

Este exemplar corresponde à  
redação final da tese defendida  
pel candidato Edson Antunes  
e aprovada pela comissão

Julgadora

Cm, 13/5/87

EDSON ANTUNES

*Antunes*

**PODER NEUTRALIZANTE DE SOROS ANTIOFÍDICOS  
SOBRE A ATIVIDADE LIBERADORA DE HISTAMINA  
DE VENENOS OFÍDICOS.**

Orientadora: Profa.Dra.Julia Prado Franceschi  
Co-orientadora: Profa.Dra.Lea Rodrigues Simioni

TESE DE MESTRADO, APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVER  
SIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
-UNICAMP, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

CAMPINAS  
1987

Esta tese foi preparada no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, durante o curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia e apresentada ao Instituto de Biologia desta Universidade, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências.

UNICAMP - CAMPINAS - SÃO PAULO

1987

Aos meus pais e irmãos,  
pelo constante incentivo

## AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra.JULIA PRADO FRANCESCHI, principalmente pelo entusiasmo contagiante com que se dedica às pesquisas de venenos ofídicos, e que muito me tem influenciado.

À Profa.Dra.LEA RODRIGUES SIMIONI, pela orientação sempre sensata, serena e objetiva.

À TODOS do Departamento de Farmacologia, pela ajuda , atenção e sobretudo pela grande amizade que nos uniu ao longo desses anos.

Ao Dr. ADOLFO MAX ROTHSCHILD, pela gentileza com que nos deu acesso ao método de obtenção de mastócitos de rato e pela avaliação crítica deste trabalho.

Ao Dr. ANTONIO ARI GONÇALVES, pelo comportamento sempre acessível mostrado durante o curso de pós-graduação, e agora, pelas sugestões e críticas na elaboração final da tese.

Ao Dr. BENEDITO OLIVEIRA, Dr. SERGIO MARANGONI e JOSÉ CAMILO NOVELLO, pela maneira sempre cordial com que temos trabalhado.

Ao Dr. JOSE ROBERTO GIGLIO, MARIA INES H.BRANDEBURGO , HELOISA S. SELISTRE, pela pronta colaboração e simpatia com que nos recebem em seu laboratório .

À Dra. INGRID MENZ e ao Sr. ACRISIO BELLEI, pelo fornecimento de cobaias.

Ao ERASMO GOMES CARRASCO e à SOLANGE APARECIDA DOS SANTOS BASSO, pelo esmero e dedicação no trabalho de datilografia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço a bolsa de mestrado concedida no período de 1983 a 1985.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia, pela atenção dispensada durante o cumprimento dos crêditos.

Campinas, março de 1987.

## I N D I C E

<b>I</b>	<b>- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>II</b>	<b>- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
	2.1. Animais.....	15
	2.2. Peçonhas.....	15
	2.3. Soros antipeçonhentos ofídicos.....	16
	2.4. Drogas e reagentes.....	16
	2.5. Toxicidade das peçonhas.....	17
	2.6. Titulação dos soros.....	17
	2.6.1. Reação de floculação.....	17
	2.6.2. Injeção venosa em camundongos.....	18
	2.7. Obtenção e tratamento do lavado peritoneal de ratos... 18	
	2.7.1. Composição da solução de Krebs-Ringer.....	18
	2.7.2. Procedimento.....	18
	2.7.3. Indução da liberação de histamina.....	19
	2.7.4. Dosagem da histamina liberada.....	20
	2.8. Análise estatística dos dados.....	21
<b>III</b>	<b>- RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
	3.1. Toxicidade das peçonhas.....	23
	3.2. Titulação dos soros ofídicos.....	24
	3.2.1. Reação da floculação ("in vitro").....	24
	3.2.2. Injeção venosa da mistura soro-peçonha em camundongos ("in vivo").....	25
	3.2.3. Correlação "in vitro/in vivo".....	27
	3.2.4. Outras observações.....	28
	3.3. Observações preliminares sobre a liberação de hista mina de mastócitos de rato.....	29
	3.4. Liberação de histamina de mastócitos de rato induzi zida pelos venenos brutos de <u>C.d.terrificus</u> , <u>C.d.cascavella</u> , <u>B.jararacussu</u> e <u>B. alternatus</u> .....	30

3.5.	Liberação de histamina induzida pelos soros Antibo trópico, Anticrotálico e Polivalente.....	32
3.6.	Efeito dos soros Anticrotálico, Antibotrópico e Polivalente sobre a atividade liberadora de hista- mina de mastócitos de rato.....	35
3.6.1.	<u>Crotalus durissus terrificus</u> .....	35
3.6.2.	<u>Crotalus durissus cascavella</u> .....	38
3.6.3.	<u>Bothrops jararacussu</u> .....	39
3.6.4.	<u>Bothrops alternatus</u> .....	43
3.7.	Liberação de histamina induzida pela crotamina.....	44
3.8.	Efeito dos soros Anticrotálico e Polivalente sobre a liberação de histamina induzida pela crotamina.....	47
IV	- DISCUSSÃO.....	49
V	- CONCLUSÕES.....	60
VI	- SUMÁRIO.....	62
VII	- SUMMARY.....	65
VIII	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## I - INTRODUÇÃO



Os vários estímulos pelos quais a histamina po de ser liberada no organismo e participar de reações tran sitórias ou permanentes tais como queda da pressão arte rial, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, constrição bronquiolar, edema e outros, despertaram grande interesse nas décadas de 40-50, fato traduzido pelos numerosos estudos até então realizados e reunidos em revisões (ROCHA e SILVA, 1966; KAZIMIERCZAK & DIAMANT, 1978; ROTHSCCHILD & ROTHSCCHILD, 1979; LAGUNOFF & MARTIN, 1983).

Nestes, o uso de mastócitos tornou-se relevan te a partir do trabalho pioneiro de RILEY & WEST (1953) que evidenciaram a primeira correlação farmacológica en tre quantidade de mastócitos e teor de histamina presen tes nos vários tecidos de mamíferos.

Vários métodos para obtenção de populações ho mogêneas de mastócitos têm sido desenvolvidos (PADAWER & GORDON, 1955; UVNAS & THON, 1959; JOHNSON & MÖRAN, 1966 ; COOPER & STANWORTH, 1974). Mastócitos peritoneais de ra to são o suporte principal para estudos detalhados do me canismo de liberação da histamina, embora tais estudos

sejam também frequentemente realizados com células obtidas da cavidade pleural, bem como do próprio pulmão (EILBACK & SMITH, 1967; PATERSON et al., 1976; ENNIS, 1982). A razão da utilização dessa fonte de células é a relativa facilidade de obtenção, e isolamento em número necessário para estudos quantitativos.

O tamanho do mastócito varia nas diferentes espécies animais assim como no mesmo indivíduo. O mastócito peritoneal de rato, p. ex., possui um diâmetro de  $13,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  com cerca de 1000 grânulos em seu interior os quais ocupam de 50 a 55% do volume citoplasmático celular (BLOOM, 1974).

Sob condições normais, toda a histamina estocada nos mastócitos está localizada nos grânulos secretórios (RILEY & WEST, 1966). No rato, é bem estabelecido que a substância responsável pela ligação da histamina nos grânulos é um complexo heparina-proteína insolúvel em água (KAZIMIERCZAK & DIAMANT, 1978). Em algumas espécies, os mastócitos estocam ainda serotonina e dopamina (BENDITT et al., 1955; SLORACH & UVNÄS, 1968; ENERBACK & HAGGENDAL, 1970; CARRAWAY et al., 1984).

A lista de agentes capazes de induzir liberação de histamina é vasta. O sistema de classificação dos agentes liberadores de histamina proposto por PATON (1957) foi recentemente modificada por LAGUNOFF & MARTIN (1983). Assim, de acordo com essa nova classificação, os agentes que liberam histamina podem ser divididos em agentes dependentes da imunoglobulina IgE, agentes

citotóxicos, enzimas, polissacarídeos, lectinas, anafilótoxinas, compostos básicos, cálcio e outros (ácido fosfatídico, baixa concentração extracelular de sódio, fluoreto, deficiência de magnésio, etc.).

O estudo da liberação de histamina por peçonhas ofídicas foi introduzido por FELDBERG & KELLAWAY (1937a,b) e desde então vem sendo conduzido quer em experimentos realizados "in vivo", quer em preparações isoladas.

FELDBERG & KELLAWAY (1937a,b; 1938) mostraram que havia liberação de histamina de pulmões de cobra, gato, cão e macaco perfundidos com venenos de abelha e alguns tipos de venenos ofídicos. A concepção inicial desses autores, quando de seus primeiros estudos, era de que a liberação de histamina estava estritamente correlacionada com o teor de fosfolipase A presente em tais venenos. Assim, essa enzima seria a responsável pela geração de lisofosfatídeos (lisolecitina e lisocefalina) que promoveriam a liberação e eventual distribuição dessa amina pelo corpo da vítima.

Essa opinião foi corroborada por alguns trabalhos que se seguiram. Em 1957, HÖGBERG & UVNÄS mostraram que a fosfolipase A obtida de vários venenos ofídicos e venenos de abelha tinha um efeito degranulante sobre mastócitos mesentéricos de rato. Posteriormente, MORAN et al. (1962) demonstraram que a fosfolipase A de veneno de abelha era capaz de liberar histamina e serotonina de mastócitos isolados da cavidade peritoneal de

rato. O fator degranulador de mastócitos presente no meio de cultura de Clostridium welchii, foi também considerado como sendo a fosfolipase A (FREDHOLM et al. 1960).

Entretanto, estes dados foram revistos por ROTHCHILD (1965, 1966), FREDHOLM (1966) e DAMERAU et al. (1975) que demonstraram que a fosfolipase A, pura, obtida de veneno crotálico, elapídico e veneno de abelha não é o componente responsável pela liberação de histamina de mastócitos isolados de rato.

ROTHCHILD (1965, 1966), tendo verificado a capacidade da lisolecitina (produto da ação da fosfolipase A sobre a lecitina) de liberar histamina, tanto de mastócitos isolados ("in vitro") quanto de pele de rato ("in vivo"), classificou a liberação de histamina pela fosfolipase A de indireta, isto é, liberação que requer formação de lisolecitina. Dessa forma, surge a necessidade de uma fonte de fosfolipídeos não mastocítica para que tal processo se realize. Este autor demonstrou ainda que o componente liberador de histamina presente no veneno da cascavel Crotalus durissus terrificus em mastócitos isolados de rato, está completamente dissociado da fração com atividade fosfolipásica, sendo provavelmente uma enzima de natureza proteolítica, termolábil e de elevado peso molecular.

Tais resultados foram confirmados por MARKWARDT (1966), VITAL BRAZIL et al. (1966) e VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI (1968).

MARKWARDT (1966) observou que o veneno da cascavel sul-americana Crotalus durissus terrificus contém uma proteína de elevado peso molecular que é capaz de liberar aminas biogênicas de plaquetas sanguíneas, tanto de preparações isoladas, quanto na corrente sanguínea causando hipotensão.

Similarmente, VITAL BRAZIL et al. (1966) e VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI (1968) verificaram que o efeito hipotensor secundário e a hemoconcentração produzidos quando da administração venosa da peçonha crotálica em cães eram causados por alguma fração desprovida de atividade fosfolipásica, fração esta denominada pelos autores de "deltatoxina". Esta toxina, através da liberação de histamina promoveria os referidos efeitos. A "deltatoxina" e a "convulxina" (PRADO-FRANCESCHI, 1970; PRADO-FRANCESCHI et al. 1981) estão presentes na fração I deste veneno (VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI, 1968) e correspondem provavelmente ao fator liberador de aminas de MARKWARDT (PRADO-FRANCESCHI, comunicação pessoal).

A crotamina, um polipeptídeo miotóxico básico purificado do veneno da cascavel Crotalus durissus terrificus de certas regiões da América do Sul (VITAL BRAZIL, 1972) é também capaz de liberar histamina de mastócitos do fluido peritoneal de ratos (ROTHSCHILD, 1966). Porém, esta atividade é marcadamente menor do que aquela apresentada pelo veneno bruto e incapaz de explicar os efeitos observados no envenenamento. Além disso, como venenos de algumas cascavéis desprovidas de crotamina, como p. ex. o de

Crotalus durissus cascavella, são também potentes liberadores de histamina, têm-se buscado outros fatores como responsáveis por tal liberação.

DAMERAU et al. (1975) observaram que o fator liberador de histamina e degranulador de mastócitos do veneno da serpente Naja naja também está dissociado da fosfolipase A. Em perfusato de pulmão de cobaia e em suspensão de mastócito peritoneal de rato, a fosfolipase A produziu pouca degranulação de mastócito mostrando não haver liberação de histamina no primeiro sistema e uma liberação limitada no segundo. Ao contrário, o "fator lítico direto" (DLF), um polipeptídeo de natureza não-enzimática obtido deste veneno e tido como uma cardiotoxina, foi capaz de liberar histamina e degranular os mastócitos em ambos os sistemas estudados. A combinação da fosfolipase A com o DLF produziu um potente sinergismo em pulmões de cobaia sem, entretanto, alterar a resposta das células isoladas.

Do veneno de abelha já foram reconhecidos dois componentes capazes de atuar diretamente em mastócito causando liberação de histamina: a MELITINA e o "MCL -PEPTIDE". O primeiro representa cerca de 50% do veneno seco e atua diretamente na superfície do mastócito como um agente citolítico, liberando histamina de modo muito semelhante à própria lisolecitina (ROTHSCHILD, 1965). O segundo, que representa uma massa de 1 a 2% do veneno seco, exerce um mecanismo de ação altamente seletivo em mastócito com atividade comparável ao do composto 48/80; é de 10 a 100

vezes mais ativo que a Melitina. O "MCL-PEPTIDE" não é capaz de liberar serotonina de plaquetas de coelho ou hemoglobina de hemácias humanas, e na pressão arterial de ratos (0,5 mg/kg) causa severa depressão e extrema cianose (HABERMANN & BREITHAUPT, 1968). Este componente provavelmente representa o mesmo fator isolado por FREDHOLM (1966) e denominado FII.

Quanto à peçonha de serpentes botrópicas, as informações existentes são bem mais escassas. Ao contrário do início do século, quando proliferaram os trabalhos de VITAL BRAZIL e seu grupo (de 1901 a 1930) que focalizaram os venenos botrópicos de forma geral, em nossos dias temos trabalhos relacionados principalmente a aspectos isolados: atividade enzimática (VIDAL & STOPPANI, 1971 ; NISENBOM et al, 1986), hemorrágica (MANDELBAUM et al 1984 ) e/ou coagulante (KELEN et al, 1978; NAHAS et al, 1983).

Recentemente, RODRIGUES-SIMIONI et al. ( 1983 ) realizaram um estudo pioneiro sobre as ações farmacológicas do veneno bruto de B.jararacussu e seus componentes tóxicos. Observaram que o pool IV obtido do veneno total cromatografado em Sephadex G-75 e G-50 representa aquele de maior massa e atividade, sendo responsável por ações neuro e citotóxicas semelhantes às do veneno bruto. Verificaram ainda que esta fração (PM = 13.000 daltons) é seis vezes mais ativa do que o veneno bruto na produção do bloqueio da transmissão neuromuscular, apresentando efeito hemolítico indireto, cálcio-dependente e ausência de atividade proteolítica. A recromatografia desta fração (BRANDEBURGO et al. 1986) resultou em cinco componentes ,

dos quais o último, denominado Bothropstoxina, representa o de maior massa (40% da fração original) e é completamente desprovido de atividade fosfolipásica. A Bothropstoxina, tida pelos autores como cardiotoxina-símile, apresenta uma banda em eletroforese em gel de poliacrilamida, serina como aminoácido N-terminal e peso molecular aparente de 12.400. Com relação às atividades farmacológicas estudadas, esta toxina mantém a atividade bloqueadora da junção neuromuscular e ausência de atividade hemolítica (RODRIGUES-SIMIONI, comunicação pessoal). Entretanto, ao contrário dos estudos realizados com o DLF, a atividade liberadora de histamina da Bothropstoxina ainda não foi satisfatoriamente abordada (RODRIGUES-SIMIONI et al, 1985).

O veneno da Bothrops alternatus (urutu) fracionado em Sephadex G-75 deu origem a três pools ( $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ ) que apresentam respectivamente peso molecular em torno de 70 a 85 mil, 40 a 60 mil e 20 a 25 mil (NOVELLO et al., 1984). Desses, o mais potente liberador de histamina foi aquele de alto peso molecular (ANTUNES et al. 1984). Este componente, embora desprovido de atividade fosfolipásica, encontra-se contaminado com fatores hemorrágico, coagulante e hemolítico.

Assim, apesar de vários estudos realizados com venenos ofídicos, a liberação de histamina que acompanha os envenenamentos apresenta ainda aspectos de difícil interpretação. Embora as neurotoxinas e/ou cardiotoxinas - sejam os principais componentes responsáveis pelo quadro



tóxico do envenenamento, o choque que frequentemente está presente na sintomatologia do acidente ofídico, mas não no envenenamento experimental por essas toxinas, requer um estudo sistemático mais pormenorizado.

EFRATI (1966) descreveu em algumas vítimas da Vipera palestinae efeitos muito semelhantes aos do verdadeiro choque anafilático (ROCHA & SILVA, 1966) que são provavelmente devidos a uma liberação generalizada de histamina. Entre estes, constavam distúrbios gastrointestinais (náusea, dor abdominal, diarreia), choque periférico e angioneurótico, edema dos lábios, língua e cérebro.

Apesar disso, independente do grau de importância que a liberação de histamina possa assumir na vítima acidentada, até o momento não existem testes para detectar se os soros antiofídicos existentes são capazes de neutralizar os componentes liberadores de aminas presentes nos venenos ofídicos. Também não está sendo verificada a correlação porventura existente entre a letalidade e os efeitos locais tais como o hemorrágico, mionecrótico e edematizante, pois nos laboratórios de controle dos antivenenos a única prova que se emprega de rotina, relacionada com a capacidade antitóxica do soro, é o teste de neutralização da peçonha que é realizado em animais de laboratório.

Situação diferente ocorre nos laboratórios de pesquisa. VITAL BRAZIL (1959) procurou verificar a neutralização da atividade espasmogênica presente na peçonha

de Crotalus terrificus terrificus tipo 1\* não são pelos soros comercializados como também pelos soros produzidos pela inoculação de animais com peçonha de tipo 1 e tipo 2\*. ROSENFELD & KELEN (1966) analisaram in vitro o poder neutralizante de soros antivenenos sobre a atividade coagulante de diversos venenos ofídicos. GUTIÉRREZ et al. (1981) observaram em camundongos inoculados com o veneno de Bothrops asper e o antiveneno polivalente, a neutralização dos efeitos mionecrótico, hemorrágico, edematizante bem como do efeito letal.

A neutralização da atividade liberadora de histamina pelos soros comercializados está sendo estudada agora, pela primeira vez. Com estes estudos pretendemos contribuir para a compreensão da participação deste auto-cóide no choque presente no envenenamento ofídico.

---

\* A Crotalus terrificus terrificus tipo 1 corresponde atualmente à Crotalus durissus terrificus crotamina-positivo; o tipo 2 refere-se a peçonha crotamina-negativo.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo determi  
nar a potência liberadora de histamina das peçonhas de  
Crotalus durissus terrificus, Crotalus durissus cascavella ,  
Bothrops jararacussu e Bothrops alternatus e verificar a  
capacidade neutralizante dos soros Anticrotálico, Antibotrô  
pico e Polivalente sobre a atividade liberadora de histami  
na induzida pelas peçonhas acima citadas.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. ANIMAIS

Os ratos "Wistar" e os camundongos "Swiss" foram fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. As cobaias foram adquiridas de fornecedor particular ou cedidas pela Rhodia Ind. Química, Paulínia (SP).

## 2.2. PEÇONHAS

As peçonhas utilizadas, de diversas procedências, foram obtidas de serpentes das seguintes localidades:

Crotalus durissus terrificus - Lavras (MG);

Crotalus durissus cascavella - São Luis (MA);

Bothrops jararacussu (jararacuçu) - Alcobaça (BA) e Estado do Espírito Santo;

Bothrops alternatus (urutu) - Furnas (MG);

Crotamina - gentilmente cedida pelo Prof.Dr.José Roberto Giglio do Departamento de Bioquímica da FMRP, USP.

A qualidade do veneno dessecado e da crotamina foi avaliada pela determinação de suas doses letais 50%.

### 2.3. SOROS ANTIPEÇONHENTOS OFÍDICOS

Os soros Anticrotálico (contra a picada de ser pentes do gênero *Crotalus* - cascavéis), Antibotrópico (con tra a picada de serpentes do gênero *Bothrops*-jararacuçu , jararaca, cotiara, urutu e outros) e Polivalente (contra a picada de serpentes de ambos os gêneros) empregado nos expe rimentos foram do tipo comercial produzidos pelo Instituto Butantan, São Paulo (SP). Estes representam uma solução purificada de imunoglobulinas específicas obtidas de equi<sup>í</sup> deos hiperimunizados contra venenos das serpentes em ques tão.

### 2.4. DROGAS E REAGENTES

Merck, Darmstadt, Germany - Ácido clorídrico (PA), bicarbonato de sódio , cloreto de cálcio , cloreto de magnésio , cloreto de potássio , cloreto de sódio , glicose, hidróxido de sódio e sulfato de magnésio.

Baker Analyzed Reagent, São Paulo, Brasil - Fosfato dibásico de sódio e fosfato monobásico de sódio.

Kochlight Laboratories, England - Cloridrato de histamina.

C.H.Boehringer Sohn, Darmstadt, Germany - Sulfato de atropina .

Sigma, St.Louis, U.S.A. - 48/80.

## 2.5. TOXICIDADE DAS PEÇONHAS

As doses letais 50% dos venenos de C. d. terrificus, C.d. cascavella, B. jararacussu, B. alternatus e da crotamina foram determinadas por inoculação, i.v., em camundongos (18 a 22g) empregando-se doses seriadas com razão de 1,5; cada uma dessas doses foi injetada em seis animais. Os resultados foram registrados depois de 24 h e estimados de acordo com o método de WEIL (1952). As DL50 e seus intervalos de confiança a 95% foram expressos em µg/camundongo de 20g.

## 2.6. TITULAÇÃO DOS SOROS

### 2.6.1. REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO

A 0,2 ml dos soros Anticrotálico, Antibotrôpico ou Polivalente acrescentou-se a peçonha (diluída em soro fisiológico 120 mM) em diferentes concentrações. O volume das misturas foi completado para 1,5 ml com soro fisiológico e os tubos foram imersos em banho-maria a 50°C em até 1/3 da coluna líquida. O parâmetro observado foi a ordem em que a floculação apareceu nos diferentes tubos. As observações estenderam-se por 24 h (segundo VITAL BRAZIL, 1959).



### 2.6.2. INJEÇÃO VENOSA EM CAMUNDONGOS

A 0,2 ml dos soros Anticrotálico, Antibotrópico ou Polivalente acrescentou-se a peçonha (diluída em soro fisiológico 120 mM) em diferentes concentrações. O volume das misturas foi completado para 1,0 ml com soro fisiológico. Após 24 h à temperatura ambiente as misturas foram centrifugadas e 0,5 ml do sobrenadante foram injetados em camundongos de  $20 \pm 2$  g. A verificação das mortes e sobrevividas foi feita decorridos 24 h da injeção da mistura soro-peçonha. (Segundo VITAL BRAZIL, 1959).

### 2.7. OBTENÇÃO E TRATAMENTO DO LAVADO PERITONEAL DE RATOS

#### 2.7.1. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO KREBS-RINGER

NaCl - 154 mM

KCL - 6,2 mM

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O - 2,8 mM

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 1,5 mM

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> - 5,0 mM

Tampão fosfato (pH 7,4) - 0,01 M

#### 2.7.2. PROCEDIMENTO

Em cada experimento utilizaram-se de 4 a 5 ratos de ambos os sexos pesando de 180 a 300 g. Os ratos, após anestesia com éter, foram mortos através de secção ampla

dos vasos cervicais e colocados em decúbito dorsal. Com o auxílio de instrumental cirúrgico retirou-se uma tira longitudinal da pele da parede abdominal. A seguir, foram injetados 10 ml de tampão Krebs-Ringer. Massageou-se o abdômem cerca de 90 seg a fim de que o líquido se espalhasse uniformemente por toda a cavidade. O lavado foi então colhido por meio de uma incisão longitudinal mediana usando-se pipeta semi-automática. O total de líquido retirado (cerca de 8 ml) foi então centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 1,0 ml de tampão. Desse material contendo mastócitos, retirou-se 0,05 ml para coloração e contagem. A coloração foi feita com azul de toluidina 0,1% e a contagem em câmara de Neubauer.

### 2.7.3. INDUÇÃO DA LIBERAÇÃO DE HISTAMINA

A suspensão de células, como obtidas no item anterior, foi distribuída em tubos com a seguinte sequência de incubação:

- 1º) Solução Krebs-Ringer (0,25 a 0,5 ml);
- 2º) Suspensão de mastócitos (0,5 ml);
- 3º) Soros Anticrotálico, Antibotrópico ou Polivalente (10 a 40 uI), quando o protocolo exigia;
- 4º) Veneno em estudo (0,1 ou 0,2 ml).

Para cada experiência foram preparados 3 tubos controle. Um deles determinava a liberação espontânea de

histamina. Outro tubo determinava a liberação de histamina induzida somente pelos soros e finalmente, um terceiro determinava a liberação de histamina induzida pelo veneno em estudo. Ocasionalmente, empregou-se também o composto 48/80 como um controle do experimento. Em todos os casos, o volume de cada tubo fez 1,0 ml.

O conteúdo dos diferentes tubos passou por um período de tratamento que compreendeu banho-maria a 37°C durante 10 minutos em presença do soro, seguido por uma incubação (15 min, 37°C) em presença do veneno. A seguir, foram novamente centrifugados a 1000 rpm durante 10 minutos, para separar as células peritoneais e fragmentos do mesentério do sobrenadante que continha a substância liberada. Acrescentou-se HCl 0,1 N (1,0 ml) ao resíduo e HCl 1,0 N (0,2 ml) ao sobrenadante, e submeteram-se os tubos a aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 minutos. O material resultante foi guardado em geladeira para subsequente dosagem de histamina. (Segundo ROTHCHILD, 1965).

#### 2.7.4. DOSAGEM DA HISTAMINA LIBERADA

A neutralização dos tubos acima foi feita com NaOH 1,0 N e os volumes foram completados para 4,0 ml. A dosagem de histamina foi realizada em íleo atropinizado de cobaia segundo ensaio biológico a três pontos (PERRY, 1968). A dosagem foi feita usando-se tanto o resíduo quanto o sobrenadante, sendo a porcentagem de

histamina liberada calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ de histamina liberada} = \frac{\text{resíduo}}{\text{resíduo} + \text{sobrenadante}} \times 100$$

Os dados foram lançados em gráfico como % de histamina liberada usando-se valores corrigidos da liberação espontânea.

## 2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados finais foram expressos como  $\bar{x} \pm$  erro padrão das médias. A significância dos dados foi testada mediante utilização do teste "t" de Student a nível de  $p < 0,05$ . (Segundo SPIEGEL, 1971).

### III - RESULTADOS

### 3.1. TOXICIDADE DAS PEÇONHAS

A tabela 1 mostra o valor da DL50 ( $\mu\text{g}$  camundongo) para cada veneno estudado, usando-se a via endovenosa.

T A B E L A I

VALORES DE DL50 DOS VENENOS OFÍDICOS ESTUDADOS E  
SEUS LIMITES A NÍVEL DE 95%

	DL50 ( $\mu\text{g}$ /camundongo 20 g)
<u>C. d. terrificus</u>	3,58 (3,0 a 4,28)
<u>C. d. cascavella</u>	2,92 (2,42 a 3,32)
<u>B. jararacussu</u>	5,74 (4,4 a 7,48)
<u>B. alternatus</u>	26,2 (21,0 a 32,6)

### 3.2. TITULAÇÃO DOS SOROS ANTIOFÍDICOS

#### 3.2.1. REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO ("in vitro")

O exame da tabela 2 mostra que, empregando - se a reação de floculação, 0,2 ml do soro Antibotrópico neutralizam 500 µg das peçonhas de B.jararacussu e B.alternatus. Com a utilização do soro Anticrotálico, nota-se que para cada 0,2 ml deste anti-soro houve uma neutralização de 300 µg das peçonhas de C.d.terrificus e C.d. cascavella. Finalmente, com o emprego do soro Polivalente (0,2 ml), observa-se que o veneno de B.jararacussu foi o mais eficazmente neutralizado por este anti-soro, floculando primeiramente a mistura que continha 1000 µg deste veneno. Para as peçonhas de C. d. terrificus, C. d. cascavella e B. alternatus, a neutralização situou-se entre 200 e 300 µg.

T A B E L A II

**TITULAÇÃO DOS DIVERSOS ANTI-SOROS PELA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO.  
DOSE DE PEÇONHA (µg) NECESSÁRIA PARA PROMOVER A FLOCULAÇÃO\*  
COM 0,2 ML DO SORO ANTIOFÍDICO**

	S.A.B.	S.A.C.	S.P.
<u>B.jararacussu</u>	500	-**	1000
<u>B. alternatus</u>	500	-**	300
<u>C.d.terrificus</u>	-**	300	200
<u>C.d.cascavella</u>	-**	300	300

\* A dose registrada refere-se à primeira mistura em que ocorre a reação (ver item 2.6.1).

\*\* Indica ausência de floculação.

S.A.B. - soro antibotrópico

S.A.C. - soro anticrotálico

S.P. - soro polivalente

### 3.2.2. INJEÇÃO VENOSA DA MISTURA SORO-PEÇONHA EM CAMUNDONGOS ("in vivo")

Os resultados da titulação do soro Anticrotálico, Antibotrópico e Polivalente com os venenos de C. d. terrificus, C. d. cascavella, B. jararacussu e B. alternatus, através da injeção venosa da mistura soro-peçonha em camundongos, estão expressos na tabela 3.

Esta tabela mostra que 0,2 ml do soro Antibotrópico neutralizaram até 500 µg das peçonhas de B. jararacussu e B. alternatus que correspondem respectivamente a 87 e a 19 DL50 de cada veneno. Este soro foi também capaz de neutralizar as peçonhas de C. d. terrificus e C. d. cascavella em até 25 µg (6,9 DL50) e 35 µg (12 DL50), respectivamente. Com o soro Anticrotálico, houve uma neutralização da ordem de 250 µg (69 DL50) e 400 µg (137 DL50) para os venenos de C. d. terrificus e C. d. cascavella. Além disso, este soro exibiu uma certa capacidade de neutralizar a peçonha de B. jararacussu, protegendo os animais de doses equivalentes a 200 µg (35 DL50). Com relação ao soro Polivalente, nota-se que este proporcionou uma proteção maior aos animais injetados com o veneno de B. jararacussu e C. d. cascavella, neutralizando-os na ordem de 500 e 250 µg que correspondem a 87 e 86 DL50 respectivamente.



T A B E L A    III

TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITÓXICA DOS ANTI-SOROS POR INJEÇÃO VENOSA EM CAMUNDONGOS. DOSE DE PEÇONHA (µg) QUE EM MISTURA COM O SORO ANTIOFÍDICO, PERMITIU A SOBREVIVÊNCIA DE 100% DOS CAMUNDONGOS E SUA CORRESPONDÊNCIA EM NÚMERO DE DL50 NEUTRALIZADA

	S.A.B.		S.A.C.		S.P.	
	Dose de peçonha (µg)	Nº de DL50	Dose de peçonha (µg)	Nº de DL50	Dose de peçonha (µg)	Nº de DL50
<u>B. jararacussu</u>	500	87	200	35	500	87
<u>B. alternatus</u>	500	19	50	1,9	250	9,5
<u>C. d. terrificus</u>	25	6,9	250	69	250	69
<u>C. d. cascavella</u>	35	12	400	137	250	86

n = 6

S.A.B. - soro Antibotrópico

S.A.C. - soro Anticrotálico

S.P. - soro Polivalente

### 3.2.3. CORRELAÇÃO "IN VITRO/IN VIVO"

A tabela 4 sumariza os resultados obtidos com soros Anticrotálico, Antibotrópico e Polivalente e mostra a correlação "in vitro/in vivo" para cada peçonha empregada.

Com o soro Antibotrópico, podemos verificar que o valor da correlação "in vitro/in vivo" foi de 1,0 para as peçonhas de B. jararacussu e B. alternatus. Para o soro Anticrotálico, esta correlação mostrou, respectivamente, valores de 0,83 e 0,75 para as peçonhas de C.d. terrificus e C.d. cascavella. Finalmente, com o uso do soro Polivalente a correlação "in vivo/in vitro" apresentou valores de 0,5 para a peçonha de B. jararacussu, 0,80 para a de C.d. terrificus e 0,83 para as peçonhas de C.d. cascavella e B. alternatus.

T A B E L A IV

VALORES DAS CORRELAÇÕES "IN VITRO/IN VIVO" OBTIDOS A PARTIR DOS TESTES DE TITULAÇÃO\*

	S.A.B.	S.P.	S.A.C.
<u>C.d. terrificus</u>	-**	0,80	0,83
<u>C.d. cascavella</u>	-**	0,83	0,75
<u>B. jararacussu</u>	1,0	0,50	-**
<u>B. alternatus</u>	1,0	0,83	-**

\* A correlação "in vitro/in vivo" foi calculada dividindo-se o valor da neutralização obtida no teste "in vitro" (reação de floculação) pelo valor obtido naquele "in vivo" (injeção em camundongos) para cada anti-soro e peçonha.

\*\* Indica que nestes casos, a correlação não foi efetuada porque a reação de floculação estava ausente.

S.A.B. - soro Antibotrópico

S.A.C. - soro Anticrotálico

S.P. - soro Polivalente

### 3.2.4. OUTRAS OBSERVAÇÕES

Os camundongos injetados com o veneno crotálico i.v. mostram sinais de intoxicação proporcionais ao tempo de observação e à dose administrada. O primeiro sinal a se manifestar é a apnéia que ocorre dentro de 20 segundos após a administração de doses próximas a 20 µg/animal 20 g. Dependendo da origem da peçonha a apnéia pode ser seguida de crises convulsivas intermitentes do tipo tônico-clônico que podem levar à morte. Os animais que sobrevivem podem, dentro de 10 a 20 minutos, mostrar convulsões típicas da giroxina. Após 30 minutos surge em todos os animais a sequência dos sinais característicos de curarização: queda da cabeça, perda do tônus da musculatura do trem anterior, paralisia do trem posterior e finalmente parada respiratória e morte. Com doses em torno de DL50 (3 µg/animal) observam-se apenas os sinais tardios que, ou levam à morte ou regridem na ordem inversa à sua implantação. Com doses superiores a 50 µg/animal, além dos sinais imediatos já descritos, se a peçonha for crotamina-positiva ocorre o fechamento dos músculos orbiculares e o aparecimento de crises intermitentes de paralisia espástica.

Quanto aos animais injetados com as peçonhas botrópicas, entre os sinais precoces predominam as hemorragias e a prostração; a apnéia e as convulsões, quando presentes, precediam a morte.

Os camundongos injetados com a mistura soro-peçonha não inteiramente neutralizados morriam num período

variável de 1 min a 24 h , dependendo da relação de concentração soro/peçonha administrado ao animal.

Quando era administrada a mistura que continha peçonha de C.d.terrificus e anti-soros Crotálico ou Poliva lente os camundongos morriam exibindo crises espasmódicas intermitentes acompanhadas de fechamento dos músculos orbiculares, efeitos estes característicos da crotamina. Estes foram mais intensos à medida em que a mistura continha uma dose maior de peçonha crotálica, mostrando pelos efeitos observados, que a crotamina presente na mistura não havia sido neutralizada.

Os camundongos injetados com a mistura de veneno crotálico e soro Antibotrópico morriam em crises características de crotamina e crotoxina (VITAL BRAZIL et al. 1966) , ou seja, apresentavam de imediato paralisia espástica, fechamento dos orbitales (crotamina) e morriam posteriormen te em paralisia flácida (crotoxina) caso se recuperassem da primeira crise determinada pela crotamina.

Os camundongos injetados com misturas que continham peçonha botrópica com quaisquer dos anti-soros utilizados morriam após exibirem os sinais já descritos.

### 3.3. OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SOBRE A LIBERAÇÃO DE HISTAMI NA DE MASTÓCITOS DE RATO

A suspensão de mastócitos empregada nos experimentos continha um número variável de 2 a 3 x 10<sup>5</sup> células/ml .

A liberação espontânea de histamina, ou seja, aquela que naturalmente ocorre na ausência de soro ou de peçonha mostrou um valor de  $4,0 \pm 0,34\%$  ( $n = 127$ ). Os experimentos cuja liberação espontânea de histamina apresentava valores acima de 10% foram desprezados.

A liberação de histamina induzida pelo 48/80, eventualmente determinada em cada experimento como um controle, revelou um valor de liberação igual a  $84,09 \pm 2,13\%$  para uma concentração de  $10,0 \mu\text{g/ml}$ .

### 3.4. LIBERAÇÃO DE HISTAMINA DE MASTÓCITOS DE RATO INDUZIDA PELOS VENENOS BRUTOS DE C. d. terrificus, C. d. cascavella, B. jararacussu e B. alternatus.

A figura 1 ilustra de modo comparativo as curvas dose-efeito de liberação de histamina induzida pelos venenos brutos de C.d.terrificus, C.d. cascavella, B.jararacussu e B.alternatus.

Vemos que as curvas de liberação de histamina referentes aos venenos de C.d.terrificus, C.d.cascavella e B. jararacussu mostram pontos que se superpõem ou se afastam um do outro para as mesmas concentrações. Ao contrário, a curva de liberação de histamina induzida pelo veneno de B.alternatus se encontra marcadamente deslocada para a direita em relação às outras três. Assim, o valor da DE50 deste veneno ( $11,50 \mu\text{g/ml}$ ) foi aproximadamente 6,0 vezes maior do que os valores da DE50 dos venenos de C.d. cascavella e B.jararacussu ( $1,72$  e  $1,97 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente) e 9,0 vezes maior do que o do veneno de C.d. terrificus ( $1,25 \mu\text{g/ml}$ ).

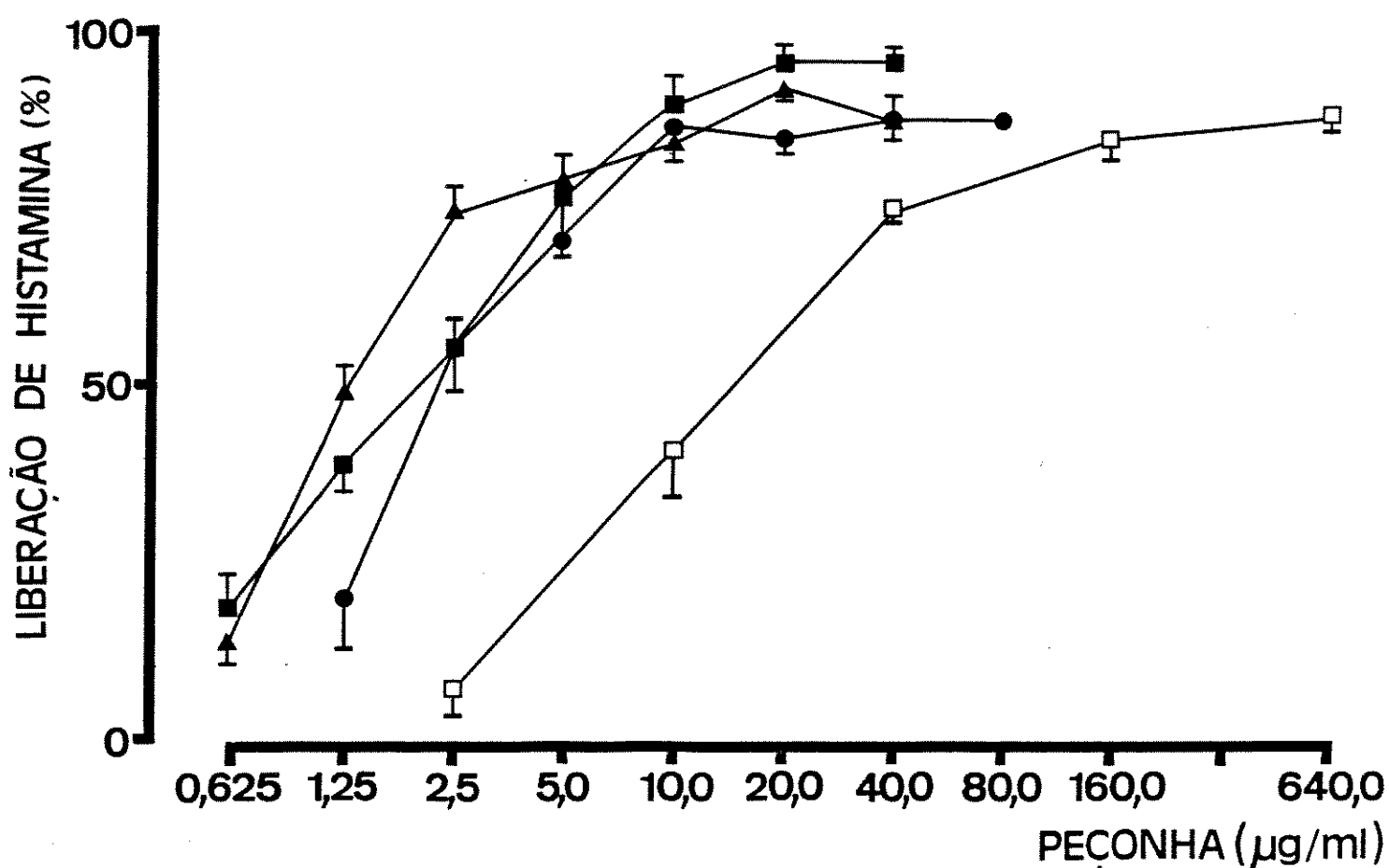


FIGURA 1 - CURVAS DOSE-EFEITO DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA INDUZIDAS PELOS DIFERENTES VENENOS OFÍDICOS. As células foram incubadas (15 min, 37°C) em presença da peçonha de C. d. terrificus (▲-▲), C.d.cascavella (■-■), B. jararacussu (●-●) ou B. alternatus (□-□). Os dados foram lançados em gráfico como % de histamina liberada usando-se valores corrigidos da liberação espontânea. As barras verticais representam o erro padrão das médias.  $n \geq 3$ .

A figura 1 revela ainda que os venenos de C.d.terrificus, C.d.cascavella e B. jararacussu determinam uma liberação superior a 10% com doses de 0,625 e 1,25 µg/ml e atingem a resposta maximal de liberação aos 10,0 µg/ml (82,75% 88,87% e 85,65%, respectivamente). Com relação ao veneno de B.alternatus, nessa mesma concentração (10,0 µg/ml), a liberação foi apenas de  $40,49 \pm 6,25\%$  atingindo-se a resposta maximal somente após concentrações de 160,0 µg/ml ( $83,86 \pm 2,92\%$ ) e 640,0 µg/ml ( $86,77 \pm 1,92\%$ ).

O exame da figura 1 informa também que na concentração de 1,25 µg/ml, o poder liberador de histamina apresentado pelo veneno de B.jararacussu é significativamente inferior ao dos venenos crotálicos correspondendo a 50% da liberação por eles evocada.

Em relação aos venenos crotálicos estudados, nota-se que as curvas de liberação de histamina de ambas as peçonhas não diferem muito entre si. Apenas na concentração de 2,5 µg/ml o valor de liberação de histamina do veneno de C.d.terrificus ( $73,99 \pm 4,07\%$ ) é significativamente maior que o de C.d.cascavella ( $54,54 \pm 4,39\%$ ), com  $p < 0,02$ .

### 3.5. LIBERAÇÃO DE HISTAMINA INDUZIDA PELOS SOROS ANTIBOTRÓPICO, ANTICROTÁLICO E POLIVALENTE

A capacidade liberadora de histamina de mastócitos de rato induzida pelos soros Antibotrópico, Anticrotálico e Polivalente está ilustrado graficamente na figura 2.

O resultado revelou que a potência liberadora

de histamina dos três anti-soros é semelhante. Em todos os pontos da curva, ou seja, com volumes de anti-soro que variam de 10 a 400  $\mu$ l, a resposta liberadora de histamina destes soros não diferiram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). As curvas dose-efeito mostraram baixos valores percentuais de liberação com 10  $\mu$ l (aproximadamente 4%), aumentando gradativamente dos 25 aos 100  $\mu$ l (10 a 30%) e atingindo os valores maximais de liberação (aproximadamente 40%) com 200 e 400  $\mu$ l.

Em vista do teor de liberação de histamina induzido pelos próprios anti-soros, decidiu-se empregar volumes dos mesmos da ordem de 10 a 40  $\mu$ l, os quais produzem por si sô baixa liberação de histamina (4 a 20%) e que ao mesmo tempo seriam suficientes para neutralizar as concentrações de peçonhas escolhidas e padronizadas previamente.



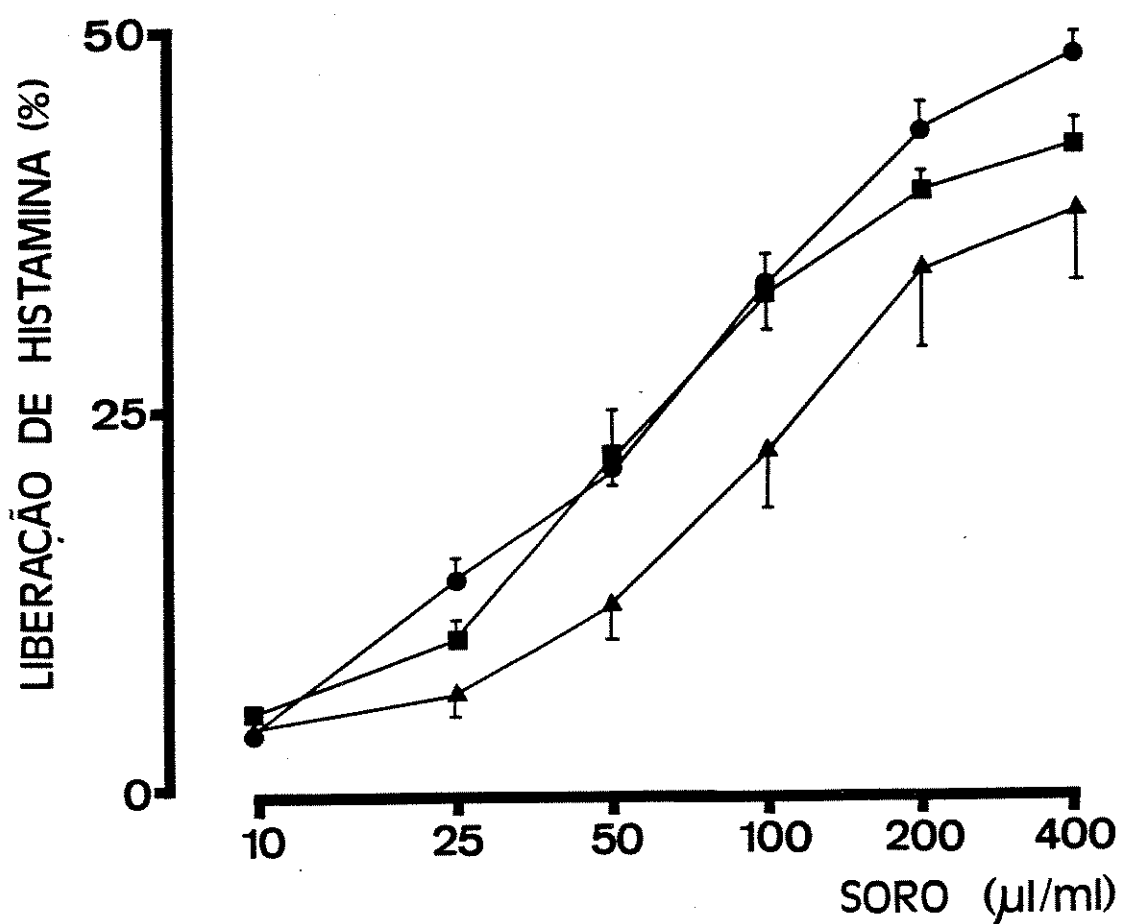


FIGURA 2 - CURVAS DOSE-EFEITO DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA INDUZIDA PELOS DIFERENTES ANTI-SOROS. As células foram incubadas (10 min, 37°C) em presença dos anti-soros Botrômico (■—■), Crotálico (●—●), ou Polivalente (▲—▲). Os dados foram lançados em gráfico como % de histamina liberada usando-se valores corrigidos da liberação espontânea. As barras verticais representam o erro padrão das médias.  $n = 3$ .

### 3.6. EFEITO DOS SOROS ANTICROTÁLICO, ANTIBOTRÓPICO E POLI VALENTE SOBRE A ATIVIDADE LIBERADORA DE HISTAMINA DE MASTÓCITOS DE RATOS.

#### 3.6.1. Crotalus durissus terrificus

A figura 3 ilustra a curva de liberação de histamina induzida pelo veneno de C.d.terrificus em presença dos soros Anticrotálico, Antibotrópico ou Polivalente.

Os soros Anticrotálico ou Polivalente foram incubados em quantidade suficiente para neutralizar 20 µg/ml deste veneno. Tais quantidades de soro foram padronizadas segundo resultado obtido no teste de titulação "in vivo". O soro Antibotrópico foi incubado em quantidade suficiente para neutralizar apenas 2,0 µg deste veneno.

O exame da figura 3 mostra que em concentração igual ou menor que 20 µg/ml (valores incluídos na faixa de neutralização) e em concentração de 40 µg/ml (fora da faixa de neutralização), os anti-soros Crotálico, Botrópico e Polivalente exerceram um significativo efeito neutralizante da atividade liberadora de histamina em relação aos valores controles. A resposta liberadora de histamina, nessas condições, assumiu valores mínimos independentes da dose. Com 40 µg/ml do veneno houve uma tendência de retorno aos valores controles de liberação ( $86,43 \pm 4,42\%$ ), principalmente na curva referente ao soro Polivalente ( $62,50 \pm 4,09\%$ ,  $p < 0,01$ ). Nessa mesma concentração,

os pontos referentes aos soros Anticrotálico e Antibotrôpico mostraram, respectivamente, valores de liberação iguais a  $29,78 \pm 4,21\%$  e  $33,19 \pm 0,68\%$ , estatisticamente diferentes dos valores observados para o soro Polivalente ( $p < 0,01$ ) e veneno bruto ( $p < 0,001$ ).

Nas concentrações de veneno incluídas na faixa de neutralização, ou seja, dos 0,625 aos 20  $\mu\text{g/ml}$ , os valores percentuais de liberação de histamina em presença dos três anti-soros não diferiram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Apenas na dose de 1,25  $\mu\text{g/ml}$  o soro Antibotrôpico mostrou, paradoxalmente, uma neutralização mais eficaz que aquela exercida pelo soro Anticrotálico, com valores de liberação iguais a  $1,68 \pm 1,68\%$  e  $15,93 \pm 2,71\%$ , respectivamente, com  $p < 0,02$ .

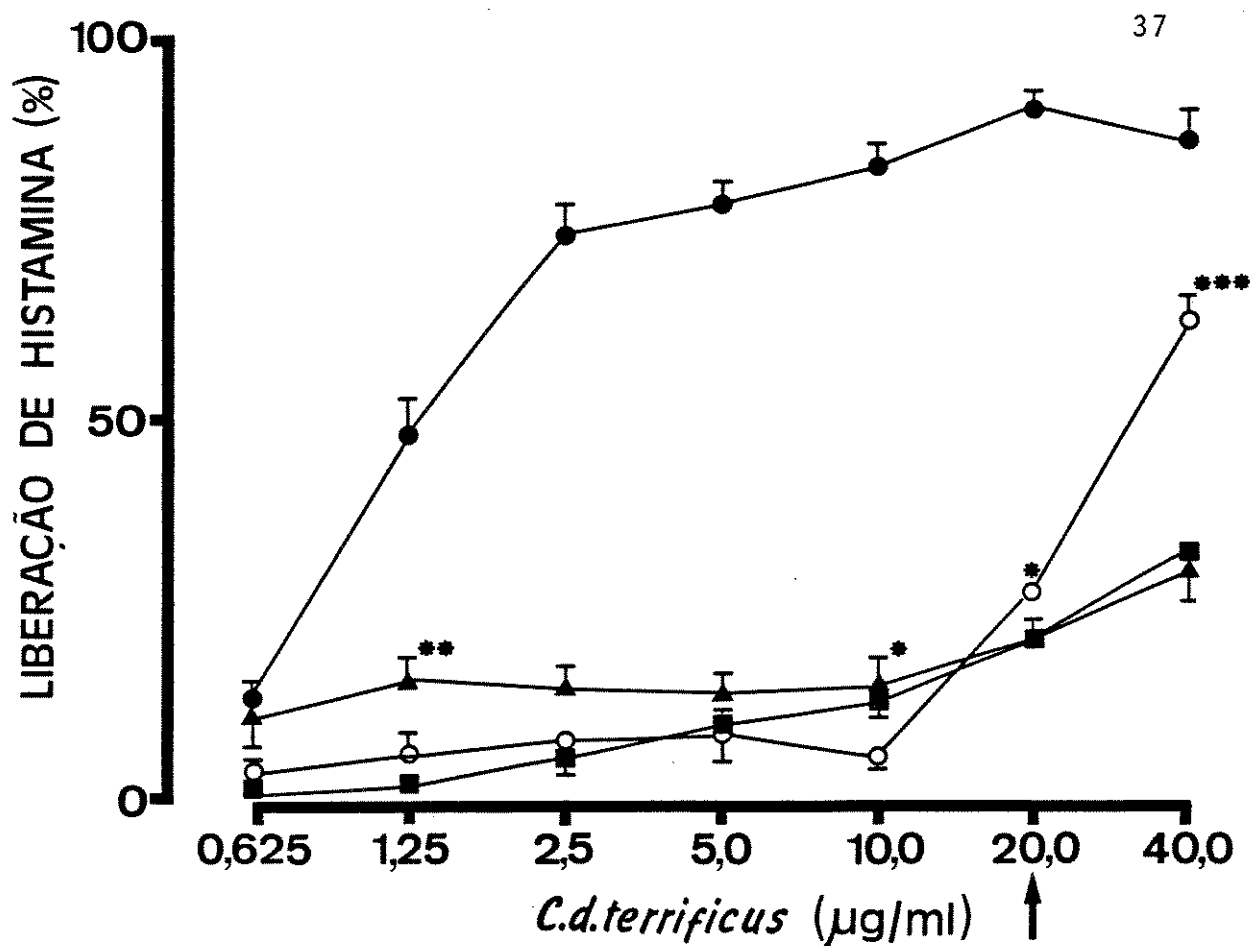


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO EFEITO NEUTRALIZANTE DOS ANTI-SOROS OFÍDICOS SOBRE A ATIVIDADE LIBERADORA DE HISTAMINA DO VENE-NO DE *C.d.terrificus*. As células foram incubadas (10 min. 37°C) com os anti-soros Crotálico (▲—▲), Botrópico (■—■) ou Polivalente (○—○), seguido por incubação (15 min. 37°C) com o veneno de *C.d.terrificus*. Os anti-soros Crotálico e Polivalente foram incubados em quantidades suficientes para neutralizar 20 µg/ml (indicado pela flecha) e o anti-soro Bo trópico foi incubado na mesma quantidade que os anteriores, porém capaz de neutralizar somente 2,0 µg/ml do veneno (se- gundo método de titulação "in vivo"). Os dados foram lança- dos em gráfico como % de histamina liberada corrigindo-se os valores de liberação determinados pelos anti-soros. As bar- ras verticais representam o erro padrão das médias. n = 3.

\* p < 0,05, em relação do soro polivalente  
 \*\* p < 0,02, em relação ao soro antitetrápico  
 \*\*\* p < 0,01, em relação aos soros antitetrápico e anticrotálico.

### 3.6.2. Crotalus durissus cascavella

Na figura 4 está representada graficamente a neutralização que os soros Anticrotálico, Antibotrópico e Polivalente exerceram sobre a atividade liberadora de histamina induzida pelo veneno de C.d.cascavella.

As observações feitas para o veneno de C.d.terrificus com relação à quantidade de soro Anticrotálico, soro Antibotrópico e soro Polivalente empregados nos experimentos são válidas também para este veneno. Assim, incubaram-se os mastócitos com uma quantidade de soro Anticrotálico ou Polivalente capazes de neutralizar até 20 µg/ml deste veneno, sendo o soro Antibotrópico incubado em quantidade capaz de neutralizar apenas 1,75 µg desta peçonha.

A análise da figura 4 mostra que em concentrações de veneno que variam de 1,25 a 20 µg/ml (incluídos na faixa de neutralização) a resposta liberadora de histamina é marcadamente menor que os valores controles (em 1,25 µg/ml:  $p < 0,01$  na presença do soro Anticrotálico e Polivalente e  $p < 0,02$  em relação ao soro Antibotrópico; de 2,5 a 20 µg/ml:  $p < 0,001$  para os três anti-soros).

Podemos observar ainda que as curvas de liberação de histamina referentes aos soros Anticrotálico e Polivalente são muito semelhantes e praticamente se superpõem de 1,25 a 10 µg/ml. A neutralização exercida pelo soro Antibotrópico também não diferiu significativamente dos outros dois em várias

das concentrações ensaiadas. Entretanto, em 2,5 e 5,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a neutralização exercida pelos soros Anticrotálico e Polivalente foi significativamente maior do que a do soro Antibotrópico, apresentando valores de liberação de histamina iguais a  $7,05 \pm 0,94\%$  e  $7,80 \pm 1,21\%$  em 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e  $9,82 \pm 2,19\%$  e  $9,22 \pm 1,72\%$  em 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente. Nessas concentrações, os valores de liberação de histamina referentes ao soro Antibotrópico foram respectivamente,  $19,22 \pm 2,20\%$  e  $20,30 \pm 3,35\%$  com  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ .

Em concentrações superiores a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a liberação de histamina tende a se aproximar do valor controle ( $95,04 \pm 2,55\%$ ), principalmente no ponto relacionado ao soro Antibotrópico, o qual exibiu uma liberação igual a  $57,10 \pm 7,06\%$ ,  $p < 0,01$ . Os soros Anticrotálico e Polivalente mostraram nessa concentração, respectivamente, uma neutralização cujos valores de liberação foram iguais a  $25,78 \pm 5\%$  e  $33,94 \pm 10,66\%$  ( $p < 0,001$  em relação ao controle). A neutralização exercida pelos soros Anticrotálico e Antibotrópico, nesse ponto, foi também significativamente diferente com  $p < 0,02$ .

### 3.6.3. Bothrops jararacussu

A figura 5 ilustra a liberação de histamina de mastócitos de rato induzida pelo veneno bruto de B. jararacussu em presença dos soros Antibotrópico, Anticrotálico e Polivalente. A quantidade de cada soro usada na incubação com o veneno foi padronizada para neutralizar 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  deste veneno, conforme resultados obtidos na titulação "in vivo".

É necessário ressaltar que o soro Anticrotálico, por a apresentar um elevado título em relação a este veneno (tabela 3), foi também empregado em quantidade suficiente para neutralizar os 10 µg/ml, sem induzir no entanto liberação de alto teor de histamina.

Podemos observar através da figura 5 que nas concentrações de 2,5, 5 e 10 µg/ml, os três anti-soros neutralizaram significativamente a liberação de histamina ( $p < 0,001$ ) em relação aos valores controles. Verificamos ainda que nessas concentrações, a resposta liberadora de histamina em presença dos anti-soros é do tipo dose - -resposta, ao contrário do que ocorreu com os venenos de C.d.terrificus e C.d.cascavella. Entretanto, os valores de liberação de histamina induzida por este veneno (em 2,5; 5 e 10 µg/ml) na presença dos soros Antibotrópico, Anticrotálico ou Polivalente não foram significativamente diferentes entre si a nível de  $p > 0,05$ . A partir de 10 µg/ml, ou seja, após as concentrações incluídas na faixa de neutralização, os valores de liberação de histamina referentes às curvas dos soros Antibotrópico e Polivalente se igualaram aos valores controles. Entretanto, a resposta liberadora de histamina referente à curva do soro Anticrotálico continuou revelando uma neutralização parcial, com valores de liberação iguais a  $49,50 \pm 5,04\%$  para 20 µg/ml;  $64,10 \pm 0,83\%$  para 40 µg/ml e  $66,08 \pm 0,41\%$  para 80 µg/ml. Nessas concentrações, os valores controles são, respectivamente,  $83,77 \pm 2,11\%$ ;  $87,29 \pm 3,20\%$  e  $87,27 \pm 1,07\%$ .

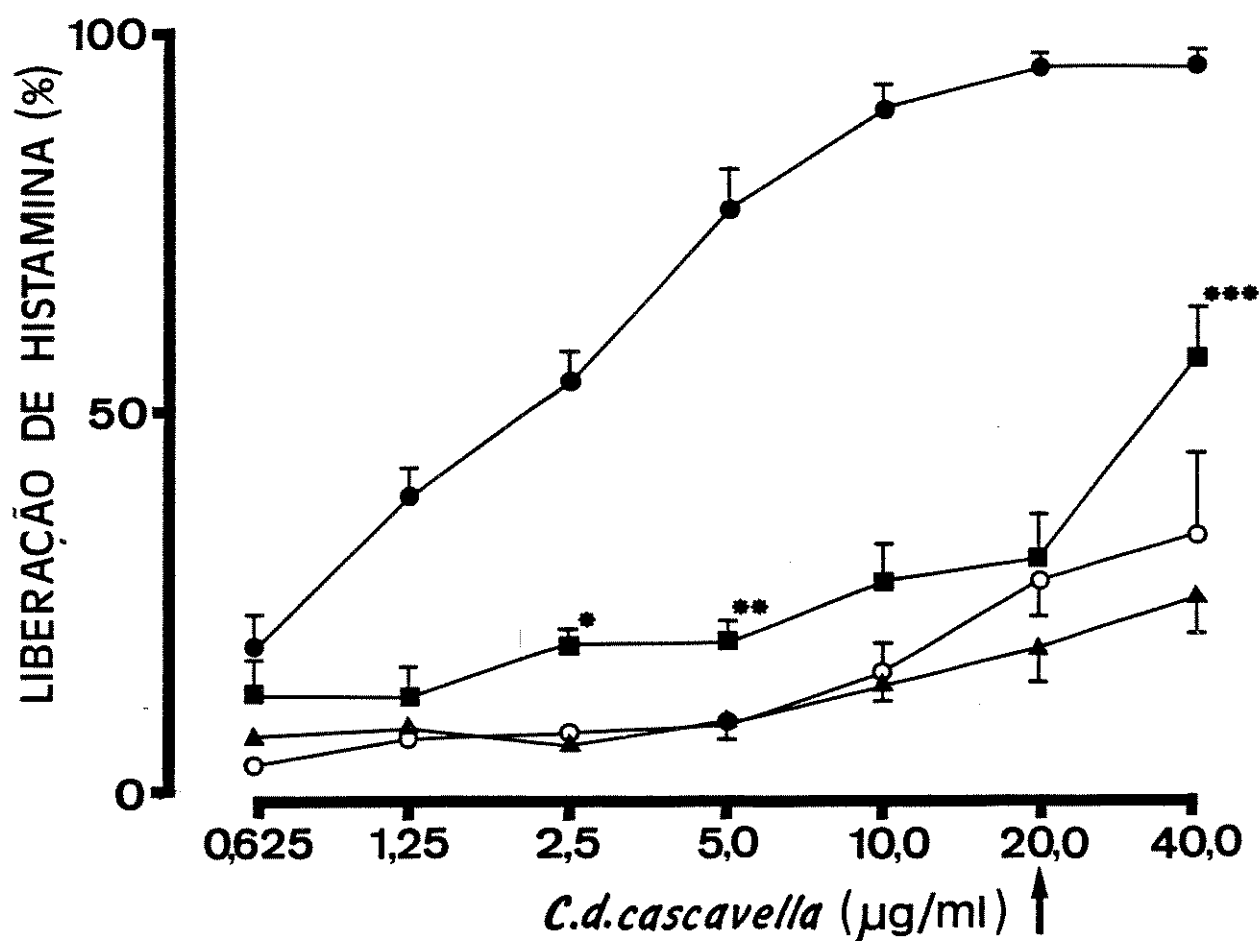


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO EFEITO NEUTRALIZANTE DOS ANTI-SOROS OFÍDICOS SOBRE A ATIVIDADE LIBERADORA DE HISTAMINA DO VENENO DE *C.d.cascavella*. As células foram incubadas (10 min, 37°C) com os anti-soros Crotálico (▲—▲), Botrópico (■—■) ou Polivalente (○—○), seguido por incubação (15 min, 37°C) com o veneno de *C.d.cascavella*. Os anti-soros Crotálico e Polivalente foram incubados em quantidade suficiente para neutralizar 20 µg/ml do veneno bruto (indicado pela flecha); o anti-soro Botrópico foi incubado na mesma quantidade que o anti-soro Crotálico, porém capaz de neutralizar somente 1,75 µg do veneno (segundo método de titulação "in vivo"). Os dados foram lançados em gráfico como % de histamina liberada corrigindo-se os valores de liberação determinados pelos anti-soros. As barras verticais representam o erro padrão das médias. n=3.

\*  $p < 0,01$ , em relação aos soros anticrotálico e polivalente

\*\*  $p < 0,05$ , em relação ao soro polivalente

\*\*\*  $p < 0,02$ , em relação ao soro anticrotálico.



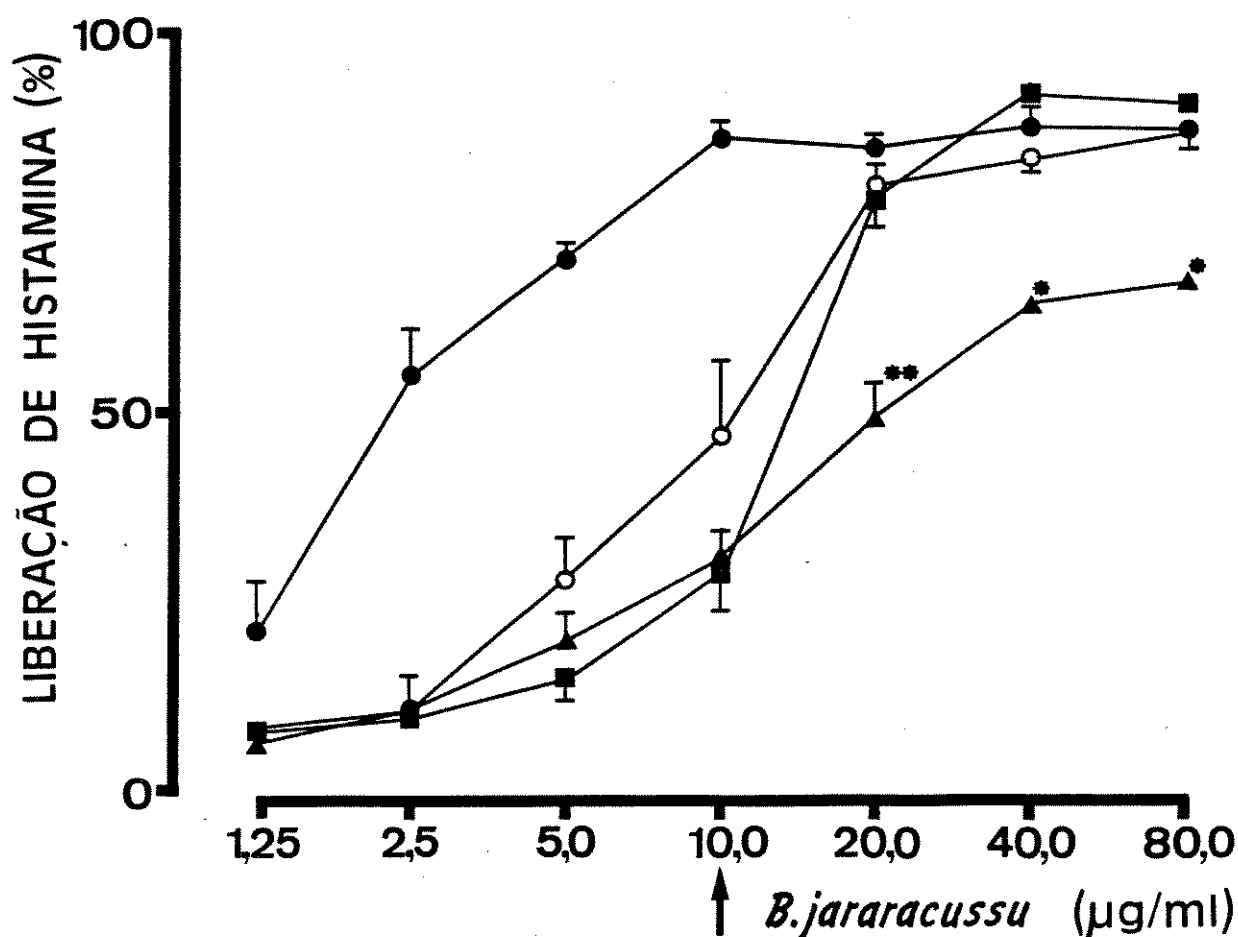


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO EFEITO NEUTRALIZANTE DOS ANTI-SOROS OFÍDICOS SOBRE A ATIVIDADE LIBERADORA DE HISTAMINA DO VENENO DE *B. jararacussu*. As células foram incubadas (10 min, 37°C) com os anti-soros Botrópico (■—■), Crotálico (▲—▲) ou Polivalente (○—○), seguido por incubação (15 min, 37°C) com o veneno de *B. jararacussu*. Todos os anti-soros foram incubados em quantidade suficiente para neutralizar 10 µg/ml do veneno bruto (indicado pela flecha), segundo método de titulação "in vivo". Os dados foram lançados em gráfico como % de histamina liberada corrigindo-se os valores de liberação determinados pelos anti-soros. As barras verticais representam o erro padrão das médias.  $n = 3$ .

\*  $p < 0,02$ , \*\*  $p < 0,001$ , em relação aos soros antiofídico e polivalente.

#### 3.6.4. Bothrops alternatus

Os efeitos neutralizantes dos soros Antibotr $\acute{o}$ pico, Anticrot $\acute{a}$ lico e Polivalente sobre a libera $\tilde{c}$ o de histamina de mast $\acute{o}$ citos de rato induzidos pelo veneno de B. alternatus est $\tilde{a}$ o representados na figura 6.

A quantidade dos soros Antibotr $\acute{o}$ pico e Polivalente utilizados na incubac $\tilde{a}$ o pr $\acute{e}$ via com o veneno foi padronizada para neutralizar 40  $\mu$ g/ml deste veneno, conforme m $\acute{e}$ todo de titulac $\tilde{a}$ o "in vivo". Quanto ao soro Anticrot $\acute{a}$ lico, o volume empregado foi suficiente para neutralizar apenas 5  $\mu$ g da pe $\tilde{c}$ onha.

A figura 6 mostra que os tr $\acute{e}s$  anti-soros, ao longo das concentra $\tilde{c}$ oes ensaiadas, reduziram marcadamente a resposta liberadora de histamina em rela $\tilde{c}$ ao aos valores controles. O soro Antibotr $\acute{o}$ pico mostrou neutraliza $\tilde{c}$ ao total de libera $\tilde{c}$ ao de histamina em 10 e 40  $\mu$ g/ml (concentra $\tilde{c}$ oes inclu $\tilde{i}$ das na faixa de neutraliza $\tilde{c}$ ao). Em 640  $\mu$ g/ml, o valor de libera $\tilde{c}$ ao de histamina ( $6,62 \pm 1,32\%$ ) tendeu a se aproximar daquele na aus $\tilde{e}$ ncia de soro ( $86,77 \pm 1,92\%$ ) significativamente diferentes a n $\acute{i}$ vel de  $p < 0,001$ .

Com rela $\tilde{c}$ ao aos soros Anticrot $\acute{a}$ lico e Polivalente podemos notar que apresentam curvas semelhantes de neutraliza $\tilde{c}$ ao. Em 10  $\mu$ g/ml do veneno ambos mostraram uma neutraliza $\tilde{c}$ ao total da libera $\tilde{c}$ ao de histamina. Com 40 e 160  $\mu$ g/ml, a neutraliza $\tilde{c}$ ao exercida por estes anti-soros - foi parcial e significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que aquela apresentada pelo soro Antibotr $\acute{o}$ pico. Al $\acute{e}$ m disso, o

soro Polivalente, em 640  $\mu\text{g/ml}$ , tendeu a manter uma neutralização estável com valor de liberação igual a 33,67  $\pm$  3,03%, valor este, significativamente maior que aquele apresentado pelo soro Antibotrópico (61,20  $\pm$  0,76%,  $p < 0,001$ ). Nessa concentração, a liberação de histamina em presença do soro Anticrotálico ocupou um valor intermediário igual a 54,07  $\pm$  8,70% não diferente ( $p > 0,05$ ) da daquele encontrado para os outros dois anti-soros.

### 3.7. LIBERAÇÃO DE HISTAMINA INDUZIDA PELA CROTAMINA

A figura 7 ilustra a curva dose-efeito de liberação de histamina de mastócitos de rato induzida pela crotamina, em comparação com a do veneno bruto de C.d.terrificus.

O exame da figura 7 revela que os valores percentuais de liberação de histamina exercida pela crotamina (28,27  $\pm$  6,72%, 42,09  $\pm$  10,97%; 69,39  $\pm$  4,63% ; 79,65  $\pm$  3,05% e 80,73  $\pm$  1,52% para 10, 20, 40, 80 e 160  $\mu\text{g/ml}$  desta toxina, respectivamente) são equivalentes ãqueles obtidos com o veneno bruto de C.d.terrificus, porém, em concentrações 16 vezes menores. Em outras palavras, a crotamina, que representa uma toxina purificada deste venenos, contribuiu com uma liberação de histamina aproximadamente 16 vezes menor do que aquela do veneno bruto.

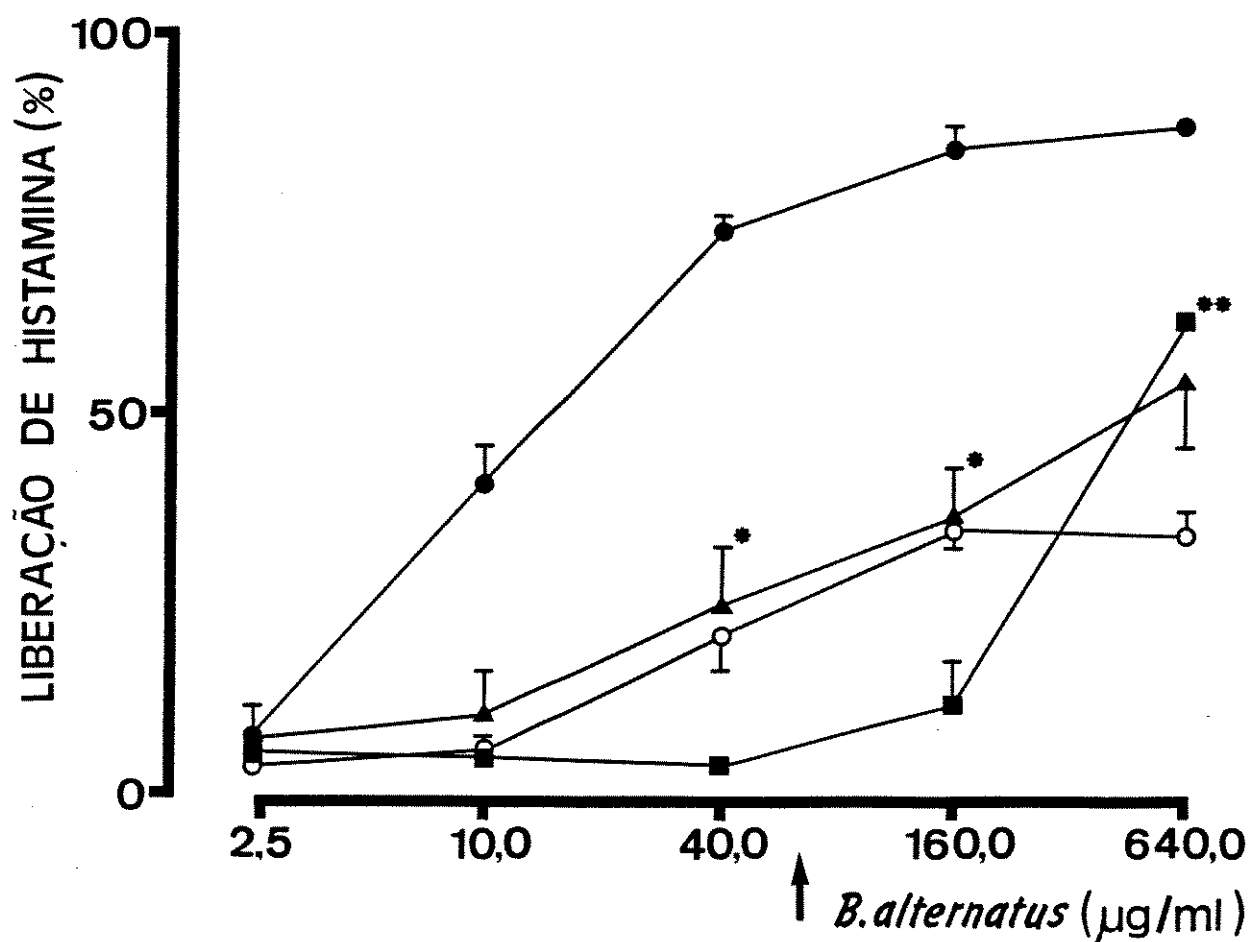


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO EFEITO NEUTRALIZANTE DOS ANTI-SOROS OFÍDICOS SOBRE A ATIVIDADE LIBERADORA DE HISTAMINA DO VENENO DE *B.alternatus*. As células foram incubadas (10 min, 37°C) com os anti-soros Botrôpico (■—■), Crotálico (▲—▲) ou Polivalente (○—○), seguido por incubação (15 min, 37°C) com o veneno de *B.alternatus*. Os anti-soros Botrôpico e Polivalente foram incubados em quantidade suficiente para neutralizar 50 µg/ml do veneno bruto (indicado pela flecha); o anti-soro Crotálico foi incubado na mesma quantidade que o anti-soro Botrôpico, porém capaz de neutralizar somente 5 µg/ml do veneno (segundo método de titulação "in vivo"). Os dados foram lançados em gráfico como % de histamina liberada, corrigindo-se os valores de liberação determinados pelos anti-soros. As barras verticais representam o erro padrão das médias. n = 3.

\* p < 0,05, em relação ao soro antibotrôpico

\*\* p < 0,001, em relação ao soro polivalente.

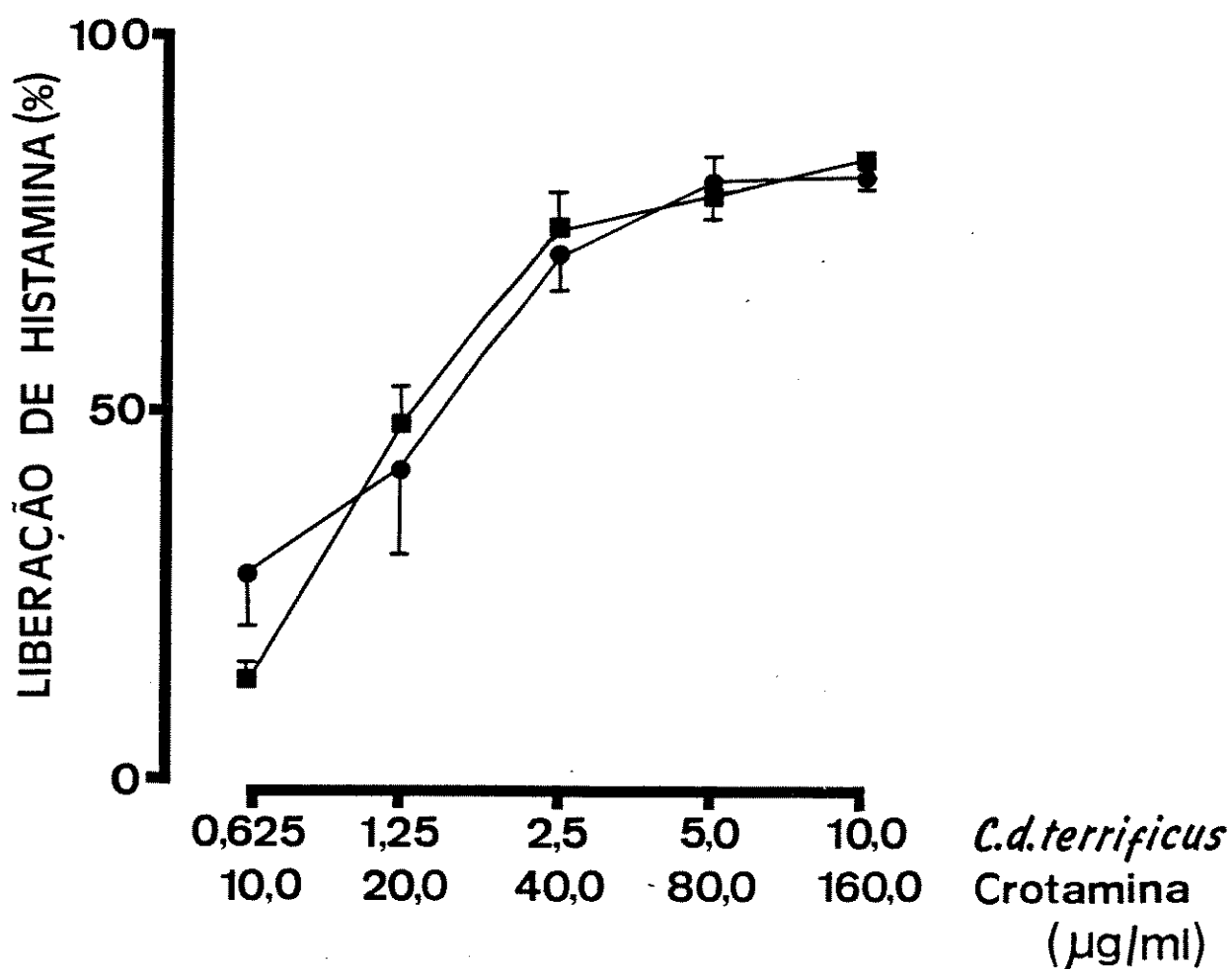


FIGURA 7 - CURVA DOSE-EFEITO DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA INDUZIDA PELA CROTAMINA. As células foram incubadas (15 min, 37°C) em presença da crotamina (●-●). Para comparação, também foi incluída a curva de liberação do veneno de *C.d.terrificus* (■-■), que já havia sido mostrada na figura 1. Os dados foram lançados em gráfico como % de histamina liberada usando-se valores corrigidos da liberação espontânea. As barras verticais representam o erro padrão das médias.  $n \geq 3$ .

### 3.8. EFEITO DOS SOROS ANTICROTÁLICO E POLIVALENTE SOBRE A LIBERAÇÃO DE HISTAMINA INDUZIDA PELA CROTAMINA

A verificação, em camundongos, da incapacidade do soro Anticrotálico em neutralizar a crotamina, levou-nos a investigar o efeito deste anti-soro, bem como o do Polivalente sobre a liberação de histamina induzida pela crotamina. A quantidade de cada soro colocada previamente a incubar foi igual àquela empregada para neutralizar os 20 µg/ml do veneno bruto de C.d.terrificus.

O resultado, expresso na figura 8, indicou que a resposta liberadora de histamina induzida pela crotamina não foi significativamente modificada na presença de quaisquer dos anti-soros empregados. Assim, os valores de liberação de histamina com 20 µg/ml na presença dos soros Anticrotálico e Polivalente, foram respectivamente, de  $44,22 \pm 1,63\%$  e  $35,11 \pm 5,40\%$ ; com 80 µg/ml, os valores foram de  $74,54 \pm 1,61\%$  e  $73,44 \pm 2,32\%$ . Tais resultados não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) dos valores controles, ou seja,  $44,68 \pm 6,12\%$  para 20 µg/ml e  $76,36 \pm 2,67\%$  para 80 µg/ml.

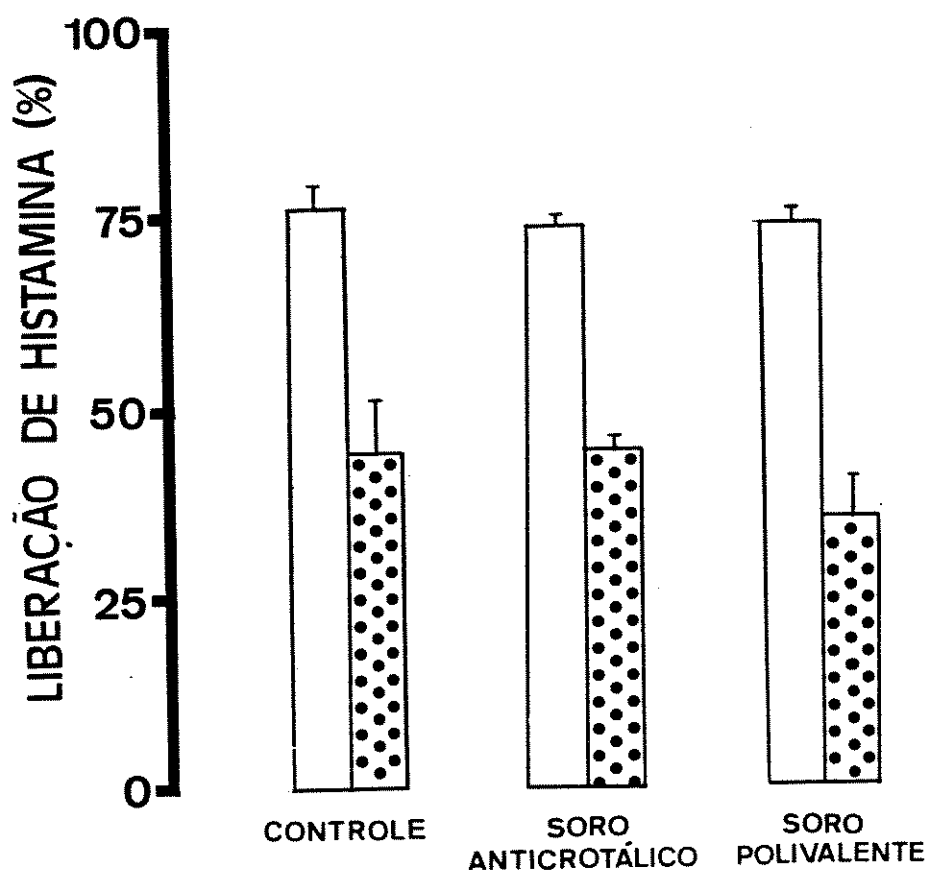


FIGURA 8 - EFEITO DOS ANTI-SOROS OFÍDICOS SOBRE A LIBERAÇÃO DE HISTAMINA INDUZIDA PELA CROTAMINA. As células foram incubadas (10 min, 37°C) com os anti-soros Crotálico ou Polivalente seguido por incubação (15 min, 37°C) com a crotamina nas doses de 80 µg/ml (1ª coluna) e 20 µg/ml (2ª coluna). Os anti-soros Crotálico e Polivalente foram incubados em quantidade suficiente para neutralizar 20 µg/ml do veneno bruto de C.d.terrificus. Os valores foram apresentados como % de histamina liberada corrigindo-se os valores de liberação determinados pelos anti-soros. As barras verticais representam o erro padrão das médias. n = 3.

#### IV - D I S C U S S Ã O



A titulação de soros antiofídicos através da reação de floculação e da injeção venosa da mistura soro - peçonha em camundongos já foi utilizada anteriormente por VITAL BRAZIL (1959) para venenos crotálicos do tipo 1 (espasmogênico) e do tipo 2 (não-espasmogênico) e anti-soros específicos contra estes. No presente trabalho encontramos valores de correlações in vitro/in vivo para os diversos anti-soros e venenos estudados em torno de 1.0 (soro Antibotrópico x veneno de B.jararacussu e B. alternatus) , 0.83 (soro Anticrotálico x veneno de C.d.terrificus; soro Polivalente x C.d.cascavella e B. alternatus), 0.80 (soro Polivalente x C.d.terrificus), 0.75 (soro Anticrotálico x C.d. cascavella) e 0.5 (soro Polivalente x B.jararacussu) .

Assim, a obtenção de altos valores de correlação em sua maioria nos mostra que há uma certa identidade - entre os dois métodos de titulação empregados.

Além disso, nossas observações de que os soros Anticrotálico e Polivalente comerciais produzidos pelo Instituto Butantan não são capazes de neutralizar a crota mina corroboram as observações iniciais de VITAL BRAZIL (1959). Este autor observou que os soros Anticrotálicos

comerciais estudados não foram capazes de neutralizar o fator espasmogênico (crotamina). Em ratos, a injeção de misturas de peçonha tipo 1 (crotamina-positiva) com excesso de soro anti-tipo 2 (crotamina-negativa) produzia contração espontânea do gastrocnêmio, aumento da amplitude de suas contrações e alongamento do período de relaxamento muscular; estes efeitos são comuns após a injeção da peçonha do tipo 1, não neutralizada pelo anti-soro. VITAL BRAZIL (1959) observou ainda que enquanto o soro obtido de cavalo hiperimunizado com a peçonha da cascavel tipo 1 era capaz de neutralizar pequenas doses espasmogênicas, aquele obtido com a peçonha de C.d.terrificus tipo 2 era incapaz de neutralizar o componente espasmogênico. Estes resultados sugeriram ao autor que apesar da crotamina ser fracamente antigênica, é capaz de dar lugar à formação de anticorpos capazes de a neutralizar,.

Nossa verificação de que o soro Antibotrópico comercial foi capaz de neutralizar as peçonhas de C.d.terrificus (0,125 mg/ml) e C.d. cascavella (0,175 mg/ml) e de que o soro Anticrotálico também foi capaz de neutralizar os venenos de B.jararacussu (1 mg/ml) e B. alternatus (0,25 ~~mg~~ mg/ml) (tabela 3), doses estas suficientemente letais em camundongos quando inoculadas na ausência destes soros, parece indicar a existência de elementos comuns em ambos os venenos. Ou seja, os venenos botróticos devem conter componentes que são reconhecidos e neutralizados pelo soro Anticrotálico da mesma forma, em menor grau, os venenos crotálicos devem conter componentes que são reconhecidos e neutralizados pelo soro Antibotrópico. Na

verdade, já no começo do século VITAL BRAZIL (1901 a,b 1903 ) imunizou cães e cabritos com peçonha de cascavel ou de jararaca e reconheceu, pela primeira vez, a especificidade - imunológica das peçonhas ofídicas. Porém, observou ainda, que enquanto o anti-soro proveniente do veneno de jararaca não neutralizava o veneno crotálico, o soro Anticrotálico dava pequena proteção contra o veneno da jararaca. Nossos resultados com o veneno de jararacuçu seguem a mesma linha, pois verificamos que o soro Anticrotálico mostrou-se capaz de neutralizar até 1 mg de veneno/ml permitindo, portanto, a sobrevivência de animais injetados com até 35 DL50 deste veneno. Completando esta observação, há que se ressaltar ainda que apesar das serpentes jararacuçu e urutu pertencerem ao mesmo gênero, os sinais e sintomas do envenenamento determinado pela B.jararacussu se aproximam mais do quadro de envenenamento crotálico do que do botrópico. De fato , os venenos crotálicos sul americanos, bem como o de B.jararacussu, exibem atividade neuromuscular da qual resulta um bloqueio da transmissão nervosa e paralisia muscular que leva o animal a morte em parada respiratória. No veneno crotálico, este efeito se dá por ação de seu principal componente, a crotoxina, que atua nas terminações nervosas motoras inibindo a liberação do neuro-transmissor - (ACh) pelos impulsos nervosos (VITAL BRAZIL & EXCELL, 1970). Já o veneno de B.jararacussu bloqueia a transmissão neuromuscular através de despolarização persistente a nível de nervo e músculo (RODRIGUES-SIMIONI et al. 1983), à semelhança das cardiotoxinas. Por outro lado, no caso da B.alternatus, o quadro típico de envenenamento é botrópico mostrando efeitos proeminentemente locais caracterizados

por hemorragia, edema e necrose (VITAL BRAZIL, 1982).

Apesar da potência de seus efeitos locais, o veneno de urutu apresenta uma atividade liberadora de histamina ( $DE_{50} = 11,5 \mu\text{g/ml}$ ) marcadamente inferior à dos venenos de C.d.terrificus, C.d.cascavella e B.jararacussu ( $DE_{50} = 1,25; 1,72$  e  $1,97 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente). Estes dados concordam com a observação de VITAL BRAZIL (1982) de que a histamina talvez não possa ser responsabilizada pelas perturbações cardiovasculares (hipotensão, choque) ou mesmo o edema local provocados pelos venenos botrópicos do tipo urutu. Por outro lado, o veneno de B.jararacussu exibe um efeito quantitativo muito semelhante aos próprios venenos crotálicos. Parece, portanto, que a atividade liberadora de histamina apresentada por este veneno representa uma característica a mais que o aproxima do veneno crotálico quanto às suas propriedades farmacológicas.

Em termos quantitativos, a potência liberadora de histamina exibida pelos venenos crotálicos e pelo veneno de jararacuçu (figura 1) é similar à do composto 48/80. Este composto, tido como um dos mais potentes liberadores de histamina que se conhece, é obtido a partir da reação de condensação do p-metoxifenetilmetilamina com o formaldeído, e representa uma mistura de vários polímeros cujo peso molecular varia de 700 a 1400 (PATON, 1951; ROTHCHILD, 1970). O mecanismo de liberação de histamina induzida pelo 48/80 é pouco conhecido, mas há sugestões de que este composto possa atuar em receptores específicos na superfície celular (HINO et al. 1977). O 48/80 é ainda capaz de induzir liberação sub-ótima de histamina num meio sem cálcio,

revelando a sua capacidade em mobilizar cálcio intracelular de modo a permitir que a liberação se processe (KAZIMIERCZAK et al. 1976; ROTHCHILD, 1970 ). Em elevadas concentrações, o 48/80 torna-se citotóxico com danos irreversíveis para a membrana celular (JOHNSON & MORAN, 1969; ELLIS et al. 1970) . Em pulmões de rato, a liberação de histamina induzida pelo 48/80 parece ocorrer por conta de dois processos: um, dependente do metabolismo da célula, envolve a secreção dos grânulos dos mastócitos; o outro, independente do metabolismo, parece consistir de uma reação de simples troca entre a histamina e o composto 48/80. Em pulmões de cobaia, somente este último processo parece ocorrer (ROTHCHILD, 1970).

O mecanismo de liberação de histamina induzida pelos venenos ofídicos ainda é pouco conhecido, mesmo porque até o momento ainda não se conseguiu isolar satisfatoriamente o componente que apresenta esta propriedade. Este efeito parece não ser a causa primária da letalidade como sugere a não existência de correlação entre a neutralização dos efeitos tóxicos e a neutralização do efeito liberador de histaminas. Nas figuras 3 e 4, por exemplo, o próprio soro antibotrópico, que neutralizou relativamente quantidades muito pequenas do veneno crotálico (tabela 3), foi capaz de neutralizar a liberação de histamina da mesma forma que os demais. Além disso, a neutralização da liberação de histamina continua ocorrendo mesmo quando se empregaram concentrações de veneno além da faixa de neutralização. Contudo, VITAL BRAZIL et al. (1966, 1967) relataram para o veneno de C.d.terrificus alterações importantes no sistema

cardiovascular levando a aumento da permeabilidade capilar e hipotensão, e ocasionalmente instalação do quadro de choque, sinais sugestivos da liberação de histamina e demais autacóides neste envenenamento.

Estes efeitos, não são mediados pela fosfolipase A contida no veneno crotálico (VITAL BRAZIL et al. 1966; ROTHCHILD, 1966, 1967), como não o são no veneno de abelha (ROTHCHILD, 1965) ou no veneno da Naja naja (DAMERAU et al. 1975). Já foi demonstrado por esses autores que esta enzima só atua indiretamente como uma consequência da clivagem enzimática de fosfolipídeos dos fluidos teciduais, com formação de lisofosfatídeos (ex. lisolecitina) que são agentes altamente citolíticos e não-específicos.

Já o DLF (fator lítico direto), cardiotoxina presente no veneno de Naja naja com ação liberadora de histamina e degranuladora de mastócitos, parece exercer dois mecanismos de ação sobre essa célula: (1) como um peptídeo básico, esta toxina pode se ligar inespecificamente em mastócitos altamente sensíveis de rato em concentrações muito pequenas para potencializar o efeito da fosfolipase A; (2) em doses maiores, é capaz de ligar-se a mastócitos menos sensíveis de cobaia, os quais podem ser danificados por um processo citolítico, não específico, envolvendo a potencialização da fosfolipase A à semelhança do que ocorre sobre o eritrócito (DAMERAU et al. 1975).

Entretanto, independente do modo pelo qual

os venenos ofídicos possam atuar no organismo liberando histamina e outros autacóides, verificamos que esta atividade foi total ou parcialmente neutralizada pelo anti-soro ofídico, específico ou não (figuras 3, 4, 5, 6). Assim, a liberação de histamina induzida pelo veneno de C. d. terrificus (figura 3) pareceu ser até melhor neutralizada pelo anti-soro botrópico do que pelo próprio anti-soro crotálico ou polivalente. Com veneno de C. d. cascavella notamos que o soro Anticrotálico exerceu uma neutralização praticamente total sobre a atividade liberadora de histamina, o que foi também verificado para os soros Antibotrópico e Polivalente. Parece, portanto, que os venenos crotálicos encerram componentes liberadores de histamina antigênicos comuns, perfeitamente neutralizados por quaisquer dos anti-soros testados; mesmo em concentrações acima de 20 µg/ml, todos os anti-soros testados exerceram uma neutralização do efeito liberador, embora esta tenha sido, na maioria das vezes, somente do tipo parcial.

Quanto à crotamina, tida inicialmente como a responsável pela atividade liberadora de histamina do veneno bruto (MOURA GONÇALVES & ROCHA e SILVA, 1958), mostrou-se apenas um discreto liberador de histamina quando comparada com o veneno bruto (figura 7) não tendo sido neutralizada pelos anti-soros ofídicos testados (figura 8). De fato, seu baixo peso molecular (4880 daltons) não favorece a formação de anticorpos.

Com relação ao veneno de B. jararacussu (figura 5), as curvas de neutralização de liberação de

histamina parecem indicar que este veneno apresenta componentes antigênicos perfeitamente neutralizados pelos soros Antibotrópico, Anticrotálico e Polivalente, e componentes não-antigênicos capazes de liberar histamina. Este efeito foi verificado pela liberação de histamina nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  doses que se encontram ainda na faixa de neutralização dos efeitos tóxicos da peçonha.

Deve ser ressaltado também que dos quatro venenos estudados, o veneno de jararacuçu foi o único no qual a neutralização exercida pelos soros Antibotrópico e Polivalente sobre a liberação de histamina, anulou-se completamente após os 10  $\mu\text{g/ml}$ , atingindo os valores controles de liberação. Paradoxalmente, isto não aconteceu com o soro Anticrotálico onde a neutralização da liberação de histamina continuou parcial mesmo após os 10  $\mu\text{g/ml}$  demonstrando mais uma vez a semelhança existente entre este veneno e o crotálico.

Por outro lado, a atividade liberadora de histamina exercida pelo veneno de B. alternatus (figura 6) foi totalmente neutralizada pelo soro Antibotrópico (até 160  $\mu\text{g/ml}$ ), e parcialmente pelos soros Anticrotálico e Polivalente, efetivos até a concentração de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Este resultado indica que o veneno de urutu deve possuir componentes liberadores de histamina antigênicos em sua natureza e que são reconhecidos e neutralizados pelos anti-soros em estudo, principalmente pelo anti-soro botrópico.

Portanto, este estudo revelou uma neutralização cruzada da atividade liberadora de histamina dos venenos



ofídicos com os anti-soros testados. Assim, deduz-se que a constituição antigênica dos componentes liberadores de histamina presentes nos venenos botrópicos e crotálicos estudados exibem alguma similaridade entre si; se, por um lado, o soro anticrotálico é capaz de neutralizar o componente liberador de histamina do veneno botrópico, o soro Antibotrópico é capaz de neutralizar também a atividade liberadora exibida pelo veneno crotálico. ROSENFELD & KELEN (1966) obtiveram resultado semelhante quando estudaram a neutralização do poder coagulante de venenos ofídicos frente a diversos anti-soros. Os autores chegaram à conclusão de que a constituição antigênica dos fatores coagulantes dos diferentes venenos estudados exibem muitos aspectos em comum. Eles verificaram, por exemplo, que o veneno de C.d.terrificus contém os seus próprios antígenos para o fator coagulante, e também antígenos de B.jararacussu e em menor proporção antígenos de B.atrox, B. neuwiedi e outras bothrops; Igualmente, diversos venenos botrópicos estudados (B.neuwied, B. atrox, B. jararaca e B. cotiara) mostraram possuir além de seu próprio antígeno, proporções variáveis de antígenos de outras espécies botrópicas e antígenos de C.d.terrificus.

Outros autores estudaram a capacidade neutralizante dos soros antiofídicos sobre os efeitos locais produzidos pelos venenos ofídicos (GUTIÉRREZ et al. 1981; OWNBY et al. 1983). O primeiro grupo de autores (GUTIÉRREZ et al. 1981) estudou a neutralização exercida por um anti-soro Polivalente sobre a mionecrose, hemorragia e edema produzidos pelo veneno de Bothrops asper. Concluíram que

o anti-soro Polivalente de origem equina é relativamente ineficaz em neutralizar os efeitos locais produzidos por este veneno em ratos, ainda que o efeito hemorrágico seja bem neutralizado; se se administrasse o anti-soro pouco tempo depois do envenenamento, os efeitos mionecrótico e edematizante também seriam parcialmente neutralizados. O segundo grupo de autores (OWNBY et al. 1983) estudou a capacidade do soro anti-miotoxina a, toxina presente no veneno da cascavel C.viridis viridis, em neutralizar a miotoxicidade local e os efeitos letais desta toxina, comparando-a com o veneno bruto homólogo. Os resultados indicaram que o soro anti-miotoxina a é mais efetivo em neutralizar a mionecrose local enquanto o anti-soro Polivalente, apesar de não neutralizar a miotoxina a, é mais efetivo em neutralizar a letalidade do veneno bruto.

Os exemplos citados mostram a dificuldade existente na interpretação dos resultados obtidos quando se procura estudar a neutralização de cada um dos componentes tóxicos existentes nos venenos: hemorrágico, edematizante, mionecrótico, coagulante, hemolítico, liberador de aminas e outros.

Nossos resultados se alinham aos demais e esperamos possam constituir mais uma informação relevante para o esclarecimento tanto da fisiopatologia do envenenamento quanto da imunquímica desses venenos e da filogenia das espécies em questão.

V - CONCLUSÕES

19) A potência liberadora de histamina do veneno de Bothrops alternatus foi marcadamente menor do que a dos venenos de Crotalus durissus terrificus, Crotalus durissus cascavella e Bothrops jararacussu;

29) Não houve correlação entre a atividade neutralizante dos efeitos tóxicos do veneno total e o efeito liberador de histamina nos venenos de C.d.terrificus, C.d.cascavella e B.alternatus;

39) A neutralização cruzada (total ou parcial) desta atividade sugere a existência de um "fator liberador de amins" comum aos venenos estudados;

49) Os soros antiofídicos comerciais não foram capazes de neutralizar as ações espasmogênicas determinadas pela crotamina, nem a atividade liberadora de histamina desta substância.

**VI - S U M Á R I O**

Os venenos brutos de Crotalus durissus terrificus , Crotalus durissus cascavella, Bothrops jararacussu e Bothrops alternatus foram investigados quanto à sua atividade liberadora de histamina em lavado peritoneal de ratos. Foi avaliada também a capacidade neutralizante dos soros antiofídicos comerciais sobre a ação liberadora de histamina dos venenos ofídicos.

A potência liberadora de histamina foi semelhante para os venenos de C.d.terrificus (DE50 = 1,25 µg/ml) , C.d.cascavella (DE50=1,72 µg/ml) e B.jararacussu (DE50 = 1,97 µg/ml) sendo significativamente menor para o veneno de B.alternatus (DE50 = 11,5 µg/ml). A crotamina, componente miotóxico presente no veneno de C.d.terrificus, mostrou apenas uma discreta liberação de histamina (16 vezes menor que a do veneno bruto), com atividade comparável à do veneno de B. alternatus.

O efeito liberador de histamina induzido pelos venenos brutos foi neutralizado pelos soros antiofídicos, independente da dose necessária para a neutralização de seu efeito letal. A existência da neutralização cruzada (parcial ou total) indica que os componentes liberadores

de histamina presentes em tais venenos são antigênicos em sua natureza e provavelmente semelhantes entre si. O fato de os soros antiofídicos serem incapazes de neutralizar a atividade liberadora de histamina induzida pela crotamina sugere fortemente que esta toxina de baixo peso molecular se comporta como sendo fracamente antigênica.

VII - S U M M A R Y



The histamine releasing ability of Crotalus durissus terrificus, Crotalus durissus cascavella, Bothrops jararacussu and Bothrops alternatus venoms on rat peritoneal mixed cells was studied, as well the neutralization of this histamine releasing effect by commercial antiophidic sera.

The ED50 values for the histamine releasing effect for C.d.terrificus (ED50 = 1,25 µg/ml), C.d. cascavella (ED50 = 1,72 µg/ml) and B.jararacussu (ED50 = 1,97 µg/ml) was similar and significantly smaller than ED50 for B.alternatus venom (ED 50 = 11,5 µg/ml). Crotamine, a miotoxic component of C.d.terrificus venom, showed a histamine releasing activity 16 times smaller than that of the whole venom, comparable to that of B. alternatus venom.

The histamine releasing effect was neutralized by antiophidic sera in doses not related to those used for neutralization of toxic effects. A significant cross neutralization (partial or total) was observed. It is proposed that the histamine releasing fractions of the four venoms tested are antigenic and are probably similar.

The antiophidic serum did not neutralize the histamine releasing activity of crotamine suggesting that this low molecular weight toxin behaves as a feeble antigen.

## VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, E.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. ;  
NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. - The effects  
of Bothrops alternatus venom and its components on  
biological preparations. Arq.Biol.Tecnol, 27 (2): 225 ,  
1984.

BENDITT, E.P.; WONG, R.L.; ARASE, M.; ROEPER, E. 5 -  
Hydroxytryptamine in mast cells. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,  
90 (1): 304-4, 1955.

BLOOM, G.D. - Structural and biochemical characteristics of  
mast cells. In: Zweifach, B.W.; BRENT, L.; MACHRISEKEY ,  
R.T. The Inflammatory Process. 2 ed. New York, Academic  
Press, 1974. v.1, p. 545-99.

BRANDEBURGO, M.I.H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI,  
J.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETTO, H.; GIGLIO, J.R. - A  
mionecrotic toxin from the venom of Bothrops jararacussu :  
isolation and characterization. Arq.Biol.Tecnol., 29 (1):  
218, 1986.

- CARRAWAY, R.E.; COCHRANE, D.E.; GRANIER, C.; KITABGI, P. ;  
LEEMAN, E.; SINGER, E.A. - Parallel secretion of  
endogenous 5-hydroxytryptamine and histamine from mast  
cells stimulated by vasoactive peptides and compound  
48/80. Br.J.Pharmac., 81: 227-9, 1984.
- COOPER, P.H. & STANWORTH, D.R. - A simple and reproducible  
method of isolating rat peritoneal mast cells in high  
yield and purity. Prep. Biochem., 4 (2): 105-14, 1974.
- DAMERAU, B.; LEGE, L.; OLDIGS, H.D.; VOGT, W. - Histamine  
release, formation of Prostaglandin-like activity (SRC-C)  
and mast cell degranulation by the direct lytic factor  
(DLF) and Phospholipase of cobra venom. Naunyn-Schmiedeberg's  
Arch.Pharmak., 287: 141-56, 1975.
- EFRATI, P. - Clinical manifestation of snake bite by  
Vipera xanthina palestinae (Werner) and Their pathological  
basis. Mem. Inst. Butantan, 33: 189-91, 1966.
- EILBACK, J.F. & SMITH, W.G. - Histamine release from the  
mast cells of guinea-pig lung. J.Pharm.Pharmacol., 19:  
374-82, 1967.
- ELLIS, H.V.; JOHNSON, A.R.; MORAN, N.C. - Selective release  
of histamine from mast cells by several drugs. J.Pharm.  
Exp.Ther., 175 (3): 627-31, 1970.

ENERBACK, L. & HAGGENDAL, I. - Uptake and Storage of catecholamines in mucosal mast cells of the rat. J. histochem. cytochem., 18 (11): 803-11, 1970.

ENNIS, M. - Histamine release from human pulmonary mast cells. Agents Actions, 12: 60-3, 1982.

FELDBERG, W. & KELLAWAY, C.H. - Liberation of histamine from the perfused lung by snake venoms. J. Physiol. (Lond), 90: 257-79, 1937a.

FELDBERG, W. & KELLAWAY, C.H. - The circulatory and pulmonary effects of the venom of Australian copperhead (*Denisonia superba*). Aust. J. Biol. Med. Sci., 15: 81-95, 1937b.

FELDBERG, W.; HOLDEN, H.F.; KELLAWAY, C.H. - The formation of lysolecithin and of a muscle-stimulating substance by snake venoms. J. Physiol. (Lond), 94: 232-48, 1938.

FREDHOLM, B. - Studies on a mast cell degranulating factor in bee venom. Biochem. Pharmac. 15: 2037-43, 1966.

FREDHOLM, B.; HOGBERG, B.; UVNAS, B. - Role of phospholipase A and C in mast cell degranulation induced by non-purified Clostridium welchii toxin. Biochem. Pharmac., 5: 39-45, 1960.

- GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. - Neutralizacion de los efectos locales del veneno de Bothrops asper por un antiveneno polivalente. Toxicon, 14 (4): 493-500, 1981.
- HABERMANN, E. & BREITHAUPT, H. - MCL-Peptide, a selectively mastocytolytic factor isolated from bee venom. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak., 260: 127-8, 1968.
- HINO, R.N.; LAU, C.K.H.; READ, G.W. - The site of action of the histamine release compound 48/80 in causing mast cell degranulation. J.Pharm. Exp. Ther., 200 (3): 658 - 663, 1977.
- HOGBERG, B. & UVNÄS, B. - The mechanism of the disruption of mast cells produced by compound 48/80. Acta.Physiol. Scand., 41: 345-69, 1957.
- JOHNSON, A.R. & MORAN, N.C.,. - Comparison of several methods for isolation of rat peritoneal mast cells. Proc. Soc. Exp.Med., 123: 886-9, 1966.
- JOHNSON, A.R. & MORAN, N.C. - Selective release of histamine from rat mast cells by compound 48/80 and antigen. Am.J. Physiol., 216 (3): 453-9, 1969.
- KAZIMIERCZAK, W. & DIAMANT, B. - Mechanisms of histamine release in anaphylatic and anaphylactoid reactions. Prog. Allergy, 24: 295-365, 1978.

- KAZIMIERCZAK, W.; PERET, M.; MASLINSKI, C. - The action of local anaesthetics on histamine release. Biochem.Pharmac. 25: 1747-50, 1976.
- KELEN, E.M.A.; ROSENFELD, G.; VAINZOF, M.; MACHADO, Z.C. - Experimental defibrination and bothrops: a study on the fibrinolytic mechanism in vivo. Haemostasi, 7(1): 35-45, 1978.
- LAGUNOFF, D. & MARTIN, T.W. - Agents that release histamine from mast cells. Ann.Rev.Pharmacol.toxicol., 23:331-51, 1983.
- MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T.; REICHEL, A.P.-Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of Bothrops neuwiedi(jararaca pintada). Toxicon, 22 (2) : 193-206, 1984.
- MARKWARDT, F. - The release of biogenic amines from blood platelets under the influence of Crotalus d. terrificus venom. Mem.Inst.Butantan, 33 (3): 851-4, 1966.
- MORAN, N.C.; UVNAS, B.; WESTERHOLM, B. - Release of 5-hydroxytryptamine and histamine from rat mast cells. Acta. Physiol. Scand., 56: 26-41, 1962.



- MOURA GONÇALVES, J . & ROCHA e SILVA, M. - Fator de Permeabilidade capilar no veneno de Crotalus terrificus crotaminicus. Ciência Cultura, 10: 163, 1958.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; SOUSA e SILVA, M.C.; RIBEIRO de BARROS, M.A.; MORENA, P. - The inactivating effect of Bothrops jararaca and waderophis merremii snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. Toxicon , 21(2): 239-246, 1983.
- NISENBON, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. - Phospholipase A<sub>2</sub> from Bothrops alternatus (vībora de la cruz) venom . Purification and some characteristic properties. Toxicon , 24(03): 259-272, 1986.
- NOVELLO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. - Search for the Biological activity of Bothrops alternatus venoms. Arq.Biol.Tecnol. 27(2): 256, 1984.
- OWNBY, C.L.; ODELL, G.V.; WOODS, W.M.; COLBERG, T.R. - Ability of antiserum to myotoxin a from prairie rattlesnake (Crotalus viridis viridis) venom to neutralize local myotoxicity and lethal effects of myotoxin a and homologous crude venom. Toxicon, 21:35-45, 1983.
- PADAWER, J. & GORDON, A.S. - Isolation of mast cells from other cellular elements of rat peritoneal fluid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 88 (1): 29-31, 1955.

PATERSON, N.A.M.; WASSERMAN, S.I.; SAID, J.W.; AUSTEN, K.F.

-Release of chemical mediators from partially purified human lung mast cells. J. Immun., 117 (4): 1356-62, 1976.

PATON, W.D.M. - Compound 48/80: A potente histamine liberator.

Br. J. Pharmac., 6: 499-508, 1951.

PATON, W.D.M. - Histamine release by compounds of simple chemical structure. Pharmac. Rev., 9: 269-328, 1957.

PERRY, W.L.M. - Pharmacological experiments in isolated preparations. Great Britain, E & S. Livingstone, 1968.

PRADO-FRANCESCHI, J. - Estudo sobre convulxina. São Paulo , 1970. 62 p. [Tese de doutoramento - Instituto de Biologia - UNICAMP].

PRADO-FRANCESCHI, J. : TAVARES, D.Q.; HERTEL, R.; LÔBO DE ARAUJO, A. - Effects of convulxin, a toxin from rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anesthetized rabbits. Toxicon, 19 (5): 661-6, 1981.

RILEY, J.F. & WEST, G.B. - The presence of histamine in tissue mast cells. J. Physiol., 120: 528-37, 1953.

RILEY, J.F. & WEST, G.B. - The occurrence of histamine in mast cells. In: Rocha e Silva, M. Exp. Pharmacol. Histamine. Its Chemistry, Metabolism and Physiological and Pharmacological action. Berlin-Heidelberg, New York-Spinger, 1966. vol. 18, p. 116-78.

- ROCHA e SILVA, M. - Histamine and antihistamines. In : Handb Exp.Pharmacol. Histamine. Its Chemistry Metabolism and Physiological and Pharmacologic Actions. Berlin - Heidelberg, New York: Springer, 1966. vol. 18.
- RODRIGUES-SIMIONI, L. ; BORGESE, N. ; CECCARELLI, B. The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience, 10(2): 475-89, 1983.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; HELUANY, N-F.; HONSI-BRANDEBIRGO , M.I.; QUEIROZ, L.S.; ANTUNES, E.; PRADO-FRANCESCHI, J. ; GIGLIO, J.R. - Efeitos de um componente botrópico semelhante   cardiotoxina. In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terap utica Experimental 3. São Paulo, 1985 . Anais. São Paulo, p. 247.
- ROSENFELD, G. & VELEN, E.M.A. - Cross Neutralization of the coagulant activity of some snake venoms by antivenins . Toxicon, 4:7-15, 1966.
- ROTHSCHILD, A.M. - Histamine release by bee venom phospholipase A and melittin in the rat. Br.J.Pharmacol., 25 : 59-66, 1965.
- ROTHSCHILD, A.M. - Mechanism of histamine release by animal venom. Mem.Inst.Butantam, 33(2): 467-76, 1966.

ROTHSCHILD, A.M. - Chromatographic separation of Phospholipase A from a histamine releasing component of Brazilian Rattlesnake venom. (Crotalus durissus terrificus). Experientia, 23: 741-2, 1967.

ROTHSCHILD, A.M. - Mechanism of histamine release by compound 48/80. Br.J.Pharmac., 38: 253-62, 1970.

ROTHSCHILD, A.M. & ROTHSCCHILD, A. - Liberation of Pharmacological active substances by snake venoms. In: Lee, C.Y. Snake Venoms. Berlin . Heidelberg New York, Springer - Verlag, 1979. vol. 52, p. 591-628.

SLORACH, S.A. & UVNAS, B. - Amine Formation by rat mast cells in vitro. Acta.Physiol.scand., 73: 457-70, 1968.

SPIEGEL, M.R. - Estatística. 1.ed. São Paulo, McGraw.Hill do Brasil, 1971. 580 p.

UVNAS, B. & THON, I.L. - Isolation of "Biologically Intact" mast cells. Exp.cell Res., 18: 512-20, 1959.

VIDAL, J.C. & STOPPANI, A.D.M. - Isolation and purification of two phospholipases A from Bothrops venoms. Arch.Biochem. Biophys., 145:543, 1971.

VITAL BRAZIL. - Contribuição ao estudo do veneno ophidico. I. O veneno de algumas espécies brasileiras. Rev.med de São Paulo, 4: 296-300, 1901 a.

VITAL BRAZIL. - Contribuição ao estudo do veneno ophidico .

II. Tratamento das mordeduras de cobra. Rev.med. de São Paulo, 4: 375-80, 1901 b.

VITAL BRAZIL. - Contribuição ao estudo do veneno ophidico .

III. Tratamento das mordeduras de cobras. Rev.med.de São Paulo, 6: 265, 1903.

VITAL BRAZIL, O. - Heterogeneidade imunológica da peçonha

de Crotalus terrificus terrificus Laur 1876. Revta.bras. Med., vol. XVI (8): 1-20, 1959.

VITAL BRAZIL, O. - Peçonhas. In: Corbett, C.E.Farmacodinâmica

ca. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p . 1044-74.

VITAL BRAZIL, O. - Neurotoxins from the South American -

rattlesnake venoms. J.Formosan Med. Assoc., 71:394, 1972.

VITAL BRAZIL, O. & PRADO-FRANCESCHI, J. - Convulxina e del

tatoxina, duas novas toxinas da peçonha de Crotalus durissus terrificus. In: Reunião Anual da SBPC, 20., São Paulo, 1968.

VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B.J. - Action of crotoxin and

crotactin from the venom of Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. J.Physiol., 212: 34-5, 1970.

VITAL BRAZIL, O.; FRANCESCHI, J.P.; WAIBICH, E. - Fator neu  
rotóxico na peçonha de Crotalus durissus terrificus di  
diferente da crotoxina e crotamina. Ciência e Cultura ,  
19(4): 658-65, 1967.

VITAL BRAZIL, O.; FARINA, R.; YOSHIDA, L.; OLIVEIRA, V.A. -  
Pharmacology of crystalline crotoxin. III. Cardiovascular  
and respiratory effects of crotoxin and Crotalus durissus  
terrificus venom. Mem.Inst.Butantan, 33(3): 993-1000, 1966.

WEIL, C.S. - Tables for convenient calculation of median  
dose (LD50 or ED50) and instructions in their use .  
Biometrics, 8: 249-63, 1952.