foram utilizados:

- ◆ Soro Antibotrópico comercial produzido pelo Instituto Butantan
- ◆ Soro experimental obtido pela imunização de eqüinos com um novo pool de antígenos contendo: 50% do veneno de *B. jararaca*, 10% de veneno de *B. alternatus*, 10% de *B. moojeni*, 10% de *B. neuwiedi*, 10% de *B. jararacussu* e 10% de *B. erythromelas*, preparado sob os mesmos padrões de qualidade que o antiveneno comercial e fornecido pela seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes, Instituto Butantan. Os antivenenos foram mantidos a 4 °C até o momento da utilização.

### **3.4 Estudos de Soroneutralização**

Os estudos foram precedidos pela seleção de doses – desafio dos venenos para cada atividade estudada. Uma vez definidas as doses, os venenos foram misturados com diferentes concentrações de ambos os antivenenos e incubados a 37 °C durante 30 minutos. Após o período de incubação, as misturas foram utilizadas e a magnitude de cada atividade, determinada, conforme proposto por Gutiérrez et al. (1990).

Para as atividades letal, hemorrágica, fosfolipásica e edematogênica a capacidade de neutralização do antiveneno foi expressa como dose efetiva 50% (volume de antiveneno -  $\mu\text{L}$ ) a qual reduz 50% da atividade da dose-desafio do veneno. Já para as atividades, coagulante e desfibrinante, a neutralização foi expressa como dose efetiva, conforme descrito por Gene et al. (1989).

### **3.5 Atividades Biológicas dos Venenos e suas Neutralizações**

#### **3.5.1 Atividade Letal**

A toxicidade letal dos venenos foi avaliada pela determinação da dose letal 50% (DL50). Para cada veneno a DL50 foi avaliada pela injeção i.p. de diferentes concentrações de veneno contidas em 0,5 ml de salina nos camundongos. Foram utilizados 6 animais por concentração e as mortes, acompanhadas até 48 horas após a injeção. O cálculo da DL 50 foi realizado conforme descrito pelo método de PROBITO.

Para o estudo da neutralização desse efeito foi utilizada dose de 5 vezes a DL50 como dose desafio misturada a várias quantidades de ambos os antivenenos. A neutralização foi expressa como a Dose Efetiva 50% (DE50), definida como o volume de antiveneno que neutraliza 50% da dose de veneno utilizada no teste.

### **3.5.2 Atividade Hemorrágica**

A atividade hemorrágica local de cada veneno foi avaliada determinando-se a Dose Mínima Hemorrágica (DMH) conforme o método descrito por Gutiérrez et al. (1985). Grupos de camundongos foram injetados pela via i.d. com diferentes concentrações de veneno na região ventral, previamente depilada (24 horas antes). Duas horas após a injeção do veneno, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. A pele da região injetada com os venenos foi removida e a área hemorrágica medida em sua face interna. A DMH é definida como a menor concentração de veneno que induz um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro.

Para estudos de soroneutralização, foram utilizadas doses – desafio correspondentes a 3 vezes a DMH. O resultado foi expresso em DE50.

### **3.5.3 Atividade Coagulante**

Essa atividade foi avaliada pela determinação da Dose Mínima Coagulante (DMC) em plasma humano para cada veneno. Diferentes concentrações de veneno contidas em 0,1 ml de salina foram adicionados a 0,2 ml de plasma, anotando-se o tempo de coagulação. Cada teste foi realizado em quadruplicata. A DMC é definida como a menor concentração de veneno que coagula o plasma humano citratado padrão em 60 segundos a 37°C, conforme descrito por Theakston e Reid (1983). O plasma humano padrão foi obtido de indivíduos saudáveis de ambos os sexos.

Para a soroneutralização, foram utilizadas doses correspondentes a 2 vezes a DMC de cada veneno. A neutralização foi expressa como dose eficaz, definida como o volume de antiveneno que prolongue o tempo de coagulação em 3 vezes em relação ao tempo de coagulação da dose-desafio, sem o antiveneno.

### **3.5.4 Atividade Desfibrinante**

A atividade desfibrinante foi avaliada determinando-se a Dose Mínima Desfibrinante (DMD) (Theakston e Reid, 1983). Diferentes concentrações dos venenos foram injetadas via i.v. em grupos de 4 camundongos. Uma hora após, amostras de sangue foram colhidas pelo plexo retro-orbital, transferidas para tubos de vidro e mantidas a 37 °C durante 1 hora, quando fora verificada a presença ou não de coágulo. A DMD é definida como a menor concentração de veneno que produz incoagulabilidade sanguínea 1 hora após a sua injeção intravenosa.

Para o estudo da soroneutralização foram utilizadas doses – desafio correspondente a 2 vezes a DMD de cada veneno. A neutralização foi expressa como dose eficaz, definida como a menor proporção de veneno / soro em que o sangue de todos os camundongos do grupo coagula normalmente.

### **3.5.5 Atividade Fosfolipásica**

Esta atividade foi avaliada seguindo metodologia descrita por Santoro et al. (1999). Concentrações crescentes dos venenos, contidas em 2µL, foram aplicadas em micro placas de 96 poços contendo 200 µL de uma solução (NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton X-100 7 mM, Lecitina de soja granulada, vermelho fenol e água destilada (como qsp – 100mL), pH 7,6) a 37 °C; e lidas em comprimento de onda de 558nm. Foi considerada a dose que provocou consumo de 50% de substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a soroneutralização, dose-desafio de 2x a obtida para atividade fosfolipásica foi utilizada. O resultado foi expresso como ED50.



### 3.5.6 Atividade Edematogênica

Animais foram injetados no coxim plantar direito com 0,03mL de solução salina estéril (0.15 M NaCl) contendo 1.0µg de veneno de *B. erythromelas*. A pata contra lateral recebeu o mesmo volume de salina estéril como controle. O edema de pata foi medida com auxílio de um pletismômetro (Letica, Spain) 1, 2, 4, 6 h após injeção do veneno. Os resultados foram expressos como a diferença (%) entre os volumes de patas injetadas com veneno e com salina, obtida pela seguinte fórmula:

$$E\% = \frac{P_v - P_s}{P_s} \times 100$$

\* Pv: pata injetada com veneno; Ps: pata injetada com salina; e E%: porcentagem de edema

### 3.6 Caracterização do perfil farmacológico do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*

O delineamento experimental foi realizado com grupos de 5 animais que receberam os seguintes tratamentos:

- ✓ Prometazina (Promethazine hydrochloride, Sigma): inibidor de receptor H<sub>1</sub>, 10 mg/kg, dissolvida em salina estéril e administrada por via i.p. 30 min antes da injeção veneno (Gonçalves e Mariano, 2000);

✓ Metissergida (Methysergide maleate salt, Sigma): antagonista de receptor serotoninérgico 5HT, 0,8 mg/kg, dissolvida em salina estéril e administrada por via subcutânea (s.c.) 30min antes da injeção do veneno (Gonçalves e Mariano, 2000);

✓ Dexametasona (Decadron<sup>®</sup> Promade, Brasil): inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub>, 1,0 mg/kg, dissolvida em salina estéril e administrada por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes da injeção veneno (Gonçalves e Mariano, 2000);

✓ Indometacina (Indomethacin, Sigma): inibidor de ciclooxigenase, 3 mg/kg, dissolvida em tampão TRIS 1M, pH 8, a 37 °C e solução salina estéril (1:10). O composto foi administrado por via i.p. 30 min antes da injeção do veneno (Araújo et al., 2007);

✓ Celecoxib (Celebra<sup>®</sup> Pfizer, Brasil): inibidor de ciclooxigenase-2 administrado por via oral 30 min antes da injeção do veneno. Para cada comprimido contendo 200 mg adiciona-se 2,5 mL uma solução de carboximetil (CMC) 1%, desta solução foi utilizada uma dose de 30 mg/kg (Chacur et al., 2003);

✓ Ácido nordihidroguaiarético (Nordihydroguaiaretic acid - NDGA, Sigma): inibidor 5-lipoxygenase administrado por via i.p. 30min antes da injeção do veneno. Para cada 30 mg/kg do composto, adicionou-se 2 mL de solução contendo etanol-salina (1:9), sendo o pH ajustado pra 7,5 com NaOH 0,1 N; (Chacur et al., 2001);

✓ Pentoxifilina (Pentoxifylline, Sigma): inibidor de fosfodiesterase que reduz seletivamente a concentração de mRNA para TNF- $\alpha$ , 100 mg/kg, dissolvida em salina estéril e administrada por via i.p., 30min antes da injeção do veneno (Mota et al., 2006);

✓ L-NAME (L-N<sup>G</sup>-nitro arginina metil ester, Sigma): inibidor inespecífico da enzima óxido nítrico sintase (NOS), 100 mg/kg, dissolvida em salina estéril e administrada por via s.c. 24h e 30min antes da injeção do veneno (Chaves et al., 2006);

- ✓ D-NAME (7-N<sup>G</sup>-nitro d arginina metil ester, Sigma): controle para L-NAME, 100mg/kg, dissolvida em salina estéril e administrada por via s.c. 30 minutos antes do veneno (Chaves et al., 2006);
- ✓ Aminoguanidina (Aminoguanidine hydrochloride, Sigma): inibidor seletivo da enzima óxido nítrico induzível (iNOS), 50 mg/kg dissolvida em salina estéril e administrada por via i.p. 24h e 100 mg/kg dissolvida em salina estéril e administrada por via i.p. 30min antes da injeção do veneno (Chaves et al., 2006);
- ✓ Captopril (Captopril, Sigma): inibidor da enzima conversora da angiotensina, 100 mg/kg dissolvida em salina estéril e administrada por via s.c. 30min antes da injeção do veneno (Lopes-Ferreira et al., 2004);
- ✓ Soro antibotrópico (SAB) (Instituto Butantan, Brasil): foi administrado 200  $\mu$ L por via endovenosa (i.v.) administrado sozinho ou em associação com algumas drogas (das acima mencionadas), com suas doses e vias específicas. O grupo controle recebeu salina estéril pelas mesmas vias especificadas (Araújo et al., 2007).

### **3.7 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  d.p. (desvio padrão), analisados estatisticamente por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram determinadas com o programa GraphPad InStat e os resultados foram representados graficamente com a utilização do programa GraphPad Prism software (versão 4.0). Foram considerados significantes resultados com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das atividades biológicas dos venenos de *B. erythromelas* e *B. jararaca*

O veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) apresentou atividades letal, hemorrágica e desfibrinante significativamente menos intensas, porém atividades fosfolipásica e coagulante significativamente mais intensas que às observadas no veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) (Tabela 1).

### 4.2 Soroneutralização das atividades biológicas

Todas as atividades do veneno de *Bothrops erythromelas* testadas foram neutralizadas eficientemente pelo antiveneno botrópico comercial. Entretanto, quando comparado ao poder neutralizante desse antiveneno frente ao veneno de *Bothrops jararaca* (principal componente do *pool* de antígenos) verificou-se algumas diferenças importantes para neutralização das atividades hemorrágica, fosfolipásica e desfibrinante, onde foram necessários volumes significativamente maiores de antiveneno para neutralização. A atividade coagulante, no entanto, foi neutralizada com volume significativamente menor de antiveneno, como demonstrado na Tabela 2. Na mesma tabela podemos observar que apesar do volume de antiveneno necessário para neutralizar a atividade letal do veneno de *Bothrops erythromelas* ser maior que o necessário para neutralizar o veneno de *Bothrops jararaca* essa comparação não resultou em diferença estatística.

### **4.3 Soro experimental**

Os resultados para soroneutralização obtidos utilizando-se o soro antibotrópico experimental (SABex), que inclui o veneno de *B. erythromelas* no *pool* de antígenos, mostram que este antiveneno também se mostra eficaz no tratamento das ações provocadas por ambos os venenos. Em comparação à soroneutralização realizada com o soro antibotrópico comercial (SAB) os volumes necessários para neutralização da atividade desfibrinante foram os mesmos obtidos pelo soro experimental. Houve uma diminuição significativa da quantidade de antiveneno experimental utilizado para neutralizar as atividades hemorrágica e fosfolipásicas do veneno de *B. erythromelas*, porém, um aumento significativo do volume desse soro foi necessário para a mesma neutralização do veneno de *B. jararaca*. Observou-se uma diminuição expressiva no volume desse soro necessário para neutralização da atividade coagulante para veneno de *B. jararaca*, porém, houve um aumento significativo do volume deste mesmo soro para neutralização da atividade coagulante provocado por *B. erythromelas*.

Quanto a letalidade, a potência do antiveneno experimental foi ajustada no momento da formulação do produto final sendo 5mg/mL para *Bothrops jararaca* e 5mg/mL para *Bothrops erythromelas*.

**Tabela 1.** Atividades biológicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*

Veneno	Letal <sup>a</sup>	Hemorrágica <sup>b</sup>	Coagulante <sup>c</sup>	Desfibrinante <sup>d</sup>	Fosfolipásica <sup>e</sup>
VBJ	57,4 (42,8-76,9) <sup>f</sup>	1,3±0,012 <sup>f</sup>	5,9±0,2 <sup>f</sup>	2,5	3,8
VBE	88,1 (79,4-97,8)	2,4±0,034	0,6±0,2	8	0,97

<sup>a</sup> Letalidade é expressa como dose letal média (LD<sub>50</sub>), definida como a dose de veneno que provoca morte de 50% dos animais injetados intraperitonealmente.

<sup>b</sup> Atividade hemorrágica é expressa como dose mínima hemorrágica (DMH), definida como a quantidade de veneno (µg) que induza um halo hemorrágico de 10 mm diâmetro 2h após injeção.

<sup>c</sup> Atividade coagulante é expressa como dose mínima coagulante (DMC), definida como a quantidade de veneno (µg) que induza a coagulação do plasma humano em 60s.

<sup>d</sup> Atividade desfibrinante é expressa como dose mínima desfibrinante (DMD), definida como a quantidade de veneno (µg) que induza incoagulabilidade sanguínea em todos os animais 1h após a injeção.

<sup>e</sup> Atividade fosfolipásica é expressa como a concentração capaz de promover consumo de 50% do substrato.

<sup>f</sup> Resultados apresentados como média ± S.D, exceto na letalidade, onde 95% dos limites de confiança são inclusos entre parênteses.

**Tabela 2.** Neutralização das atividades biológicas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas* pelo soro antibotrópico comercial e soro antibotrópico experimental.

Veneno	SAB	SABex
<b>Neutralização da Atividade hemorrágica (ED50)<sup>a</sup></b>		
<i>μL soro/3 DMH</i>		
<i>B. jararaca</i>	0,34±0,024	0,42±0,01 <sup>#</sup>
<i>B. erythromelas</i>	0,91±0,072 <sup>*</sup>	0,57±0,06 <sup>*#</sup>
<b>Neutralização da atividade fosfolipásica (ED50)<sup>a</sup></b>		
<i>μL soro/2 atividade fosfolipásica</i>		
<i>B. jararaca</i>	1,30±0,03	1,60±0,02 <sup>#</sup>
<i>B. erythromelas</i>	2,0±0,01 <sup>*</sup>	1,44±0,15 <sup>*#</sup>
<b>Neutralização da atividade coagulante (ED)<sup>b</sup></b>		
<i>μL soro/2 DMC</i>		
<i>B. jararaca</i>	5,7±0,120	2,99±0,025 <sup>#</sup>
<i>B. erythromelas</i>	0,94±0,053 <sup>*</sup>	1,37±0,08 <sup>*#</sup>
<b>Neutralização da atividade desfibrinante (ED)<sup>b</sup></b>		
<i>μL soro/2 DMD</i>		
<i>B. jararaca</i>	0,9	0,9
<i>B. erythromelas</i>	3,2	3,2
<b>Neutralização da letalidade</b>		
<i>μL soro/5 LD<sub>50</sub><sup>c</sup></i>		
<i>B. jararaca</i>	16,05 (11,08-27,98)	nd <sup>e</sup>
<i>B. erythromelas</i>	24,62 (14,1-36)	nd

<sup>\*</sup> P<0,05 em comparação entre o volume (μL) de SAB necessário para neutralização das atividades biológicas de VBe e VBj

<sup>#</sup> P<0,05 em comparação entre o SAB e SABex

<sup>a</sup> Neutralização das atividades hemorrágica e fosfolipásica são expressas como dose efetiva 50%

<sup>b</sup> Neutralização das atividades coagulante e desfibrinante são expressas como dose efetiva

<sup>c</sup> Neutralização da letalidade é expressa como dose efetiva 50%

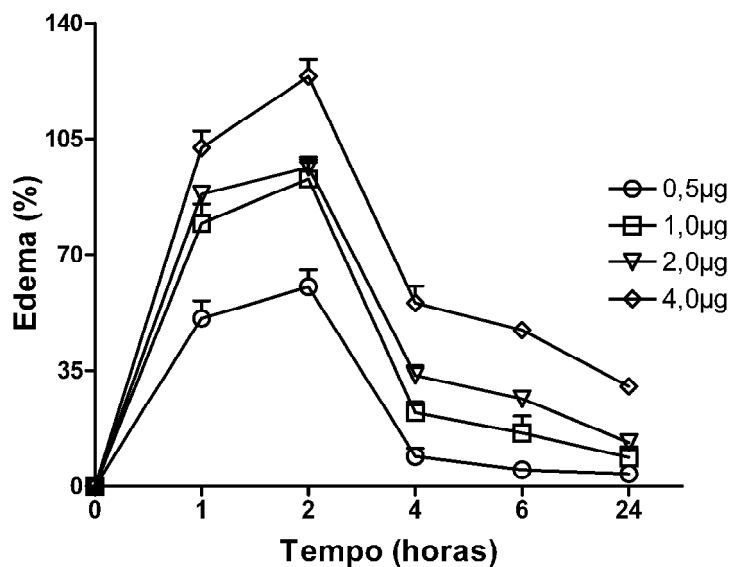
<sup>e</sup> nd – não determinado

#### **4.4 Atividade Edematogênica**

O veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe), em camundongos, induz formação prematura de um edema que atinge seu pico máximo em 2 horas após o envenenamento, sofre queda abrupta na 4<sup>a</sup> hora e continua em declínio até a 24<sup>a</sup>. A relação dose-efeito para esse veneno foi observada (Figura 2) e a dose utilizada na bateria de experimentos foi a de 1µg de veneno, não havendo presença de hemorragia macroscópica decorrente da dose utilizada.

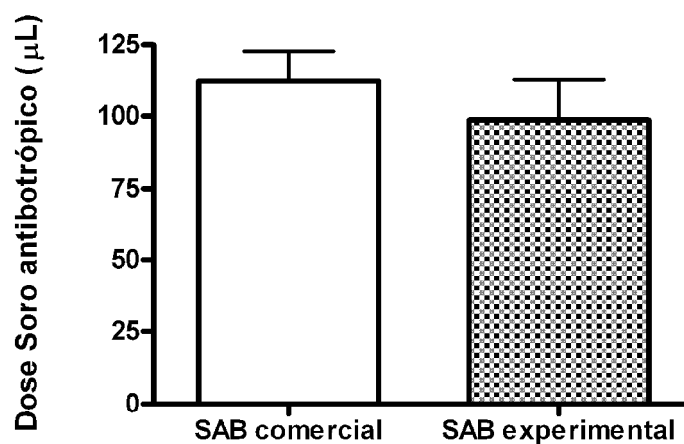
Tanto o antiveneno comercial quanto o antiveneno experimental neutralizaram o edema. Não houve diferença estatística entre as doses efetivas 50% de ambos os antivenenos (Figura 3).





**Figura 2. Edema de pata induzido por diferentes concentrações de veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) em camundongos.**

As soluções do VBe foram injetadas no coxim plantar de camundongos em diferentes concentrações num volume final de 30 µl/pata e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4, 6 e 24h) após a injeção do veneno. O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média ± S.D. (n= 5 animais por grupo).

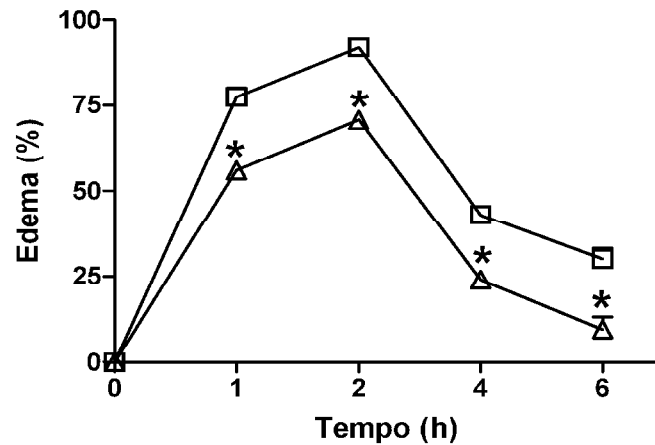


**Figura 3. Soroneutralização do edema de pata induzido por 1μg de veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) em camundongos associado a diversas concentrações de ambos os antivenenos após 2h da injeção.**

As soluções do VBe + antiveneno foram injetadas no coxim plantar de camundongos num volume final de 30 μl/pata. O edema foi avaliado por pletismografia após 2 horas da injeção do SAB comercial ou SAB experimental. Resultados correspondem à média ± S.D. (n= 5 animais por grupo).

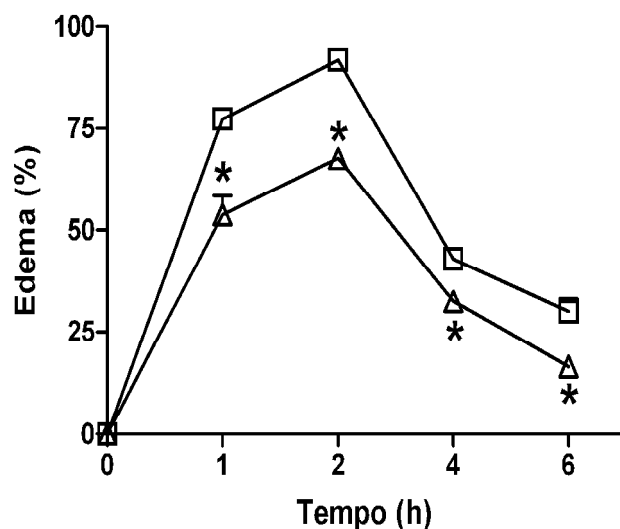
#### ***4.4.1 Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata de camundongo induzido por VBe***

Pré-tratamentos com Dexametasona (Figura 4), NDGA (Figura 5) Indometacina (Figura 6) e resultaram em reduções significativas de edema em todos os tempos avaliados, fato que não foi observado com o pré-tratado com Celecoxib que promoveu redução significativa somente nas 2 primeiras horas (Figura 7).



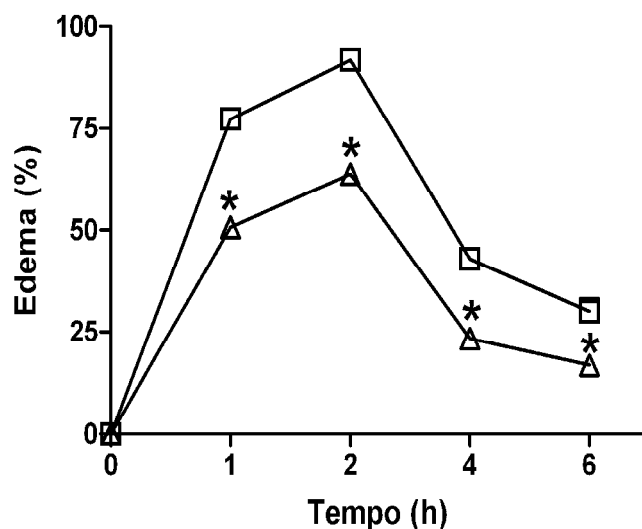
**Figura 4. Edema de pata de camundongos induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) em animais pré-tratados com Dexametasona.**

Os animais receberam tratamento com Dexametasona (1,0 mg/Kg) ou Salina, 30 min antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.



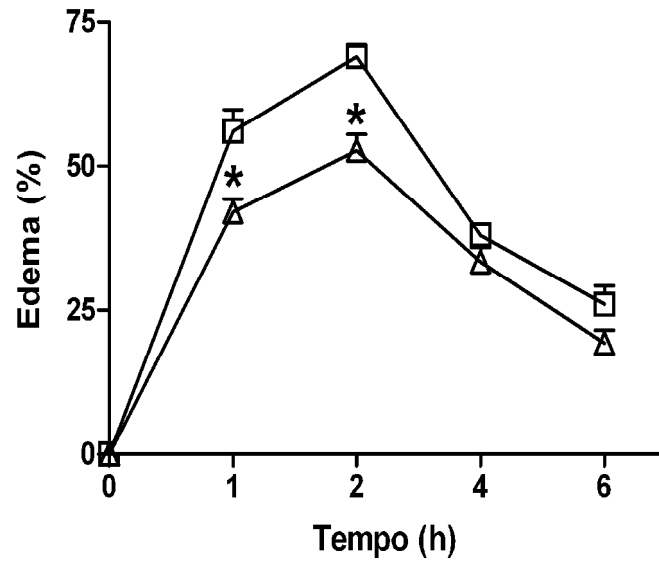
**Figura 5. Edema de pata de camundongos induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) em animais pré-tratados com NDGA.**

Os animais receberam tratamento com NDGA (30 mg/Kg) ou Salina, 30 min antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.



**Figura 6. Edema de pata de camundongos induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) em animais pré-tratados com Indometacina.**

Os animais receberam tratamento com Indometacina (3,0 mg/Kg) ou Salina, 30 min antes da injeção de VBe (1 µg/30 µl) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média ± S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.

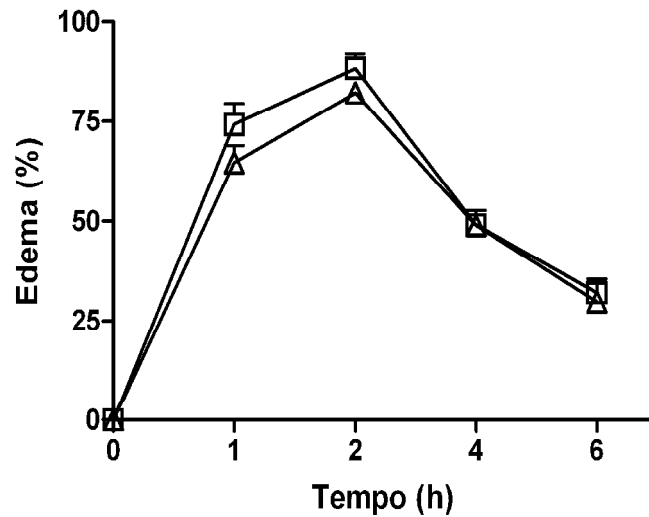


**Figura 7. Edema de pata de camundongos induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) em animais pré-tratados com Celecoxib.**

Os animais receberam tratamento com Celecoxib (30 mg/Kg) ou CMC 1%, 30 min antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.

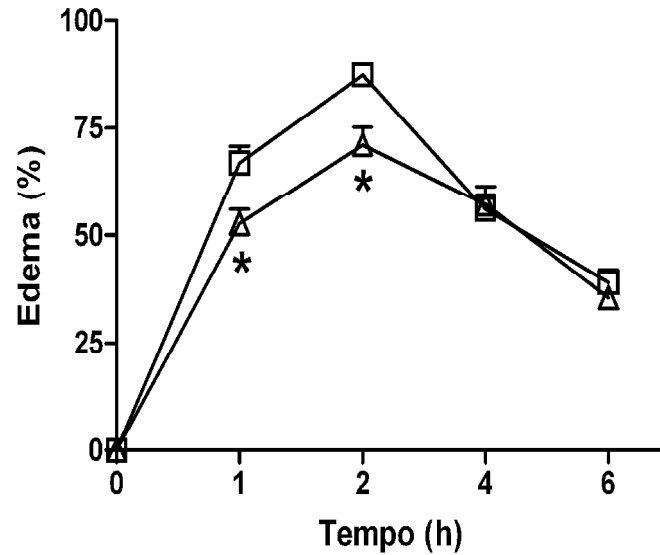
Foi observado que o pré-tratamento com prometazina não surtiu efeito no perfil edematogênico causado pelo VBe (Figura 8). Reduções significativas na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>ª</sup>h após o envenenamento foi observada no tratamento com metissergide (Figura 9). O tratamento com pentoxifilina promoveu pequena, porém, significativa redução do edema apenas na 6<sup>a</sup> hora (Figura 10).





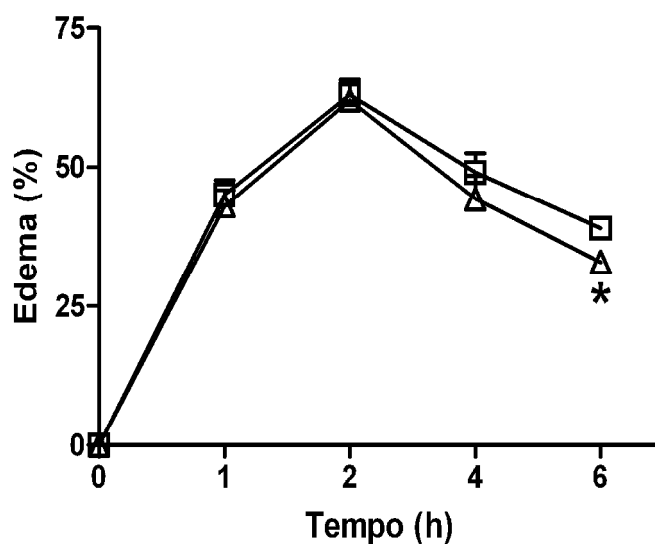
**Figura 8. Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em animais pré-tratados com Prometazina.**

Os animais receberam tratamento com Prometazina (10 mg/Kg) ou Salina, 30 min antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.



**Figura 9. Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em animais pré-tratados com Metissergida.**

Os animais receberam tratamento com Metissergida (0,8 mg/Kg) ou Salina, 30min antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.

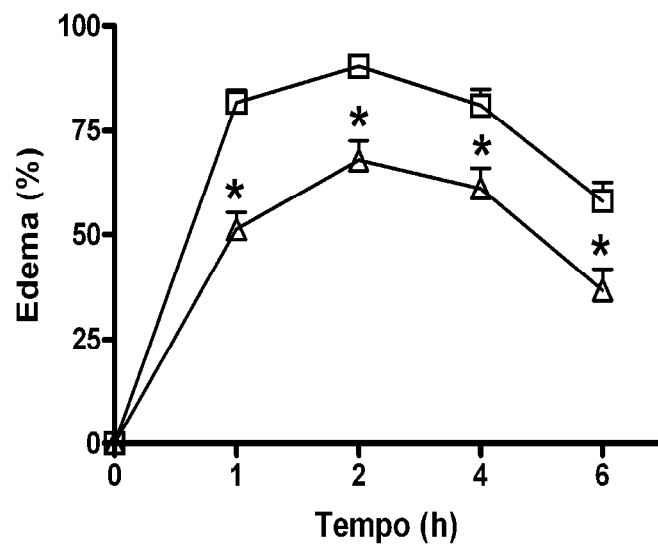


**Figura 10. Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em animais pré-tratados com Pentoxifilina.**

Os animais receberam tratamento com Pentoxifilina (100 mg/Kg) ou Salina, 30min antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.

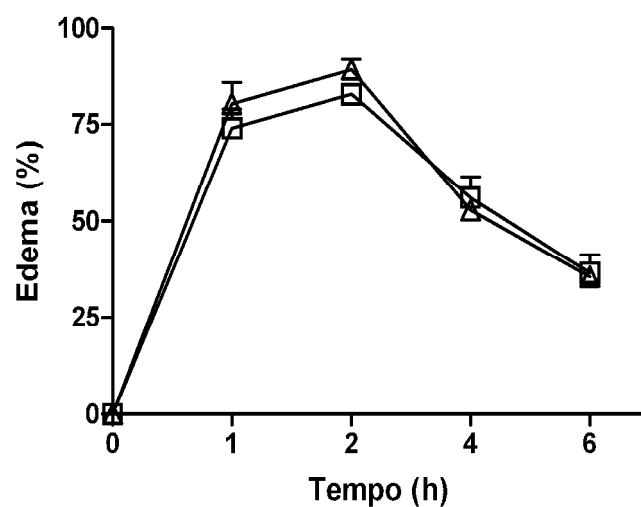
Animais tratados com L-NAME (Figura 11), mas não com D-NAME (figura 12) apresentam redução significativa do edema em todos os tempos analisados. Já, o pré-tratamento com Aminoguanidina resultou numa diminuição de edema até a 4<sup>a</sup>h após o envenenamento (Figura 13).

O tratamento com Captopril promoveu aumento expressivo do perfil edematogênico em todos os tempos observados (Figura 14).



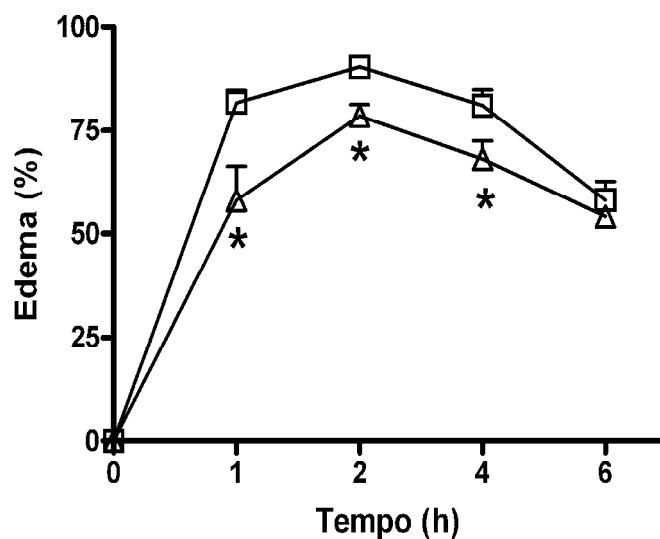
**Figura 11. Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em animais pré-tratados com L-NAME.**

Os animais receberam tratamento com L-NAME (100 mg/Kg) ou Salina, 30min antes da injeção de VBe (1 µg/30 µl) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média ± S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.



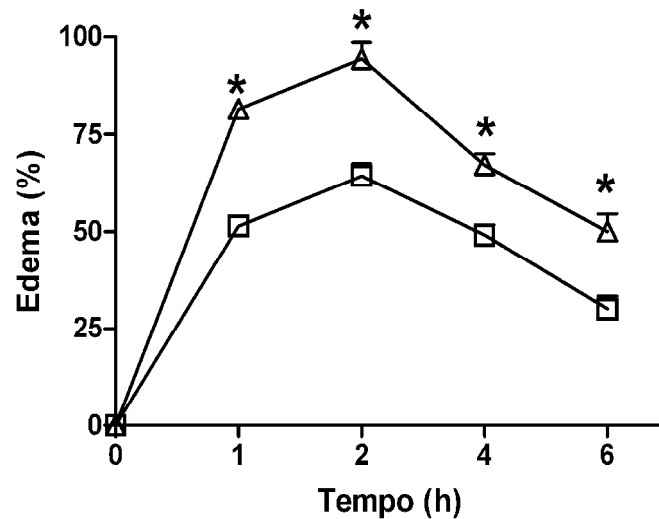
**Figura 12. Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em animais pré-tratados com D-NAME.**

Os animais receberam tratamento com D-NAME (100 mg/Kg) ou Salina, 30min antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.



**Figura 13. Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em animais pré-tratados com Aminoguanidina.**

Os animais receberam tratamento com Aminoguanidina (50 e 100 mg/Kg) ou Salina, 24 horas e 30 min, respectivamente, antes da injeção de VBe (1  $\mu$ g/30  $\mu$ l) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.



**Figura 14. Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em animais pré-tratados com Captopril.**

Os animais receberam tratamento com Captopril (100 mg/Kg) ou Salina, 30min antes da injeção de VBe (1 µg/30 µl) ou Salina no coxim plantar e foram analisados em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6h). O edema foi avaliado por pletismografia. Resultados correspondem à média ± S.D. (n= 5 animais por grupo). \*p<0,05 em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina. Grupos controle=quadrados, grupos tratados=triângulos.



#### **4.4.2 Associação terapêutica – SAB + Dexametasona**

Como observado na Figura 2, o soro antibotrópico comercial possui anticorpos que neutralizam as toxinas do VBe que induzem esse edema inflamatório. No entanto, o soro *per se* foi efetivo em diminuir a atividade edematogênica do veneno quando aplicado até 30 min após o veneno (Figura 15A). Nesse tempo, houve também, inibição significativa do edema apenas com Dexametasona (Figura 15A). No entanto, a associação entre antiveneno botrópico e a dexametasona foi o único tratamento efetivo quando aplicada 45 min após o envenenamento induzido por VBe (Figuras 15B).

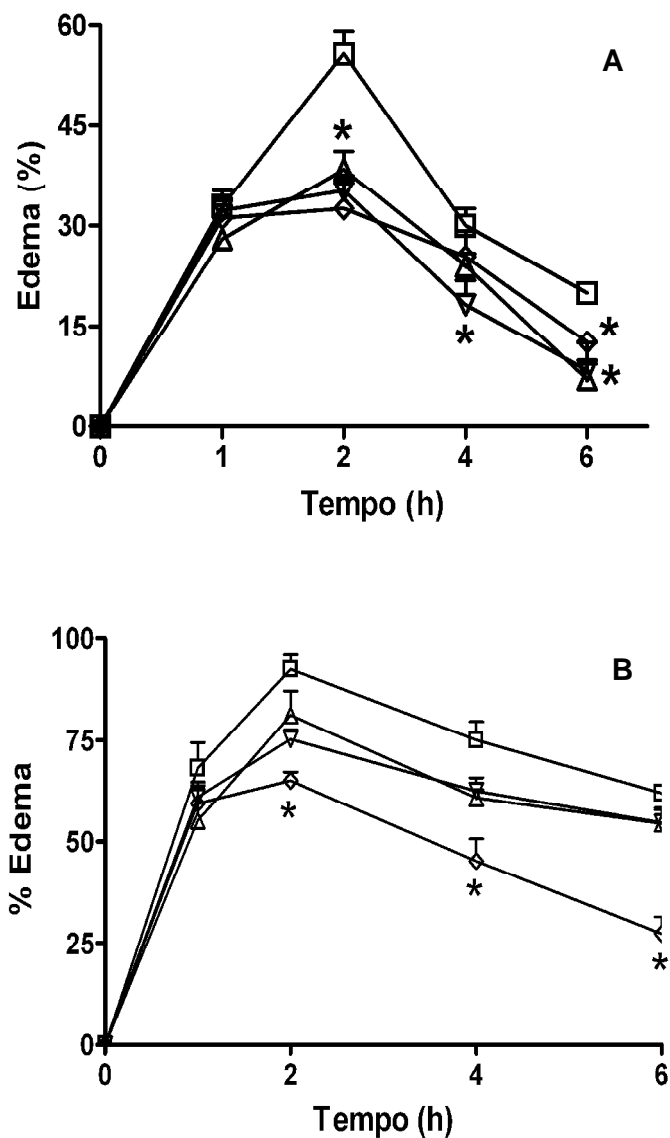


Figura 15. Efeito do tratamento com salina (quadrados), SAB (triângulos), Dexametasona (triângulo invertido) ou com a associação de SAB + Dexametasona (losango) sobre o edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) em camundongos.

Os animais receberam tratamento 30min (A) e 45min (B) após o envenenamento induzido por VBe. Resultados correspondem à média  $\pm$  S.D. (n= 5 animais por grupo). \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle injetado com veneno, mas pré-tratado com salina.

## 5 DISCUSSÃO

Na região nordeste do Brasil é registrado o menor coeficiente anual de acidentes ofídicos por regiões fisiográficas, embora essa região apresente o maior índice de letalidade desse agravo (Ministério da Saúde, 2001).

Na região da caatinga nordestina a espécie *Bothrops erythromelas* é serpente predominante e a principal causadora de acidentes. Seu veneno, contudo, não faz parte do *pool* de antígenos utilizado na imunização de cavalos para obtenção do antiveneno botrópico. Frente a essas informações, testou-se o poder neutralizante do soro antibotrópico (SAB) contra as principais atividades biológicas do veneno de *B. erythromelas* (VBe), em comparação à neutralização das mesmas atividades do de *B. jararaca* (VBj), veneno de referência nacional, pelo mesmo soro.

Para tanto, fez-se necessária caracterização e comparação das atividades biológicas de ambos os lotes de venenos utilizados nesse estudo, para a definição das doses-desafio empregadas nos testes de soroneutralização. Tanto o veneno de *B. erythromelas* quanto o veneno de *B. jararaca* utilizados apresentaram atividades biológicas de magnitudes compatíveis com as descritas na literatura (Sanchez et al., 1992; Ferreira et al., 1992). O veneno de *B. erythromelas* apresentou atividades coagulante e fosfolipásica mais potentes que as observadas no veneno de *B. jararaca* (Sanchez et al., 1992; Ferreira et al., 1992; Boechat et al., 2001), enquanto que no veneno de *B. jararaca*, as atividades letal, hemorrágica e desfibrinante foram mais potentes que as do veneno de *B. erythromelas*.

Uma vez obtida a caracterização das atividades biológicas, o veneno de *B. erythromelas* foi colocado à prova contra o soro antibotrópico comercial e comparado ao resultado obtido para o veneno de referência.

Para a soroneutralização da atividade letal, embora o valor obtido para o veneno de *B. erythromelas* tenha sido nominalmente superior ao valor obtido para *B. jararaca*, os valores não apresentaram diferenças estatísticas.

Para a atividade hemorrágica, desfibrinante e fosfolipásica, os volumes de soro antibotrópico necessários para neutralização do veneno de *B.*

*erythromelas* foram significativamente superiores aos volumes utilizados para a neutralização das mesmas atividades do veneno de *B. jararaca*.

Por outro lado, para a atividade coagulante, o volume de soro antibotrópico utilizado foi significativamente menor para *B. erythromelas* do que para *B. jararaca*. Esse resultado pode ser, pelo menos em parte, devido à presença, no veneno de *B. erythromelas*, apenas de toxinas ativadoras de fatores X e II, enquanto que o veneno de *B. jararaca* possui, além dessas, uma toxina tipo trombina (Maruyama et al., 1992; Kamiguti. e Sano-Martins, 1995). Por esse raciocínio, seria esperado resultado semelhante para atividade coagulante. No entanto, para essa atividade foi necessário um volume maior de soro do que o necessário para neutralizar o mesmo efeito do veneno de *B. jararaca*, indicando a participação de outras toxinas nesse efeito, que não apenas as pró-coagulantes.

Fosfolipases A<sub>2</sub> com ação anticoagulante têm sido descritas em venenos botrópicos (Gutiérrez e Lomonte, 1995). Entretanto, não se têm informações nesse sentido para fosfolipases presentes no veneno de *B. erythromelas*. Sabe-se que esse veneno, bem como os venenos de outras serpentes do mesmo gênero, apresenta concentrações maiores de fosfolipase A<sub>2</sub> em sua composição, do que a presente no veneno de *B. jararaca* (Moura-da-Silva et al., 1991; Gutiérrez e Lomonte, 1995). A maior atividade fosfolipásica observada no veneno de *B. erythromelas* utilizado no presente estudo sugere uma maior concentração desse componente no veneno dessa serpente, o que poderia justificar a maior quantidade de soro necessária para a neutralização dessa atividade nesse veneno, quando comparado ao veneno de *B. jararaca*.

A diferença do poder neutralizante de um soro para serpentes de mesmo gênero e até mesmo de mesmas espécies provenientes de diferentes regiões geográficas tem sido relatada (Otero et al., 1997; Bogarin et al., 1999; Bogarin et al., 2000; Muniz et al., 2000; Saravia et al., 2001).

Os resultados obtidos corroboram observações que demonstram a identidade imunológica presente em venenos botrópicos brasileiros (Dias da Silva et al., 1989; Camey et al., 2002).

O soro antibotrópico comercial brasileiro é eficaz em neutralizar o veneno de *B. erythromelas*, porém, devido ao volume significativamente maior necessário para neutralizações de determinadas atividades, testou-se uma possível melhoria do antiveneno incluindo-se o veneno dessa serpente ao *pool* de antígenos, obtendo-se de um soro antibotrópico experimental (SABex).

Comparando os resultados obtidos através da soroneutralização obtida com o SABex em relação à obtida com o soro comercial, para o veneno de *B. erythromelas* houve diminuição significativa nos volumes necessários para neutralização das atividades, hemorrágica e fosfolipásica. Inversamente, esses valores se mostraram significativamente superiores para o veneno de *B. jararaca*.

Já, para atividade coagulante, houve um aumento significativo no volume de soro necessário para neutralização do veneno de *B. erythromelas*, e uma diminuição significativa no volume de soro necessário para a neutralização do veneno de *B. jararaca*. Entretanto, como observado com o soro comercial, para essa atividade se manteve a necessidade de um volume significativamente maior de soro para neutralizar o veneno de *B. jararaca* em relação ao veneno de *B. erythromelas*.

Os volumes necessários para a neutralização da atividade desfibrinante não se mostraram alterados com a inclusão do veneno de *B. erythromelas* ao *pool* de antígenos.

A região sudeste apresenta o maior número de notificações de casos de envenenamentos ofídicos no país e, nessa região a serpente causadora do maior número de acidentes é a *B. jararaca*. Assim, o aumento significativo dos volumes do soro experimental necessários para a neutralização das atividades hemorrágica e fosfolipásica do veneno de *B. jararaca*, quando comparado ao soro comercial, inviabilizam a simples inclusão do veneno de *B. erythromelas* ao *pool* de antígenos utilizado para a obtenção do soro antibotrópico, uma vez que possivelmente seria necessário um aumento significativo na produção desse soro.

Os acidentes ofídicos são classificados quanto à gravidade em leves, moderados e graves. Nos casos de acidentes botrópicos recomenda-se a

utilização de 2 a 4 ampolas no tratamento de casos leves, 4 a 8 em casos moderados e 12 ampolas nos casos graves (Ministério da Saúde, 2001).

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que o soro antibotrópico comercial atual neutraliza eficientemente todas as atividades do veneno de *B. erythromelas*, comprovando o que havia sido sugerido por Camey et al.. (2001). Uma vez que são necessários volumes maiores para a neutralização de algumas destas atividades, os dados podem sugerir que, na região nordeste do país, se fosse recomendada a utilização do maior volume de ampolas de soro preconizado para cada faixa de gravidade do envenenamento, ou seja, 4 ampolas nos casos leves, 8 nos casos moderados e 12 nos casos graves.

Por outro lado, a inclusão do veneno de *B. erythromelas* proporcionou a melhora significativa da neutralização de uma atividade biológica importante para o envenenamento causado por venenos botrópicos, que é a atividade coagulante. Fica ressaltada a importância de estudos sobre a melhor composição do *pool* de antígenos a ser utilizado para a obtenção de um soro antibotrópico mais eficiente para todos os venenos botrópicos, visando uma melhoria no tratamento de acidentes provocados por estes venenos.

A literatura descreve que os sintomas locais do envenenamento botrópico, principalmente o edema, são os mais difíceis de se neutralizar, uma vez que estes venenos atuam muito rapidamente e alguns desses efeitos são causados por mediadores endógenos da resposta inflamatória liberados pelo tecido lesado, em resposta à ação destes venenos (Gutiérrez et al., 1998; Picoletti et al., 2002).

No presente trabalho não foi observada diferença significativa entre os volumes necessários de ambos os antivenenos estudados para neutralização da atividade edematogênica.

Trabalho realizado por Araújo et al.. (2007) mostrou que a associação de antiinflamatórios esteroidais à soroterapia foram eficientes no tratamento tardio do edema, induzido por veneno de *B. jararaca*, em pata de camundongo, entretanto, havia a necessidade de se comprovar se essa melhoria promovida pela associação de drogas antiinflamatórias à soroterapia seria benéfica

também no tratamento do edema induzido por outros venenos botrópicos. Assim, testou-se esse tratamento para o edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas* por ser uma serpente de predominância regional e, como citado anteriormente, não participante do *pool* de antígenos utilizado na obtenção do soro antibotrópico.

Para tanto, fez-se necessária uma caracterização do perfil da mediação farmacológica do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*, para verificar quais fármacos antiinflamatórios poderiam ser associados à soroterapia.

O veneno de *Bothrops erythromelas* causa edema inflamatório, assim como descrito para outras serpentes do gênero *Bothrops* (de Araujo et al., 2000; Barbosa et al., 2003). Os resultados mostram que esse veneno induz um edema que se instala rapidamente.

No caso do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*, foi observada uma significativa inibição desse efeito nos grupos de animais pré-tratados com dexametasona, indometacina e celecoxibe, e NDGA, indicando uma grande participação de eicosanóides, derivados da degradação do ácido araquidônico, na mediação desse edema.

Os fármacos antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona, após penetrarem nas células, ligam-se a receptores específicos de alta afinidade. Após essa interação, o receptor ativado migra para o núcleo e liga-se a elementos de resposta aos esteróides no DNA. O efeito consiste em repressão ou indução da transcrição gênica. A repressão é obtida através da inibição da ação de fatores de transcrição como AP-1 (*activator protein-1*) e NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*), que inibem os genes da COX-2, de várias citocinas e fatores de moléculas de adesão, bem como a iNOS (Rang et al., 2004). Já o efeito indutível promove o aumento da síntese de uma proteína, a lipocortina-1 ou anexina-1, que tem efeito inibitório sobre a expressão da fosfolipase A<sub>2</sub>, como conseqüência há uma diminuição na produção de produtos derivados do ácido araquidônico, tanto os gerados pela via ciclooxigenase, como os da via lipoxigenase (Czock et al., 2005).

Já os fármacos antiinflamatórios não esteróidais (AINEs) vem sendo utilizados amplamente afim de inibir seletivamente a ação de determinados mediadores químicos inflamatórios. A indometacina é um exemplo de AINEs , que inibe as enzimas COX-1 e COX-2 impedindo dessa forma a síntese de prostanóides e tromboxanos (Rang et al., 2004). O celecoxibe é outro antiinflamatório que possui efeito seletivo, inibindo especificamente a COX-2, que impede conseqüentemente a síntese de prostaglandinas, evitando assim, reações adversas que afetam particularmente o trato gastrointestinal como à observada com o uso de um antiinflamatório não seletivo para ciclooxygenase (Rang et al., 2004). O grupo tratado com a indometacina (inibidor das enzimas COX-1 e COX-2) apresentou diminuição significativa do edema em todos os tempos observados. Entretanto, o grupo tratado com celecoxibe (inibidor da enzima COX-2) apresentou diminuição significativa do edema até a 2<sup>a</sup>h. Essa melhor eficácia da indometacina pode ser explicada pelo fato de a inibição completa da via das ciclooxygenases não resultar na liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e tromboxanos; o que não ocorre quando há tratamento com celecoxibe, onde somente a prostaglandina oriunda da ação da COX-2 é inibida, mas não a ação dos mediadores inflamatórios induzidos pela ação da COX-1.

Além disso, existem fármacos derivados da planta *Larrea divaricata* que atuam inibindo a via da 5-lipoxigenase e possuem uma potente ação antioxidante, como é o caso do ácido nordiidroguaiarético (NDGA-*Nordihydroguaiaretic acid*) (Werz, 2007). A participação da via da 5-lipoxigenase também foi demonstrada na migração celular induzida pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (Flores et al., 1993).

Uma mediação preponderante por parte de eicosanóides também foi observada para outros venenos botrópicos, tais como o de *B. insularis* (Barbosa et al., 2003), *B. lanceolatus* (Araújo et al., 2000) e *B. jararaca* (Trebien e Calixto, 1989; Perales et al., 1992; Gonçalves e Mariano, 2000).

Por outro lado, a prometazina, um inibidor seletivo para receptores H1 da histamina não inibiu o edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*, sugerindo a não participação da histamina no processo. Outros estudos demonstraram a não participação desse mediador no edema induzido por



outros venenos, tais como o de *B. jararaca* (Perales et al., 1992; Gonçalves e Mariano) e *B. asper* (Chaves et al., 1995) em camundongos; embora a histamina participe na mediação do edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* em ratos (Trebien e Calixto, 1989).

Já a serotonina, avaliada através do pré-tratamento dos animais com metissergida, antagonista específico dos receptores de serotonina (5-HT<sub>2</sub>), aparentemente participa da mediação na fase inicial do edema induzido por VBe. A participação desse mediador não fica evidente no edema induzido por outros venenos botrópicos tais como os venenos de *B. insularis* (Barbosa et al., 2003) e de *B. lanceolatus* (Araújo et al., 2003), mas sim no edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* (Gonçalves e Mariano, 2000).

Há ainda outros fármacos que podem atuar como inibidores de citocinas, como é o caso da pentoxifilina, um derivado da metilxantina que atua na modulação da produção de TNF- $\alpha$  no nível pré-transcricional (Edwards et al., 1992). Os resultados do presente estudo sugerem que o TNF- $\alpha$  pode participar da mediação na fase tardia do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*. Esse resultado está coerente com o obtido por Petricevich et al. (2000), sugerindo liberação desse mediador inflamatório em tempos mais tardios, após o estímulo inflamatório dado pelo veneno de *B. jararaca*.

Os resultados observados nos grupos tratados com inibidores de óxido nítrico sintetase constitutiva e induzida (NOS e iNOS), L-NAME e aminoguanidina, respectivamente, sugerem a participação do óxido nítrico na mediação desse edema, uma vez que estes tratamentos provocaram uma diminuição significativa desse efeito. Essa inibição também foi observada para o edema induzido pelo veneno de *B. insularis* (Barbosa et al., 2003) e de *B. asper* (Chaves et al., 2006), porém, para este último foi avaliada somente a participação da NOS.

O edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*, aparentemente também é mediado pela bradicinina, uma vez que o tratamento com captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, a qual degrada a bradicinina, produziu um aumento significativo do edema induzido pelo VBe. O mesmo efeito foi observado na mediação do edema induzido pelo veneno de *B.*

*lanceolatus* (De Faria et al., 2001). Entretanto, aparentemente, esse mesmo mediador não participa do edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* (Trebien e Calixto, 1989; Perales et al., 1992), embora medeia a dor induzida por esse veneno (Chacur et al., 2001).

Efeitos patológicos induzidos por venenos botrópicos podem possuir mediações farmacológicas distintas. Como exemplo podemos citar o efeito hiperalgésico causado por VBj, que possui mediação distinta da atividade edematogênica (Teixeira et al., 1994), bem como a atividade edematogênica, a qual possui mediação diferente da hemorragia (Gonçalves e Mariano, 2000).

Quanto à neutralização desse edema pelo soro antibotrópico, o pré e pós-tratamento com o antiveneno botrópico inibiu a formação do edema induzido por VBe. No entanto, essa inibição não foi observada no grupo que recebeu o SAB 45 minutos após injeção do veneno. Esse resultado mostra que o soro possui anticorpos contra as toxinas do veneno que induzem o edema, porém, esse efeito é observado apenas quando o soro é administrado poucos minutos após o envenenamento. Esse resultado corrobora dados obtidos por Picolo et al. (2002), que mostram uma melhor diminuição do edema quando o soro é administrado imediatamente após a injeção de veneno de *B. jararaca* no coxim plantar de ratos.

Portanto, como já mencionado, pode se constatar que, em se tratando de lesões inflamatórias locais desencadeadas por venenos botrópicos, grande parte deste efeito se deva à atuação de mediadores inflamatórios liberados no local da inoculação do veneno (Trebien e Calixto, 1989; Perales et al., 1992; Búrigo et al., 1996; Gonçalves e Mariano, 2000; De Faria et al., 2001).

Nossos resultados confirmam dados da literatura e demonstram uma grande participação dos metabólitos do ácido araquidônico na evolução do edema de pata induzido pelos venenos botrópicos. Nesse sentido, a associação de antiinflamatórios, esteroidais ou não, como a dexametasona, indometacina ou celecoxibe ao soro antibotrópico poderia, teoricamente, melhorar a eficiência da soroterapia no tratamento de reações inflamatórias locais causadas por esses venenos, como sugere o trabalho de Araújo et al. (2007).

No presente estudo, os animais tratados com a associação de dexametasona ao soro antibotrópico demonstraram uma melhora na evolução do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*. Também como no edema induzido pelo veneno de *B. jararaca*, esse efeito de inibição foi observado em períodos tardios pós-inoculação do VBe, 30 e 45 minutos. Porém, 45 minutos após o envenenamento, somente a associação dexametasona + soro foi efetiva em inibir o edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*.

Em comparação aos resultados obtidos por Araújo et al. (2007), aparentemente há uma menor eficácia dessa associação no tratamento do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*, em relação ao observado no tratamento do edema induzido pelo veneno de *B. jararaca*. Essa menor eficácia pode ser devida à participação de alguns mediadores inflamatórios liberados pelo veneno de *B. erythromelas* que não medeiam o edema induzido pelo veneno de *B. jararaca*, como a bradicinina.

Apesar disso, a associação farmacológica de dexametasona ao soro antibotrópico mostrou-se eficiente na redução do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas*. Este resultado sugere que esse procedimento possa ser benéfico no tratamento do edema inflamatório induzido por outros venenos botrópicos que sejam mediados por eicosanóides.

Um estudo duplo-cego, randomizado, realizado no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, indica que a associação de dexametasona à soroterapia diminuiu significativamente o edema dos pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops* (Susaki et al., 2005), corroborando os dados obtidos nos estudos experimentais (Araújo et al., 2007), incluindo-se o presente trabalho. Entretanto outros estudos clínicos são necessários para se comprovar definitivamente o benefício dessa associação no tratamento das reações inflamatórias locais resultantes de picadas por serpentes do gênero *Bothrops*.

## 6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados expostos, podemos concluir que

✓ O veneno de *B. erythromelas* é neutralizado pelo SAB, porém são necessários volumes maiores de soro quando comparado ao VBj. A simples inclusão desse veneno ao *pool* de antígenos utilizado para a obtenção do SAB não trouxe os benefícios esperados, porém os resultados reforçam a importância de estudos no sentido de se obter uma formulação de antígenos que melhore a eficiência do soro antitoxigênico.

✓ A associação dexametasona e antiveneno foi eficiente em diminuir o edema induzido por esse veneno quando administrada em tempos tardios, pós-envenenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Ministério da Saúde. Acidente por Animais Peçonhentos – Notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação-SINAN. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/animaisp/bases/animaisbr.def> [2008 jul 6].

Alvarado J, Gutiérrez JM. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). Rev Biol Trop. 1988;36(2B):563-5.

Araújo SD, De Souza A, Nunes FPB, Gonçalves LRC. Effect of dexamethasone associated to the antiothropic serum in the treatment of the paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom in mice. Inflamm Res. 2007;56:409-13.

Barbosa AM, Do Amaral RO, Teixeira, CF, Hyslop S, Cogo JC. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. Toxicon. 2003; 42(5): 515-23.

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacol Ther. 1994;62(3):325-72.

Boechat AL, Paiva CS, Franca FOS. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001; 43(1): 7-14.

Bogarin G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, Guidolin R, Rojas G, Higashi HG, Gutiérrez, J. M. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. Toxicon. 2000; 38(10): 1429-41.

Bogarin G, Romero M, Rojas G, Lutsch C, Casadamont M, Lang J, Otero R, Gutiérrez JM. Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. Toxicon. 1999; 37(3): 551-7.

Brazil V. Therapeutica do ophidismo. Revista Médica de São Paulo. 1911;1(14):164-74.

Búrigo AC, Calixto JB, Medeiros YS. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. J Pharm Pharmacol. 1996;48(1):106-11.

Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1993;268(12):9030-3.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Cabral GA. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sci.* 2005;77(14):1699-710.

Camey KU, Velarde DT, Sanchez EF. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon.* 2002; 40(5): 501-9.

Cardoso JL, Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *Q J Med.* 1993;86(5):315-25.

Chacur M, Longo I, Picolo G, Gutiérrez JM, Lomonte B, Guerra JL, Teixeira CF, Cury Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops jararaca* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon.* 2003;41:667-78.

Chacur M, Picolo G, Gutiérrez JM, Teixeira CF, Cury Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon.* 2001; 39(8): 1173-81.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(21): 13926-31.

Chaves F, Barbosa M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon.* 1995;33(1):31-9.

Chaves F, Teixeira CF, Gutiérrez JM. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. *Inflamm Res.* 2006; 55(6): 245-53.

Collins T. Acute and Chronic Inflammation. *Robbins pathologic basis of disease.* 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000. p. 44-48.

Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(1):61-98.

De Araujo AL, De Souza AO, Da Cruz-Hofling MA, Flores CA, Bom C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon.* 2000; 38(2): 209-21.

De Faria L, Antunes E, Bon C, De Araújo A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon.* 2001;39(6):825-30.

Dias da Silva W, Guidolin R, Raw I, Higashi HG, Caricati CP, Moraes JF, Lima MLSR, Yamaguchi IK, Nishikawa AK, Stephano MA, Marcelino JR, Pinto JR, Santos MJ. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Memórias do Instituto Butantan*. 1989; 51(4): 153-168.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Méd Lab*. 2003;39 (4):343-50.

Edwards MJ, Todd Heniford B, Klar EA, Doak KW, Miller FN. Pentoxifylline inhibits interleukin-2-induced toxicity in C57BL/6 mice but preserves antitumor efficacy. *J Clin Invest*. 1992;90:637-41.

Farsky SH, Gonçalves LRC, Gutiérrez JM, Correa AP, Rucavado A, Gasque P, Tambourgi DV. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. *Med Inflamm*. 2000;9:213-21.

Ferreira, ML, Moura-da-Silva AM, Franca FO, Cardoso JL, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*. 1992; 30(12): 1603-8.

Flores CA, 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*. 1993, 31(12):1551-9.

Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinase. *Toxicon*. 2005;45:969-85.

França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Savier; 2003. p. 72-86.

Franchischetti IMB, Castro HC, Zingali RB, Carlini C, Guimaraes, JA. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp Biochem Physiol*. 1998; 119C: 21-29.

Gene JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1989; 27(8): 841-8.

Gonçalves LRC, Mariano M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Med Inflamm*. 2000;9(2):101-7.

Gonçalves LRC, Chudzinski-Tavassi AM. High molecular mass kininogen inhibits metalloproteases of *Bothrops jararaca* snake venom. *Bioch Biophys Res Commun*. 2004; 318:53-9.

Grantsau, R. As cobras venenosas do Brasil, 1928. São Bernardo do Campo, Bandeirante; 1991.

Guimarães AQ, Cruz-Hofling MA, Ferreira De Araújo PM, Bom C, Lobo De Araújo A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflamm Res*. 2004;53(7):284-91.

Gutiérrez JM, Rojas G, Lomonte B, Gené JA, Chaves F. La evaluación de la capacidad neutralizante de los antivenenos en América. Universidade de Costa Rica; 1990. p. 21.

Gutiérrez JM, Gene JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1985;23(6):887-93.

Gutiérrez JM, Leon G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 1998; 36(11):1529-38.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 1995;33(11):1405-24.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina. In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Savier; 2003, p. 468.

Gutiérrez JM, Lomonte B, Chaves F, Moreno E, Cerdas L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol C*. 1986; 84(1): 159-64.

Guzzo ML, Farsky SH, De Neuci G, Antunes E, Silva MA, Mello SB. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 2000;38:1535-46.

Kamiguti AS, Hay CR, Zuzel M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha_2 \beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem J*. 1996;320:635-41.

Kamiguti AS, Sano-Martins, I. South American Snake Venoms Affecting Haemostasis. *J Toxicol Toxin Rev*. 1995; 14: 359-374.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran. *Patologia- Bases patológicas das doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 49-79.

Laloo DG, Theakston RD. Snake antivenoms. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2003; 41(3): 277-90; 317-27.



Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000; 95(10): 3032-43.

Nahas L, Kamiguti AS, Barros MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb Haemost*. 1979; 41(2): 314-28.

Otero R, Nunez V, Gutiérrez JM, Robles A, Estrada R, Osorio RG, Del-Valle G, Valderrama R, Giraldo CA. Neutralizing capacity of a new monovalent anti-*Bothrops atrox* antivenom: comparison with two commercial antivenoms. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(3): 375-9.

Perales J, Amorim CZ, Rocha SLG., Domont GB, Moussatché H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antithrombotic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Agents Actions*. 1992; 37:250-

Petricevich VL, Teixeira CF, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 2000;38:1253-66.

Piccolo G, Chacur M, Gutiérrez JM, Teixeira CF, Cury Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(10):1221-8.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada, S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1990;87:5193-7.

Ramos OH, Selistre-de-Araujo HS. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006; 142(3-4): 328-46.

Raw I, Guidolin R. Antivenins in Brazil: preparation. In: Tu AT, editor. *Reptile venoms and toxins: Handbook of natural toxins*. 1991; v.5, p. 557-581.

Rocha e Silva M, Garcia-Leme J. *Chemical mediators of the acute inflammatory reaction*: Oxford: Pergamon Press; 1972. p.1-47.

Rojas G, Jimenez JM, Gutiérrez JM. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. 1994; 32(3): 351-63.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: WB EB, editor. *Venomous Animals and their Venoms*. New York: Academic Press; 1971. v. 2, p. 345-84.

Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernandes CM, Diaz C, Gutiérrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Med Inflamm*. 2002;11:121-8.

Saadi S, Wrenshall LE, Platt JL. Regional manifestations and control of the immune system. *Faseb J*. 2002;16(8):849-56.

Sanchez EF, Cordeiro MN, De Oliveira EB, Juliano L, Prado ES, Diniz CR. Proteolytic specificity of two hemorrhagic factors, LHF-I and LHF-II, isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Toxicon*. 1995; 33(8): 1061-9.

Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Cotta G, Diniz CR. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 1992; 30(1): 95-103.

Sano-Martins IS, Fan HW, Castro, SC, Tomy SC, Franca FO, Jorge MT, et al.. Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snakes. Butantan Institute Antivenom Study Group. *Toxicon*. 1994;32(9):1045-50.

Santoro ML, Sousa-e-Silva MC, Goncalves LR, Almeida-Santos SM, Cardoso DF, Laporta-Ferreira IL, Saiki M, Peres CA, Sano-Martins IS. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1999; 122(1): 61-73.

Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, Lopez JC, Chaves E, Velasquez R, Rojas G, Gutiérrez JM. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon*. 2001; 39(2-3): 401-5.

Serhan CN, Savil J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1191-7.

Silva MB, Schattner M, Ramos CR, Junqueira-de-Azevedo IL, Guarneri MC, Lazzari MA, Sampaio CA, Pozner RG, Ventura JS, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem J*. 2003; 369(Pt 1): 129-39.

Spinosa SH, Górnaiak SL, Bernardi MM. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*; 1999. p. 212 - 226.

Suzaki TT, Fan HW, Málaque CMS, Medeiros CR, Cardoso JLC, Ferrari RA, Vicente PM, Sano-Martins IS, Gonçalves LRC, Tomy SC, Bárbaro KL, Clissa PB, França FOS. Effect of dexametasone therapy on local edema after *Bothrops* accidents. *Memórias do Instituto Butantan*. 2005; 61: 156.

Teixeira CF, Cury Y, Oga S, Jancar S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). *Toxicon*. 1994; 32(4): 419-26.

Theakston RD, Reid AH. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull World Health Organ*. 1983; 61(6): 949-56.

Trebien HA, Calixto JB. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions*. 1989;26(3-4):292-300.

Warrell DA, Looareesuwan S, Stimson AF, Hutton RA. Rediscovery and redefinition of Malcolm Smith's *Trimeresurus kanburiensis* in Thailand, with a report of envenoming. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992; 86(1): 95-9.

Werz O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med*. 2007;73:1331-57.

Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CF. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon*. 2001;39:1505-13.

Zingali RB, Jandrot-Perrus M, Guillin MC, Bon C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*. 1993;32:10794-10802.