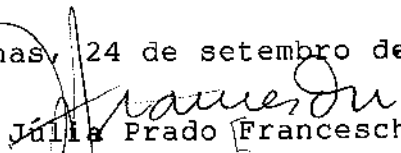


ANTONIO LELIS FRANCO ANDRADE

ESTUDO FARMACOLÓGICO DA PEÇONHA
DE *BOTHROPS MOOREI*

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia do biólogo **ANTONIO LELIS FRANCO ANDRADE.**

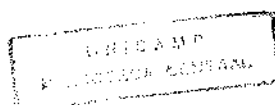
Campinas, 24 de setembro de 1993

Profa. Dra.  Júlia Prado Franceschi

-Orientadora-

CAMPINAS - S.P

1993



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS F.C.M

ESTUDO FARMACOLÓGICO DA PEÇONHA DE
BOTRHOPS MOOJENI

ANTONIO LELIS FRANCO (ANDRADE) ^{2^a}
Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
de Campinas para a obtenção do
título de Mestre em FARMACOLOGIA.
Orientadora: Dra JÚLIA PRADO
FRANCESCHI.

CAMPINAS - S.P - 1993

Dedico este trabalho
a CRISTINA.

Mestre não é quem sempre
ensina, mas quem de
repente aprende.
Guimarães Rosa.

AGRADECIMENTOS

Como autor deste trabalho agradeço às seguintes pessoas:

Meus pais: Accácio Andrade e Maria Tereza pelo incentivo constante.

Dra. Júlia Prado Franceschi pela valiosa orientação e contribuição a minha formação científica.

Dra. Léa Rodrigues Simioni com quem iniciei meu estágio no Departamento de Farmacologia da UNICAMP.

Ao amigo Dr. Marcos Dias Fontana do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pelo incentivo e aconselhamento.

Dr. Carlos Alberto Flores do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pelas sugestões sempre pertinentes.

Dra. Lindioneza Adriano Ribeiro do Centro de Vigilância Epidemiológica (C.V.E.) São Paulo - SP., pelo auxílio no levantamentos de dados.

Ao amigo José Carlos Cogo pelo auxílio e presença constantes.

Ao biólogo Gildo Bernardo Leite pela assessoria técnica ao longo deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da UNICAMP que muito cotribuíram para minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP pelo auxílio sempre simpático.

A granja ITO S/A pelo fornecimento de animais.

A Coodenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE MATERIAIS

Material	Procedência
Peçonha de <i>B. moojeni</i>	Serpentário particular, Campinas, S.P.
Atropina	Sigma Chemical CO; Poole, G.B.
Carragenina	Sigma Chemical CO; Poole, G.B.
Cimetidina	Smithkline, Rio de Janeiro - RJ, BR.
Cloral hidratado	Reagen (Quimbrás), Rio de Janeiro - RJ, BR.
Cloreto de Sódio	Reagen (Quimbrás), Rio de Janeiro - RJ, BR.
Dialysis Sacks 12.000	Sigma Chemical CO. Poole, G.B.
Heparina Sódica	Roche, São Paulo - SP.BR.
Mepiramina	Sigma Chemical CO Poole, G.B.
Sulfato de Celulose	Aldrich Chemical CO Dorset, G.B.
Urethane(Ethyl-Carbamate)	Sigma Chemical CO Poole, G.B.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	01
II - OBJETIVOS	07
III - MATERIAIS E MÉTODOS	08
IV - RESULTADOS	13
V - DISCUSSÃO	16
VI - RESUMO E CONCLUSÕES	21
VII - SUMMARY	25
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ESTUDO FARMACOLÓGICO DA PEÇONHA DE B. MOOJENI

INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos da humanidade, as serpentes, que suscitavam medo e eram objeto de superstição, despertam o interesse dos estudiosos. No entanto somente no século XVII foi demonstrada a relação entre toxicidade e o líquido que escorre pelo aparelho venenoso, (Abbatius 1603, Redi 1664).

No século XIX, com o progresso da ciência, iniciaram-se os estudos de seus efeitos, com a sugestão de que alguns componentes seriam os responsáveis pelas diversas atividades biológicas.

Apesar disso, em pleno século XX, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981), dados sobre a patologia do acidente ofídico humano são escassos na maioria dos países, notadamente naqueles situados em regiões tropicais, onde podem causar acidentes de gravidade variável.

No Brasil os estudos de peçonhas iniciaram-se com trabalhos de João Batista Lacerda, que no século passado realizou, no Museu Nacional, algumas pesquisas sobre a farmacologia do veneno de serpentes brasileiras (Brazil, 1982 a).

Deve-se, no entanto, à Vital Brazil Mineiro da Campanha (1865-1950), o grande desenvolvimento que alcançaram as investigações ofídicas envolvendo aspectos sistemáticos,

clínicos, imunológicos, bioquímicos, farmacológicos e profiláticos. Seus ensinamentos, após tantos anos, continuam, sob muitos aspectos, atualíssimos.

Em 1963, iniciou-se a implantação dos centros de controle de intoxicação, os CCI, que tiveram como protótipo o serviço instalado por S. Schvartsman no Instituto da Criança.

Os trabalhos realizados por estes centros demonstraram que os acidentes causados por animais peçonhentos representavam a segunda causa de atendimento nos hospitais de grandes centros do estado de São Paulo, superados somente por intoxicação medicamentosa. Nos centros localizados em regiões de grande atividade agrícola como em regiões do interior do Estado de São Paulo, a situação se inverte (CCI da UNICAMP).

Em relação à distribuição dos acidentes ofídicos ("mapeamento" do ofidismo) no Brasil, vale ressaltar que só está sendo possível porque foram definidos critérios diagnósticos clínicos, fato mencionado por Rosenfeld, (1971): "Era necessário o estabelecimento de critérios diagnósticos baseados na sintomatologia que permitissem o diagnóstico e consequente terapêutica e avaliação prognóstica, sem a identificação da serpente, pois a maioria dos médicos era incapaz de classificar serpentes peçonhentas e era pouco frequente que o paciente ou família trouxessem a serpente que causou o acidente".

No Brasil existem aproximadamente 250 espécies de serpentes que estão distribuídas em nove famílias, das quais apenas duas (*Elapidae* e *Viperidae*) englobam os quatro gêneros peçonhentos (*Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus*) existentes no país. As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo território nacional, compreendendo vinte espécies, e são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos peçonhentos que ocorrem no país (Ministério da Saúde, 1991). Algumas espécies apresentam maior importância por sua extensa distribuição geográfica tais como *B. jararaca* que ocorre desde a região Sul, Sudeste e Centro Oeste; *B. moojeni* no Centro Oeste; *B. erythromelas* no Nordeste e *B. atrox* na Amazônia).

As peçonhas botrópicas apresentam um perfil de efeitos mais ou menos constante, destacando-se os efeitos locais que vão de eritema, edema, até necrose e efeitos sistêmicos como o choque circulatório, que segundo Vital Brazil (1982) é a causa mais frequente de morte nos acidentes causados por estas serpentes. Clinicamente o choque é do tipo hipovolêmico e este efeito parece ser devido ao extravasamento de sangue para os tecidos e órgãos internos. A hipotensão observada é devida à vasodilatação que determina um decréscimo na resistência periférica vascular.

Autacóides como bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandinas, liberados por enzimas contidas na peçonha (proteases e fosfolipases) podem contribuir para hipotensão (Rothschild & Rothschild, 1979).

A participação da bradicinina no envenenamento botrópico foi sugerida por Rocha e Silva & Beraldo (1949) que verificaram a liberação desta cinina de uma fração globulínica do plasma, devido à ação do veneno de *B. jararaca* e da tripsina.

Ferreira (1965), verificou a presença de uma substância que aumentava a ação da bradicinina liberada e a chamou de BPF (bradykinin-potentiating factor). Estudos posteriores demonstraram que o BPF inibe a enzima peptidil dipeptidase, responsável pela síntese de angiotensina II e degradação da bradicinina, substâncias que se encontram envolvidas na regulação da pressão arterial.

Sung et al (1988), estudando a interação da bradicinina com células endoteliais da artéria pulmonar bovina verificaram que o efeito final a nível de receptores do tipo B2 consiste na elevação dos níveis intracelulares de cálcio e EDRF (Endothelium derived relaxing factor) composto descoberto por Furchgott & Zawadski em 1980.

Rothschild & Almeida (1969), estudando a participação de cininas no choque fatal produzido pela peçonha de *B. jararaca* verificaram que mesmo uma liberação maciça de bradicinina pode ser tolerada por ratos previamente tratados com sulfato de celulose.

A espécie *B. moojení* (Hoge, 1966; Fig.1) é conhecida popularmente como "caçaca", termo que significa "o que queima" em tupi-guarani. Apresenta uma ampla distribuição geográfica (Fig. 2), onde causa a maioria dos acidentes



Figura 1- Exemplar da espécie *B. moojeni*, conhecida popularmente como "caicaca", apresenta uma coloração marrom aveludada. Estas serpentes caracterizam-se por serem ágeis, podendo dar botes sucessivos. Apesar do pequeno porte, produzem até 300mg de veneno por extração.

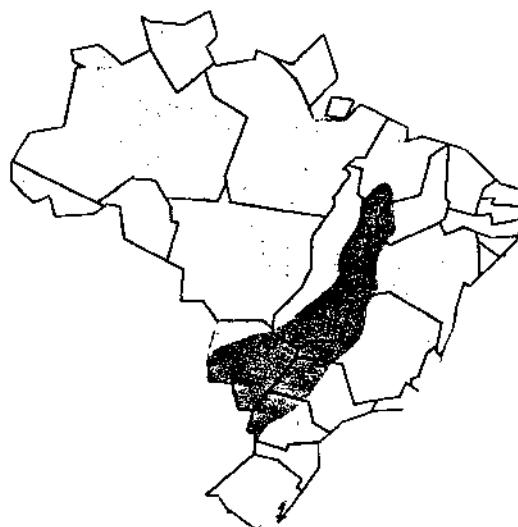


Figura 2- *B. moojeni*- distribuição geográfica. Preferência cerrados e lavouras.

ofídicos, apesar do pequeno porte de seus representantes (cerca de 1,50 m). Habita geralmente lugares secos, campos ou beira de matas, onde se alimenta de pequenos roedores. Eventualmente sobe em árvores quando acossada por enchentes. Os animais jovens todavia, preferem viver em riachos, onde se alimentam de pequenos peixes. É uma espécie ovovivipara, constituindo-se cada ninhada de 12 a 20 filhotes.

Os dados clínicos-laboratoriais mais importantes descritos em acidentes ofídicos causados por *B. moojeni* são: efeitos locais, tais como dor e edema imediatos (até 30 minutos pós-picada, 100%), tempo de coagulação prolongado/sangue incoagulável (73,9%) e presença de hemorragias clinicamente evidentes (8,3%). Estes sinais decorrem das ações proteolítica, coagulante e hemorrágica do veneno. Foi relatada ainda elevação transitória dos níveis séricos de uréia e creatinina, sendo raro o aparecimento de insuficiência renal grave (0,5-1%). De acordo com estes dados os acidentes foram classificados como leves (20%), moderados (65%) e graves (15%), sendo em geral, mais graves do que aqueles causados por *B. jararaca* em relação aos efeitos locais e porcentagem de aumento no tempo de coagulação, (Kouyomdjian & Polizelli, 1987).

Um fator introduzido erroneamente pelo homem no envenenamento botrópico é o garroteamento. Apesar das advertências do Instituto Butantan e Secretaria de Saúde, ainda ocorre em até 70% dos casos, contribuindo para o agravamento dos efeitos locais. Este agravamento se deve

provavelmente à diminuição da perfusão e a concentração do veneno na região distal ao garroteamento, contribuindo para uma maior concentração tecidual. A distribuição do veneno limita-se, inicialmente, ao tecido subcutâneo, mas com muita frequência compromete estruturas mais profundas, como tendões e músculos, levando à necrose. Além disso, concomitantemente ocorre liberação de substâncias farmacologicamente ativas, em maior escala, contribuindo para o agravamento do quadro.

A peçonha de *B. moojeni* vem merecendo a atenção dos pesquisadores desde o início do século (Vital Brazil, 1911; Vieira, 1950; Minton, 1967; Meier, 1983; Assakura et al, 1985; Furtado, 1987 Serrano et al, 1993a e 1993b). Os acidentes ofídicos causados por estas serpentes vêm aumentando em incidência por toda região Noroeste de São Paulo, associados à cultura do café, ainda presente (Fig.3).

A frequência dos acidentes ofídicos causados por *B. moojeni* é maior do que a de outras espécies do gênero *Bothrops* na região de São José do Rio Preto. Em 42 casos de acidentes botrópicos aí registrados, observa-se a seguinte distribuição: *B. moojeni* (37 casos-88%), *B. alternatus* (4 casos-9.5%) *B. jararaca* (1 caso-2.3%) (Kouyoumdjian et al, 1988).

Até o presente momento, os estudos farmacológicos com peçonhas botrópicas preferenciaram o veneno de *B. jararaca*. A nosso ver, os efeitos responsáveis pelos sinais e sintomas apresentados tanto no envenenamento experimental (animais)

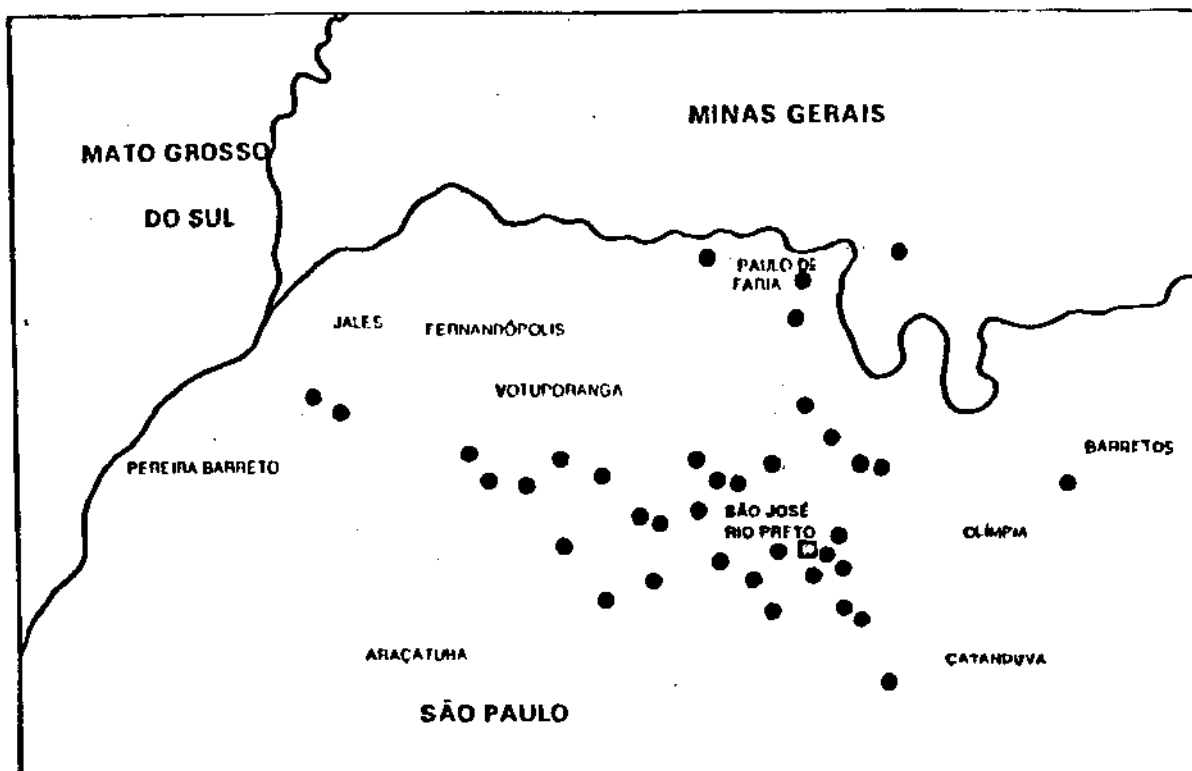


Figura 3- Acidentes por *B. m. pojei*: localização geográfica dos casos na região de São José do Rio Preto S.P. no período de outubro de 82 à setembro de 1987, (KOUYOUMDJIAN et al-1990).

como acidental (humano), causados pela *B. moojeni*, merecem um estudo mais detalhado.

Estabelecemos, portanto os seguintes objetivos :

1) Determinação da DL50 da peçonha de *B. moojeni* por diferentes vias em espécies animais distintas, observando-se a sequência de aparecimento dos sinais e sintomas .

2) Avaliação da atividade da peçonha sobre a pressão arterial de ratos anestesiados.

3) Avaliação da influência do garroteamento sobre a evolução dos efeitos observados na pressão arterial

4) Avaliação farmacológica: Efeito de antagonistas.

MATERIAIS E MÉTODOS

PEÇONHA

Foram utilizadas peçonha de dois exemplares adultos de serpentes da espécie *B. moojeni* procedentes de Mato Grosso do Sul, Região de Três Lagoas.

TOXICIDADE

1) DETERMINAÇÃO DA DL50 EM CAMUNDONGOS: Para determinação da DL50 foram utilizados camundongos machos da espécie *Mus musculus*, (Linnaeus, 1758), pesando em média 20 ± 2 g, todos provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. A via de administração foi intraperitoneal (i.p.), empregando-se 6 animais por dose (24, 36, 54, e 81 ug/kg). A peçonha foi dissolvida em solução salina para a obtenção de uma solução estoque, a partir da qual foram preparadas quatro soluções de concentrações que guardavam entre si uma razão igual a 1,5.

Os efeitos da peçonha de *B. Moojeni* foram observados desde o momento da injeção até 24 horas após, quando então eram anotadas as sobrevidas. Em seguida foram calculadas as doses letais medianas e os respectivos intervalos fiduciais a nível de 95%, pelo método descrito por Weil (1952).

2) DETERMINAÇÃO DA DL50 EM PINTAINHOS: Para determinação da DL50 foram utilizados pintainhos (linhagem HY-LINE W 36) pesando em média 45 ± 5 g (aproximadamente 7 dias de vida), todos provenientes da Granja ITO S/A. Utilizou-se a via intramuscular (i.m.) como via de inoculação, sendo a peçonha de *B. moolerei* injetada no músculo peitoral esquerdo, empregando-se 6 animais por dose (80, 120, 180 e 270 ug/kg). A peçonha foi dissolvida em solução salina para obtenção de uma solução estoque a partir da qual foram preparadas quatro soluções de concentrações que guardavam entre si uma razão igual a 1,5. Os efeitos da peçonha foram observados desde o momento da injeção até 24 horas após, quando então eram anotadas as sobrevidas. Em seguida eram calculadas as doses letais medianas e os respectivos intervalos fiduciais a nível de 95%, pelo método descrito por Weil (1952).

3) DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEÇONHA DE *B. MOOJENI* NA PRESSÃO ARTERIAL: Para a avaliação da atividade da peçonha de *B. moojeni* na pressão arterial foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando em média 300 ± 10 g, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Os animais foram anestesiados com hidrato cloral a 10%, na dose de 500mg/kg (0,5ml para cada 100g), por via i.p. A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por Condon (1951) (Fig 4).

Após a traqueostomia, uma cânula traqueal foi inserida para manter a respiração. A seguir, a artéria carótida foi isolada e canulada com um tubo de polietileno contendo heparina sódica (200 U.I./ml, em solução de cloreto de sódio 0,9%). O registro da pressão arterial foi feito utilizando-se manômetro de mercúrio acoplado a um quimógrafo, ou através de um transdutor de pressão (SPECTRAMED-STATHAM), acoplado a um fisiógrafo GOULD RS3400 (Figs 5).

Após a estabilização do sistema por um período de no mínimo 15 minutos, doses de veneno de 600, 700, 800 e 900 ug/kg foram administradas na veia femoral. A significância dos valores em % de queda em relação a pressão inicial foram expressas em média $\pm$ EPM.

Para se excluir o fato de que a hipotensão causada pelo veneno de *B. moojeni* deve-se totalmente a presença de histamina no veneno, submetemos o mesmo à diálise em água com trocas feitas em 12 e 24 horas, (Dialysis sacks, 12.000

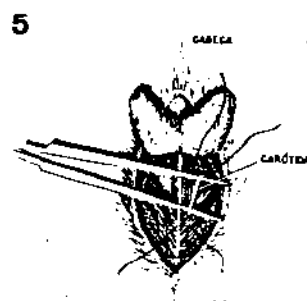
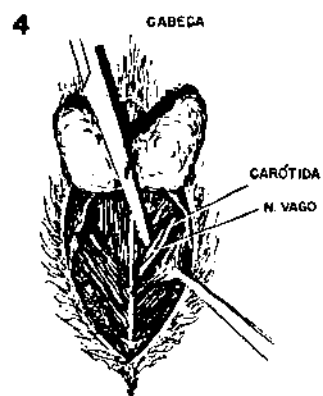
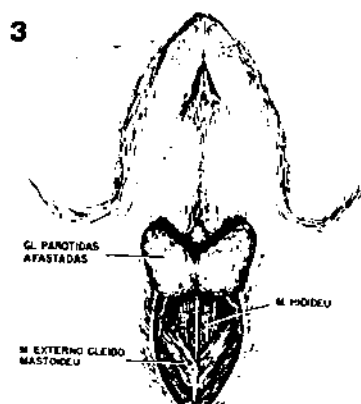
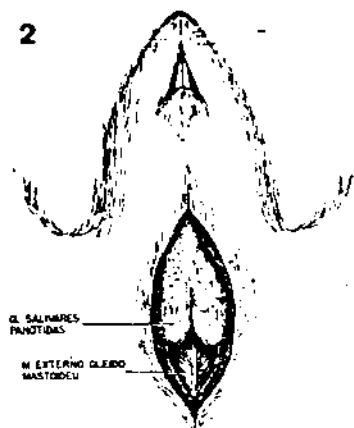
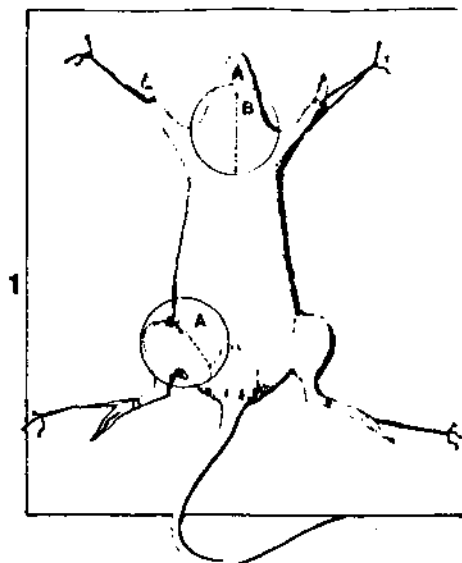


Figura 4- Técnica de CONDON para registro da pressão arterial, CONDON (1951)

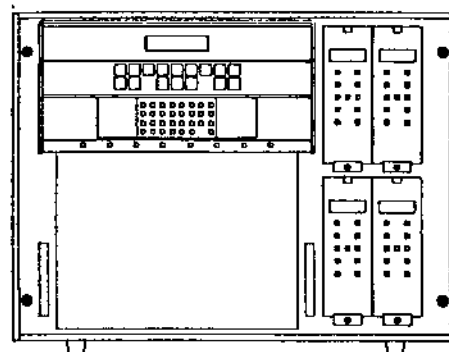
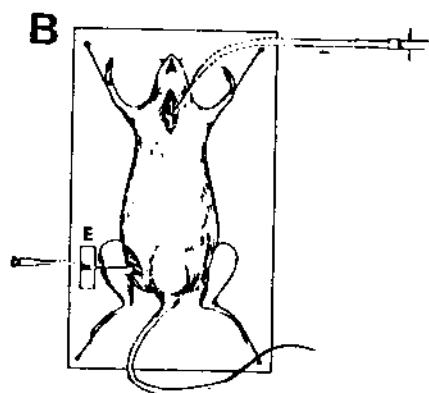
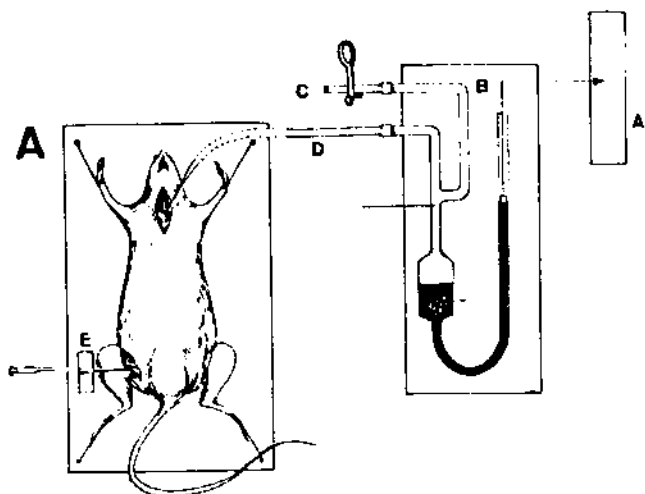


Figura 5- A= registro da pressão arterial em manômetro de mercúrio acoplado a um quimógrafo; B= registro em fisiógrafo, CONDON (1951)

SIGMA). O veneno dialisado foi injetado em ratos anestesiados, na dose de 800ug/kg.

4) AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GARROTE: Visando avaliar o efeito do garroteamento sobre a evolução dos efeitos observados na pressão arterial, foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando em média $300 \pm 10g$, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Os animais foram preparados de acordo com o método já descrito anteriormente (item 3). Após 15 minutos de estabilização da preparação, doses de 800ug/kg de peçonha foram administradas na pata esquerda do animal, sendo feito em seguida o garroteamento, com um cordão de linha, por um período de 30 minutos.

Após a retirada do garrote foram calculadas as porcentagens de queda na pressão arterial. Utilizamos o mesmo procedimento no grupo controle, constituído de animais aos quais se administrou salina 0.9% (0.2ml).

5) EFEITO DE ANTAGONISTAS FARMACOLÓGICOS SOBRE A HIPOTENSÃO INDUZIDA PELO VENENO DE *B.moojeni*: Para avaliar o efeito de substâncias antagônicas nas alterações pressórias (hipotensão) induzidas pelo veneno, os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

A) Sulfato de Celulose (1 ou 2 doses de 1mg/kg i.v) e posterior administração da peçonha de *B.moojeni* (800ug/kg, i.v ou i.m).

B) Mepiramina (1 ou 2 doses de 5mg/kg i.v), cimetidina (5mg/Kg i.v) e posterior administração da peçonha de *B. moojeni* (800ug/kg, i.v).

C) Atropina (1 ou 2 doses de 3mg/kg i.m e i.v) e posterior administração da peçonha de *B. moojeni* (800ug/kg, i.v ou i.m).

D) L-NAME (10mg/kg) previamente à administração da peçonha de *B. moojeni* (800ug/kg, i.v).

Após cada bateria de testes foram calculadas as porcentagens de queda e o tempo de recuperação da pressão arterial.

6) EFEITO DE ANTAGONISTAS SOBRE A HIPOTENSÃO REGISTRADA APÓS A LIBERAÇÃO DO GARROTE : Visando avaliar o efeito de antagonistas sobre as alterações pressóricas (hipotensão) observada logo em seguida à liberação do garrote, submetemos os animais aos seguintes tratamentos:

1) Pré-tratamento com sulfato de celulose (1mg/kg i.v) antes da retirada do garrote.

2) Pré-tratamento com atropina (3mg/kg i.m) antes da retirada do garrote.

RESULTADOS

1) TOXICIDADE: Camundongos injetados i.p. com a peçonha de *B. moojeni* (24 ug/Kg) foram observados durante o período de sobrevida para avaliação de seu estado geral. Dez minutos após a administração da peçonha, observou-se dificuldade nos movimentos e perda do tono muscular. Estes sinais mostraram-se evidentes quando os animais eram estimulados a se movimentarem. Após 24 horas, todos os animais mostraram-se recuperados.

Nas doses maiores (36-81ug/kg) observou-se, além da dificuldade nos movimentos, dificuldade respiratória (dispnéia), convulsões e morte, sendo que os sintomas mais graves começaram a se manifestar de 10 a 15 minutos após a administração da peçonha, guardando relação com a dose. Observou-se uma variação individual na recuperação.

Filtainhos injetados com a dose de 80ug/kg, no músculo peitoral esquerdo, apresentaram sintomas aos 30 minutos. Os animais permaneceram de cabeça baixa ("head drop"), com pequena dificuldade de movimentos e discreta hemorragiano local da injeção. Após 24 horas todos animais mostraram-se recuperados. Nas doses maiores (120 a 270ug/kg), os sintomas observados foram semelhantes, porém mais intensos. A hemorragia tornou-se proeminente, houve o aparecimento de paresia e alguns animais foram a óbito. Observou-se, também, uma variação individual na recuperação.

Os valores obtidos para a DL50 tanto em camundongo como em pintainho estão representados na Tabela 1.

2) PRESSÃO ARTERIAL: Nos experimentos visando a avaliação dos efeitos da peçonha de *B.moojeni* sobre a pressão arterial observou-se queda da mesma, que se manifestou logo após a injeção da peçonha, em todas as doses testadas (600ug/Kg, n=7; 700ug/Kg, n=10; 800ug/Kg, n=14). Na dose de 900 ug/Kg todos os animais foram a óbito devido ao intenso choque. Os resultados da ação da peçonha de *B. moojeni* na pressão arterial estão representados na Fig. 6.

A queda da pressão durou em média, 21 minutos, havendo uma recuperação em 74% dos animais.

Além disto, se após à recuperação da pressão arterial administrássemos outra dose de veneno, a hipotensão estava presente, na mesma intensidade da dose anterior (Fig.7). Com os testes utilizados, não houve diferença na intensidade da queda da pressão entre as doses de 600 e 700ug/kg, mas houve uma diferença significativa entre estas duas doses e a de 800ug/kg.

Os efeitos cardiovasculares do veneno dialisado não diferem daqueles obtidos com o veneno bruto (dose 800 ug/kg). Nos experimentos visando a avaliação do efeito do garroteamento observou-se a formação de edema local logo em seguida a aplicação do garrote. O efeito observado sobre a pressão arterial foi o de queda, logo após a liberação do garrote (Fig 8).

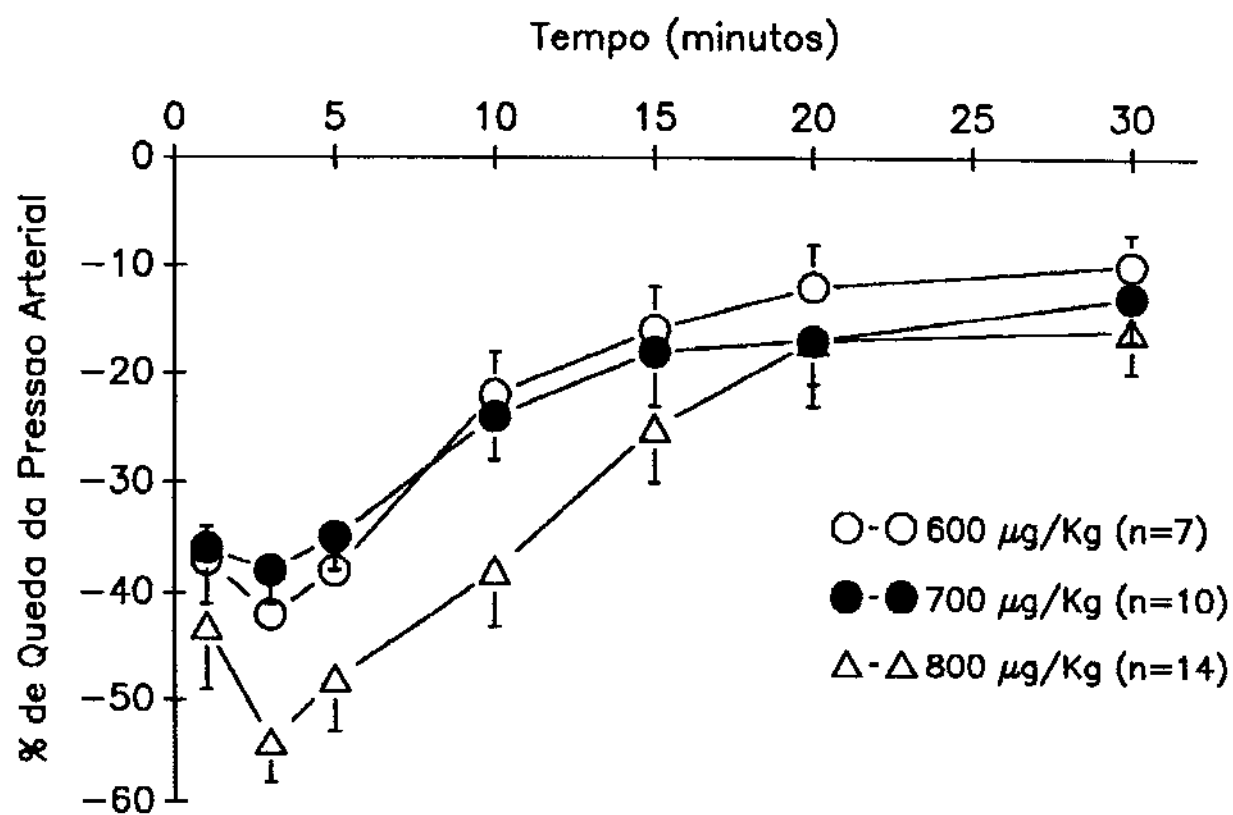


Figura 6- Efeito do veneno de *B. moojeni* sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. Animais tratados com veneno bruto nas doses de 600, 700 e 800µg/Kg (i.v). Os resultados representam a média $\pm$ EPM ($p < 0.05$).

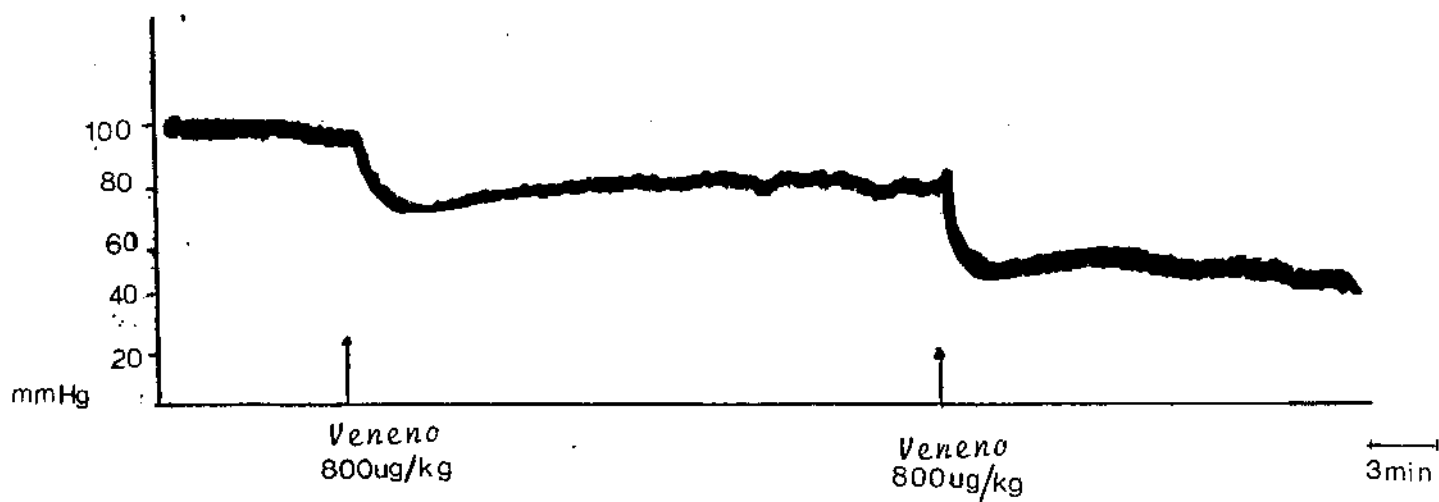


Figura 7- Efeito de doses repetidas do veneno de *B. moojeni* (800ug/Kg) sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. A figura corresponde a um registro típico (n=4).

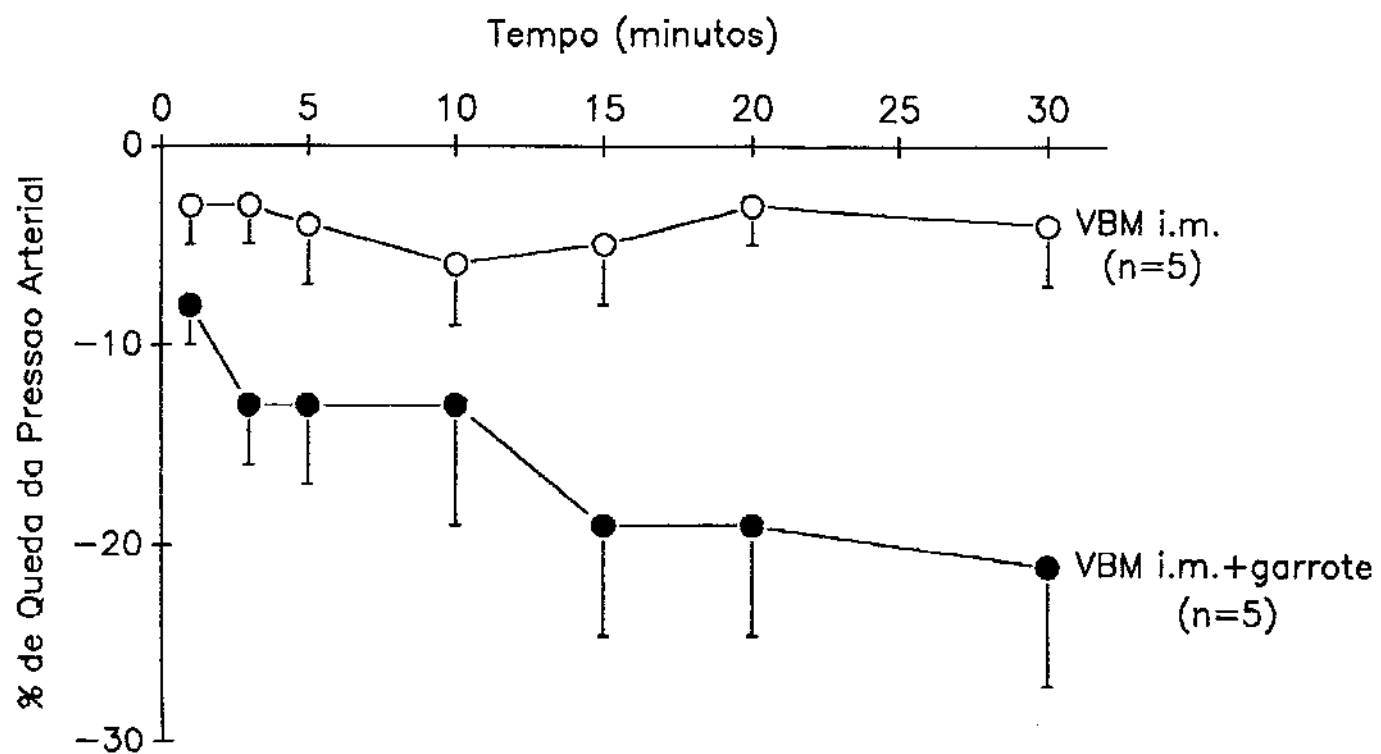


Figura 8- Efeito do garroteamento sobre a pressão arterial de ratos anestesados. Animais controle (n=5).

3) EFEITOS DE ANTAGONISTAS (I.V): Os animais pré-tratados com Sulfato de Celulose (1mg/kg dose única i.v.) apresentaram uma redução no tempo de recuperação na pressão arterial após administração do veneno de *B. moojeni* (800ug/kg i.v). Esta redução mostrou-se mais evidente quando os animais foram tratados com duas doses de Sulfato de Celulose (Fig 9).

Os pré tratamentos (i.v) com mepiramina, cimetidina, atropina ou L-NAME, não alteram o efeito hipotensor do veneno de *B. moojeni* (Figs 10 e 11).

EFEITO DE ANTAGONISTAS COM GARROTE : Os animais pré-tratados com sulfato de celulose(1mg/kg) logo após o veneno (800ug/kg i.m) exibiram 2 padrões de resposta; Quando foi feita a administração de dose única, a queda da pressão arterial foi semelhante a induzida pelo veneno. Com duas doses a proteção foi total ao longo do tempo (Fig 12).

O tratamento com atropina (3mg/kg i.m) imediatamente após o veneno (800 ug/kg i.m) reverteu completamente a hipotensão desencadeada pela liberação do garrote. A elevação discreta da pressão arterial pode ser observada na figura 13.

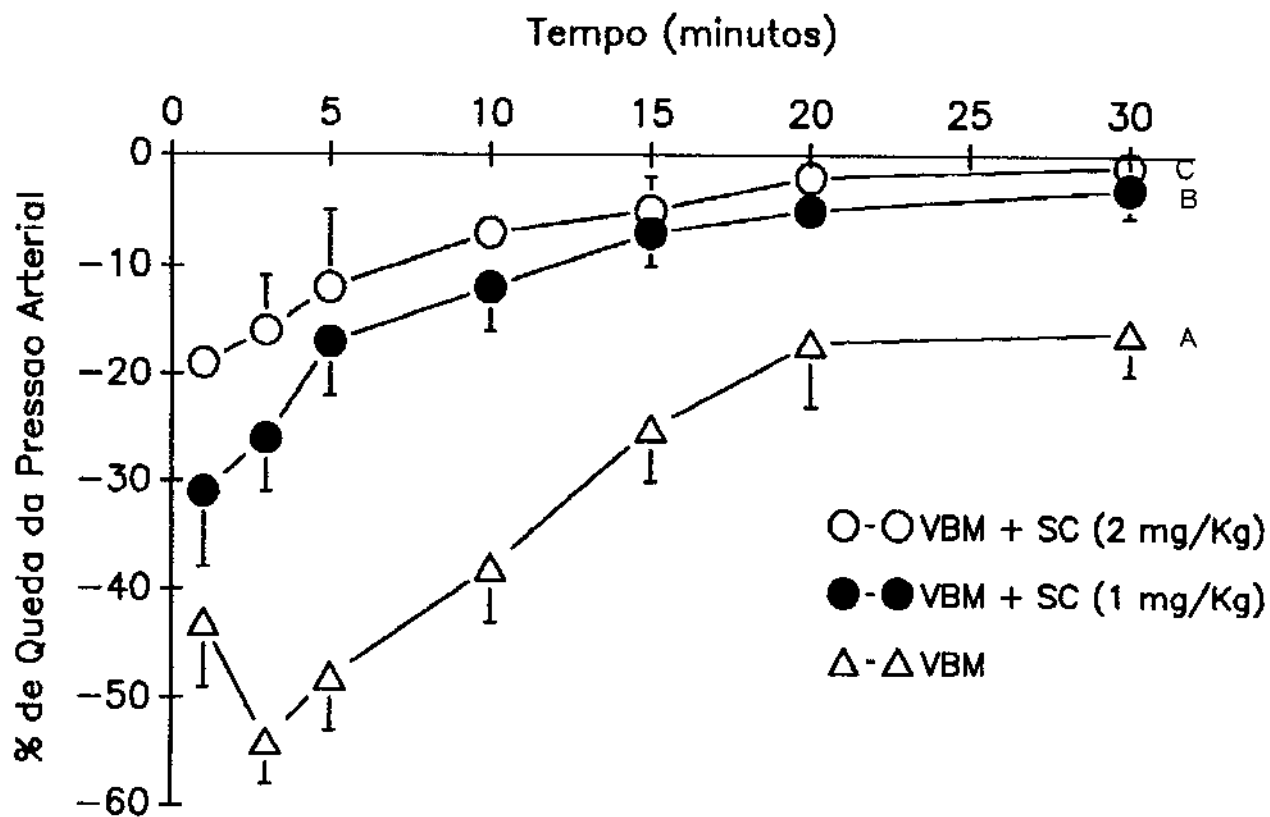


Figura 9- Efeito comparativo do tratamento com Sulfato de Celulose. A= veneno total (800ug/Kg i.v) B= Sulfato de Celulose(1mg/Kg dose única) C= Sulfato de Celulose (1mg/Kg duas doses). Os pontos representam a média $\pm$ EPM ($p < 0.05$).

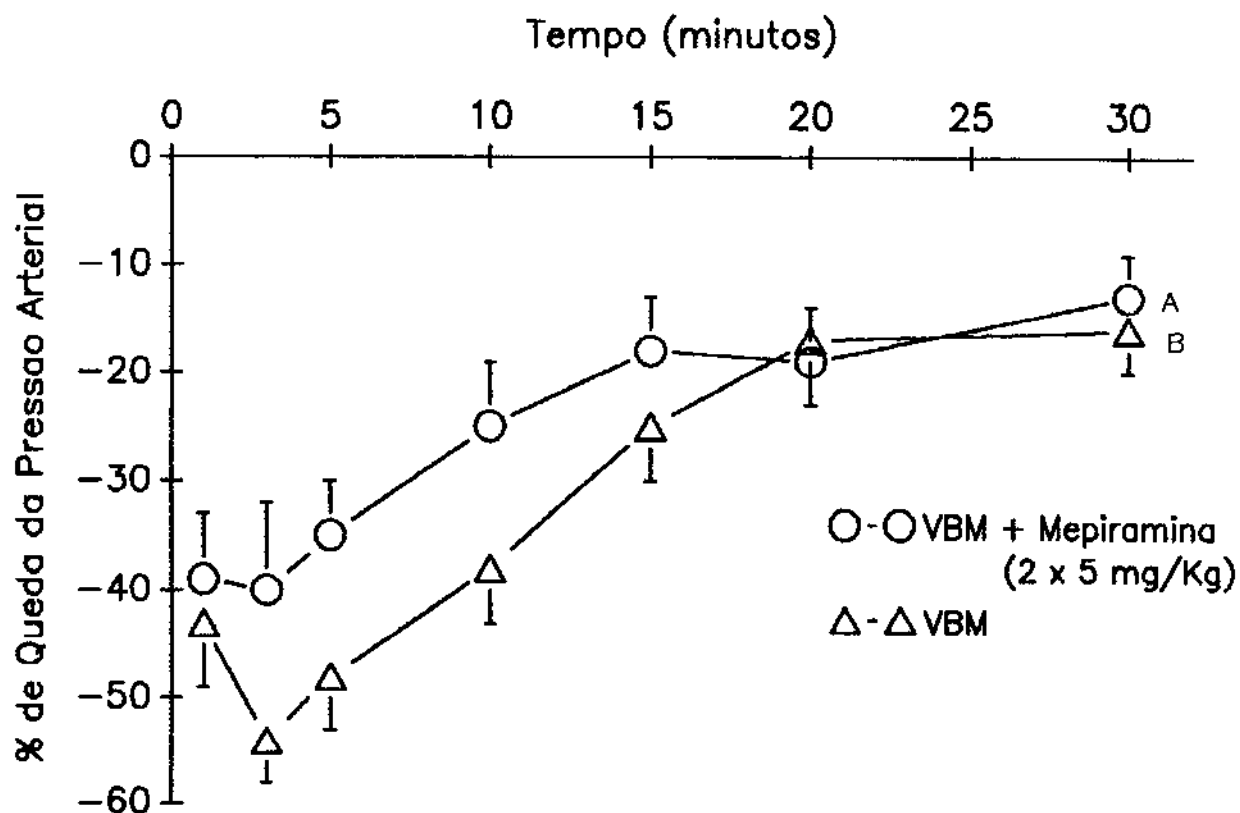


Figura 10- Efeito do veneno de *B. moojeni* (800ug/Kg) sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. A= animais tratados com mepiramina 5mg/Kg (duas doses i.v), B= veneno (800ug/Kg i.v). Os pontos representam a média $\pm$ EPM ($p < 0.05$).

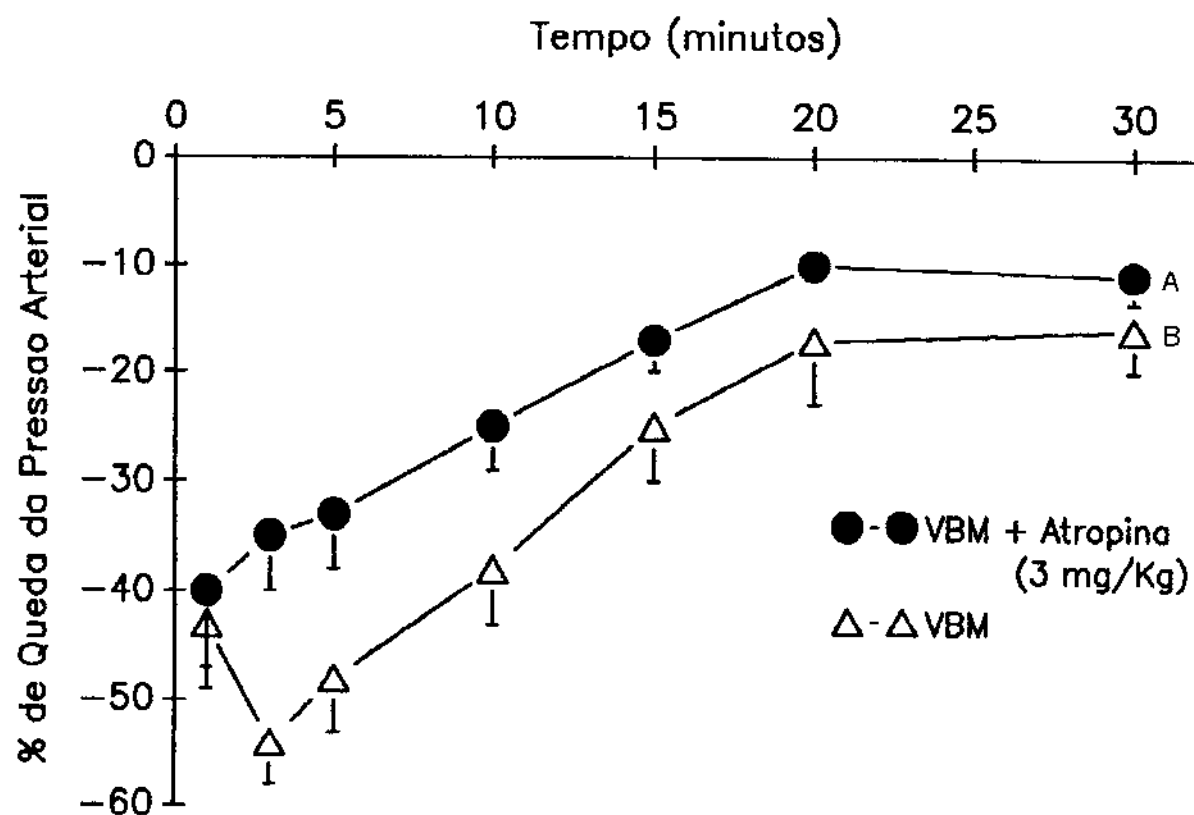


Figura 11- A= Efeito do tratamento com atropina (i.v) em ratos anestesiados, B= veneno (800ug/Kg i.v). Os pontos representam a média $\pm$ EPM (n=6 p < 0.05).

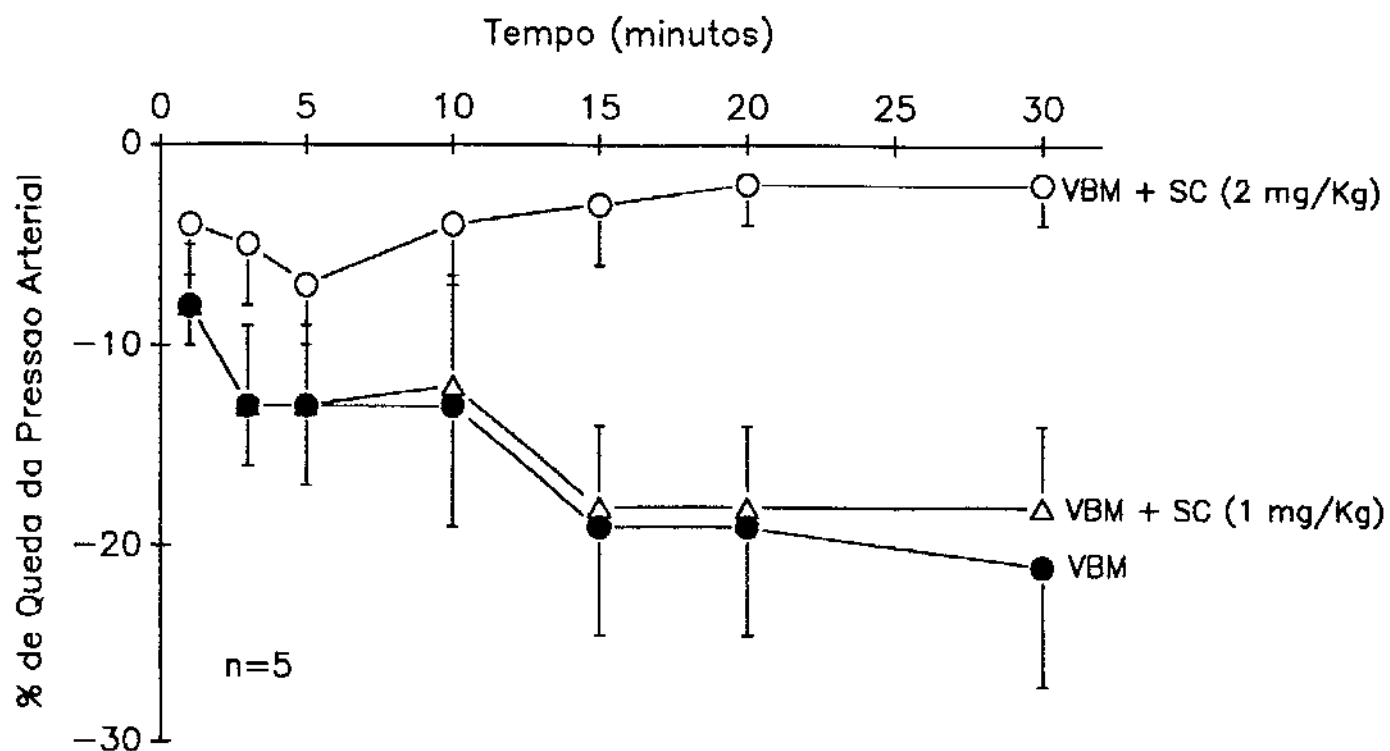


Figura 12- Efeito do garroteamento sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. A= *B. moojeni* 800ug/Kg i.m. . B= Sulfato de Celulose 1mg/Kg dose única, C= Sulfato de Celulose 1mg/Kg duas doses. Registro feito após a liberação do garrote. Os pontos representam a média $\pm$ EPM ($p < 0.05$).

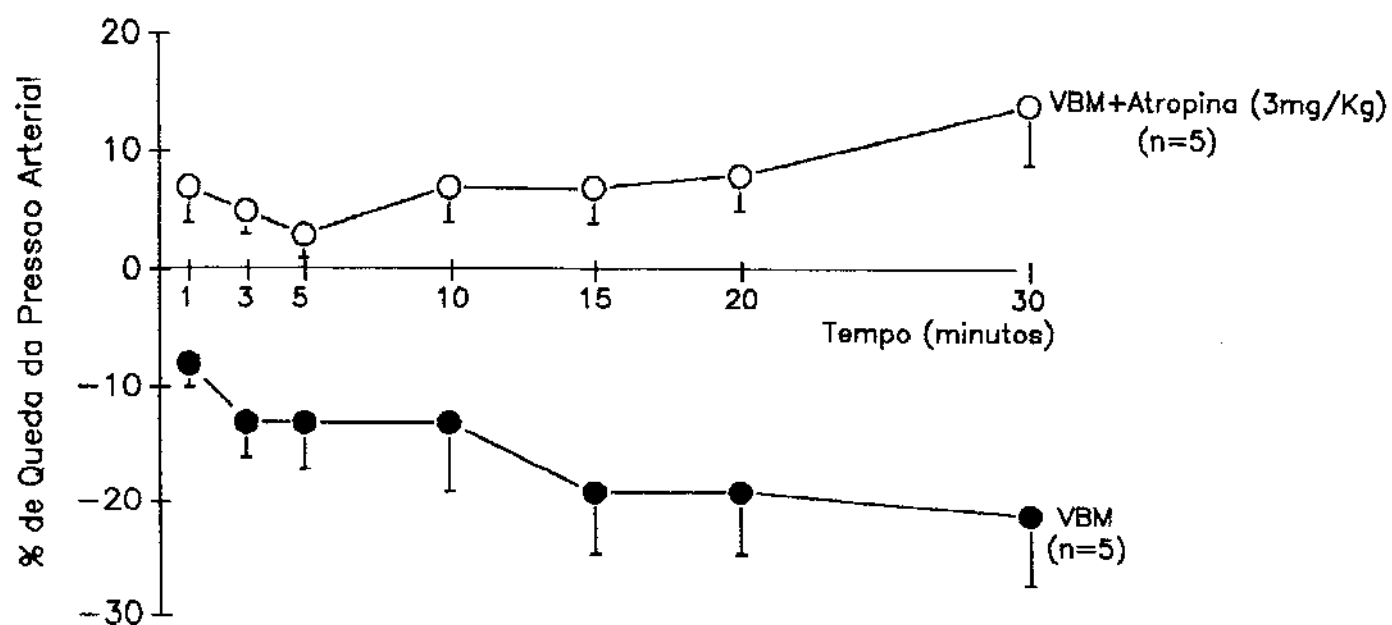


Figura 13- Efeito do veneno de *B. moojeni* (800ug/Kg i.m) sobre a pressão arterial de ratos anestesiados, que foram submetidos ao garroteamento e tratados com atropina (3mg/Kg i.m). Os pontos representam a média $\pm$ EPM (N=7 P < 0.05).

DISCUSSÃO:

Os resultados por nós obtidos nos ensaios de toxicidade em camundongos, $DL_{50} = 2,1$ (1,6-2,8) mg/Kg, foram diferentes daqueles descritos por Furtado em 1987, a qual, comparando venenos de animais jovens e adultos registrou para a DL_{50} de *B. moojeni* os valores de 3,7 (3,0 - 4,5) e 5,5 (4,5 - 6,8) mg/Kg, respectivamente.

Esta diferença poderia ser relacionada a idade dos animais: a afirmação de que venenos de serpentes jovens "apresentam maior atividade tóxica, diminuindo progressivamente de intensidade com o desenvolvimento das serpentes" (Furtado, 1987), encontra apoio em outros autores (Minton, 1967; Fiero et al, 1972; Theakston & Reid, 1978; Gutiérrez et al, 1980; Meier & Freyvogel, 1980; Meier, 1983; Lomonte et al, 1983). Entretanto, considerando-se que o pool de veneno por nós utilizado foi obtido de serpentes adultas, este fator não é suficiente para esclarecer a diferença por nós encontrada.

Outros argumentos para justificar as diferenças entre as DL_{50} devem ser abordadas, tais como, número de animais e distribuição geográfica. As diferenças de variações individuais de sensibilidade são sempre lembradas quando se trabalha com um pequeno número de animais. Schotter (1951a, 1951b, 1951c, 1952, 1954, 1955, 1955/56, 1958) tentando diminuir este erro, aumentou o número de animais em experimentação, concluindo pela irrelevância deste fator.

Como o número de animais utilizados foi igual, em ambos os protocolos, este fator também não explica a diferença encontrada.

O aparecimento de diferenças regionais traduzidas pela elaboração de peçonha mais eficiente poderia explicar a diversidade dos resultados.

Em nosso estudo, utilizamos a peçonha de dois exemplares de *B. moojeni* procedentes de Mato Grosso do Sul, região de Três Lagoas. Embora estes animais já fossem adultos quando de sua captura, a toxicidade de sua peçonha é maior do que a dos exemplares jovens de Itumbiara, Goiás (Furtado, 1987).

Devemos lembrar aqui o "espraeamento" da espécie *B. moojeni*: de fato, regiões paulistas em que não eram encontradas habitualmente, passaram a contar com mais este problema devido à vários fatores, tais como inundações de áreas para implantação de represas, rodízio de culturas, invasão de nichos ecológicos por queimadas e criação de gado etc.

A maior potência do veneno de animais provenientes de Mato Grosso em relação aqueles de Goiás, poderia estar relacionada à quantidade de moojeni protease "A" (Assakura et al, 1985 e Rodrigues Simioni, 1990) que se encontra presente. À nosso ver, esta toxina poderia ser responsabilizada pela sintomatologia apresentada pelos pintainhos: head drop, paresia, paralisia, convulsões e

morte. Tais efeitos estariam relacionados ao comprometimento da junção neuromuscular (Brazil, 1982 b).

A resposta hipotensora à administração do veneno de *B. moojeni* é monofásica. Os resultados por nós obtidos muito se assemelham aos descritos por Vellard & Huidoro (1912), que relataram "choque" circulatório precedido por perturbações respiratórias para serpentes do gênero *Bothrops*. Entretanto, diferem dos resultados obtidos por Zappellini (1991), a qual, trabalhando com peçonha de *B. erythromelas* relatou "choque" determinado por dois componentes distintos.

Em testes preliminares (Franco Andrade & Prado-Franceschi, 1992) detectamos inibição parcial por anti-histamínicos, sugerindo que a hipotensão poderia estar ligada à liberação de histamina ou então à presença deste autacóide no veneno de *B. moojeni*. No presente trabalho demonstramos que isto não deve estar ocorrendo. Primeiro, porque a queda na pressão arterial observada com veneno dialisado foi semelhante aquela observada com veneno bruto, excluindo a participação de histamina livre. Segundo, porque o uso de antagonistas de histamina mostrou-se inefetivo.

Sabe-se hoje que a vasodilatação, pode ser resultante de vários mecanismos: a) interação do agente vasodilatador com o endotélio causando liberação de EDRF (NO) o qual eleva o GMPc; b) liberação de EDHF (Endothelium-derived hyperpolarizing factor) com hiperpolarização resultante da abertura de canais de potássio; c) bloqueio dos canais de

cálcio; d) aumento do AMPc (prostaciclina). Em 1980, Furchgott & Zawadski, relacionaram os efeitos vasodilatadores da Ach à liberação do EDRF. Recentemente Edwards and Weston (1980), sugeriram que a ocupação dos receptores muscarínicos levaria também à liberação de EDHF, pois este efeito foi parcialmente antagonizado pela glibenclamida, inibidor específico do canal de K⁺ (sensível ao ATP).

Em relação aos efeitos vasodilatadores de venenos ofídicos estamos ainda na fase inicial, tentando identificar os mediadores envolvidos. Normalmente iniciamos o estudo com utilização de antagonistas clássicos, disponíveis em nosso laboratório e sulfato de celulose que inibe a liberação de cininas por depleção do cininogênio (Rothschild, 1968). Rothschild & Almeida (1969) e Zappellini (1991), utilizando peçonha de *B. jararaca* e *B. erythromelas*, respectivamente, observaram proteção do efeito hipotensor de venenos pelo sulfato de celulose, sugerindo a participação da bradicinina neste processo. Os resultados por nós obtidos, nos levarão em próxima etapa, ao estudo de antagonistas específicos de BK. Em avaliação preliminar com HOE-140, antagonista específico dos receptores de BK-subtipo B2 (dados não incluídos), verificamos que embora o efeito hipotensor da bradicinina seja inibido, o do veneno continua presente, levando os animais à morte.

A aparente discrepância entre a proteção total pelo sulfato de celulose e a ausência de antagonismo pelo HOE-140

poderia estar relacionada à quantidade de BK liberada pela dose por nós utilizada.

A influência do garrote nos efeitos observados sobre pressão arterial foi acentuada. De fato, se administrássemos o veneno por via intramuscular e observássemos o seu efeito sobre a pressão arterial, esta se mantinha. Entretanto, com a retirada do garrote (30 minutos após a inoculação do veneno) há uma hipotensão evidente. A proteção pelo Sulfato de Celulose mais efetiva nesta situação sugere que a presença do garrote, permitindo maior concentração tecidual do veneno com o desenvolvimento de reação inflamatória (ausente no modelo i.v) permita a liberação maciça de cininas.

O pré-tratamento com atropina antes da liberação do garrote, abolindo o efeito hipotensor, merece a nosso ver, futuras investigações.

RESUMO

Serpentes da espécie *B. moojeni*, conhecidas popularmente como "caigaca", apesar de medirem cerca de 1.50m, são capazes de fornecer até 300mg de veneno por extração, podendo por este motivo causar acidentes graves. Na região Noroeste do estado de São Paulo (região de São José do Rio Preto), chegam a 90% dos casos registrados.

O quadro clínico do acidentado revela dor e edema em 100% dos casos, com tempo de coagulação prolongado/incogulável, em 72,7% e hemorragias sistêmicas em 5,8% dos casos. No presente trabalho utilizamos veneno de serpentes procedentes do Estado de Mato Grosso do Sul (região de Três Lagoas). Inicialmente realizamos estudos de toxicidade aguda determinando que o veneno por nós utilizado é mais tóxico do que o de outras regiões, usado por outros autores.

Na pressão arterial de ratos anestesiados, observamos uma queda rápida na pressão, que se mostrou monofásica e dose dependente, sem taquifilaxia. O sulfato de celulose confere uma proteção contra a queda na pressão arterial.

Quando submetemos o veneno à diálise, a ausência de taquifilaxia se manteve, afastando a hipótese de histamina livre no veneno.

Nos estudos visando à avaliação do efeito do garroteamento, os resultados por nós observados comprovam

dados da literatura e do Ministério da Saúde sobre o efeito nocivo desse ato.

Estudos realizados com emprego prévio de agentes antagonistas, demonstraram que a atropina injetada pela via i.m minutos antes da retirada do garrote, parece conferir uma certa proteção aos animais contra o efeito hipotensor, observado após a retirada do mesmo. Este mecanismo deverá merecer um estudo posterior.

CONCLUSÕES

- 1 - A toxicidade da peçonha de *B. moojeni* mostrou-se semelhante nos estudos em mamíferos (camundongos) e aves (pintainhos), diferenciando-se dos efeitos da peçonha de *B. jararaca* (maior toxicidade em camundongos) e de *B. insularis* (maior toxicidade em pintainhos).
- 2 - Diferenças regionais interferem na toxicidade da peçonha de *B. moojeni*.
- 3 - Em ratos anestesiados, a peçonha de *B. moojeni* i.v determinou uma queda na pressão arterial abrupta, de curta duração, dose dependente e não taquifilática.
- 4 - O fato de o veneno dialisado exercer os mesmos efeitos na pressão arterial, descarta a participação de histamina livre na hipotensão, sugerindo efeito direto do veneno, ou a liberação de componentes diferentes da histamina.

- 5 - O pré tratamento com sulfato de celulose confere proteção contra hipotensão induzida pelo veneno bruto, sugerindo a participação de cininas.
- 6 - A influência do garroteamento na pressão arterial foi notável, pois a leve hipotensão observada com a administração i.m do veneno, é significativamente potencializada após a retirada do garrote.
- 7 - As alterações pressóricas observadas após a liberação do garrote foram abolidas com o uso de atropina antes da liberação do mesmo.

SUMMARY

Bothrops moojeni (Hoge, 1966), popularly known by the Tupi-Guarani Indian name of "caiçaca" meaning "something that burns", is a widely distributed venomous snake species found in the state of São Paulo and in neighboring regions.

Envenomation by *B. moojeni* leads to both to local reactions including hemorrhage and systemic reactions involving altered coagulation parameters and elevated serum urea levels without any renal insufficiency.

In the present work, the lethal toxicity and systemic effects of *B. moojeni* venom collected from snakes originating near the city of Três Lagoas in the state of Mato Grosso do Sul, were studied in mice, chicks and rats.

Ten minutes after intramuscular injection of venom at a dose of 24 μ g/Kg, mice experienced difficulty in locomotion and some loss of muscle tone but recovered after 24 hours. At higher venom doses, dyspnea and convulsions were common. Chicks injected with 80 μ g/Kg of venom exhibited slight hemorrhage at site of injection. Similar but more pronounced symptoms were observed at doses of 180 and 270mg/Kg. The i.m LD₅₀ for this venom were 2.8mg/Kg and 2.9mg/Kg i.m chick and mice respectively. When injected intravenously in anesthetized rats at doses up to 800 μ g/Kg, the venom caused a rapid, monophasic fall in blood pressure which lasted an average of 21 minutes. In 74% of the animals, was

subsequently a recovery in the blood pressure to near normal (pré-venom) levels. Venom doses greater than 800ug/Kg led to death in all animals (n=6) as a result of intense shock. Consecutive injections of the lower venom doses consistently reproduced the hypotensive crises, indicating that there was no tachyphylaxis in this response.

Part of the venom induced-hypotension may be caused by the release of histamine since in the presence of mepyramine and cimetidine the degree of hypotension was less.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

- ABBATIUS, BALDUS ANGELUS. (1603) De admirabili viperae natura, et de mirificis ejusdem facultatibus liber. Urbini, apud B. Ragusium.
- AMARAL, A. D. (1931) Pontos de vista básicos na terapêutica do ofidismo. *Mem. Inst. Butantan* 6, 243.
- ASSAKURA, M. T, REICHIL, A. P, ASPERTI, M. C. A, MANDEL-BAUM, F. R, (1985) Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. *Toxicon* 23, 691-706.
- BRAZIL, V. (1911). *La défense contre l'ophidisme*. 2 ed. São Paulo, Pocar & Weiss.
- BRAZIL, O. V. (1982 a) - Peçonhas in *FARMACODINÂMICA*. 6 ed Corbett. C. E. ed RIO DE JANEIRO, GUANABARA KOOGAN. Cap.71 p.1044-1074.
- BRAZIL, O. V. (1982 b) - Farmacologia da Junção Neuromuscular in *FARMACODINÂMICA*. 6 ed Corbett. C. E. ed RIO DE JANEIRO GUANABARA KOOGAN. Cap.10 p. 128-149.
- CARLINI, E. A and A. JURKIEWICZ, (1966) Hypotensive response to intravenous injection of distilled water in the rat. *Arch. int Pharmacodyn.* 159, 317-327.
- CONDON, N.E. (1951) A modification of the conventional mercury manometer for blood pressure recordings. *Brit J. Pharmacol.* 6, 19.
- DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R (1955) Some proteolytic activity of snake venoms. *J Biol. Chem.* 216, 17.
- FERREIRA, S.H. (1965) A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in venom of *Bothrops jararaca*. *Brit. J. Pharmacol.* 24, 163-169.

- FIERRO, M.K., SEIFERT, M.W., WEAVER, T.J., BONILA, C.A. (1972) Comparative study of juvenil and adult prairie rattlesnake (*Crotalus v. viridis*) venoms. *Toxicon*, 10, 91-82.
- FRANCO ANDRADE, A.L.F., PRADO FRANCESCHI, J.P. (1992) Estudos dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops moojeni* (caçaca) em ratos. in *VII reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental FESBE*, 26-29, Caxambú, M.G.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288, 373-376.
- FURLANETO, R.S., ROSA, R. R, SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F. (1973b). Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos bothrópicos inoculados por via venosa em camundongos *MUS musculus* (Linnaeus, 1758). II possibilidade de determinação da DL50 através de inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. *Hems. Inst. Butantan*, 37, 109-122.
- FURTADO, M.F.D. (1987). -Contribuição ao estudo de *B. moojeni* (Hoge, 1965). (Serpentes, viperidae, crotalinae), em função da idade das serpentes. Tese de doutoramento na UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO *INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS*.
- GUTIÉRREZ, J.M, LOMONTE, B. (1989) Local Tissue Damage Induced by Botrops Snake Venoms. *Hems. Inst. Butantan*, 51(4), 221-223.
- GUTIÉRREZ, J.M, CHAVES, F., BOLANOS, R. (1980) Estudo comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revta Biol. trop*, 28, 341-346.
- HOGUE, A.R. (1966). Preliminary Account on Neotropical Crotalinae (Serpentes, viperidae) *Hems. Inst. Butantan*, 32, 109-184.
- HOGUE, A.R. & FEDERSONI, J.P.A. (1976/77). - Observação sobre uma ninhada de *B. atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Hems. Inst. Butantan*, 40/41, 19-36.

HOGG, A. R., ROMANO, S. A., (1972). Sinopse das serpentes peçonhentas do BRASIL. *Hems. Inst. Butantan*, 36, 109-208

KOUYOUMDJIAN, J. A., POLIZELLI, C., FONSECA, F., FARES, G. F., NAKAOSKI, M. P., KOUYOUMDJIAN, N. C. V. (1987). Acidentes ofídicos causados por *B. moojenii* na região de SÃO JOSÉ DO RIO PRETO : correlação do quadro clínico com o tamanho das serpentes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 20, 53.

KOUYOUMDJIAN, J. A., POLIZELLI, C., (1988). Acidentes ofídicos causados por *B. moojenii* Relato de 37 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 30 (6); 424-432.

LOMONTE, B., GENE, J. A., GUTIÉRREZ, J. M., CERDAS, L., (1983) Estudio comparativo de los venenos de serpentes (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon*, 21, 379-394.

MEIER, J. (1983). Beitrag zur Kenntnis des giftes der sudamerikanischer anzenotter *Bothrops atrox* l. (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). Inauguraldissertation. Universität Basel, Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät. 109p.

MEIER, J. FREYVOGEL, T. A. (1990) Comparative studies on venoms of the fer-de lance (*Bothrops Atrox*), carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricollis*) snake at different ages. *Toxicon*, 18, 661-662.

MINTON, S. A. (1967). Observations on toxicity and antigenic makeup of venoms from juvenile snakes. in: Animal toxins. Russel, f. e & saunders, P. R. *EDS Oxford, pergamon press*, 211-222.

MINISTÉRIO DA SAÚDE FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (1991) Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. *Ed. rev. Brasília*.

Redi, Francesco (1664) Osservazione intorno alle viper. Firenze: insegna della Stella.

- ROCHA & SILVA, M. & BERALDO, W.T.(1949) Um novo princípio auto-farmacológico (bradicinina) liberado do plasma sob a ação de venenos de cobra e da tripsina. *Ciência e Cultura*, 1(1-2), 32-35.
- ROSENFELD, G (1971) Syntomatology, pathology and treatment of snake bites in south America.in Bucherl, W. & Buckley, E. Venemous Animals and their Venoms. *New York. Academic Press.*
- ROSENFELD, G (1972) Animais peçonhentos e tóxicos do Brasil. in LACAZ, C. S. Introdução à geografia médica do Brasil. São Paulo, *EDUSP.*
- ROTHSCHILD, A. M. & ALMEIDA, J.A.(1969) Emprego do sulfato de celulose e heparina para investigar a participação de bradicinina no efeito letal de B. jararaca no rato. *Rev. Bras. de pesquisas Méd. Biol.* 2(3), 163-166.
- ROTHSCHILD, A .M. & ROTHSCCHILD, D. Z .(1979) Liberation of pharmacologically active substances by snake venom. in LEE, C.Y. *Snake Venoms*, Springer-Verlag, Berlin, p. 519-628.
- ROTHSCHILD, A.M (1968) Some pharmacodynamic, properties of cellulose sulphate, a kininogen-depleting agent in the rat. *Br. J Pharmac. Chemother.* 33, 501-502.
- SERRANO, S. M. T, MATOS, M. F. C., MANDELBAUM, F. R, and SAMPAIO, C. A. M. (1993) Basic proteinases from Bothrops moojeni (caiçaca) venom I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic sbstrates and on platelet aggregation. *Toxicon*, 31, 417-481.
- SCHOTTLER,W.H.A.,(1951) Toxicity of Principal Snake Venoms of BRAZIL. *J. Med. Trop*,31;489-498.
- SINIONI, L. R , COGO , J. C , ASSAKURA. M. T , MANDELBAUM, R.F (1990) Muscular -blocking activity of Bothrops moojeni venom and its active fractions. *I Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia "Peçonhas e envenenamento no Brasil*, p.p 32.

- SUNG, C. P., ARLETH, A., SHIKANO, K, BERKOWITZ, B. (1988) Characterization and function of bradykinin receptors in vascular endothelium cells. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 247 (1), 8-13.
- THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. (1978) Changes in the biological properties of venom from *Crotalus atrox* with ageing. *Period. biol.*, 80, 123-133.
- VELLARD, J., HUIDOBRO, F, (1900-1912) Accion comparada de diversos venenos dos ofidios sobre la presión arterial. *Mems. Inf. Butantan*, 72-80.
- VILLARDEL, S. M, FURLANETO, R.S, ZELANTE, F, ROSA, R.R (1973) Localização do fator coagulante no espectroforético do veneno de *B. moojeni*. *Mems. Inst. Butantan*, 37, 91-97.
- WEIL, C.S., (1953) Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD50 or ED50) and instructions for their use. *Biometrics*, 249-263.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981) Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms, *WHO Publication* 58, Geneva, WHO.
- ZAPPELLINI, A. (1991) Estudo Bioquímico e Farmacológico da Peçonha de *B. erythromelas*. Tese de mestrado na UNIVERSIDADE DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS F.C.M
- ZINGALI, R.B., FRANCISCHETTI, I.M., CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J. A. (1988). Biochemical and Farmacologic Screening of Snake (Bothrops) Venoms Characterization of Componentes Acting on Blood Coagulation and Platelet Aggregation. *Brazilian J. Med. Biol.* 21, 763-765.